



Inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR : conception, synthèse et études structurales de peptides et peptidomimétiques mimes de structures secondaires

Lei Wang

► To cite this version:

Lei Wang. Inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR : conception, synthèse et études structurales de peptides et peptidomimétiques mimes de structures secondaires. Chimie organique. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB158 . tel-04476179

HAL Id: tel-04476179

<https://theses.hal.science/tel-04476179>

Submitted on 24 Feb 2024

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.

UNIVERSITE PARIS DECARTES

FACULTE DE PHAMACIE DE PARIS

ECOLE DOCTORALE 563

« MEDICAMENT, TOXICOLOGIE, CHIMIE, IMAGERIES »

Thèse de doctorat de l'Université Paris Descartes

Spécialité : Pharmacochimie

Présenté par Lei WANG

**Inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR :
Conception, synthèse et études structurales de peptides
et peptidomimétiques mimes de structures secondaires**

Thèse effectuée sous la direction du Pr. Michel VIDAL

Soutenue le 24 Novembre 2016

Membres du jury :

M. le Professeur	Vincent LISOWSKI	Rapporteur
M. le Professeur	Jean-Daniel BRION	Rapporteur
M. le Docteur	François CLERC	Examineur
Mme. le Docteur	Wang-Qing LIU	Examinatrice
M. le Docteur	Sylvain BROUSSY	Examineur
M. le Professeur	Michel VIDAL	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier profondément le Pr. Michel Vidal qui m'a chaleureusement accueilli dans son équipe « Hétérocycles et peptides : approche ciblée, cancer et angiogenèse » au sein du laboratoire de « Chimie Organique Médicinale Extractive et Toxicologie Expérimentale », UMR8638, dans la Faculté de Pharmacie de Paris à l'Université Paris Descartes. Je le remercie pour la gentillesse, la direction de cette thèse et les discussions sur les résultats ainsi que l'autonomie qu'il m'a offerte pour que je puisse travailler sur deux sujets pendant ces trois années.

Je remercie sincèrement l'ensemble des membres du jury, le Pr. Vincent Lisowski, le Pr. Jean-Daniel Brion, rapporteurs de cette thèse, ainsi que le Dr. François Clerc qui a accepté de lire et évaluer ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier énormément Wang-Qing Liu qui a co-dirigé le projet d'antagonistes du VEGFR, en particulier tout l'aspect de la conception et la synthèse de molécules. Merci pour ton aide, ta disponibilité, ta passion de la recherche et tous tes conseils sur les manips et les rédactions ainsi que les nombreuses expériences que tu as réalisé toi-même afin d'avancer ces travaux rapidement.

Je remercie très sincèrement Sylvain Broussy qui a dirigé le projet de macrocycle. Merci pour ta bonne humeur, ta disponibilité et ta rigueur scientifique. Un grand merci pour tous tes conseils et toutes les discussions sur les résultats et les difficultés des deux sujets. Merci aussi pour des nombreuses manips que tu as réalisées et la formation de plusieurs méthodologies, RMN, CD, modélisation, etc.

Je remercie également à Nathalie Gagey-Eilstein qui était ma directrice de mon premier stage en France. Merci à ta très bonne humeur, ta gentillesse et disponibilité. Merci sincèrement pour la formation de tous les tests biologiques, ELISA, MTT et « Wound healing ».

Un grand merci à Florent Huguenot pour ta présence, ta bonne humeur, tes conseils ainsi que le transfert d'articles plus récents et plus intéressants.

Ces travaux ont été effectués avec de nombreux collaborateurs. Je remercie tout d'abord Serge Bouaziz et Pascale Coric du « Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques », UMR 8015, pour les études de RMN, les discussions et aussi pour m'avoir donné accès à l'appareil de dichroïsme circulaire. Je remercie aussi l'équipe du Pr. Lili Ji « Shanghai Key Laboratory of Complex Prescription and The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica » pour le test de la formation de microtubules dans des cellules HUVE. Merci

aussi à l'équipe de Pr. D'Andrea « Istituto di Biostrutture e Bioimmagini » pour nous avoir fourni du VEGFR1 D2 ¹⁵N.

Je remercie très chaleureusement tous les autres membres, actuels et passés, du laboratoire qui étaient présent au fil de ces trois années. Je remercie particulièrement Marie, l'ancienne co-thésarde au laboratoire pour sa gentillesse et tous les bons moments passés ensemble pendant une année commune et aussi les périodes où j'étais présent en stage. Merci à Laura, notre nouvelle post-doc, pour sa bonne humeur et ses discussions.

Merci à Elise Prost pour la formation d'utilisation RMN, à Pascale Leproux pour l'analyse de spectrométrie de masse, à Sylvie Gillet pour la formation d'utilisation du MALDI-TOF, l'équipe du Pr. Olivier Laprèvote m'avoir donné accès à l'appareil MALDI-TOF. Merci aussi à l'équipe du Pr. Philippe Belmont (Etienne, Dorienne) et l'équipe du Pr. Sylviane Giorgi-Renault (Stéphanie, Philippe, Alexis) pour de nombreuses réunions d'équipe et des discussions.

Merci également à tous les stagiaires qui sont passé au laboratoire, particulièrement à Clémence, Oscar et Julie qui ont participé à faire avancer ces travaux.

Un énorme merci à ma famille et mes amis pour leur soutien permanent. Un très grand merci à mes parents pour me permettre de venir et étudier en France pendant tous ces années (depuis 2009 !). Merci à ma petite sœur, Feiyan, pour toujours accompagner papa et maman en Espagne. Un grand merci à la famille de ma tante, pour leur soutien permanent et m'avoir hébergé pendant cette longue période. Merci aux deux petits, mon cousin et ma cousine, Louis et Christine, pour des sorties, des visites et des voyages ensemble.

Enfin, merci au China Scholarship Council (CSC) pour m'avoir financé pendant ces trois ans de thèse et les personnes du Service de l'Education de l'Ambassade de la Chine en France qui m'ont aidé.

Table des matières

Table des matières	1
Liste des Abréviations	5
Chapitre 1 : Introduction	7
I. Cancer et angiogenèse.....	7
1.1 Cancer et thérapies actuelles	7
1.1.1 La maladie cancer	7
1.1.2 Les causes de cancer	8
1.1.3 Les traitements antitumoraux	9
1.2 Le rôle de l'angiogenèse dans le développement du cancer et la thérapie anti-angiogénique.....	12
1.2.1 L'angiogenèse	12
1.2.2 L'angiogenèse tumorale	13
1.2.3 Les facteurs et les récepteurs impliqués dans l'angiogenèse tumorale	14
1.2.4 L'approche anti-angiogénique pour le cancer.....	16
II. Interactions protéine-protéine (PPI) et inhibiteurs	18
2.1 Les protéines et les interactions protéine-protéine	18
2.1.1 Les protéines et leurs fonctions biologiques	18
2.1.2 Interactions protéine-protéine (PPI)	20
2.2 Inhibiteurs des interactions protéine-protéine	22
2.2.1 Généralités	22
2.2.2 Différents types d'inhibiteurs des PPI.....	23
2.3 Développement d'inhibiteurs peptidiques et peptidomimétiques d'PPI ...	25
2.3.1 Inhibiteurs peptidiques d'PPIs	25
2.3.2 Stratégies pour stabiliser la structure secondaire des inhibiteurs peptidiques	27
III. Développement d'inhibiteurs peptidiques de l'interaction VEGF/VEGFR	34
3.1 Le système VEGF/VEGFR.....	34
3.1.1 L'interaction VEGF/VEGFR et l'angiogenèse.....	34
3.1.2 Interaction VEGF/VEGFR1	36
3.2 Conception rationnelle d'inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR	38
3.2.1 Inhibiteurs peptidiques ciblant le VEGF	38
3.2.2 Inhibiteurs peptidiques ciblant le VEGFR.....	38
IV. Objectifs de la thèse.....	40
Chapitre 2 : Techniques de conception, synthèse et évaluation d'inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR	41
I. Conception rationnelle de nouveaux inhibiteurs VEGF/VEGFR	41
1.1 Observation du site d'interaction du VEGF/VEGFR	41
1.2 Conception d'inhibiteurs peptidiques à partir du complexe protéique	43

II.	Synthèse d'inhibiteurs peptidiques	45
2.1	Synthèse de peptides en phase solide (SPPS).....	45
2.2	SPPS avec le Synthétiseur Liberty 1	49
III.	Étude structurale des peptides	51
3.1	Dichroïsme circulaire (CD)	51
3.2	Résonance magnétique nucléaire (RMN)	53
3.3	Modélisation moléculaire	55
IV.	Évaluation biologique.....	56
4.1	Test de type ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	56
4.2	Test de formation de microtubule.....	58
Chapitre 3 : Conception, synthèse et évaluation d'antagonistes peptidiques du VEGFR1		59
I.	Travaux antérieurs : développement d'antagonistes peptidiques du VEGFR1...	60
1.1	Sites d'interaction du VEGF avec le VEGFR1.....	60
1.2	Résumé des travaux antérieurs développement d'antagonistes du VEGFR.....	61
1.2.1	Inhibiteurs peptidiques mimant l'hélice- α 1	61
1.2.2	Inhibiteurs peptidiques mimant la boucle β 5- β 6	62
1.2.3	Inhibiteurs peptidiques précédemment conçus au laboratoire.....	63
II.	Développement de peptides cycliques modifiés en position C-terminale	66
2.1	Résumé de l'Article 1	67
2.1.1	Conception de peptides cycliques modifiés en C-terminal	67
2.1.2	Proposition de voie de synthèse pour ces nouveaux peptides	68
2.1.3	Évaluation par un test de déplacement ELISA.....	70
2.2	Résultats supplémentaires	71
2.2.1	Autre peptide modifié en C-terminal	71
2.2.2	Études de l'interaction du peptide (16) avec le VEGFR1 D2 par RMN	71
2.2.3	Inhibition de la formation de microtubule	78
2.2.4	Conclusion.....	79
III.	Développement d'antagonistes ciblant les domaines D2-D3 du VEGFR1 en mimant des fragments des VEGF-A, VEGF-B et PlGF	80
3.1	Résumé de l'Article 3	81
3.1.1	Introduction	81
3.1.2	Conception et synthèse d'inhibiteurs.....	83
3.1.3	Évaluation biologique	85
3.1.4	Conclusions	86
IV.	Les études d'antagonistes peptidiques mimant l'hélice- α 1 du VEGF-A	87
4.1	Étude de minimisation et optimisation de peptides mimant l'hélice- α 1 du VEGF-A.....	87
4.2	Étude de modification de la séquence de peptides mimant l'hélice- α 1 du VEGF-A.....	89
4.3	Étude de stabilisation de la conformation en hélice de peptides mimant l'hélice- α 1 du VEGF-A.....	91

4.3.1	Conception de peptides monocyclique et bicyclique	91
4.3.2	Synthèse des acides aspartiques modifiés	94
4.3.3	Synthèse, étude structurale et évaluation biologique de peptides bicycliques et monocycliques	96
V.	Développement d'antagonistes peptidiques par approche combinée	102
VI.	Conclusions	105
	Chapitre 4 : Développement de peptides macrocycliques pour favoriser la structuration en hélice α	107
I.	Introduction : la stratégie HBS	107
II.	Conception de nouveaux macrocycles de type HBS	114
III.	Synthèse de nouveaux macrocycles de type HBS	117
3.1	Première voie de synthèse (échec)	117
3.1.1	Synthèse d'acides aminés protégés avec un <i>o</i> -nitrobenzènesulfonyl en N-terminal	117
3.1.2	Tentative de synthèse de macrocycles sur phase solide	118
3.2	Deuxième voie de synthèse	121
3.2.1	Synthèse d'acides aminés protégés par <i>o</i> -Ns et OAllyl	122
3.2.2	Synthèse du macrocycle	122
3.2.3	Conclusions	124
3.2.4	Article 4	125
IV.	Synthèse de macrocycles hydrosolubles et études structurales	127
4.1	Synthèse de peptides macrocycliques hydrosolubles	127
4.2	Études structurales de macrocycles hydrosolubles	129
4.3	Article 5	130
V.	Résultats supplémentaires sur le développement de macrocycles peptidiques	131
5.1	Étude de stabilité des macrocycles dans le TFA	131
5.2	Étude de la cyclisation sur support solide	133
5.2.1	Synthèse de dipeptide <i>o</i> -Ns-AA ₁ -AA ₂ -OAllyl	134
5.2.2	Synthèse des macrocycles à l'aide de dipeptides	135
5.3	Étude de la synthèse d'un peptide issu de l'hélice- α 1 du VEGF incorporant un macrocycle HBS	138
5.3.1	Conception	138
5.3.2	Synthèse	139
VI.	Conclusions	143
	Conclusions et perspectives	145
	Experimental section	147
	General	147
	Chapitre 3	149
	Part 1: Development of C-terminal substituted cyclic peptides	149
	Part 2: Identification of VEGFR1 antagonists by scanning binding epitope of 3 ligands	152
	Part 3: Development of helical peptide antagonists of VEGFR1	153
	Part 4: Peptide antagonists from combination of different binding sites of VEGFR1	179

Chapitre 4.....	183
Part 1: Synthesis of new constrained 13-membered Peptide Macrocycles.....	183
Supporting information of Article 4.....	186
Part 2: Synthesis, spectroscopic study in water and molecular modeling of 13-membered macrocyclic peptides.....	187
Supporting information of Article 5.....	187
Part 3: Supplementary results of development of 13-membered macrocyclic peptides.....	189
Bibliographie	202

Liste des Abréviations

Ahx	Acide 6-aminohexanoïque
BSA	Bovine Serum Albmine fraction IV
btVEGF	VEGF ₁₆₅ biotinylé
CD	Dichroïsme circulaire
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimide
DIEA	N,N-Diisopropylethylamine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
ECD	Extracellular Domain
EDT	Ethanedithiol
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	EGF Receptor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Electrospray Ionization
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	FGF Receptor
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyl
HATU	1-[Bis(diméthylamino)méthylène]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
HBS	Hydrogen-Bonding Surrogates
HIF	Hypoxia Inducible Facteur
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	High-Pressure Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxydase
K _d	Constante de Dissociation
MW	Microwave
NFκB	Nuclear Factor-kappa B
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NRP	Neuropilin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDB	Protein Data Bank
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor

PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
pH	Potentiel hydrogène
PI3K	Phosphatidylinositide 3-Kinases
PLC-γ	Phospholipase C gamma-protéine
PLGF	Placental Growth Factor
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Rt	Retention time
SPPS	Synthèse Peptidique sur Phase Solide
TFA	Acide Trifluoacétique
TFE	Trifluoroéthanol
THF	Tétrahydrofurane
TIPS	Triisopropylsilane
TOCSY	Total Correlated Spectroscopy
UMR	Unité Mixte de Recherche
UV	Ultra-Violet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VEGFR1-D2	Domaine 2 du VEGFR-1
VEGFR1-ECD	Domaine Extracellulaire du VEGFR-1

Chapitre 1 : Introduction

I. Cancer et angiogenèse

1.1 Cancer et thérapies actuelles

1.1.1 La maladie cancer

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) surveille les problèmes de santé publique au niveau mondial. Elle a publié trois rapports concernant le cancer depuis 2003. D'après le dernier rapport « World Cancer Report 2014 », le cancer est toujours une cause majeure de mortalité chez l'Homme. En 2012, le fardeau mondial du cancer a augmenté à environ 14 millions de malades, et il a provoqué environ 8.2 millions de décès¹, c'est-à-dire que plus de 50% des patients sont mort à cause de cette maladie. Les cancers du poumon, du sein et du colorectaux sont les plus diagnostiqués, et les plus fréquents sont les cancers du poumon, du foie et de l'estomac¹. Le Dr Christopher Wild, le Directeur du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) et corédacteur du rapport a déclaré : “En dépit de progrès prometteurs, ce rapport montre que nous ne pouvons pas régler le problème du cancer grâce aux seuls traitements”.

Le cancer est une pathologie qui se caractérise par une prolifération cellulaire anormale et incontrôlée au sein d'un tissu normal de l'organisme. C'est une maladie initiée par la dérégulation de cellules normales. Généralement, les tissus normaux produisent des signaux mitogènes pour activer la prolifération des cellules². La prolifération cellulaire est strictement sous contrôle de l'organisme. Souvent s'en suit une apoptose après une blessure ou un vieillissement cellulaire (**Figure 1a**). Cependant, les cellules normales peuvent devenir des cellules cancéreuses après des mutations accumulées pendant la division. Une fois que les cellules sont devenues cancéreuses, leur prolifération n'est plus sous contrôle (**Figure 1b**). La prolifération anormale forme une masse de cellules, qui est appelée tumeur. Il existe deux types de tumeurs : la tumeur bénigne ou la tumeur maligne. La différence fondamentale entre ces deux types de tumeurs est que la tumeur maligne, au contraire de la tumeur bénigne, est agressive, subit une prolifération anarchique, est généralement métastatique et récidive très souvent après exérèse. La tumeur bénigne cause rarement de problème grave, et est normalement plus simple à traiter. La tumeur

¹ W. Stewart B and P. WILD C. *World Cancer Report 2014*

² Hanahan D and Weinberg RA. *Cell*, **2000**, 100, 57-70

maligne, appelée cancéreuse, menace la santé de millions de personnes. D'après Hanahan D et Weinberg RA^{2,8}, les cellules cancéreuses pourraient maintenir des signalisations prolifératives elles-mêmes, diminuer des signalisations antiprolifératives, se propager par métastase et envahir l'organisme, permettre des réplifications « immortelles », induire l'angiogenèse et résister à l'apoptose². Ces caractéristiques de cellules cancéreuses sont aussi appelées : « Hallmarks of cancer ». En 2011 ces caractéristiques ont été complétées par des dérégulations métaboliques, l'échappement au système immunitaire, l'instabilité du génome et l'inflammation⁸.

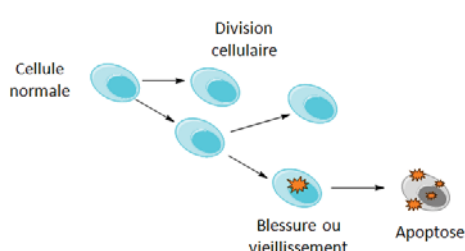


Figure 1a : Division et apoptose de cellule normale.

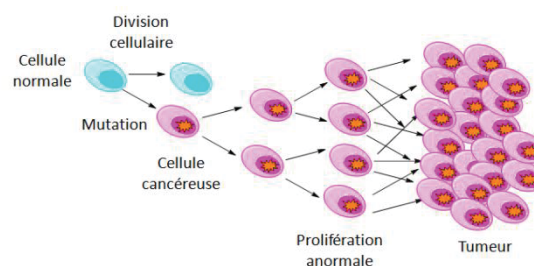


Figure 1b : Division et mutation de cellule normale à cellule cancéreuse et sa division.

1.1.2 Les causes de cancer

Les causes de cancer sont très variées et très différentes en fonction des individus. L'identification des facteurs à hauts risques fait partie de la recherche fondamentale et en épidémiologie.

Le cancer trouve son origine dans notre environnement et dans nos gènes. L'incidence des cancers liés à l'hérédité paraît aujourd'hui relativement limitée. La plupart des cancers sont dus à l'environnement et plus particulièrement à nos modes de vie et à nos comportements. Les multiples facteurs de risque interviennent, notamment le tabac, l'alcool, l'alimentation, les produits cancérogènes, les rayons UV, le manque d'activité physique ...

Par exemple, le cancer du poumon est principalement dû au tabac. Plusieurs études statistiques^{3,4} et fondamentales^{5,6} ont été réalisées pour comprendre la liaison entre le tabac et le cancer du poumon. La conclusion est que les fumeurs ont plus de risques que les non-fumeurs d'être atteints d'un cancer du poumon à cause des composés présents dans la fumée. Mais l'apparition du cancer du poumon dépend également d'autres facteurs : l'âge et l'histoire du fumeur, le type de tabac et sa consommation. L'alcool augmente le risque du cancer du foie et du côlon ; l'alimentation déséquilibrée du cancer de l'estomac ; l'exposition aux rayons UV le

³ A Crispo, P Brennan, KH Jöckel, et al. *Br J Cancer*, **2004**, 91,1280–1286

⁴ P Brennan, A Crispo, D Zaridze, et al. *Am J Epidemiol*, **2006**, 164, 1233–1241

⁵ GP Pfeiffer, MF Denissenko, M Olivier, et al. *Oncogene*, **2002**, 21, 7435–7451

⁶ Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, et al. *Nature*, **2008**, 452, 633–637

risque de cancer de la peau, etc. L'apparition d'un cancer est un processus complexe, il est souvent le résultat d'une association de plusieurs facteurs. Comprendre les causes qui entraînent le cancer pourrait aider la prévention de cette maladie.

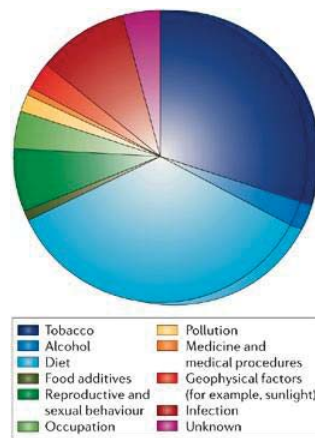


Figure 2. Les différentes causes du Cancer⁷.

1.1.3 Les traitements antitumoraux

La lutte contre le cancer a beaucoup progressé pendant ces dernières années, et le mystère du cancer est petit à petit dévoilé par la recherche scientifique. Les processus de formation et de progression du cancer sont de plus en plus clairs. De nombreuses approches thérapeutiques ont été mise en évidence, y compris les traitements traditionnels (chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie) et les nouveaux traitements (thérapie ciblée, immunothérapie).

Les Traitements antitumoraux traditionnels :

- *La chirurgie.* La chirurgie ne fonctionne pas seulement pour extraire la tumeur, mais aussi pour diagnostiquer, apaiser et prémunir le cancer. Généralement, une partie de tissu du patient est d'abord examiné pour diagnostiquer le type de cancer (examen anatomopathologique). Ensuite, une opération d'excision de tumeur ou de tissu suspect est effectuée pour le soin ou la prévention du cancer.
- *La radiothérapie.* La radiothérapie consiste à détruire ou blesser les cellules cancéreuses par une irradiation de haute énergie. Il existe trois types de source d'irradiation : irradiation externe, l'irradiation est apportée par des appareils spéciaux ; irradiation interne, l'irradiation est effectuée par implantation des matériaux radioactifs dans l'organisme ; et irradiation systémique, qui consiste à utiliser des médicaments radioactifs.

⁷ Colditz GA, Sellers TA, Trapido E. *Nat Rev Cancer*. 2006, 6, 75-83

- *La chimiothérapie.* La chimiothérapie était utilisée depuis les années 1940-50, elle consiste à tuer les cellules cancéreuses par des médicaments. Ces médicaments sont généralement des agents cytotoxiques qui ont pour cible les cellules qui prolifèrent rapidement, par exemple, les cellules cancéreuses ainsi que les cellules sanguines. Cela explique aussi que les patients traités par chimiothérapie subissent souvent des effets secondaires. Plus d'une centaine de médicaments sont sur le marché pour traiter différents types de cancer. Le plus souvent, ces médicaments sont combinés pour éviter la résistance des cellules cancéreuses.

Les trois types de traitements traditionnels sont encore les plus utilisés pour traiter les différents types de cancers, notamment avec les progrès de la technologie médicale. Par exemple, les nouveaux appareils et les progrès en imagerie permettent en oncologie une meilleure précision du geste chirurgical et moins de dégâts sur les tissus sains ; le développement de médicaments radioactifs qui ciblent et tuent spécifiquement les cellules cancéreuses après injection ou voie orale ; des nouveaux agents chimiques visant à tuer spécifiquement les cellules cancéreuses sont également développés et utilisés en chimiothérapie.

Nouveaux traitements antitumoraux :

- *L'immunothérapie.* Le système immunitaire surveille et défend le corps sain contre l'agression de corps étrangers. Cependant, les cellules cancéreuses sont transformées à partir de cellules normales qui ne sont pas considérées comme étrangères par le système immunitaire. L'immunothérapie consiste à stimuler le système immunitaire pour lutter contre le cancer. C'est une nouvelle thérapie très prometteuse.
- *La thérapie ciblée.* La cible antitumorale idéale a souvent un rôle clef dans la prolifération, la croissance et la survie des cellules cancéreuses. Ces cibles peuvent être des gènes qui contrôlent le cycle cellulaire de cellules cancéreuses ou des protéines impliquées dans la signalisation. Les agents de thérapie ciblée sont des médicaments chimiques, mais ils fonctionnent de façon à bloquer ou ralentir la prolifération et la croissance de cellules tumorales au lieu de tuer les cellules saines par rapport aux médicaments utilisés dans la chimiothérapie classique. La thérapie ciblée se base sur les caractères spécifiques de cellules cancéreuses et a été résumé par Hanahan et Weinberg⁸ (**Figure 3**). Les molécules développées s'appuient sur les mécanismes de développement du cancer et interfèrent avec les processus de prolifération, croissance et survie des cellules cancéreuses. Elles fonctionnent comme inhibiteurs de signalisation, modulateur d'expression de gènes, réducteur d'apoptose, inhibiteur d'angiogenèse, etc... Certaines sont déjà largement utilisées en clinique : Glivec® (imatinib mesylate), Iressa® (gefitinib), Velcade® (bortezomib), Avastin® (bevacizumab). Les

⁸ Hanahan D, Weinberg RA. *Cell*, **2011**, 144, 646-674

recherches sont encore en cours, car les thérapies ciblées ont montré une meilleure efficacité et moins d'effets secondaires.

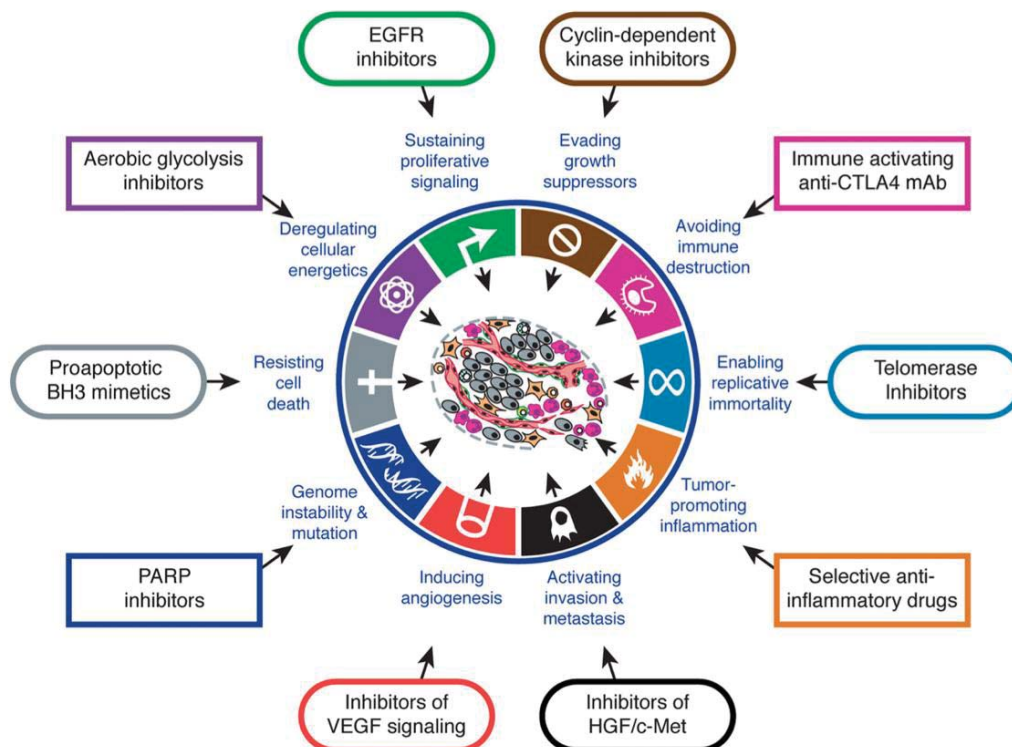


Figure 3. Les caractères de cancer et les thérapeutique ciblé aux ces caractères. Hanahan and R.A. Weinberg, Cell, 2011⁸.

Parmi ces différentes thérapies ciblées, nous nous intéressons aux thérapies anti-angiogéniques. Cela consiste à interrompre la diffusion du sang et de nutriments pour la croissance, la survie et la migration de cellules cancéreuses par inhibition de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ce processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins est appelé angiogenèse, il est indispensable pour le développement de nombreux cancers, certains étant plus dépendant que d'autres à ce mécanisme.

1.2 Le rôle de l'angiogenèse dans le développement du cancer et la thérapie anti-angiogénique.

1.2.1 L'angiogenèse

La formation du système vasculaire est initiée et développée pendant le développement de l'embryon. Le système vasculaire gère la circulation sanguine, la distribution de l'oxygène et la nutrition de l'organisme et l'élimination des métabolites. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ces vaisseaux préexistants est appelée l'angiogenèse. Pendant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, les cellules précurseurs de cellules endothéliales (angioblastes) sont produites, transférées et rassemblées pour former des plexus capillaires. Puis, les plexus capillaires fusionnent avec les vaisseaux sanguins existants⁹. La circulation de sang permet ensuite la maturation de ces vaisseaux (**Figure 4**).

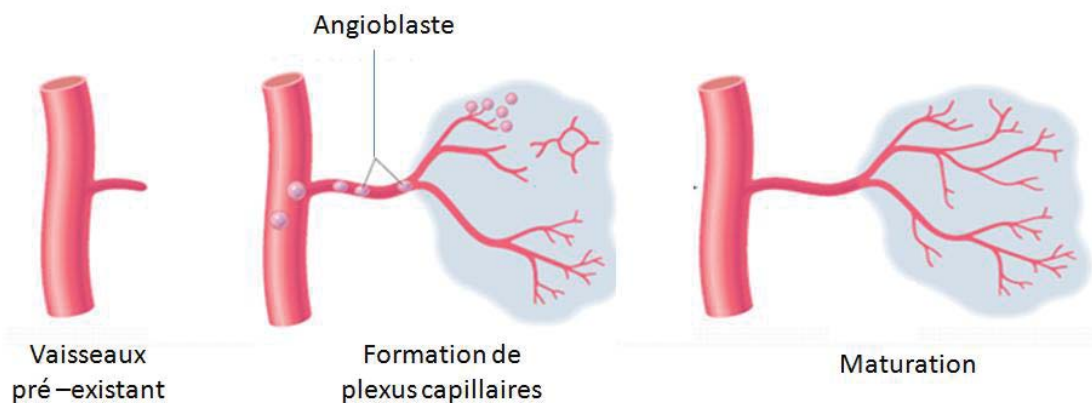


Figure 4. Formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Figure d'après Nolte S¹⁰ and Conway EM¹¹.

La plupart de l'angiogenèse normale se produit pendant le développement de l'embryon¹². Chez l'adulte, l'angiogenèse ne se déroule généralement que pour certains processus physiologiques comme la cicatrisation de blessure ou le cycle menstruel chez la femme¹³. Cependant, la dérégulation de l'angiogenèse a des relations vitales avec plusieurs processus physiologiques et pathologiques, ainsi que les maladies cardio-vasculaires, les cancers, l'inflammation chronique et la dégénérescence maculaire liée à l'âge¹⁴. Parmi eux, l'angiogenèse présente une stimulation excessive pendant le développement du cancer.

⁹ Papetti M and Herman IM. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2002**, 282,947-970

¹⁰ Nolte S. *Poster Website Medical Literature Society*, **2016**

¹¹ Conway EM, Collen D and Carmeliet P. *Cardiovasc Res.* **2001**, 49, 507-521

¹² Folkman J. *Nat Med.* **1995**, 1, 27-31

¹³ Klagsbrun M and D'Amore PA. *Annu Rev Physiol.* **1991**, 53, 217-239

¹⁴ Carmeliet P. *Nat Med.* **2003**, 9:653-660

1.2.2 L'angiogenèse tumorale

La recherche de la relation entre l'angiogenèse et le développement du cancer a débuté depuis un siècle. En 1908, E Goldmann a découvert le premier une augmentation de la vascularisation pendant la croissance de tumeurs¹⁵. En 1939, Ide et al. ont proposé l'idée que la tumeur produisait certains facteurs pour stimuler la formation de vaisseaux sanguins¹⁶. Puis, en 1945, Algire et Chalkley ont observé une formation de nouveaux capillaires autour de la tumeur maligne¹⁷. Ensuite, en 1968, deux groupes M Greenblatt, P Shubik¹⁸ et RL Ehrman, M Knoth M¹⁹ ont montré que la croissance de tumeurs s'accompagnait d'une formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Avec ses travaux précédents^{20,21}, J Folkman a confirmé cette relation entre cancer et angiogenèse en 1971²². La croissance de la tumeur exige l'apport de nutriments et d'oxygène. Elle produit des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF « Vascular Endothelial Growth Factor », qui entraîne la formation de nouveaux vaisseaux sanguins autour de la tumeur. Enfin, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins fournit les nutriments et l'oxygène pour la croissance de la tumeur ainsi que l'élimination des métabolites et la dissémination des métastases (**Figure 5**).

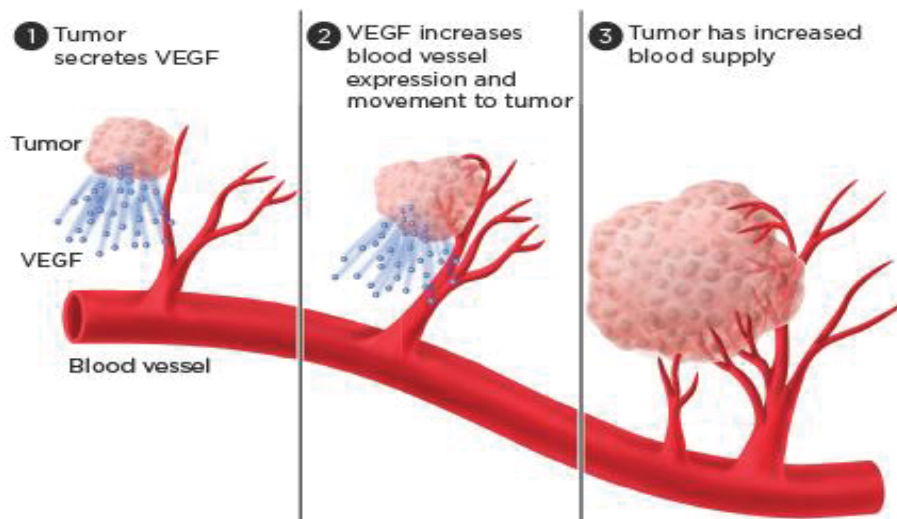


Figure 5. Relation entre la croissance d'une tumeur et l'angiogenèse. Figure d'après Nolte S¹⁰ et Folkman J²².

¹⁵ Goldmann E. *Proc R Soc Med.* **1908**, 1(Surg Sect), 1-13.

¹⁶ Ide AG, Baker NH, Warren SL. *AJR*, **1939**, 32, 891-899

¹⁷ Algire M and Chalkley W. *J Natl Cancer Inst.* **1945**, 6, 73-85

¹⁸ Greenblatt M, Shubik P. *J Natl Cancer Inst.* **1968**, 41, 1111-1124

¹⁹ Ehrman RL, Knoth M. *J Natl Cancer Inst.* **1968**, 41, 1329-1341

²⁰ Folkman J, Long DM Jr, Becker FF. *Cancer.* **1963**, 16, 453-467

²¹ Gimbrone MA Jr, Aster RH, Cotran RS, et al. *Nature.* **1969**, 222, 33-36

²² Folkman J. *N Engl J Med.* **1971**, 285, 1182-1186

L'angiogenèse a un rôle essentiel dans le développement du cancer. Dans le même article, J Folkman a proposé l'hypothèse que l'inhibition de l'angiogenèse pourrait être une approche thérapeutique pour le traitement du cancer. Depuis 1971, Folkman et son équipe ont travaillé pendant plus de 40 ans sur cette nouvelle démarche pour lutter contre le cancer. L'inhibition de l'angiogenèse pourrait être réalisée par :

- (1) Inhibition de l'interaction entre les facteurs pro-angiogéniques et leurs récepteurs ;
- (2) Inhibition de l'activité tyrosine kinase des récepteurs ;
- (3) Inhibition des voies de signalisation initiées par les facteurs pro-angiogéniques.

1.2.3 Les facteurs et les récepteurs impliqués dans l'angiogenèse tumorale

La régulation de l'angiogenèse est un processus compliqué. Il est strictement contrôlé par les facteurs pro- et anti-angiogéniques. Les facteurs pro-angiogéniques comprennent le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), le FGF (Fibroblast Growth Factor), l'EGF (Epidermal Growth Factor), le TGF- α (Transforming Growth Factor) et l'Angiopoietine-2 et le TGF- β sont deux facteurs anti-angiogéniques^{23,24}. Une liste de principaux facteurs impliqués dans l'angiogenèse est présentée par le tableau 1.

La plupart des facteurs ont une fonction pro-angiogénique, ils interagissent avec différents récepteurs puis activent une voie de signalisation intracellulaire afin d'induire la survie, la prolifération et la migration des cellules. Les VEGFs (-A, -B, -C, -D et -E) et PlGF (Placental Growth Factor) sont tous classés dans la famille des VEGFs. Ce sont les plus étudiés et les plus impliqués dans l'angiogenèse tumorale. Pourtant, ils ont des modes d'action et des fonctions biologiques différentes. Le VEGF-A et le PlGF sont plus importants dans l'angiogenèse, le VEGF-B régule la remodulation de la vascularisation et l'absorption d'acide gras par les cellules, le VEGF-C et -D sont plus impliqués dans la lymphangiogenèse, et le VEGF-E participe à la régularisation de l'épidermisation. Il existe aussi le VEGF-F qu'on trouve dans un venin de serpent. Tous les facteurs de croissance de la famille des VEGFs ont une structure similaire.

Les facteurs pro- et anti-angiogéniques se fixent sur des différents récepteurs présentés dans le tableau 1. La famille de VEGFRs (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) : VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3. VEGFR1 et VEGFR2 sont plus

²³ Ferrara N, Kerbel RS. *Nature*. **2005**, 438:967-974

²⁴ Al-Husein B, Abdalla M, Trepte M, et al. *Pharmacotherapy*. **2012**, 32, 1095-1111

impliqués dans l'angiogenèse²⁵. Le VEGFR3 est plus impliqué dans lymphangiogenèse. La famille de NRPs (Neuropilin) : NRP1 et NRP2. Ces sont des co-récepteurs aux VEGFRs dépourvus d'activité kinase contrairement aux VEGFRs²⁶. Tie 1 et Tie 2 sont deux récepteurs de l'angiopoietine.

Tableau 1. Facteurs et leurs récepteurs correspondants, et leur rôle biologique

Facteur	Récepteur correspondant	Fonction biologique
VEGF	-A	VEGFR1, VEGFR2, NRP1, NRP2
	-B	VEGFR1, NRP1
	-C	VEGFR3, NRP2
	-D	VEGFR3, NRP2
	-E	VEGFR2, NRP1, NRP2
PlGF	VEGFR1, NRP1, NRP2	Régulation d'angiogenèse dans les conditions pathologiques ³⁵
angiopoietins-1	Tie1, Tie2	Stimulation de pousse des cellules endothéliales ³⁶
angiopoietins-2	Tie1, Tie2	Antagonistes d'angiopoietins-1 ³⁷

²⁵ Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. *Nat Med.* **2003**, 9, 669-976

²⁶ Maden CH, Gomes J, Schwarz Q, et al. *Dev Biol.* **2012**, 369, 277-285

²⁷ Dvorak HF. *J Clin Oncol.* **2002**, 20, 4368-4380

²⁸ Kerbel RS. *N Engl J Med.* **2008**, 358, 2039-2049

²⁹ Ellis LM, Hicklin DJ. *Nat Rev Cancer.* **2008**, 8, 579-591

³⁰ Li X, Tjwa M, Van Hove I, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2008**, 28, 1614-1620

³¹ Hagberg CE, Falkevall A, Wang X, et al. *Nature.* **2010**, 464, 917-921

³² McColl BK, Baldwin ME, Roufail S. *J Exp Med.* **2003**, 198, 863-868

³³ Lohela M, Saaristo A, Veikkola T. *Thromb Haemost.* **2003**, 90, 167-184

³⁴ Wise LM, Inder MK, Real NC, et al. *Cell Microbiol.* **2012**, 14, 1376-1390

³⁵ Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. *Nat Med.* **2001**, 7, 575-583

³⁶ Hansen TM, Singh H, Tahir TA, et al. *Cell Signal.* **2010**, 22, 527-532

³⁷ Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R. *Science.* **1986**, 232, 1250-1253

1.2.4 L'approche anti-angiogénique pour le cancer

L'approche anti-angiogénique consiste à inhiber l'angiogenèse pour des maladies dans lesquelles l'angiogenèse est impliquée telle que le cancer³⁸. Depuis l'émission de l'hypothèse de Folkman en 1971, les anti-angiogéniques sont devenus un axe de recherche de nouveaux d'antitumoraux.

Dans la pathologie du cancer, l'implication de l'angiogenèse est souvent une cause de surproduction des facteurs pro-angiogéniques, par exemple, les VEGFs. En conséquence, la thérapie anti-angiogénique consiste à réguler ces facteurs, soit en diminuant leur expression pro-angiogénique, soit par leur capture, soit par inhibition de leurs interactions avec leurs récepteurs, ainsi que par inhibition des voies de signalisation induites. Ces thérapies appartiennent aux thérapies ciblées, en ciblant les facteurs de croissance ou leurs récepteurs.

Plusieurs agents anti-angiogéniques sont déjà approuvés dans le traitement du cancer en clinique (**Tableau 2**). Actuellement, la plupart de ces médicaments sont des inhibiteurs de tyrosine kinases qui inhibent l'activité tyrosine kinase des récepteurs ou des anticorps monoclonaux qui bloquent les facteurs angiogéniques ou les récepteurs. De nombreux patients bénéficient de ces traitements.

Entre eux, les VEGFR sont des récepteurs à activité tyrosine kinase. En bref, la fixation du facteur sur son récepteur induit la dimérisation de ce dernier puis l'activation de son domaine tyrosine kinase qui induit une autophosphorylation et recrute ensuite une autre protéine, cette dernière sera ainsi activée et active la protéine suivante. Ce relais d'activation passe de cette façon de l'extracellulaire jusqu'au noyau, influence la régulation et l'expression de certains gènes favorisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et la dissémination de métastases tumorales. La fixation d'un ligand à son récepteur et le rapprochement d'une protéine à une autre dans ce processus sont essentiellement dus à des interactions protéine-protéine. Le développement d'inhibiteurs de ces interactions se développe de plus en plus ces dernières années grâce aux avancements de la biologie structurale. Ces inhibiteurs sont non seulement importants dans le traitement du cancer, mais aussi pour d'autres maladies comme les infections bactériennes et les maladies neurodégénératives³⁹.

La partie suivante résume les interactions protéine-protéine et leurs inhibiteurs avant de présenter mes travaux de recherche sur l'inhibition de l'interaction entre le VEGF et ses récepteurs dans un but antiangiogénique.

³⁸ Carmeliet P, Jain RK. *Nature*. **2000**, 407, 249-257

³⁹ Ryan DP, Matthews JM. *Curr Opin Struct Biol*. **2005**, 15, 441-446

Tableau 2. Médicaments utilisés comme des agents anti-angiogéniques.

Agent et entreprise	Cible et type de cancer
Sutent® (sunitinib) Pfizer	Inhibiteur multiple tyrosine kinase (VEGFRs, PDGFRs) Approuvé Par FDA dans le traitement de carcinome de cellules rénales et tumeur stromale gastro-intestinale
Avastin® (bevacizumab) Genentech	Anticorps monoclonaux, inhibiteur ciblant le VEGF Utilisé dans le traitement du cancer métastatique de la colo et le cancer du poumon de type non-petites cellules
Cyramza® (ramucirumab) Eli Lilly and Company	Anticorps monoclonaux, inhibiteur ciblant le VEGFR2, blocage de l'interaction VEGF et VEGFR2 Approuvé Par FDA dans le traitement d'adénocarcinome gastrique ou jonction œsophagique et le cancer du poumon de type non-petites cellules
Zaltrap® (Aflibercept) Sanofi et Regeneron	Protéine recombinante, fusionné à partir de domaines extracellulaires des VEGFR1 et VEGFR2, ciblant le VEGF Utilisé dans le traitement du cancer colorectal métastatique Phase III dans le traitement de carcinome de l'épithélium urinaire métastatique
Votrient® (pazopanib) GSK	Inhibiteur multiple tyrosine kinase (VEGFRs, PDGFRs) Approuvé Par FDA dans le traitement des sarcomes des tissus mous et des cancers du rein

II. Interactions protéine-protéine (PPI) et inhibiteurs

2.1 Les protéines et les interactions protéine-protéine

2.1.1 Les protéines et leurs fonctions biologiques

Les protéines sont des macromolécules qui consistent en un enchainement d'acides aminés (normalement plus de 50 acides aminés). Les résidus d'acides aminés sont liés les uns aux autres par liaisons amide. Dans l'organisme, la protéine est synthétisée par la traduction de l'ARNm par le ribosome. Au niveau structural, on distingue quatre niveaux d'organisation chez les protéines, de la structure primaire à la structure quaternaire (**Figure 6**).

- (1) Structure primaire : *ordre des acides aminés* le long de la chaîne polypeptidique (séquence protéique) codée par les gènes.
- (2) Structure secondaire : *repliement local* des chaînes polypeptides en hélices, en feuillets, en coude ou en d'autres formes similaires, grâce aux liaisons hydrogènes entre les NH et les CO des groupements amide.
- (3) Structure tertiaire : *assemblage stable dans l'espace* des structures secondaires. Les hélices et feuillets sont reliés par des coudes (réguliers) ou des boucles (non régulières) conduisant à un domaine protéique ou à une protéine possédant une fonction biologique. Un domaine protéique est une partie d'une protéine, il est structurellement et fonctionnellement indépendant du reste de la protéine. Le repliement est dû à différentes interactions intramoléculaires, ioniques, liaisons hydrogène, hydrophobes, de van der Waals, et certaines liaisons covalentes par pont disulfures entre cystéines. C'est la structure la plus importante pour les études structurales et les fonctions biologiques.
- (4) Structure quaternaire : *agencement des sous-unités* entre elles par des liaisons non-covalentes ou par des ponts disulfures, quand la protéine est constituée de plusieurs sous-unités indépendantes (comme l'est par exemple l'hémoglobine). Cette association en structure quaternaire est essentielle pour certaines fonctions biologiques.

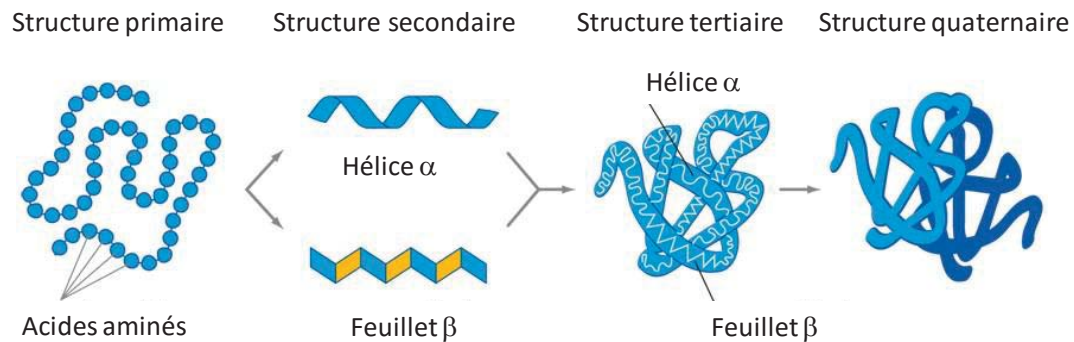


Figure 6. Quatre niveaux d'organisation des structures protéiques.

La principale force motrice de la structuration d'une protéine dans l'organisme est l'interaction de la chaîne polypeptidique avec le solvant (aqueux pour la plupart des protéines). Les protéines se replient de manière à masquer leurs résidus hydrophobes à l'intérieur de leur structure et à exposer au solvant leurs résidus hydrophiles. Les protéines membranaires, qui sont en interaction avec des lipides, obéissent à la règle inverse.

Dans le corps humain, il existe un grand nombre de protéines (environ 500 000)⁴⁰, et chaque type de protéine a sa propre fonction biologique. Par exemple, les anticorps reconnaissent l'invasion par des virus ou des bactéries, puis participent à leur destruction, les enzymes catalysent les réactions chimiques, les hormones régulent des phénomènes physiologiques, etc. Cependant, il est décrit que 80% des protéines ne fonctionnent pas toutes seules⁴¹, et les propriétés biologiques des protéines dépendent de leurs interactions avec d'autres molécules⁴². Comme décrit par L Bonetta, l'identification des partenaires d'une protéine pourrait révéler la fonction de cette dernière⁴³.

⁴⁰ Ezkurdia I, Juan D, Rodriguez JM, et al. *Hum Mol Genet.* **2014**, 23, 5866-5878

⁴¹ Berggård T, Linse S, James P. *Proteomics.* **2007**, 7, 2833-2842

⁴² Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Garland Science*, **2002**, book "Molecular Biology of the Cell. 4th edition."

⁴³ Bonetta L. *Nature.* **2010**, 468, 851-854

2.1.2 Interactions protéine-protéine (PPI)

De plus en plus de PPIs ont été identifiées par différentes techniques. Les PPI sont développées comme un réseau binaire, qui est appelé « interactome ». Plus de 14000 PPIs ont été caractérisées dans le corps humain⁴⁴. Selon ces études sur les PPIs, certaines jouent un rôle essentiel dans les processus physiologiques et pathologiques. Par exemple, VEGF/VEGFR dans l'angiogenèse^{31,32,33}, Bcl-2/Bcl-x_L-Bax/Bak⁴⁵ et p53/MDM2⁴⁶ dans le cancer, CCR5/HIV-1 gp120⁴⁷ dans le SIDA. L'étude des interactions protéine-protéine et l'interférence des PPI pourrait être importante dans la régulation de certaines maladies induites directement par les PPIs ou passant par les PPIs.

La conformation d'une protéine est établie par les interactions intramoléculaires, elle est normalement stable et structurée. Les interactions protéine-protéine passent par des interactions intermoléculaires à la surface des protéines. Généralement, les PPIs sont constituées par des liaisons non-covalentes (interaction hydrophobe, liaison hydrogène, interaction ionique ou interaction de Van der Waals), et les PPIs covalentes sont rarement observées, par exemple, par modification post-traductionnelle⁴⁸. Les liaisons non-covalentes sont normalement plus faibles que les liaisons covalentes. Pourtant, les PPIs non-covalentes ne sont pas toujours faibles, elles ont parfois des K_d (constante de dissociation) dans des gammes micromolaire ou même nanomolaire dû à leur large surface d'interaction. Les PPIs sont des interactions entre de larges surfaces ($\sim 1,500\text{--}3,000 \text{ \AA}^2$)^{49,50}, par rapport à l'interaction de petites molécules avec des protéine ($\sim 300\text{--}1,000 \text{ \AA}^2$)^{51,52}. Un réseau de liaisons non-covalentes induit une forte interaction entre les protéines.

L'interface d'interaction entre protéines n'est pas plane, et les résidus dans la zone d'interaction ont plus ou moins d'importance pour l'interaction⁵³. Certains résidus contribuent à une énergie majeure dans l'interaction, et sont appelés les « Hot spots ». L'identification d'un « Hot spot » est réalisée par la substitution d'un résidu dans la zone d'interaction par une alanine, la perte d'énergie ($\Delta\Delta G_{\text{binding}}$) de cette substitution est supérieure à 1.5 kcal/mol⁵⁴. Cette méthode d'identification est définie comme « Alanine Scanning ». L'étude de mutagenèse par alanine permet aussi d'identifier d'autres résidus moins importants dans l'interaction directe avec l'autre protéine. Ces résidus avec les « Hot spots » constituent une région « Hot spot

⁴⁴ Rolland T, Taşan M, Charlotiaux B, et al. *Cell*. **2014**, 159, 1212-1226

⁴⁵ Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, et al. *Cancer Res*. **2008**, 68, 3421-3428

⁴⁶ Vu BT, Vassilev L. *Curr Top Microbiol Immunol*. **2011**, 348, 151-172

⁴⁷ Dorr P1, Westby M, Dobbs S, et al. *Antimicrob Agents Chemother*. **2005**, 49, 4721-4732

⁴⁸ Westermarck J, Ivaska J, Corthals GL. *Mol Cell Proteomics*. **2013**, 12, 1752-1763

⁴⁹ Jones S, Thornton JM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1996**, 93, 13-20

⁵⁰ Lo Conte L, Chothia C, Janin J. *J Mol Biol*. **1999**, 285, 2177-2198

⁵¹ Cheng AC, Coleman RG, Smyth KT, et al. *Nat Biotechnol*. **2007**, 25, 71-75

⁵² Smith RD, Hu L, Falkner JA, et al. *J Mol Graph Model*. **2006**, 24, 414-425

⁵³ Guo W, Wisniewski JA, Ji H. *Bioorg Med Chem Lett*. **2014**, 24, 2546-2554

⁵⁴ Santoro M, Carlomagno F, Romano, et al. *Science*. **1995**, 267, 381-383.

region »⁵⁵. Par exemple, dans les deux modèles d'interactions entre les récepteurs et leurs facteurs (**Figure 7**), les résidus en rouge sont des « Hot spots ». Les résidus en violet, bleu et vert sont moins importants, mais ils font aussi partie de la « Hot spot region ». L'identification de ces « Hotspots » et « Hotspot region » sont essentiels pour la recherche de modulateurs des PPIs.

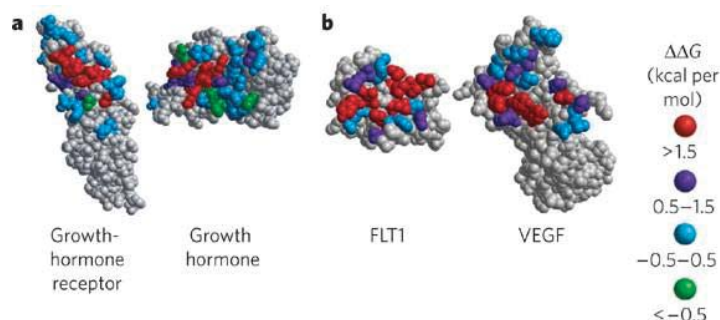


Figure 7. Les résidus essentiels des PPI identifiés par alanine scanning pour deux paires de protéines : (a) Hormone de croissance et son récepteur ; (b) VEGF et FLT1 (VEGFR1). Les couleurs représentent l'énergie nécessaire pour la dissociation de ce résidu dans l'interaction. Figure d'après Wells JA et McClendon CL⁵⁶.

Les PPIs peuvent initier une réponse cellule par activation d'un récepteur comme dans le cas du VEGF, qui interagit avec le VEGFR⁵⁷, elles sont également impliquées dans la transduction du signal comme la cascade de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK⁵⁸. L'inhibition des PPI est donc très importante pour la régulation de fonctions biologiques induites par un signal et constitue une des approches dans le développement de nouveaux médicaments. Les inhibiteurs peuvent être peptidiques, peptidomimétiques ou non-peptidiques. Ce peuvent être également des anticorps ou des protéines recombinantes.

⁵⁵ DeLano WL, Ultsch MH, de Vos AM, et al. *Science*. **2000**, 287, 1279-1283

⁵⁶ Wells JA, McClendon CL. *Nature*. **2007**, 450, 1001-1009

⁵⁷ Shibuya M. *Genes Cancer*. **2011**, 2, 1097-1105

⁵⁸ McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. *Biochim Biophys Acta*. **2007**, 1773, 1263-1284

2.2 Inhibiteurs des interactions protéine-protéine

2.2.1 Généralités

Les inhibiteurs des interactions protéine-protéine sont des molécules qui interagissent avec une de ces protéines et empêchent son interaction avec les autres protéines partenaires. Leurs rôles de régulation des processus biologiques ont été confirmés par des études récentes^{59,60,61}. Les inhibiteurs interagissant en générale au niveau du « Hot spot region » et bloque ainsi la fonction biologique induite par cette PPI. Par exemple, la protéine « BAD » (Bcl-2-associated death promoter) interagit avec la protéine « Bcl-XL » (B-cell lymphoma-extra large) pour inhiber l'activité anti-apoptotique induite par Bcl-XL. Un inhibiteur (ABT-737) de la protéine Bcl-XL interagit avec Bcl-XL pour empêcher l'interaction Bcl-XL/BAD (**Figure 8**) et est donc capable d'induire l'apoptose⁶².

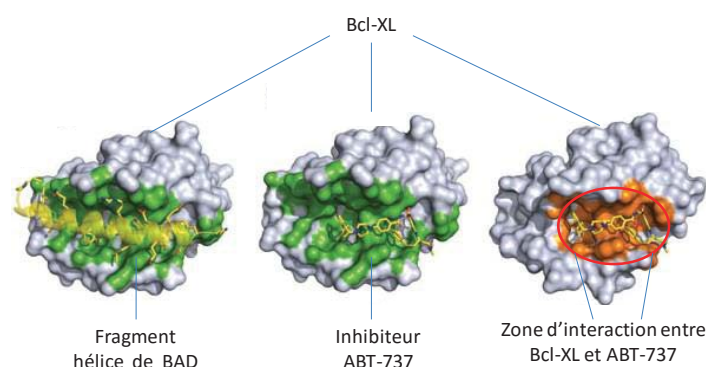


Figure 8. Zone d'interaction (en vert) de Bcl-XL et l'hélice de BAD (gauche), zone d'interaction (en orange) de Bcl-XL et un inhibiteur ABT-737 (droite). Figure d'après Wells JA et McClendon CL⁵⁶.

⁵⁹ Milroy LG, Grossmann TN, Hennig S, et al. *Chem Rev.* **2014**, 114, 4695-4748

⁶⁰ L. Nevola, E. Giralt, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 3302 -3315

⁶¹ T. A. Hill, N. E. Shepherd, F. Diness, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 13020-13041

⁶² Petros AM, Nettlesheim DG, Wang Y, et al. *Protein Sci.* **2000**, 9, 2528-2534

2.2.2 Différents types d'inhibiteurs des PPI

Il existe plusieurs stratégies pour développer les inhibiteurs d'PPI. La stratégie choisie dépend également de la nature de l'inhibiteur, que l'on peut classer en différentes catégories :

- (1) Anticorps et protéine recombinantes. Le développement d'anticorps monoclonaux comme inhibiteurs d'PPI constitue une partie très importante pour l'inhibition de PPI. Les anticorps sont des macromolécules qui ont une interaction spécifique avec les protéines ciblées. Ils sont parmi les premiers inhibiteurs d'PPI utilisés en clinique pour traiter certaines maladies. On peut citer le bevacizumab⁶³ qui reconnaît le VEGF. La Fusion de différents domaines de protéines partenaires est aussi une stratégie pour développer des inhibiteurs protéique d'PPIs⁶⁴, comme l'aflibercept, qui se fixe également au VEGF.
- (2) Petites molécules et produits naturels issus de criblage. La surface d'PPI est extrêmement large par rapport à la taille d'une petite molécule⁶⁵. Il est difficile de prédire l'interaction entre une petite molécule et une protéine. Le même problème s'est posé pour sélectionner des inhibiteurs d'PPI issus de produits naturels⁶⁶. Les méthodes utilisées pour chercher des modèles de petites molécules comme les inhibiteurs d'PPI sont actuellement plus efficaces. Basé sur un site d'interaction connu d'une protéine, l'identification d'inhibiteurs d'PPI peut être réalisée par un criblage à haut débit : « high-throughput screening ». C'est une méthode pour faciliter la découverte des candidats inhibiteurs d'PPI dans un grand nombre de bibliothèque de molécules. Cette méthode permet aussi identifier des inhibiteurs pour les interactions faibles ($K_d > 200$ nM) d'PPI⁶⁷.
- (3) Molécules issues de la conception rationnelle. La conception rationnelle d'inhibiteurs d'PPI est basée sur les « Hot spots » et « Hot spot region » dans les interactions protéine-protéine, qui sont décrits dans la partie précédente. Cette méthode a montré une grande efficacité dans le développement d'inhibiteurs d'PPI^{68, 69}. Par conséquent, la conception rationnelle d'inhibiteurs d'PPI est forcément dépendante de la connaissance de la structure du complexe des protéines identifiées. Des méthodes comme la RMN (résonance magnétique nucléaire) et la cristallographie sont utilisées pour déterminer ces structures. Par ailleurs, d'autres méthodes existent pour

⁶³ Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. *Biochem Biophys Res Commun.* **2005**, 333, 328-335

⁶⁴ Holash J, Davis S, Papadopoulos N, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**, 99, 11393-11398

⁶⁵ Fuller JC, Burgoyne NJ, Jackson RM. *Drug Discov Today.* **2009**, 14, 155-161

⁶⁶ Sperl B, Seifert MH, Berg T. *Bioorg Med Chem Lett.* **2009**, 19, 3305-3309

⁶⁷ Cesa LC, Patury S, Komiyama T, et al. *ACS Chem Biol.* **2013**, 8, 1988-1997

⁶⁸ Zinzalla G, Thurston DE. *Future Med Chem.* **2009**, 1, 65-93

⁶⁹ Wells JA, McClendon CL. *Nature.* **2007**, 450, 1001-1009

la prédiction des « Hot spots » et « Hot spot region », comme la modélisation moléculaire ou la mutagénèse dirigée. Récemment, des nouvelles techniques sont également développées pour identifier des « Hot spots » et « Hot spot region », par exemple, la méthode « molecular dynamics (MD) simulations »^{70,71}, ou une méthode d'alignement par logiciel qui est appelé « iPred »⁷². Toutes ces méthodes d'identification d'PPI enrichissent les données sur lesquelles on peut se baser pour la conception des inhibiteurs. Des peptides fragments des protéines sont généralement le point de départ pour la conception rationnelle d'inhibiteurs d'PPI. La modification de ces peptides conduit ensuite à des molécules non-peptidiques ayant des avantages comme la stabilité enzymatique, ou la perméabilité membranaire, etc... Je résumerai dans la partie suivante ces différents types d'inhibiteurs d'PPI.

⁷⁰ Yang CY, Wang S. *ACS Med Chem Lett.* **2010**, 1, 125-129

⁷¹ Yang CY, Wang S. *ACS Med Chem Lett.* **2011**, 2, 280-284

⁷² Geppert T, Hoy B, Wessler S, Schneider G. *Chem Biol.* **2011**, 18, 344-353

2.3 Développement d'inhibiteurs peptidiques et peptidomimétiques d'PPI

2.3.1 Inhibiteurs peptidiques d'PPIs

Les peptides sont des “mini protéines”, considérés également comme des fragments isolés des protéines. La différence entre protéine et peptide est la longueur de la séquence (le nombre d'acides aminés). Une chaîne simple constituée de moins de 50 acides aminés est généralement appelée peptide. Les protéines sont des polypeptides. Les peptides dans le corps humain ont souvent leurs propres fonctions biologiques, par exemple, l'insuline est une hormone peptidique avec un rôle essentiel dans le métabolisme du glucose.

Les inhibiteurs peptidiques d'PPI sont des peptides conçus à partir de complexes protéiques. Ils ont plusieurs avantages comme la similarité avec le fragment protéique, la possibilité d'être synthétisés par synthèse et l'existence de multiples groupes fonctionnels⁷³. Ils servent à mimer un site d'interaction d'une protéine et se fixent sur la surface de l'autre protéine pour bloquer l'interaction. Comme indiqué précédemment, la conception rationnelle d'inhibiteurs peptidiques est très dépendante des résidus ou des régions « Hot spots ». La conception initiale d'inhibiteurs consiste normalement à choisir un fragment de séquence de la « Hot spot region »⁷³. Ce fragment de la séquence naturelle d'une protéine a la possibilité de se fixer sur son partenaire et de bloquer leur interaction⁷⁴. En dehors des épitopes de reconnaissance conformationnelle, dans lesquels les acides aminés importants sont localisés sur des fragments totalement différents et éloignés en terme de séquence primaire, les fragments du « Hot spot region » sont souvent structurés selon une structure secondaire bien définie dans la protéine : une hélice alpha, un coude ou un feuillet beta, qui présentent tous une structure contrainte (**Figure 9b**). Ces structures secondaires de protéine sont stables et favorisées par des interactions intramoléculaires entre différents résidus de la protéine. Un exemple d'interaction protéine-protéine et les résidus « Hot spots » est présenté dans la **Figure 9**⁷⁵. Dans l'interaction de deux protéines « Small GTPase Ras » et « RafGDP » (**Figure 9a**, gauche PDB : 1LFD⁷⁶), les « Hot spots » de ces deux protéines marquées en rouge sont présentés en surface et en stick à droite⁷⁷. Les structures des fragments présentés en stick dans la **Figure 9a** correspondent à des structures secondaires de peptides qui sont montrées dans la **Figure 9b**.

⁷³ Wójcik P, Berlicki Ł. *Bioorg Med Chem Lett*. **2016**, 26, 707-713

⁷⁴ Kuenemann MA, Sperandio O, Labbé CM, et al. *Prog Biophys Mol Biol*. **2015**, 119, 20-32

⁷⁵ M. Pelay-Gimeno, A. Glas, O. Koch, et al. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2015**, 54, 8896-8927

⁷⁶ Huang L, Hofer F, Martin GS, et al. *Nat Struct Biol*. **1998**, 5, 422-426

⁷⁷ Kiel C, Serrano L, Herrmann C. *J Mol Biol*. **2004**, 340, 1039-1058

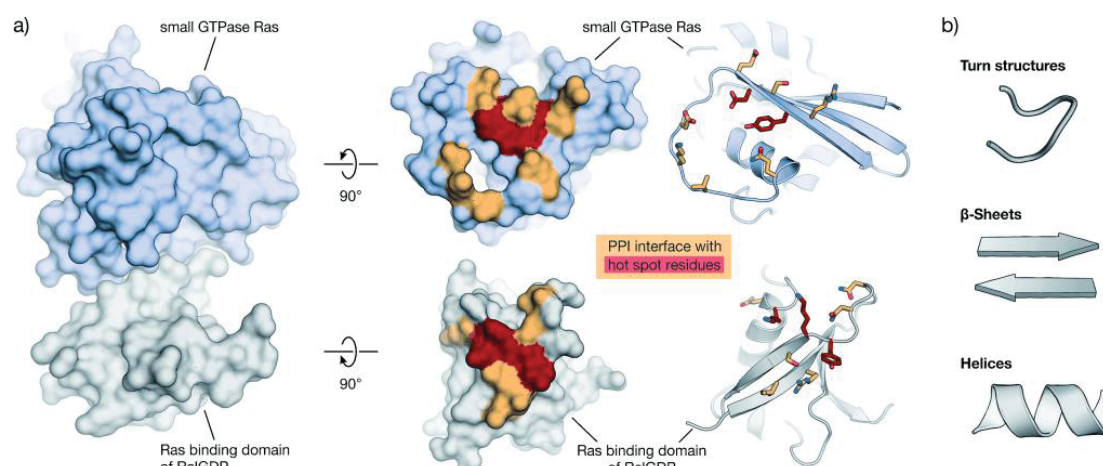


Figure 9. Exemple d'interaction protéine-protéine de Ras avec RalGDP. (a) Les résidus hotspots sont marqué en rouge dans les deux protéines en deux modèles différents (surface et stick). (b) Structure secondaire de fragment protéine (peptide). Figure d'après M. Pelay-Gimeno *et al.*⁷⁵.

Les résidus « Hot spots » sont souvent dispersés dans les différents fragments d'une protéine. Chaque fragment peut être un modèle structural pour un inhibiteur. Cependant, une reconstitution ou une réorganisation de plusieurs résidus « Hot spots » est habituellement requise pour concevoir des inhibiteurs avec de meilleures affinités. L'affinité des inhibiteurs peptidiques dépend de la structure secondaire des peptides isolés en solution aqueuse et de la structure en interaction avec son partenaire⁷⁹. Les peptides linéaires courts naturels sont généralement instables et facilement dégradés par les peptidases^{78,79}. Comparés aux peptides linéaires, les peptides contraints et structurés ont une variation d'entropie énergétique (ΔS) plus basse dans l'interaction avec la protéine. Il a de plus été montré que les peptides contraints sont plus résistants aux enzymes protéolytiques, plus sélectifs et passent parfois mieux les membranes cellulaires⁸⁰. Par conséquent, la modification de la séquence naturelle et l'introduction d'acides aminés non-naturels est une méthode approuvée pour le développement d'inhibiteurs peptidiques.

⁷⁸ K. N. Houk, A. G. Leach, S. P. Kim, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4872-4897

⁷⁹ London N, Raveh B, Movshovitz-Attias D, et al. *Proteins*. **2010**, 78, 3140-3149

⁸⁰ Azzarito V, Long K, Murphy NS, et al. *Nat Chem*. **2013**, 5, 161-173

2.3.2 Stratégies pour stabiliser la structure secondaire des inhibiteurs peptidiques

La conception rationnelle d'inhibiteurs peptidiques d'PPI est normalement basée sur la structure secondaire d'un fragment protéique. Un fragment isolé d'une protéine ne conserve en général pas sa structure secondaire. Une stabilisation de cette structure secondaire est donc nécessaire pour que le fragment isolé mime correctement sa conformation dans la protéine. Quatre conformations, le coude, la boucle (ou aussi appelé boucle est « loop » flexible), l'hélice et le feuillet- β sont les structures les plus étudiées⁸¹.

- Mimes des structures coude et boucle.

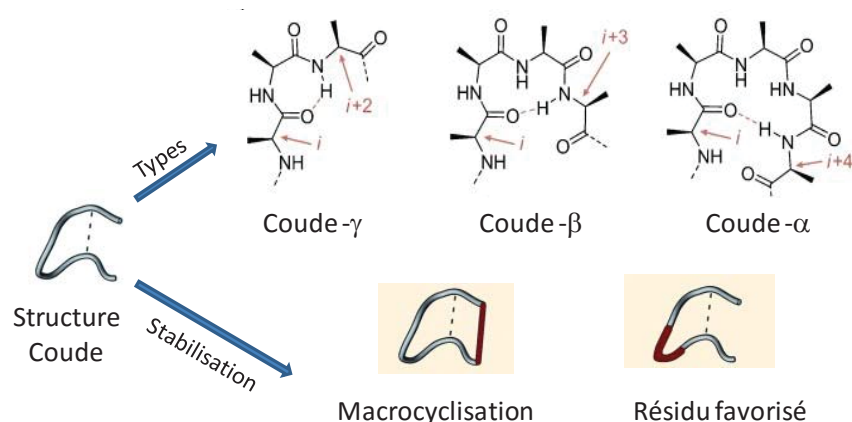


Figure 10. Structure coude et boucle dans les protéines et stratégies de stabilisation.

Les structures « coude » et « boucle » sont des structures permettant à la chaîne peptidique de se replier vers elle-même. Ce sont des structures de base pour la formation de protéines globulaires⁸². Selon la liaison hydrogène entre les résidus i et $i + n$, les coudes sont divisés en 4 familles : coude- α , coude- β , coude- γ et coude- π ⁸³. Ces structures coudes sont importantes pour le repliement de la protéine. Il s'agit d'une conformation flexible, en général sans liaison-hydrogène entre les atomes de la chaîne principale des résidus. Dans la protéine, elle relie les parties de structures secondaires pour constituer la structure tertiaire. Certains coudes et boucles localisés sur la surface de la protéine participent à des interactions protéine-protéine et sont considérés comme des motifs favorables pour la conception d'inhibiteurs d'PPIs⁸⁴.

Dans une protéine, les structures coudes et boucles sont induites par des interactions intramoléculaires de résidus. Les fragments isolés des structures « coude » et « boucle » ne gardent souvent pas la conformation d'origine. Les

⁸¹ Dharanipragada R. *Future Med Chem.* **2013**, 5, 831-849

⁸² C. M. Venkatachalam. *Biopolymers* **1968**, 6, 1425-1436

⁸³ K.-C. Chou. *Anal. Biochem.* **2000**, 286, 1-16.

⁸⁴ Gavenonis J, Sheneman BA, Siegert TR, et al. *Nat Chem Biol.* **2014**, 10, 716-722

inhibiteurs mimant les coudes et boucles nécessitent une stratégie de stabilisation de leur structure. La conception de peptides cycliques est ainsi une stratégie commune pour ce but. Cette stratégie est aussi appelée macrocyclisation car la cyclisation des peptides forme un peptide macrocyclique, peut se faire de façon « Head-to-tail » ou « Head/Tail-to-Side Chain » ou « Side Chain-to-Side Chain »^{85, 86}. La macrocyclisation peut stabiliser non seulement le coude et la boucle mais aussi les autres structures comme les hélices ou les feuillet- β (précisé dans la partie suivante). C'est une stratégie efficace pour développer des inhibiteurs structurés d'PPI. Par exemple, des peptides cycliques^{87,88} mimant la boucle développés par Tavassoli *et al.* pour inhiber l'interaction Gag/TSG101 ou HIF-1 α /HIF-1 β ont montré une bonne affinité. Parfois, les résidus qui favorisent la conformation coude et boucle sont introduit pour leur stabilisation, par exemple, les acides aminés **Pro**, **Gly**, **Asn** et **Asp** sont plus fréquents dans les coude- β ⁸⁹.

Il existe également une grande famille de molécules appelées « turn mimetics ». Ce sont souvent des molécules cycliques portant des fonctions capables de relier les chaînes peptidiques au niveau de coudes⁷⁵. L'introduction de ces molécules dans une séquence peptidique favorise ou oblige le peptide à adopter une conformation coudée. Plusieurs études ont été effectuées sur les coudes- β mimétiques (**Figure 11**).

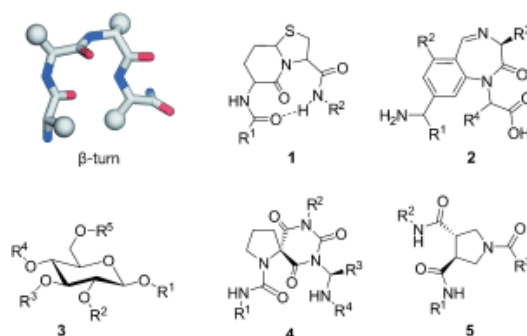


Figure 11. Conformation de coude- β mimétique. (1) Peptide bicyclique⁹⁰; (2) Benzodiazepine⁹¹; (3) dérivé du glucose⁹²; (4) Mimétique spirocyclique⁹³; (5) trans-pyrrolidine-3,4-dicarboxamide⁹⁴. Figure d'après M. Pelay-Gimeno *et al.*⁷⁵.

⁸⁵ White CJ, Yudin AK. *Nat Chem.* **2011**, 3, 509-524

⁸⁶ Pelay-Gimeno M, Tulla-Puche J, Albericio F. *Mar Drugs.* **2013**, 11, 1693-1717

⁸⁷ Tavassoli A, Lu Q, Gam J, et al. *ACS Chem Biol.* **2008**, 3, 757-764

⁸⁸ Miranda E, Nordgren IK, Male AL, et al. *J Am Chem Soc.* **2013**, 135, 10418-10425

⁸⁹ Koch O, Klebe G. *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2009**, 74, 353-367

⁹⁰ Nagai U, Sato K, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 647-650

⁹¹ Ripka WC, De Lucca GV, Bach II AC, et al. *Tetrahedron.* **1993**, 49, 3593-3608

⁹² Hirschmann R, Nicolaou KC, Pietranico S, et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9217-9218.

⁹³ Lomlim L, Einsiedel J, Heinemann FW, et al. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 3608-3611

⁹⁴ Whitby LR, Ando Y, Setola V, et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 10184-10194

- Mimétiques de la structure feuillet- β .

La structure en feuillet- β est une conformation dans laquelle le peptide adopte une conformation étendue avec des angles dièdres bien définis (ϕ, ψ) = $(-120^\circ, 115^\circ)$. Les liaisons hydrogènes se forment entre les deux brins et stabilisent cette conformation⁷⁹. Il existe deux types de feuillet- β , parallèles et antiparallèles (**Figure 12a et 12b**). Les feuillets- β sont importants dans la formation de structure tertiaire et quaternaire de la protéine, l'agrégation des protéines et les interactions protéine-protéine⁷⁹. La structure constituée par deux brins antiparallèle est appelé épinge- β ⁹⁵. La structure mimétique de ces conformations constitue une autre partie importante dans le développement d'inhibiteurs d'PPI.

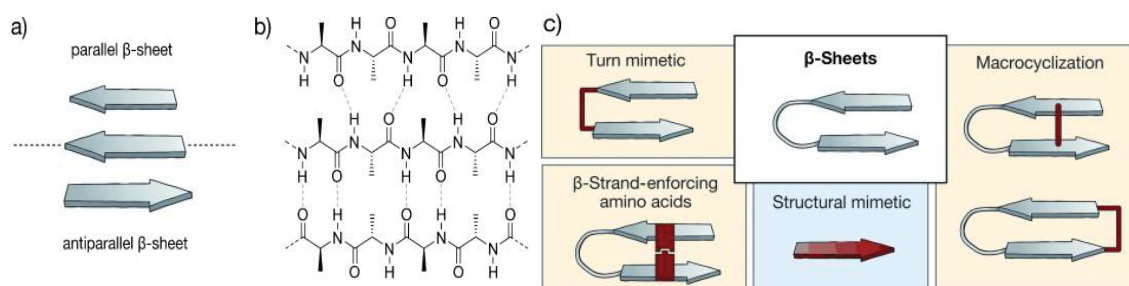


Figure 12. Structure feuillet- β et stratégie de stabilisation. (a) Présentation schématique des feuillets- β parallèles et antiparallèles. (b) réseaux de liaisons hydrogènes existant dans les feuillets- β parallèles et antiparallèles. (c) Stratégie de stabilisation de feuillet- β . Figure d'après M. Pelay-Gimeno et al⁷⁵.

Il existe plusieurs types de stratégies pour mimer un feuillet- β ou l'épinge- β : le mimétique de coude, la macrocyclisation et l'insertion d'acides aminés de structure favorable (**Figure 12c**).

Les mimétiques de coudes de feuillet- β et d'épinge- β sont différents des mimétiques de coudes et-boucles décrits précédemment. Le coude de feuillet- β et épinge- β sert à positionner les deux brins peptidiques en parallèle. Certains modèles comme D -Pro-L-Pro^{96, 97} et D -Pro-Gly⁹⁸ sont des dipeptides pour stabiliser l'épinge- β , D -Pro-DADME (1,2-diamino-1,1-diméthylethane) favorise le feuillet- β ⁹⁹. En effet, le modèle de dipeptide D -Pro-L-Pro est déjà utilisé dans le développement d'inhibiteurs des PPIs basés sur l'épinge- β ¹⁰⁰.

⁹⁵ Sibanda BL, Thornton JM. *Nature* **1985**, 316, 170-174

⁹⁶ Athanassiou Z, Dias RL, Moehle K, et al. *J Am Chem Soc.* **2004**, 126, 6906-6913

⁹⁷ Chatterjee B, Saha I, Raghothama S, et al. *Chemistry*. **2008**, 14, 6192-6204

⁹⁸ Stanger HE, Gellman SH. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4236-4237

⁹⁹ J. M. Langenhan, I. A. Guzei, S. H. Gellman. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2402-2405

¹⁰⁰ Fasan R, Dias RL, Moehle K, et al. *ChemBiochem.* **2006**, 7, 515-26

Les conformations en feuillet- β et épingle- β peuvent aussi être stabilisées par la macrocyclisation entre le C-terminal et N-terminal du peptide ou entre les chaînes latérales. La macrocyclisation entre les extrémités C-terminales et N-terminales rapproche les deux brins et renforce les liaisons hydrogène entre eux¹⁰¹. Les résidus à l'opposé de la structure qui n'ont pas de liaison hydrogène peuvent être remplacés par deux cystéines reliées par pont disulfure qui stabilise la conformation feuillet- β et épingle- β ¹⁰². Deux inhibiteurs peptidiques (numéroté 1 et 63) d'interaction p53–HDM2 développés par Fasan R *et al.* basés sur le modèle D-Pro-L-Pro et la macrocyclisation ont montré une conformation stabilisée en épingle- β et une activité biologique (**Figure 13**)¹⁰⁰.

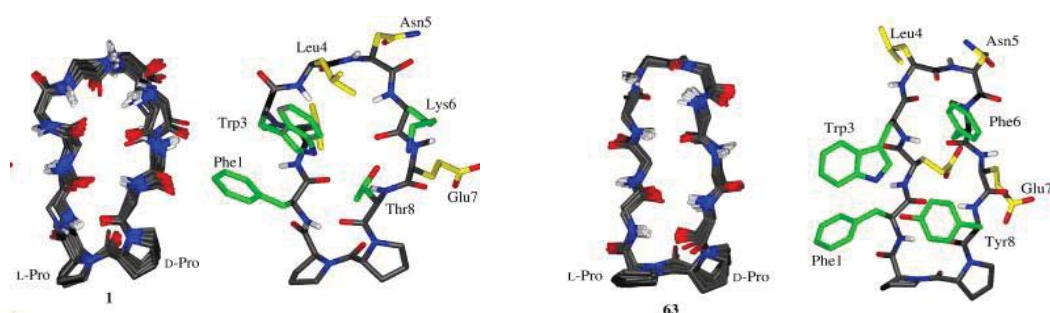


Figure 13. Deux inhibiteurs peptidiques (1 et 63) de p53–HDM2 et leur structure déterminée par RMN. Figure d'après Fasan R *et al.*¹⁰⁰.

L'autre stratégie pour stabiliser la conformation en feuillet- β et épingle- β est d'utiliser des acides aminés modifiés ou des modèles chimiques comme l'acide aminé Hao (5-hydrazino-2-methoxybenzoic acid)¹⁰³. Cependant, aucun inhibiteur d'PPI basé sur ces modèles chimiques ayant une activité biologique n'a été développé jusqu'à présent⁷⁹.

¹⁰¹ Chan LY, Zhang VM, Huang YH, *et al.* *Chembiochem.* **2013**, 14, 617-624

¹⁰² Almeida AM, Li R, Gellman SH. *J Am Chem Soc.* **2012**, 134, 75-78

¹⁰³ Nowick JS, Holmes DL, Mackin G, *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2764-2765

- Mimétiques de la structure hélice.

Dans les structures de protéines connues, environ 30-40 % des structures secondaires sont des hélices¹⁰⁴. Selon la liaison hydrogène présente entre les résidus en position i et $i + n$, les structures hélices sont classées en 3_{10} -, 3.6_{13} -, and 4.4_{16} -hélice. Parmi eux, l'hélice 3.6_{13} , souvent appelé hélice- α , constitue la plupart des conformations en hélice⁷⁹. Les hélices participent à beaucoup d'interactions protéine-protéine¹⁰⁵, elles peuvent d'être un point de départ pour concevoir des inhibiteurs d'PPI¹⁰⁶. La stabilisation d'hélice- α est une approche largement répandue.

Il existe généralement 3 types de stratégies pour stabiliser la conformation en hélice- α : la cyclisation entre chaîne latérale, la cyclisation entre les carbone- α , et le remplacement de liaison hydrogène par liaison covalente (**Figure 14**).

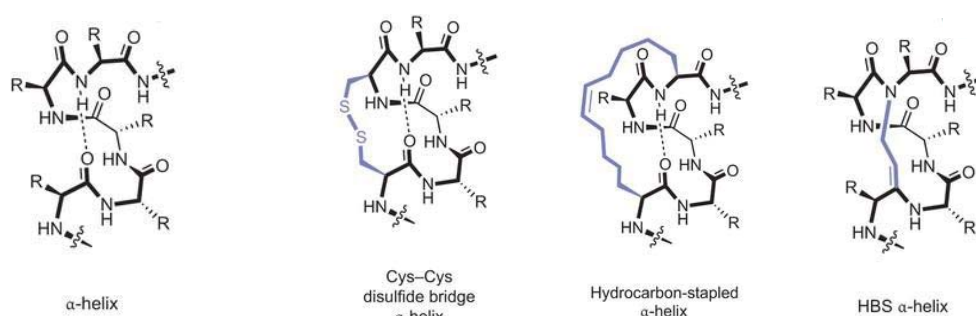


Figure 14. Structure d'une hélice α et stratégies pour la stabiliser. Figure d'après Azzarito V et al.¹⁰⁷.

- (1) Cyclisation entre chaînes latérales. Dans une protéine naturelle, l'hélice- α est stabilisée par les liaisons hydrogènes entre les résidus i et $i + 4$. Les chaînes latérales des résidus i , $i + 4$ et $i + 7$ sont orientées du même côté. L'introduction de linkers liant les chaînes latérales de ces résidus formant une liaison covalente entre les résidus i et $i + 4$ ou i et $i + 7$ peut stabiliser la conformation en hélice- α . Les premiers exemples sont des cyclisations entre les chaînes latérales d'acide glutamate et de lysine¹⁰⁸ ou un pont disulfure entre deux cystéines¹⁰⁹ en position i et $i + 4$. Ensuite, plus de linkers ont été développés pour remplacer ces liaisons, par exemple des liaisons basées sur les disulfures : dérivés de *m*-xylène¹¹⁰, dérivés de bisarylméthylène^{111,112}

¹⁰⁴ Koch O, Cole J, Block P, et al. *J Chem Inf Model*. **2009**, 49, 2388-2402

¹⁰⁵ Bullock BN, Jochim AL, Arora PS. *J Am Chem Soc*. **2011**, 133, 14220-14223

¹⁰⁶ Jochim AL, Arora PS. *ACS Chem Biol*. **2010**, 5, 919-923

¹⁰⁷ Azzarito V, Long K, Murphy NS, et al. *Nat Chem*. **2013**, 5, 161-173

¹⁰⁸ Chorev M1, Roubini E, McKee RL, et al. *Biochemistry*. **1991**, 30, 5968-5974

¹⁰⁹ Jackson DY, King DS, Chmielewski J, et al. *J. Am. Chem. Soc*. **1991**, 113, 9391-9392

¹¹⁰ Jo H, Meinhardt N, Wu Y, et al. *J. Am. Chem. Soc*. **2012**, 134, 17704-17713

¹¹¹ Muppidi A, Wang Z, Li X, et al. *Chem. Commun*. **2011**, 47, 9396-9398

¹¹² Muppidi A, Doi K, Edwardraja S, et al. *J. Am. Chem. Soc*. **2012**, 134, 14734-14737

(Figure 15). Il existe également d'autres linkers ou cyclisation de chaîne latérale pour favoriser l'hélice- α , par exemple la cyclisation entre deux résidus D^- et L^- -cystéine en position i et $i + 3$ induit la structuration du peptide en hélice¹¹³. Le groupement [1,2,3]-triazole est aussi utilisé comme linker de chaîne latérale en position i et $i + 4$ pour former des peptides structurés en hélice- α ¹¹⁴. De nombreux inhibiteurs d'PPI sont développés avec cette stratégie, dont certains qui présentent de bonnes activités biologiques¹¹⁵.

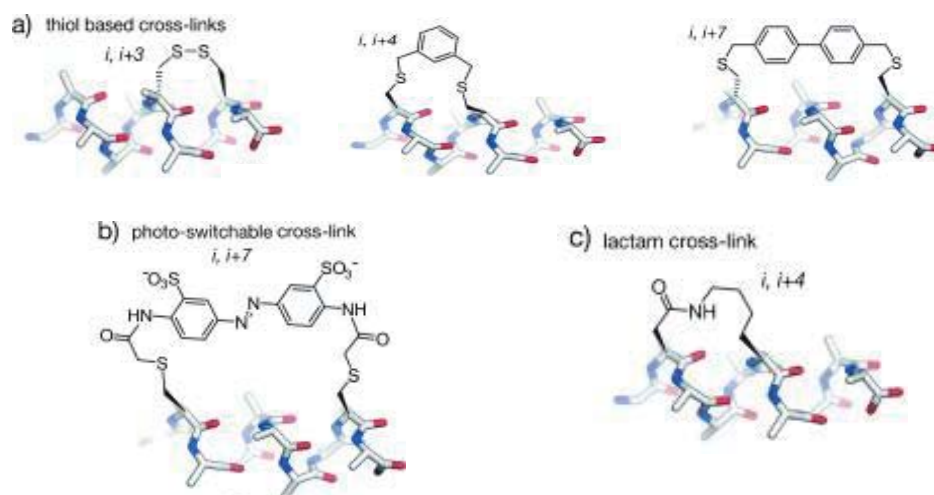


Figure 15. Différents linkers de chaîne latérale pour stabiliser les hélices- α . Figure d'après Milroy LG *et al.*⁵⁹.

- (2) Cyclisation entre les carbones- α . Cette stratégie consiste à introduire un linker pour lier les carbones- α entre les résidus i et $i + 4$ ou i et $i + 7$ pour stabiliser l'hélice- α (Figure 16). Il faut alors d'abord méthyler les deux carbones- α désirés et ensuite introduire un linker puis la cyclisation finale est réalisée par métathèse des oléfines¹¹⁶. Les premiers exemples de peptides hélices stabilisé par cette méthode ont montré une conformation correcte en hélice^{117,118}. Des inhibiteurs peptidiques d'PPI développés par cette méthode ont montré des avantages comme une conformation plus stable, la résistance aux protéases et parfois une meilleure absorption par des cellules^{119,120,121}. Récemment, des chercheurs ont utilisé deux linkers indépendant¹²² ou deux linkers connectés par le carbone- α au milieu¹²³ pour renforcer encore plus l'hélice- α .

¹¹³ Leduc AM, Trent JO, Wittliff JL, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 11273-11278

¹¹⁴ Cantel S, Isaad Ale C, Scrima M, et al. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 5663-5674

¹¹⁵ Baek S, Kutchukian PS, Verdine GL, et al. *J Am Chem Soc.* **2012**, 134, 103-106

¹¹⁶ Schafmeister CE, Po J, G. L. Verdine GL. *J Am Chem Soc.* **2000**, 122, 5891-5892

¹¹⁷ H. E. Blackwell, R. H. Grubbs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3281-3284

¹¹⁸ Blackwell HE, Sadowsky JD, Howard RJ, et al. *J Org Chem.* **2001**, 66, 5291-5302

¹¹⁹ Grossmann TN, Yeh JT, Bowman BR, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2012**, 109, 17942-17947

¹²⁰ Cui HK, Zhao B, Li Y, et al. *Cell Res.* **2013**, 23, 581-584

¹²¹ Q. Chu, R. E. Moellering, G. J. Hilinski, et al. *MedChemComm* **2015**, 6, 111-119

¹²² Bird GH, Madani N, Perry AF, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2010**, 107, 14093-14098

¹²³ Hilinski GJ, Kim YW, Hong J, et al. *J Am Chem Soc.* **2014**, 136, 12314-12322

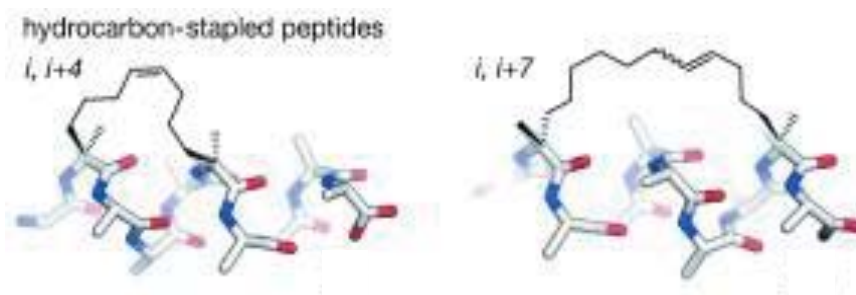


Figure 16. Linker entre les carbone- α pour stabiliser une hélice- α .

- (3) Remplacement d'une liaison hydrogène par une liaison covalente. Cette méthode est aussi appelée la capture N-terminale, car l'analyse de données structurales a montré que la liaison hydrogène en N-terminal augmente le degré d'hélicité des peptides⁷⁹. Le remplacement de liaison hydrogène est souvent effectué par introduction d'un groupement artificiel en N-terminal pour initier l'hélice- α . L'exemple le plus connu dans le développement d'inhibiteurs peptidiques d'PPI est le remplacement de liaison hydrogène, dans lequel la liaison hydrogène entre le C=O de l'acide aminé en N-terminal (i) et le NH du résidu en $i + 4$ est remplacé par une liaison covalente¹²⁴. Cette stratégie pour développer des peptides en hélice est bien avancé par l'équipe d'Arora avec différents linker comme une liaison alcène ou thioéther^{125,126,127}.

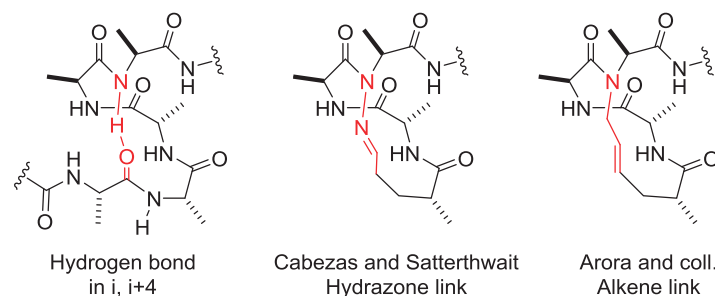


Figure 17. Remplacement d'une liaison hydrogène par une liaison covalente pour stabiliser l'hélice- α .

En conclusion, des efforts pour stabiliser les conformations de peptide ont été effectués et constituent des approches intéressantes. Ces approches sont ainsi appliquées dans la recherche d'inhibiteurs de l'angiogenèse tumorale initiées par l'interaction du VEGF avec ses récepteurs. L'inhibition de cette interaction VEGF/VEGFR constitue mon projet de thèse. Je résumerai d'abord les inhibiteurs développés dans la littérature, puis présenterai mes travaux de recherches.

¹²⁴ Cabezas E, Satterthwait AC. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3862-3875

¹²⁵ Chapman RN, Dimartino G, Arora PS. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12252-12253

¹²⁶ Patgiri A, Menzenski MZ, Mahon AB, et al. *Nat. Protoc.* **2010**, 5, 1857-1865

¹²⁷ Kushal S, Lao BB, Henchey LK, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 15602-15607

III. Développement d'inhibiteurs peptidiques de l'interaction VEGF/VEGFR

3.1 Le système VEGF/VEGFR

3.1.1 L'interaction VEGF/VEGFR et l'angiogenèse

Comme indiqué dans la partie précédente, les interactions protéine-protéine peuvent provoquer plusieurs effets biologiques. Les interactions entre les VEGFs et leurs récepteurs (VEGFRs) induisent des effets biologiques comme l'angiogenèse et la lymphangiogenèse. Nous nous intéressons particulièrement à l'angiogenèse provoquée par l'interaction du VEGF-A avec les VEGFR1 et VEGFR2.

Selon le nombre d'acide aminé dans la séquence, le VEGF-A contient différents isoformes comme le VEGF₁₂₁, le VEGF₁₄₅, le VEGF₁₆₅ ou le VEGF₁₈₉¹²⁸. Le VEGF₁₆₅ (appelé VEGF) est prédominant chez l'homme et il joue un rôle important en angiogenèse. Le VEGF se fixe sur deux types de VEGFR, VEGFR1 et VEGFR2 qui ont une structure similaire. Ils sont structurés tous les deux en 7 domaines immunoglobulines extracellulaires, un domaine juxtamembranaire et deux domaines tyrosines kinases intracellulaires. Ils ont 43.2 % d'homologie en total, dont 33.3 % pour les domaines extracellulaires et 54.6 % pour les domaines tyrosines kinases¹²⁹. Le VEGF se fixe sur la partie extracellulaire, notamment les domaines D1-D3. Cette fixation de VEGF sur un monomère de VEGFR1 ou VEGFR2 permet de la dimérisation du récepteur et la formation d'un homodimère de VEGFR1 ou de VEGFR2. Il existe aussi des hétérodimères de VEGFR1 et VEGFR2. La dimérisation des VEGFR active ensuite les domaines tyrosine kinases puis induit la signalisation intracellulaire pour la survie, la prolifération et la migration des cellules. Le processus d'activation de VEGFR est résumé par Stuttfield E *et al.* (**Figure 18**)¹³⁰.

¹²⁸ Takahashi N, Shibuya M. *Clinical Science*, **2005**, 109, 227-241

¹²⁹ Rahimi N. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. **2006**, 11, 818-829

¹³⁰ Stuttfield E, Ballmer-Hofer K. *IUBMB Life*, **2009**, 61, 915-922

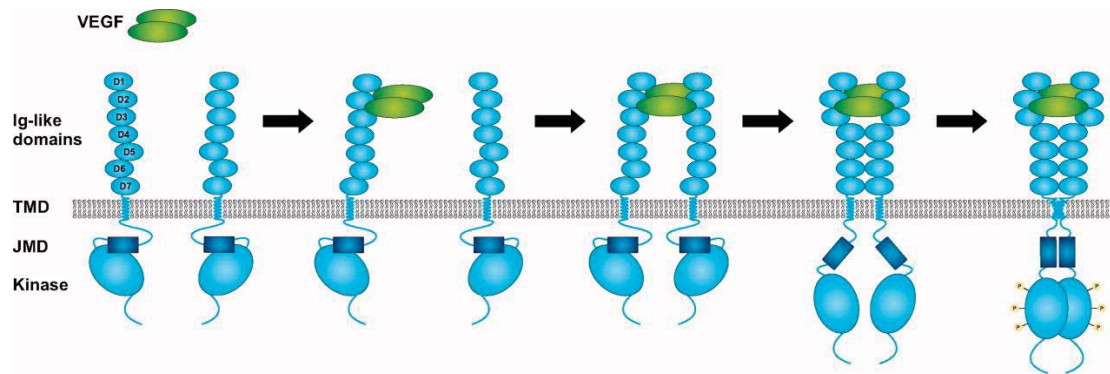


Figure 18. Structure générale des VEGFR1 et VEGFR2, et mécanisme de dimérisation après fixation du VEGF sur le domaine extracellulaire. Figure d'après Stüttfeld E *et al.*¹³⁰.

Ce mécanisme de dimérisation du VEGFR a déjà été à la base de stratégies anti-angiogéniques. Le système VEGF/VEGFR peut être bloqué soit au niveau de l'interaction VEGF avec ses récepteurs soit par inhibition directe de l'activité tyrosine kinase. Ces deux approches sont validées avec succès en clinique. On peut citer l'Avastin®, le Cyramza® ou le Sutent®.

Le VEGFR2 a longtemps été considéré comme le récepteur le plus impliqué dans l'angiogenèse physiologique et tumorale. En effet, l'activation du VEGFR2 génère une forte signalisation intracellulaire¹³¹. L'interaction VEGF/VEGFR2 induit des réponses cellulaires par différentes voies de signalisation, par exemple la voie PI3K pour la survie des cellules endothéliales¹³², la voie de PLC- γ pour la prolifération des cellules¹³³. Plusieurs recherches ont montré dans des modèles *in vitro* et *in vivo* que l'activation du VEGFR2 par ses ligands stimule l'angiogenèse^{134,135}.

Bien que le VEGFR1 a une affinité excellente avec le VEGF ($K_d = 1 \sim 10$ pM), soit 10 fois plus que l'affinité du VEGFR2 avec le VEGF, l'activité tyrosine kinase du VEGFR1 est 10 fois plus faible que celle du VEGFR2¹³⁶. Ainsi, pendant longtemps le VEGFR1 a été considéré comme un régulateur négatif de l'angiogenèse à cause de sa meilleure affinité avec le VEGF (« piège à VEGF »)¹³⁷. Il a été montré que la capture du VEGF par le VEGFR1 a diminué le taux de VEGF interagissant avec le VEGFR2¹²⁸. Il a été cependant montré par la suite que la suppression du VEGFR1 induit la prolifération des cellules endothéliales¹³⁸. Il existe de plus un type de VEGFR1, le VEGFR1 soluble (sFlt1) qui est constitué seulement par la partie extracellulaire du VEGFR1. Ce sFlt1 peut capturer le VEGF et diminuer son taux dans le plasma et interférer avec l'angiogenèse¹³⁹. La dimérisation de sFlt1 avec le VEGFR2 n'a pas de fonction

¹³¹ Koch S, Tugues S, Li X, et al. *Biochem J.* **2011**, 437, 169-183

¹³² Gerber HP, McMurtry A, Kowalski J, et al. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 30336-30343.

¹³³ Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, et al. *EMBO J.* **2001**, 20, 2768-2778

¹³⁴ Youssoufian H, Hicklin DJ, Rowinsky EK. *Clin Cancer Res.* **2007**, 13, 5544-5548

¹³⁵ Delcombel R, Janssen L, Vassy R, et al. *Angiogenesis.* **2013**, 16, 353-371

¹³⁶ Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, et al. *Cell Growth Differ.* **1996**, 7, 213-221

¹³⁷ Kappas NC, Zeng G, Chappell JC, et al. *J Cell Biol.* **2008**, 181, 847-858

¹³⁸ Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, et al. *Nature.* **1995**, 376, 66-70

¹³⁹ Maynard SE, Min JY, Merchan J, et al. *J Clin Invest.* **2003**, 111, 649-658

biologique¹⁴⁰. L'ensemble de ces résultats montrent un rôle négatif du VEGFR1 dans l'angiogenèse.

Cependant, d'autres recherches ont montré que le VEGFR1 est indispensable dans certains processus d'angiogenèse, l'interaction VEGFR1 avec ses ligands spécifique, VEGF-B et PlGF a montré l'activation de tyrosine kinase et l'activation de voies de signalisation intracellulaires¹⁴¹. Bien que les voies de signalisation activées par l'interaction VEGF/VEGFR1 sont moins nombreuses, le VEGFR1 a été montré comme ayant une implication très importante dans l'angiogenèse tumorale^{142,143,144}. Une mutation du gène codant de VEGFR1 et une neutralisation du VEGFR1 par des anticorps ont permis un ralentissement de la croissance de tumeur chez les souris^{135,145}. De plus, Wu *et al.* ont montré par xénogreffe chez la souris que dans certaines lignées tumorales, du sein, la signalisation de croissance était directement induite par l'activation du VEGFR1¹⁴⁶.

En conséquence, le VEGFR1 et le VEGFR2 sont tous les deux importants pour le processus d'angiogenèse. Le VEGFR1 semble plus impliqué dans l'angiogenèse pathologique comme l'angiogenèse tumorale. Nous nous intéresserons donc plus particulièrement à l'interaction entre le VEGF et le VEGFR1.

3.1.2 Interaction VEGF/VEGFR1

Le VEGF se fixe sur la partie extracellulaire du VEGFR1. Wiesmann C *et al.* ont étudié l'interaction entre le VEGF et le VEGFR1 et résolu la structure cristallographique du complexe VEGF/domaine D2 du VEGFR1¹⁴⁷. Dans cette étude, le fragment (1-110) du VEGF-A₁₆₅, dont l'affinité a été montrée comme étant équivalente à celle du VEGF-A₁₆₅ pour la fixation sur le VEGFR1 a été utilisé¹⁴⁸. Une étude de délétion des domaines extracellulaires du VEGFR1 a montré que le fragment D2-D3 a une affinité proche de celle du domaine extracellulaire entier (D1-D7, domaines extracellulaires). Le domaine D2 seul est environ 20 fois moins affin que le domaine D2-D3 mais l'affinité résultante a été suffisante pour interagir avec le VEGF. Par conséquent, l'étude a été faite en utilisant le VEGF-A (8-109) sous forme dimérique avec VEGFR1 D2 (**Figure 19**).

¹⁴⁰ Kendall RL, Wang G, DiSalvo J, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* **1994**, 201, 326-330

¹⁴¹ Tchaikovski V, Fellbrich G, Waltenberger J. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2008**, 28, 322-328

¹⁴² Kerber M, Reiss Y, Wickersheim A, et al. *Cancer Res.* **2008**, 68, 7342-7351

¹⁴³ Muramatsu M, Yamamoto S, Osawa T, et al. *Cancer Res.* **2010**, 70, 8211-8221

¹⁴⁴ Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, et al. *Cancer Cell.* **2002**, 2, 289-300

¹⁴⁵ Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. *Nature.* **2005**, 438, 820-827

¹⁴⁶ Wu Y, Hooper AT, Zhong Z, et al. *Int J Cancer.* **2006**, 119, 1519-1529

¹⁴⁷ Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, et al. *Cell.* **1997**, 91, 695-704

¹⁴⁸ Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, et al. *J Biol Chem.* **1996**, 271, 7788-7795

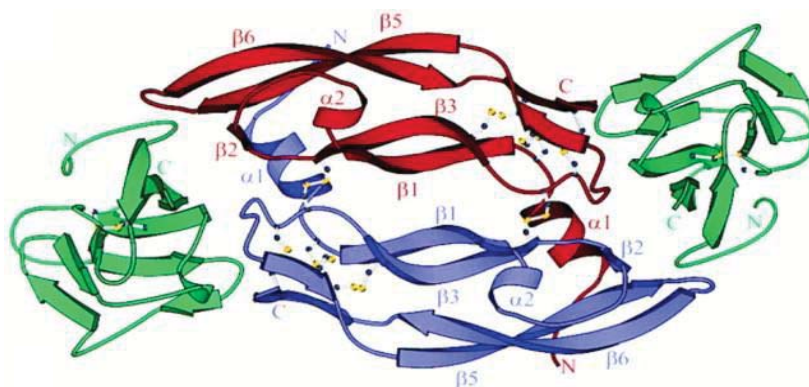


Figure 19. Structure cristallographique du VEGF (8-109) dimère avec le VEGFR1 D2. Les deux monomères de VEGF sont en rouge et bleu, les deux domaines D2 du VEGFR1 sont en vert. Figure d'après Wiesmann C *et al.*¹⁴⁷.

La structure est symétrique. Sur le VEGF, 3 fragments d'un monomère ont été montré comme étant en interaction avec la VEGFR1 D2 : l'hélice $\alpha 1$ (résidus 16-27) et la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ (résidu 61-66) avec un domaine D2 du VEGFR1, la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ (79-91) avec l'autre domaine D2 du VEGFR1.

Ensuite, une étude de « Alanine Scanning » a été réalisée pour identifier les « Hot spots » sur le fragment du VEGF et du VEGFR1 D2¹⁵⁰. Du côté VEGF, les résidus « Hot spots » sont dispersés dans 3 fragments : **F17**, **M18**, **Y21**, **Q22** et **Y25** de l'hélice $\alpha 1$; **D63** et **L66** de la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$; **Q79**, **M81**, **I83**, **H86**, **Q89** et **I91** de la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$. Du côté du VEGFR1 D2, les résidus « Hot spots » concernent **P143**, **I145**, **F172**, **I202**, **L204**, **L221**, **H223**.

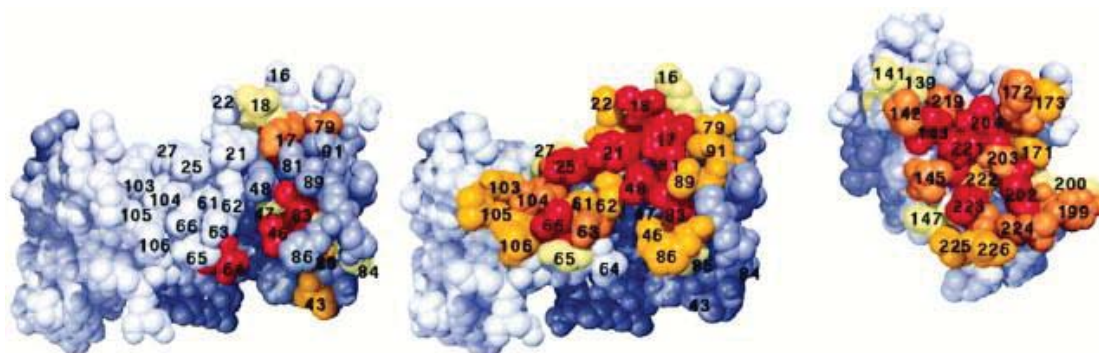


Figure 20. « Hot spots » dans l'interaction VEGF/VEGFR1 D2. A gauche : structure du complexe. Milieu : « Hot spots » du VEGF dimère. Droite : « Hot spots » du VEGFR1 D2. Figure d'après Wiesmann C *et al.*¹⁴⁷. Les couleurs représentent l'importance du résidu dans l'interaction (rouge, 75%–100%; orange, 50%–75%; jaune, 25%–50%; jaune clair, 0%–25%).

Cette structure cristallographique a apporté des informations très importantes. Depuis, de nombreux inhibiteurs d'interaction VEGF/VEGFR1, antagonistes du VEGF, ont été développés par une voie de conception rationnelle.

3.2 Conception rationnelle d'inhibiteurs de l'interaction

VEGF/VEGFR

3.2.1 Inhibiteurs peptidiques ciblant le VEGF

La capture du VEGF dans le plasma est validée pour la thérapie anti-angiogénique, certains médicaments sont déjà utilisés en clinique, comme l'Avastin®, Zaltrap®. La conception du Zaltrap® est basée sur l'interaction VEGF/VEGFR puisqu'il s'agit d'une protéine reconstituée du domaine D2 du VEGFR1 et du domaine D3 du VEGFR2¹⁴⁹. Selon la littérature, il existe néanmoins peu de petites molécules qui bloquent l'interaction VEGF/VEGFR au niveau du VEGF.

Deux peptides (**RTELNVGIDFNWEYPASK** et (**RTELNVGIDFNWEYPAS**)₂**K**) conçu à partir du domaine D3 du VEGFR2 ont été montré capable d'inhiber la fixation du VEGF au VEGFR2, et l'activation qui en découle¹⁵⁰, ainsi que l'inhibition de l'angiogenèse¹⁵¹.

Un autre peptide (**VEPNc[CIHVMWEWEC]FERL**) sélectionné par la technique de « phage display » (une technique de criblage de peptides exprimés par bactérie¹⁵²) a montré la capacité de se fixer sur le VEGF, et les études structurales ont été également réalisées¹⁵³. Au sein de l'équipe, des modifications ont été faites à partir de ce peptide et une série de peptides modifiés a été développée¹⁵⁴.

3.2.2 Inhibiteurs peptidiques ciblant le VEGFR

Un plus grand nombre de recherches ont été effectuées sur des inhibiteurs qui se fixent sur le récepteur. Beaucoup d'inhibiteurs de VEGFR1 ou VEGFR2 ont été sélectionnés par la technique de « phage display ». Par exemple, le peptide (**HTMYHHYQHHL**) qui cible le VEGFR2¹⁵⁵, ou le peptide (**WHSDMEWWYLLG**) qui cible le VEGFR1^{156,157}.

La structure cristallographique du VEGF avec le VEGFR1 a été validée en 1997 par Wiesmann C *et al.*¹⁵¹. Pourtant, la structure cristallographie du VEGF avec le VEGFR2 a été résolue beaucoup plus tard, en 2012 par Brozzo MS *et al.*¹⁵⁸, car l'affinité du

¹⁴⁹ Holash J, Davis S, Papadopoulos N, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002**, 99, 11393-11398

¹⁵⁰ Piossek C, Schneider-Mergener J, Schirner M, et al. *J Biol Chem*. **1999**, 274, 5612-5619

¹⁵¹ Piossek C, Thierauch KH, Schneider-Mergener J, et al. *Thromb Haemost*. **2003**, 90, 501-510

¹⁵² Bazan J, Całkosiński I, Gamian A. *Hum Vaccin Immunother*. **2012**, 8, 1817-1828

¹⁵³ Wiesmann C, Christinger HW, Cochran AG, et al. *Biochemistry*. **1998**, 37, 17765-17772

¹⁵⁴ Reille-Seroussi M, Gaucher JF, Desole C, et al. *Biochemistry*. **2015**, 54, 5147-5156

¹⁵⁵ Hetian L, Ping A, Shumei S, et al. *J Biol Chem*. **2002**, 277, 43137-43142

¹⁵⁶ An P, Lei H, Zhang J, et al. *Int J Cancer*. **2004**, 111, 165-173

¹⁵⁷ Zhou Z, Zhao C, Wang L, et al. *Am J Cancer Res*. **2015**, 5, 3149-3161

¹⁵⁸ Brozzo MS, Bjelić S, Kisko K, et al. *Blood*. **2012**, 119, 1781-1788

VEGF pour le VEGFR2 est plus faible que pour VEGFR1. Ces structures ont permis la conception rationnelle d'inhibiteurs peptidiques.

Les premières conceptions d'inhibiteurs peptidiques de l'interaction VEGF/VEGFR était basé sur le complexe VEGF/VEGFR1 D2. Par exemple, le peptide (cycl.[**FPQIMRIKPHQGQHIGE**]) développé par Zilberberg L *et al.* mime la boucle $\beta 5-\beta 6$ du VEGF¹⁵⁹, le peptide (Ac-**KLTWMELYQLAYKGI**-NH₂) développé par Basile A *et al.* mime l'hélice- $\alpha 1$ du VEGF¹⁶⁰. Ces deux peptides issus de l'interaction VEGF/VEGFR1 ont montré la capacité de bloquer l'interaction VEGF/VEGFR1 et également interaction VEGF/VEGFR2, probablement dû à l'homologie du VEGFR1 et du VEGFR2. Le peptide (Ac-**EEVKFMc[EVYQK]SY**-NH₂) et des analogues, développés par García-Aranda MI *et al.*¹⁶¹, miment aussi l'hélice- $\alpha 1$ du VEGF et bloquent également l'interaction VEGF/VEGFR1.

Enfin, notre équipe a conçu un peptide cyclique (c[**YYDEGLEE**]-NH₂) qui mime la boucle $\beta 3-\beta 4$ et l'hélice- $\alpha 1$ pour inhiber l'interaction VEGF/VEGFR. Ce peptide est basé sur la séquence naturelle de la boucle $\beta 3-\beta 4$ en insérant deux résidus **Tyr** de l'hélice- $\alpha 1$. Cette boucle $\beta 3-\beta 4$ fait une de « Hot spots région » de l'interaction VEGF/VEGFR1 D2 et les deux résidus **Tyr** sont des « Hot spots » dans l'interaction. La conception est issue de la proximité dans l'espace de la boucle et de ces deux résidus aromatiques de l'hélice. Pour mieux mimer la boucle, le peptide est cyclisé de la tête à la chaîne latérale du **Glu** en C-terminal. La capacité d'inhibition d'interaction VEGF/VEGFR1 a été validée dans les travaux précédents^{162,163}. Puis, l'étude RMN et la modélisation ont montré que les deux **Tyr** ne sont pas parallèles. Un « Alanine Scanning » des résidus du peptide a montré que la deuxième Tyr n'est pas essentielle, elle peut être remplacée par une **Lys** ou une **4-hydroxy-coumarinyl-alanine (Hca)** pour des études d'imagerie¹⁶².

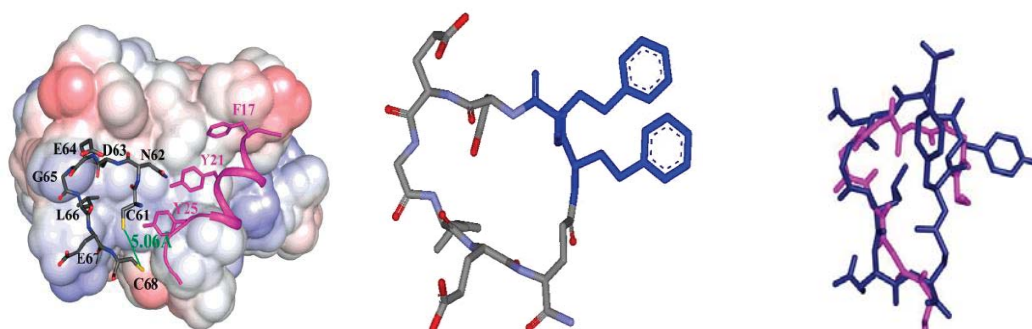


Figure 21. Conception de peptide cyclique en mimant la boucle $\beta 3-\beta 4$ et deux résidus **Tyr** d'hélice- α . Site d'interaction du VEGF avec VEGFR1 D2, la boucle $\beta 3-\beta 4$ et hélice- $\alpha 1$ (gauche). Peptide cyclique dérivé de la conception(milieu). Superposition de la structure moyenne du peptide cyclique obtenu par RNM et la boucle $\beta 3-\beta 4$ (droite).

¹⁵⁹ Zilberberg L, Shinkaruk S, Lequin O, et al. *J Biol Chem.* **2003**, 278, 35564-35573

¹⁶⁰ Basile A, Del Gatto A, Diana D, et al. *J Med Chem.* **2011**, 54, 1391-1400

¹⁶¹ García-Aranda MI, González-López S, Santiveri CM, et al. *Org Biomol Chem.* **2013**, 11, 1896-1905

¹⁶² Goncalves V, Gautier B, Coric P, et al. *J Med Chem.* **2007**, 50, 5135-5146

¹⁶³ Gautier B, Goncalves V, Diana D, et al. *J Med Chem.* **2010**, 53, 4428-4440

IV. Objectifs de la thèse

Le traitement anti-angiogénique pour le cancer par les inhibiteurs d'interaction protéine-protéine a été validé. La détermination de la structure du complexe VEGF/VEGFR nous a permis de concevoir des inhibiteurs peptidiques. Nous nous sommes particulièrement focalisé sur l'interaction VEGF-A/VEGFR1 et le développement d'inhibiteurs de cette interaction.

Suite aux résultats précédents du laboratoire, en particulier ceux du peptide cyclique (c[YYDEGLEE]-NH₂), une partie de mes travaux porte sur l'optimisation de ce peptide et la synthèse de nouveaux peptides, ainsi que leur étude par RMN pour identifier les sites d'interaction du D2 du VEGFR1. La validation cellulaire a également été effectuée. L'objectif n'est pas seulement la poursuite du travail précédent, mais aussi la conception de nouveaux inhibiteurs peptidiques à partir de la structure du complexe VEGF/VEGFR, ainsi que l'obtention de co-structures avec d'autres facteurs comme le VEGF-B ou le PlGF, qui fixent spécifiquement le VEGFR1. Enfin, une attention est particulièrement apportée à la stabilisation en hélice- α . Une stratégie de stabilisation de l'hélice- α par la cyclisation des chaînes latérales est réalisée dans la synthèse d'inhibiteurs peptidiques de l'interaction VEGF/VEGFR. En même temps, une autre série de peptides macrocycliques de type « Hydrogen-bonding surrogates » pour stabiliser les hélices- α en remplaçant une liaison hydrogène par une liaison covalente a été synthétisé. Leurs conformations en solution ont été étudiées par RMN, modélisation moléculaire et dichroïsme circulaire.

La conception, la synthèse des peptides, l'analyse structurale et l'évaluation par test ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) ont été réalisées dans le laboratoire. Le test d'inhibition de l'angiogenèse (formation de tubes) a été réalisé par des collaborateurs d'un laboratoire de pharmacologie à Shanghai. L'étude d'investigation de site d'interaction des peptides avec le VEGFR1 a été réalisée en collaboration avec une équipe de biologie structurale au sein de la Faculté.

Chapitre 2 : Techniques de conception, synthèse et évaluation d'inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR

Le rôle des inhibiteurs d'interactions protéine-protéine a été résumé dans l'introduction ainsi que les stratégies pour développer des inhibiteurs. L'interaction VEGF/VEGFR et les inhibiteurs de cette interaction ont été plus particulièrement décrits. Dans cette partie, les techniques utilisées pour la conception, la synthèse et l'évaluation d'inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR dans les travaux de ma thèse sont résumées.

I. Conception rationnelle de nouveaux inhibiteurs VEGF/VEGFR

Quand la fonction biologique d'une interaction protéine-protéine et la structure du complexe sont résolues, il est possible de concevoir par voie rationnelle des inhibiteurs pour interférer avec cette interaction, notamment des inhibiteurs peptidiques dérivés de la séquence naturelle d'un des partenaires de cette interaction, dans le but de la bloquer. Quelques exemples de conception d'inhibiteurs PPI du VEGF avec le VEGFR sont présentés dans cette partie.

1.1 Observation du site d'interaction du VEGF/VEGFR

Les structures tridimensionnelles de protéines ou de complexes d'interactions protéine-protéine sont publiées dans la PDB (Protein Data Bank) après déterminations structurales par cristallographie aux rayons X ou spectroscopie RMN. Ces données structurales sont disponibles sur les sites internet comme le site "World Wide Protein Data Bank" : www.wwpdb.org ; le site "Protein Data Bank in Europe" : www.pdbe.org ou sur le site "RCSB Protein Data Bank" : www.rcsb.org/pdb. Par exemple, sur l'interaction VEGF/VEGFR1 D2, PDB : 1FLT; sur l'interaction VEGF/VEGFR2 D2-D3, PDB : 3V2A ; sur l'interaction PIGF/VEGFR1, PDB : 1RV6, etc. Puis, un logiciel est nécessaire pour examiner les interactions entre les protéines. Il existe plusieurs logiciels pour l'observation d'interaction entre les protéines, par exemple, « Pymol », « CCDC GOLD », « Accelrys Discovery Studio », « MOE », etc. Certains logiciels ont une version gratuite pour la visualisation. Une version avec plus de fonctions comme la dynamique moléculaire, la minimisation énergétique, est généralement payante.

L'interaction VEGF/VEGFR1 D2 a été présentée dans l'introduction (**Figure 19 et 20**), on peut repérer certains « Hot spots » du VEGF et du VEGFR1 D2 sur l'image de la cristallographie (à l'aide du logiciel « Accelrys Discovery Studio Visualizer » (**Figure 22**)). 3 résidus (**F17**, **Y21** et **Y25**) de l'hélice $\alpha 1$ du VEGF et 5 résidus (**P143**, **F172**, **P173**, **L204** et **L221**) d'un VEGFR1 D2 ont des interactions hydrophobes entre eux.

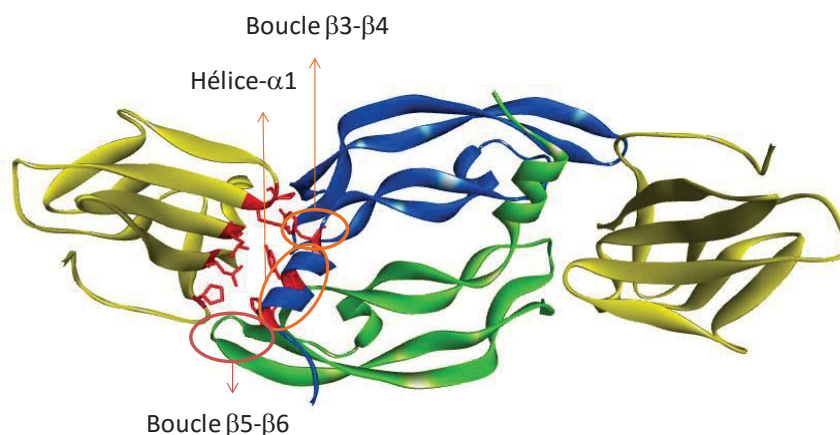


Figure 22. Structure cristallographique du VEGF/VEGFR1 D2 avec certains « Hot spots » d'hélice- $\alpha 1$ du VEGF et un VEGFR1 D2. Les deux monomères de VEGF sont en bleu et vert, les deux VEGFR1 D2 sont en doré, les résidus « Hot spots » sont en rouge. Figure d'origine PDB : 1FLT.

L'étude de la surface du VEGF est importante pour la conception d'inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR1, notamment des inhibiteurs mimant le site d'interaction du VEGF et se fixant sur le site d'interaction du VEGFR1 (**Figure 23**). Sur la surface d'interaction du dimère de VEGF avec un VEGFR1 D2, deux zones (hélice- $\alpha 1$ et boucle $\beta 3$ - $\beta 4$) de monomère 1 et une zone (boucle $\beta 5$ - $\beta 6$) de monomère 2 participent à cette interaction. Les résidus en rouge ont une grande importance pour l'affinité avec le VEGFR1 D2, les résidus en jaune ont une importance partielle, les résidus en vert ont une faible importance (**Figure 23**).

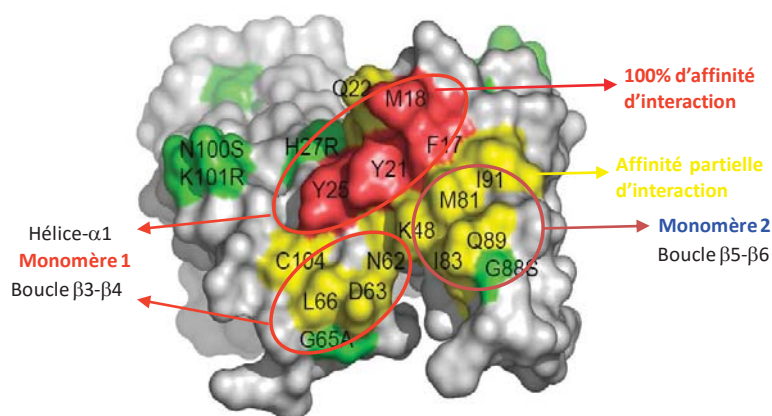


Figure 23. Surface d'interaction du VEGF avec un VEGFR1 D2. Les résidus sont marqués en différentes couleurs d'après leur importance dans l'affinité avec le VEGFR1 D2. « 100% d'affinité » signifie la perte de toute affinité en mutant par une alanine.

1.2 Conception d'inhibiteurs peptidiques à partir du complexe protéique

Suite à l'étude de la structure du complexe, on peut concevoir des inhibiteurs en mimant la surface d'une des protéines. Dans le cas du complexe VEGF/VEGFR1 D2, les inhibiteurs peuvent mimer la partie hélice- α 1, la boucle β 3- β 4, la boucle β 5- β 6 ou même plusieurs zones ensemble. Par exemple, le peptide (Ac-KLTWMELYQLAYKGI-NH₂)¹⁶⁰ et les peptides de la série (Ac-EEVKFMc[EVYQK]SY-NH₂)¹⁶¹ miment l'hélice- α 1 (₁₃EEVKFMDVYQRSY₂₅), le peptide (cycl.[fPQIMRIKPHQGQHIGE])¹⁵⁹ et les peptides de la série (Ac-MAIIGIKPHQGQAIIGI-NH₂)¹⁶⁴ sont basés sur la boucle β 5- β 6 (₇₈MQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQ₉₈), le peptide (c[YYDEGLEE]-NH₂)¹⁶² est issu de la boucle β 3- β 4 (₆₁CNDEGLEC₆₈) et de l'hélice- α 1 (Y21 et Y25).

Il est également possible de proposer des modifications à partir des structures observées, par exemple une macrocyclisation pour mimer une boucle, des remplacements de résidus, une introduction de linker pour stabiliser une hélice, etc. En s'appuyant sur l'hélice- α 1 du VEGF, les 3 résidus aromatiques (F17, Y21 et Y25) sont essentiels dans l'interaction du VEGF avec le VEGFR1 D2 ; normalement, ils ne peuvent pas être remplacés. A l'inverse, les 3 résidus de l'autre côté de l'hélice- α 1 (V15, D19 et R23) n'ont pas d'interaction directe avec le récepteur (Figure 24). Ils peuvent être remplacés par d'autres résidus ou cyclisés sur la chaîne latérale pour stabiliser la conformation en hélice. Ainsi, le peptide (Ac-EEVKFMc[EVYQK]SY-NH₂)¹⁶¹ est un peptide conçu par cette stratégie. Les deux résidus D19 et R23 ont été remplacés par un **Glu** et une **Lys**, puis cyclisés entre leurs chaînes latérales par former un pont lactame. Théoriquement, toutes les stratégies de stabilisation d'hélice- α (cyclisation par les chaînes latérales, cyclisation entre les carbones- α et capture N-terminale) indiquées dans l'introduction peuvent être utilisées pour stabiliser la conformation de cet inhibiteur. En pratique, les modifications débutent par des modifications plus simples comme un pont lactame, un pont disulfure, en limitant ainsi la complexité de la synthèse.

¹⁶⁴ García-Aranda MI, Marrero P, Gautier B, et al. *Bioorg Med Chem.* **2011**, 19, 1978-1986

La stabilisation de la conformation en hélice- α des peptides constitue l'un des objectifs de ma thèse. Plusieurs inhibiteurs mimant l'hélice- α 1 ont été conçus, synthétisés, analysés et évalués par des tests biologiques. Notamment, la conception d'un inhibiteur peptidique issu de l'hélice- α 1 du VEGF par une stratégie de bi-cyclisation sur la chaîne latérale sera présentée dans le prochain chapitre.

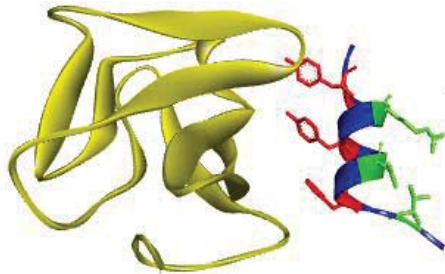


Figure 24. Interaction entre l'hélice- α du VEGF et le VEGFR1 D2. L'hélice- α du VEGF est en bleu, 3 résidus aromatiques dans l'interaction sont en rouge, 3 résidus opposés sont en vert.

II. Synthèse d'inhibiteurs peptidiques

Les inhibiteurs conçus nécessitent d'être produits, soit par synthèse chimique soit par production biologique. La production biologique de peptide est plutôt utilisée pour l'obtention de protéines (grands peptides), et la synthèse chimique pour l'obtention de peptides de petites et moyennes tailles. La synthèse chimique a deux stratégies : la synthèse en solution et la synthèse en phase solide. La synthèse en solution a des avantages économiques et qualitatifs pour la production à grande échelle de petits peptides¹⁶⁵. La synthèse en phase solide a des avantages pour la synthèse de peptide longs et de séquences variées ; gain de temps, facilité d'éliminer les intermédiaires et les agents de couplage, moins de dépendance à la solubilité des peptides et la synthèse peut être automatisée. En conséquence, la synthèse d'inhibiteurs peptidiques est réalisée en phase solide dans la plupart de cas.

2.1 Synthèse de peptides en phase solide (SPPS)

La synthèse de peptides en phase solide a été initialement publiée par Merrifield RB pour la synthèse d'un tétrapeptide en utilisant un polymère solide (appelé résine)¹⁶⁶. En bref, cette méthode de synthèse peptidique utilise une phase stationnaire solide qui est fonctionnalisée quantitativement pour attacher le groupement carboxyle du premier acide aminé, puis une solution contenant l'acide aminé protégé sur son N-terminal et sa chaîne latérale et les agents de couplage est introduits. La réaction se passe entre les deux phases, les sous-produits et les agents de couplage en excès sont éliminés par une simple filtration. Ensuite, après lavage, un processus de déprotection est effectué pour libérer la fonction amine en N-terminal du premier acide aminé accroché à la résine. Les répétitions des cycles de couplage et déprotection avec différents acides aminés mènent au peptide désiré. Enfin, le peptide est obtenu par un décrochage du peptide de la résine et déprotection de ses chaînes latérales (**Figure 25**)¹⁶⁷.

¹⁶⁵ Takahashi D, Yamamoto T. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 1936-1939

¹⁶⁶ Merrifield RB. *J Am Chem Soc.* **1963**, 85, 2149-2154

¹⁶⁷ Palomo JM. *RSC Adv.* **2014**, 4, 32658-32672

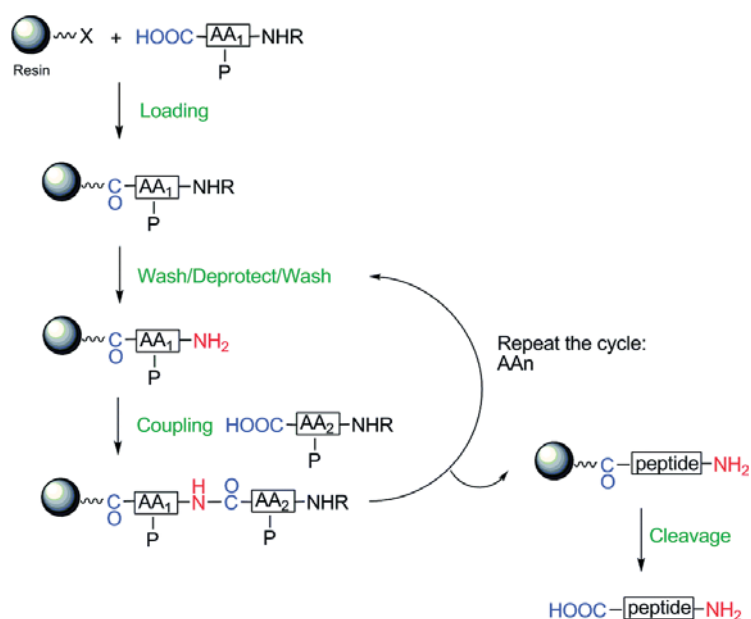


Figure 25. Processus général de la synthèse de peptides en phase solide. Figure d'après Palomo JM¹⁶⁷.

Selon le groupement protecteur en N-terminal, la SPPS est classée en deux types de chimie: la chimie Boc (*tert*-butyloxy-carbonyl)¹⁶⁶ et la chimie Fmoc (fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)¹⁶⁸.

Groupement Boc	Boc-AA-OH	Groupement Fmoc	Fmoc-AA-OH

Figure 26. Groupement Boc, Fmoc et acide aminé protégé en N-terminal par ceux-ci.

Chaque type de chimie a ses avantages et ses inconvénients. La chimie Boc est plus économique et il a moins de problèmes d'agrégation. Mais le clivage du peptide final utilise l'acide fluorhydrique (HF), très toxique, et qui nécessite un équipement spécial^{169,170}. La chimie Boc est plus pratique pour la synthèse des peptides thioester en C-terminal dans la ligation de peptides¹⁷⁰. La chimie Fmoc est plus douce mais plus coûteuse, la déprotection du groupement Fmoc se fait en condition basique et le clivage du peptide de la résine est réalisée par de l'acide trifluoroacétique (TFA). Actuellement, la plupart des synthèses en phase solide sont effectuées avec la chimie Fmoc.

¹⁶⁸ Carpino LA, Han GY. *J Am Chem Soc.* **1970**, 92, 5748-5749.

¹⁶⁹ Camarero J, Adeva, A, Muir, T. *Lett Pept Sci* **2000**, 7, 17-21

¹⁷⁰ Harris PW, Brimble MA. *Biopolymers.* **2013**, 100, 356-365

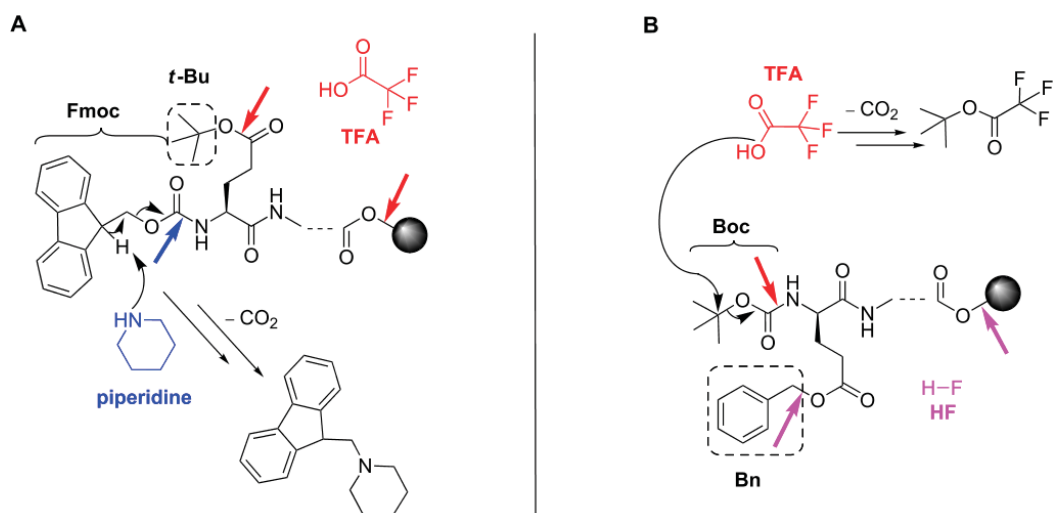


Schéma 1. Fmoc/t-Bu (A) et Boc/Bn (B) stratégie dans SPPS. (A) Déprotection du Fmoc par la piperidine, clivage et déprotection du t-Bu par le TFA ; (B) Déprotection du Boc par le TFA, clivage par HF. Schéma d'après Mäde V *et al.*¹⁷¹.

La formation de liaison peptidique consiste à activer la fonction carboxyle afin de la coupler avec la fonction amine sur la résine par les agents de couplage.

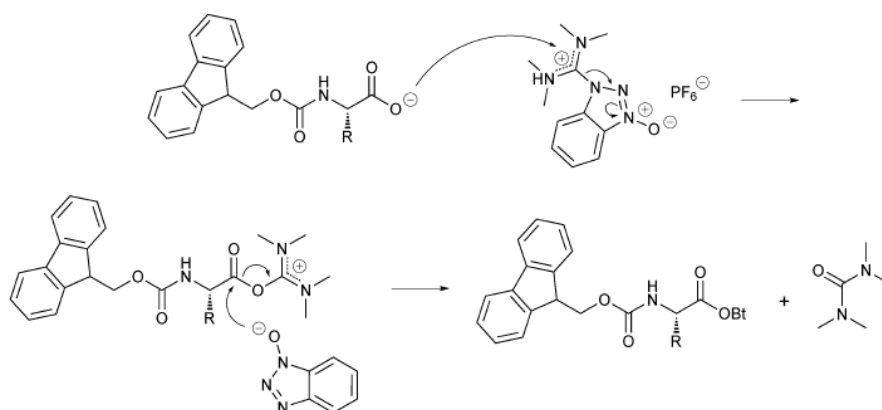


Schéma 2. Mécanisme d'activation de l'ester d'un acide aminé (ici protégé par un Fmoc) par le HBTU.

Le DCC (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide) et le DIC (*N,N'*-diisopropylcarbodiimide) ont été beaucoup utilisés dans la synthèse peptidique^{172, 173}. Mais l'activation du carboxyle par le DCC et le DIC entraîne souvent un problème de racémisation de l'ester activé. Des additifs comme le HOBt et le HOAt ont été introduits pour supprimer ou limiter ce problème¹⁷⁴. L'Oxyma a été récemment décrit comme un nouvel additif pour la synthèse avec le DIC¹⁷⁵. Ensuite, d'autres agents de couplage basés sur la structure uronium, comme le HBTU, le HATU et le TBTU, ou sur une

¹⁷¹ Mäde V, Els-Heindl S, Beck-Sickinger AG. *Beilstein J Org Chem.* **2014**, 10, 1197-1212

¹⁷² Izdebski J, Orłowski A, Anulewicz R, et al. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, 43, 184-189

¹⁷³ Els S, Beck-Sickinger AG, Chollet C. *Methods Enzymol.* **2010**, 485, 103-121

¹⁷⁴ Carpino LA. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397-4398

¹⁷⁵ Subirós-Funosas R, Prohens R, Barbas R, et al. *Chem.-Eur. J.* **2009**, 15, 9394-9403

structure contenant un sel de phosphonium, comme le PyBOP, ont été également développés. Le COMU a été identifié comme un sel d'uronium avec l'Oxyma¹⁷⁶. Le choix de l'agent couplage dépend des conditions chimiques de la réaction comme le solvant, la solubilité, la stabilité et la réactivité des réactifs, mais aussi de son coût.

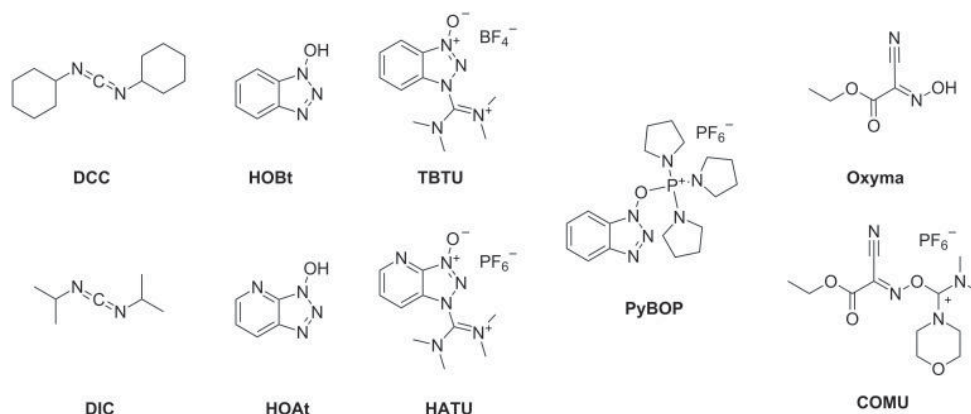


Figure 27. Exemple d'agents de couplage.

Depuis quelques années, la SPPS est souvent associée à un système micro-onde. L'irradiation micro-onde sert à chauffer lors des réactions de couplage et de déprotection dans le but d'augmenter la vitesse et l'efficacité de ces réactions¹⁷⁷. Le chauffage par micro-onde peut disperser l'énergie directement au solvant, grâce au champ électromagnétique, puisque les solvants connus, comme le DMF et la NMP, ont une capacité d'être chauffé par micro-onde^{178,179}. Plusieurs systèmes de SPPS ont été développés basés sur ces théories : « Green Motif I microwave synthesis reactor »¹⁸⁰, « Milestone CombiChem microwave synthesizer »¹⁸¹, « Liberty, CEM »¹⁸², « Discover SPS », « Syro WavetTM, Biotage »¹⁸³.

Au laboratoire, nous effectuons la synthèse de nos peptides par la chimie Fmoc en utilisant le synthétiseur automatique Liberty 1 (CEM) assistée par micro-ondes.

¹⁷⁶ El-Faham A, Subirós Funosas R, Prohens R, et al. *Chem.-Eur. J.* **2009**, 15, 9404–9416

¹⁷⁷ Pedersen SL, Tofteng AP, Malik L, et al. *Chem Soc Rev.* **2012**, 41, 1826-1844

¹⁷⁸ Gabriel C, Gabriel S, Grant EH, et al. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 213-224

¹⁷⁹ Kappe CO. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 6250-6284

¹⁸⁰ Matsushita T, Hinou H, Fumoto M, et al. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 3051-3063

¹⁸¹ Grieco P, Campiglia P, Gomez-Monterrey I, et al. *Synlett*, **2003**, 2216-2218

¹⁸² Collins JM, Collins MJ. *Biopolymers*, **2003**, 71, P267

¹⁸³ Malik L, Tofteng AP, Pedersen SL, et al. *J. Pept. Sci.* **2010**, 16, 506-512

2.2 SPPS avec le Synthétiseur Liberty 1

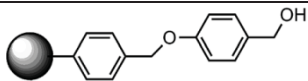
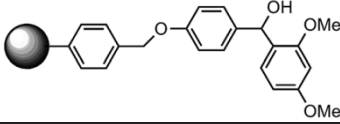
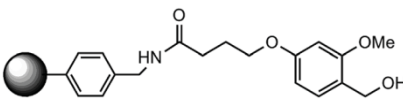
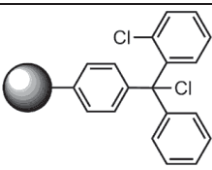
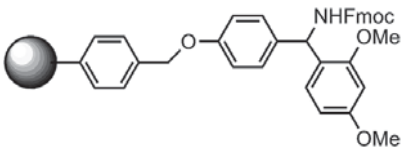
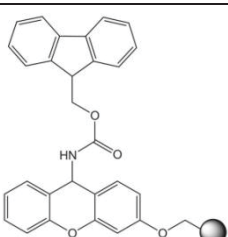
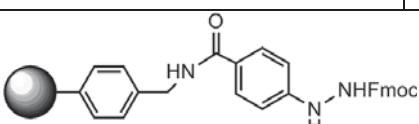
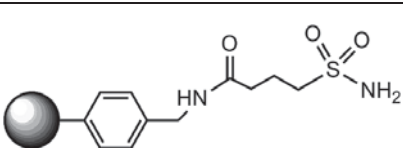


Le synthétiseur Liberty 1 de CEM (une société innovatrice en outils technologiques) est un synthétiseur automatique de peptide sous micro-ondes. Il consiste en 3 parties, un distributeur de réactifs avec 20 positons d'acides aminés, un réacteur sous micro-ondes et un logiciel (PepDriver) de programmation. La synthèse des peptides se déroule comme suit :

- a) La séquence du peptide désiré est programmée par le logiciel PepDriver.
- b) La résine sélectionnée selon la fonction C-terminale du peptide désiré (peptide acide ou peptide amide, **Tableau 3**) est déposée dans le réacteur.
- c) Une répétition de couplages et déprotections de Fmoc sur la résine est effectuée dans le réacteur sous micro-ondes.
- d) Le peptide synthétisé est clivé de la résine. La dernière étape est réalisée hors du synthétiseur (réactifs selon **Tableau 3**).

Un peptide linéaire brut est obtenu par ces 4 étapes. Ensuite, le peptide brut est analysé pour confirmer sa séquence. Les peptides synthétisés seront purifiés par HPLC (High-performance liquid chromatography) semi-préparative. La masse molaire du peptide sera confirmée par spectrométrie de masse.

Tableau 3. Différentes résines et conditions de clivage.

Nom de la résine	Structure	Condition de clivage	C-terminal
Wang résine		90-95% TFA dans CH ₂ Cl ₂ , 1-2 h	Acide
Rink acide résine		1-5% TFA dans CH ₂ Cl ₂ , 5-15 min	Acide
HMPB résine		1% TFA dans CH ₂ Cl ₂ , 2-5 min	Acide
2-Chlorotrityl chloride résine		1-5% TFA dans CH ₂ Cl ₂ 1 min	Acide
Rink amide résine		50% TFA dans CH ₂ Cl ₂ 1 h	Amide
Sieber amide résine		1% TFA dans CH ₂ Cl ₂ 5 min	Amide
Hydrazine résine		Cu(OAc) ₂ , pyridine, acide acétique dans CH ₂ Cl ₂ ou THF	Acide, ester, amide.
Sulfonamide résine		1) ICH ₂ CN/DIEA/NMP, 24 h 2) Nucléophile, DMAP, 24 h	Acide, ester, thioester, amide, etc.

III. Étude structurale des peptides

Les études structurales des peptides synthétisés sont importantes pour comprendre les relations entre la structure des peptides en solution et en interaction avec leur cible. Les techniques utilisées sont le dichroïsme circulaire (CD), la RMN et la modélisation moléculaire.

3.1 Dichroïsme circulaire (CD)¹⁸⁴

Le dichroïsme circulaire repose sur la capacité d'un échantillon chiral à absorber différemment la lumière polarisée circulairement gauche et la lumière polarisée circulairement droite. Cette différence d'absorbance (ΔA) peut être exprimée :

$$\Delta A = A_L - A_R$$

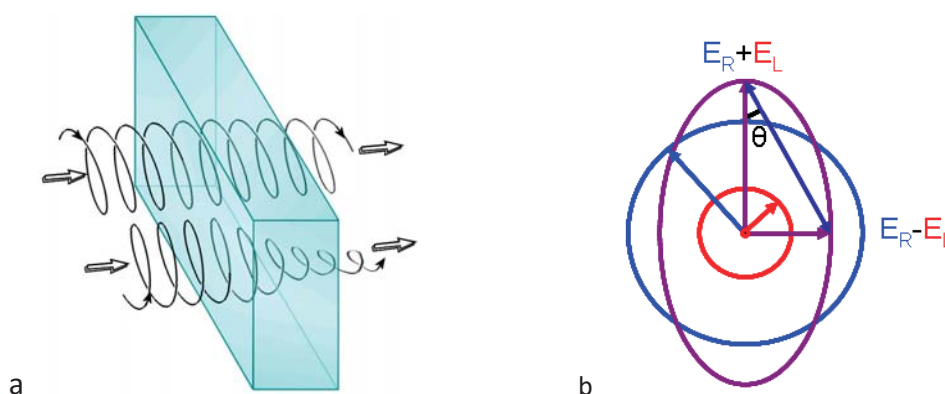


Figure 28. a) : Deux rayons lumineux polarisés circulairement vers la gauche et vers la droite. b) : Lumière elliptique polarisée (violette) après la traversée d'une solution contenant un composé optiquement actif. E_R et E_L représentent les magnitudes des vecteurs des champs électriques des lumières polarisées circulairement à droite et à gauche, respectivement.

Ces composantes gauche et droite de la lumière polarisée correspondent aux différentes magnitudes du champ électrique. Il peut être généralisé en terme d'ellipticité (θ , en degré) qui s'exprime :

$$\tan \theta = (E_R - E_L) / (E_R + E_L)$$

La relation entre la différence d'absorption et l'ellipticité s'exprime :

$$\theta = 32.98 * \Delta A$$

¹⁸⁴ Kelly SM, Jess TJ, Price NC. *Biochim Biophys Acta*. 2005, 1751, 119-139

La différence totale d'absorbance est mesurée et convertie ensuite en ellipticité (θ , en degré) après la traversée d'une distance (l) de la lumière polarisée dans une concentration (C) d'un échantillon à une longueur d'onde donnée. Le spectre de dichroïsme circulaire présenté ci-dessous est l'ellipticité molaire de molécule par nombre de résidus (n) en traversant 1 cm^2 d'échantillon ($\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}.\text{résidu}^{-1}$), qui s'exprime :

$$[\theta] = \theta / (10.C.l.n)$$

Dans le cadre des peptides et protéines, la mesure du dichroïsme circulaire dans l'UV lointain (190-250 nm, zone d'absorption de la liaison peptidique) contient des informations sur leur structure secondaire (hélices α , feuillets β , coudes et structures désordonnées). La structure en hélice- α présente un maximum de $[\theta]$ vers 190 nm et un minimum vers 208 et un autre minimum vers 222, le feuillet- β montre un maximum vers 195 nm et un minimum vers 215, et une structure aléatoire a un minimum vers 198 nm (**Figure 29**). Le traitement des données par des logiciels appropriés permet une estimation de la quantité respective des différentes structures secondaires. L'environnement (pH, solvant, température...) a un effet sur la structure des molécules à étudier.

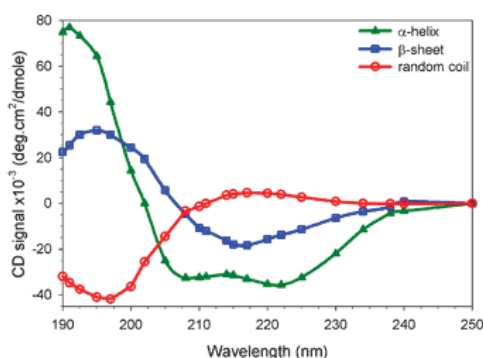


Figure 29. Spectre de CD pour trois différentes conformations de peptides ou protéines.

3.2 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire est une méthode spectroscopique basée sur l'existence de spins nucléaires non nuls possédés par certains noyaux atomiques comme ^1H , ^{13}C , ^{17}O et ^{19}F , et l'application d'un champ magnétique. En fonction de leur environnement chimique, les noyaux résonnent à différentes fréquences dans un champ magnétique, ce qui provoque des différences dans leurs déplacements chimiques. Ces différents déplacements chimiques, qui sont exprimés généralement en ppm (parties par million), permettent d'identifier le noyau correspondant dans la molécule.

Un autre phénomène observé par RMN est le couplage, induit par des interactions de noyaux voisins ou des interactions perçues à travers l'espace. Ils sont appelés le couplage scalaire et le couplage dipolaire. Le couplage scalaire est le couplage spin-spin induit par deux portons voisins. Le déplacement chimique d'un proton peut créer un champ local qui influence légèrement le déplacement chimique de l'autre proton. Cette influence provoque le dédoublement d'un pic unique par deux pics appelé doublet. L'écart de fréquence entre deux pics de doublet est appelé la constante de couplage et est exprimé en Hz. Il représente l'énergie d'interaction entre deux noyaux.

Le couplage dipolaire induit par l'interaction dipôle-dipôle entre deux noyaux en traversant l'espace indique une distance relativement proche. Cette interaction est appelée l'effet nucléaire Overhauser (NOE). Cet effet NOE est important pour caractériser la structure d'une protéine ou d'un peptide.

La méthode de la RMN 2D (bidimensionnelle) a été proposée par Jean Jeener en 1971, puis développée par différents équipes^{185,186}. Elle permet d'analyser la corrélation de pics homonucléaire (^1H - ^1H) ou hétéroannulaire (^1H - ^{13}C , ^1H - ^{15}N). Elle facilite l'attribution des déplacements chimiques de molécules compliquées comme les protéines.

Les différentes méthodes d'analyse par RMN permettent d'étudier la structure tridimensionnelle (3D) de peptides et protéines (il existe une limite en taille). L'équipe de Wüthrich K a déterminé la première structure de protéine en 3D par RMN en 1985¹⁸⁷, puis il a décrit une méthodologie permettant d'étudier la structure de protéines et peptides basée sur la RMN du proton et la RMN 2D avec l'effet NOE¹⁸⁸.

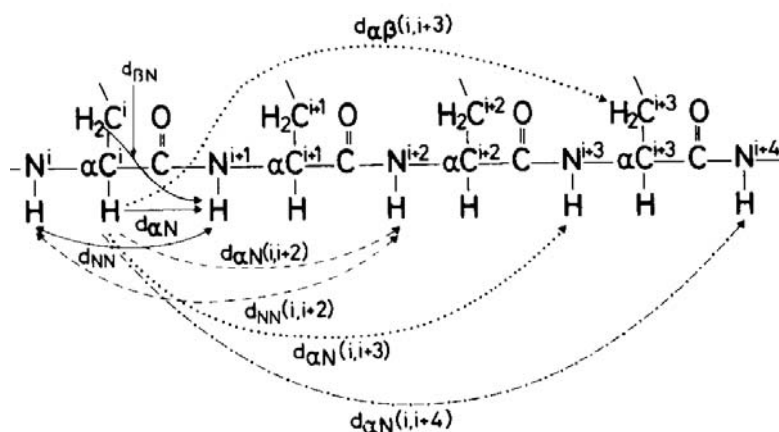
¹⁸⁵ Aue WP, Bartholdi E, Ernst RR. *Journal of Chemical Physics*, **1976**, 64, 2229-2246

¹⁸⁶ Martin GE, Zekter AS. *VCH Publishers*, **1988**, Inc. p. 59

¹⁸⁷ Williamson MP, Havel TF, Wüthrich K. *J Mol Biol*. **1985**, 182, 295-315

¹⁸⁸ Braun W et al. *J. Mol. Biol.* **1986**, 187, 125-129

Les différentes expériences de RMN, par exemple COSY (Correlated Spectroscopy), TOCSY (Total Correlated Spectroscopy), NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) et ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy), permettent d'attribuer la séquence d'un polypeptide et des effets NOE entre différents résidus. Les distances entre certains résidus sont caractéristiques pour une structure secondaire peptidique donnée.



Distance	α -Helix	3_{10} -Helix	Feuillet- β	Feuillet- β parallèle	Coude- β Type I	Coude- β Type II
$d_{\alpha N}$	3.5	3.4	2.2	2.2	3.4	2.2
$d_{\alpha N(i,i+2)}$	4.4	3.8			3.2	3.2
$d_{\alpha N(i,i+3)}$	3.4	3.3			3.6	3.3
$d_{\alpha N(i,i+4)}$	4.2				3.1-4.2	3.8-4.7
d_{NN}	2.8	2.6	4.3	4.2	2.6	4.5
$d_{NN(i,i+2)}$	4.2	4.1			2.4	2.4
$d_{\beta N}$	2.5-4.1	2.9-4.4	3.2-4.5	3.7-4.7	3.8	.3
$d_{\alpha \beta(i,i+3)}$	2.5-4.4	3.1-5.1			2.9-4.4	3.6-4.6
					3.6-4.6	3.6-4.6

Figure 30. Distance inter-protons de peptides correspondant au type de structure secondaire¹⁸⁹.

¹⁸⁹ Zerbe/Bader. *Peptide/Protein NMR*

3.3 Modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire est une technique pour modéliser les comportements de molécules par un logiciel informatique. Il existe différents modèles pour présenter les molécules : fils de fer, bâtons, boules et bâtons ou modèle compact par exemple. Toutes ces présentations de comportement de molécule sont basées sur les calculs mathématiques d'entropie (thermodynamique) totale de la molécule. Les conformations avec énergie basse sont normalement plus étudiées parce qu'elles sont plus stables dans les processus chimiques et biologiques.

Les étapes de modélisation moléculaire d'une molécule sont d'abord de construire la molécule et de minimiser l'encombrement stérique. Puis la molécule est placée dans un champ de force dans un environnement sous vide (sans solvant) en chauffant jusqu'à haute température (1000K, en général) pour échantillonner certaines conformations initiales. Puis, en diminuant la température d'environnement, le logiciel simule une conformation contrainte pour chaque échelle de température. La simulation peut être effectuée en présence d'eau. Enfin, 10 ou 20 structures d'énergie la plus basse sont sélectionnées et superposées, ce qui permet le calcul du RMSD (Root Mean Square Deviation). Le RMSD est la moyenne de la distance entre les atomes (normalement la chaîne principale pour les protéine et peptides) de deux molécules superposées. Plus le RMSD est bas, plus les conformations sont similaires. Pour l'étude de la conformation des peptides qui miment une structure secondaire de protéine, le RMSD est souvent calculé avec une structure secondaire idéale.

La modélisation moléculaire est basée sur des calculs informatiques dans un logiciel. Elle ne représente certainement pas toujours la structure réelle de la molécule en solution. La détermination de contraintes de distance (par exemple par effet NOE mesuré par RMN) peut apporter des informations sur les distances entre certains résidus. La méthode de modélisation moléculaire sous contraintes RMN permet souvent d'obtenir une structure plus proche de la structure réelle en solution.

IV. Évaluation biologique

Les inhibiteurs synthétisés doivent être testés pour leur capacité à inhiber l'interaction entre les protéines. Le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) est une technique validée pour étudier les interactions protéine-protéine. Un test de formation de microtubule est une technique spécifique pour évaluer la capacité anti-angiogénique d'un composé.

4.1 Test de type ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Le test ELISA est une méthode biochimique qui permet de détecter qualitativement ou quantitativement la présence d'anticorps ou d'antigènes dans un échantillon basé sur l'immunologie. Le principe des tests ELISA est de d'abord fixer les antigènes sur une surface, principalement des plaques pour microtitration. Les anticorps spécifiques de l'antigène sont ajoutés et réagissent avec celui-ci. Ensuite, un deuxième anticorps couplé à une enzyme, comme la peroxydase de radis noir (HRP) ou l'alkaline phosphatase (AP), et pouvant réagir avec un substrat, se lie spécifiquement à l'anticorps primaire et permet de révéler la réaction à la fin par spectrophotométrie (détection d'un produit de réaction).

Des tests ELISA ont été développés avec différents modes de détection comme la fluorescence, la chimiluminescence. Il existe de plus différents types de tests ELISA comme indirect, sandwich ou compétition. Ce type de test est largement impliqué dans la recherche d'inhibiteur d'interaction protéine-protéine. 20% des inhibiteurs PPI dans une banque de données décrite par Labbé CM *et al.* sont sélectionnés par des tests ELISA¹⁹⁰.

Dans le laboratoire, un test de compétition de type ELISA a été développé pour sectionner les inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR1¹⁹¹. Le principe de ce test est de fixer le récepteur VEGFR1 sur une plaque 96 puits de type "High binding". Puis, la surface libre est bloquée par la BSA (Bovine Serum Albumine) pour diminuer l'effet non-spécifique. Ensuite, les composés et du VEGF biotinylé (btVEGF) sont ajoutés pour une fixation compétitive avec les récepteurs fixés sur la plaque. Après plusieurs lavages, un conjugué streptavidine-HRP, qui se lie spécifiquement sur la biotine du btVEGF₁₆₅, est ajouté. Après des étapes de lavage, un substrat de la HRP (H₂O₂/luminol) est additionné, ce qui permet de révéler la quantité de signal par

¹⁹⁰ Labbé CM, Laconde G, Kuenemann MA et al. *Drug Discov Today*. **2013**, 18, 958-968

¹⁹¹ Goncalves V, Gautier B, Garbay C et al. *Anal Biochem*. **2007**, 366, 108-110

chimiluminescence, afin de calculer le pourcentage d'inhibition de l'interaction VEGF/VEGFR1 par différents composés. Les IC_{50} de ces composés peuvent également être mesurés par effet dose.

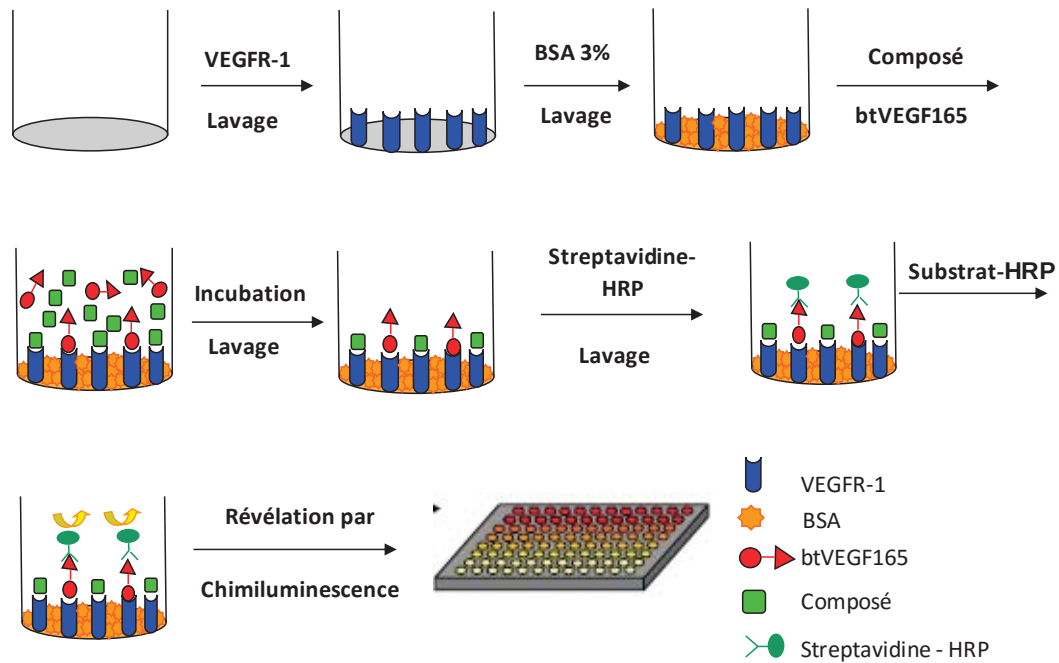


Figure 31. Processus général d'un test ELISA effectué au laboratoire.

4.2 Test de formation de microtubule

Le test de formation de microtubule est une technique cellulaire *in vitro* spécifique pour l'étude de l'angiogenèse. Couplé à d'autres techniques, ce test peut permettre de déterminer rapidement et quantitativement les gènes ou les voies de signalisations impliquées dans l'angiogenèse¹⁹². Il est premièrement décrit par Kubota Y *et al.* en 1988¹⁹³. Le principe de ce test est basé sur la capacité de division et migration des cellules endothéliales qui, en répondant aux signaux angiogéniques, sont capables de former des microtubules lorsqu'elles sont cultivées en Matrigel. L'effet des inhibiteurs d'angiogenèse, qui interfèrent ce processus, est révélés par la mesure de la diminution de formation de microtubules à la fin.

Le processus de ce test comporte 4 grandes étapes : culture cellulaire, préparation de Matrigel, test de la formation de microtubule et analyse des données.

Les cellules HUVE (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) sont largement utilisées dans les études d'angiogenèse et elles sont caractéristiques pour ce test de la formation de microtubule. Le Matrigel contient une base de composés pour la survie des cellules et peut être reconstitué selon le type d'expérience. Le Matrigel utilisé pour tester les inhibiteurs d'interaction VEGF/VEGFR1 ne contient pas de facteurs de croissance. Le Matrigel est solide à 37°C et constitue un support pour les cellules. La formation de microtubules par les cellules HUVE se fait à la surface du Matrigel. La présence d'inhibiteurs d'angiogenèse inhibe cette formation de microtubules sur le Matrigel.

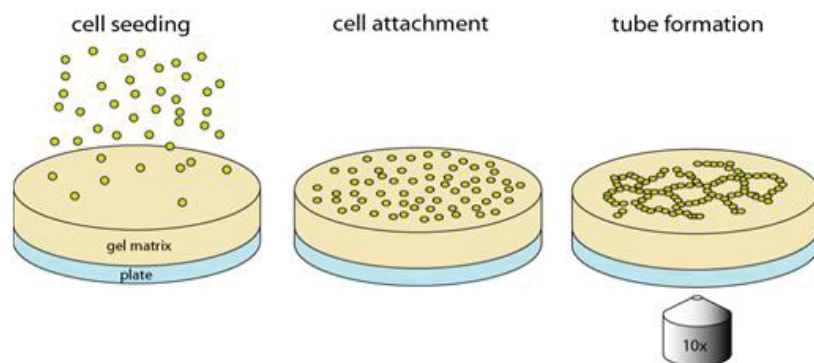


Figure 32. Principe d'un test de formation de microtubule sur Matrigel.

L'analyse de la formation de microtubule est réalisée sous microscope en comptant le nombre de microtubules, de boucles ou de nœud des branches. On peut aussi analyser l'effet des inhibiteurs en mesurant la longueur des microtubules.

Dans le cadre de cette thèse, ce test a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Dr. Lili Ji à l'Université de Médecine Traditionnelle Chinoise de Shanghai.

¹⁹² DeCicco-Skinner KL, Henry GH, Cataisson C, et al. *J Vis Exp.* **2014**, 91 : e51312

¹⁹³ Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, et al. *J Cell Biol.* 1988 Oct;107(4):1589-1598

Chapitre 3 : Conception, synthèse et évaluation

d'antagonistes peptidiques du VEGFR1

Comme indiqué dans l'introduction, des inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR peuvent interférer avec l'angiogenèse tumorale afin d'inhiber la croissance des tumeurs. Les inhibiteurs développés peuvent ainsi servir comme agents anti-tumoraux.

Basé sur l'interaction VEGF/VEGFR, les inhibiteurs cherchés peuvent cibler soit le VEGF soit le VEGFR. Les deux types d'inhibiteurs ont été validés en clinique, par exemple, l'Avastin®, anticorps ciblant le VEGF, est utilisé en clinique en association avec d'autres traitements de certains cancers métastatiques colorectaux et certains cancers du poumon non à petites cellules ; le Cyramza®, anticorps ciblant le VEGFR2, est utilisé pour le traitement de certains adénocarcinomes gastriques. Cibler le VEGFR est normalement plus efficace car le blocage du VEGFR ne permet pas seulement de bloquer l'effet angiogénique induit par l'interaction VEGF/VEGFR, mais aussi de bloquer l'effet induit par l'interaction d'autres ligands avec le VEGFR¹⁹⁴.

Alors que le rôle du VEGFR2 est bien clair dans l'angiogenèse, le rôle du VEGFR1 est encore sujet à débat. Cependant, de plus en plus de recherches ont montré que le VEGFR1 est aussi important dans l'angiogenèse^{143,144,146}. En effet, le VEGFR1 était considéré comme une cible anti-angiogénique depuis 2008¹⁹⁵. Plusieurs études ont montré que les inhibiteurs d'interaction VEGF/VEGFR1 inhibent aussi l'angiogenèse^{160,162,163}. Nos études de développement d'inhibiteurs sont basées sur l'interaction VEGF/VEGFR1. Les raisons sont non seulement le rôle crucial du VEGFR1 dans l'angiogenèse, mais également le fait que l'affinité d'interaction du VEGF/VEGFR1 est plus forte, ce qui permet de faciliter l'évaluation biologique par test ELISA. De plus, la cristallographie de l'interaction VEGF/VEGFR1 était disponible. La structure des VEGFR1 et VEGFR2, les interactions VEGF/VEGFR1 et VEGF/VEGFR2 sont également similaires. Les inhibiteurs sélectionnés par le système VEGF/VEGFR1 pourraient donc inhiber aussi l'interaction VEGF/VEGFR2 dans un environnement biologique.

Enfin, nous nous intéressons au développement d'inhibiteurs peptidiques par conception rationnelle basée sur la cristallographie du complexe VEGF/VEGFR1^{154,162,163}.

¹⁹⁴ Ferrara N. *Oncology*. **2005**, 69 Suppl 3, 11-16

¹⁹⁵ Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, et al. *Nat Rev Cancer*. **2008**, 8, 942-956

I. Travaux antérieurs : développement d'antagonistes peptidiques du VEGFR1

1.1 Sites d'interaction du VEGF avec le VEGFR1

Wiesmann C *et al.* ont montré que le VEGF avait une affinité forte avec l'ECD (domaine extracellulaire) du VEGFR1 ($K_d \approx 12$ pM), qu'il se liait sur le domaine D1-D3 du VEGFR1 ($K_d \approx 80$ pM), et que le domaine D2 était suffisant pour une interaction forte avec le VEGF ($K_d \approx 200$ pM). Le site d'interaction est localisé principalement sur le domaine D2 (**Figure 33**)

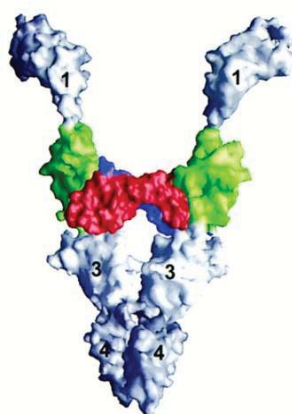


Figure 33. Modèle d'interaction VEGF₈₋₁₀₉ dimère avec VEGFR1 D1-D4¹⁴⁵.

Basé sur la structure cristallographique du complexe VEGF/VEGFR1 D2 résolue par Wiesmann *et al.*, 3 sites d'interaction sont identifiés sur la surface d'un monomère du VEGF : hélice- α 1, boucle β 3- β 4 et boucle β 5- β 6 (**Figure 19**). La nature des interactions de ces trois fragments du VEGF avec le VEGFR1 D2 sont différentes. L'hélice- α 1 interagit principalement par des interactions hydrophobes, la boucle β 3- β 4 par des interactions hydrophiles, la boucle β 5- β 6 par des interactions hydrophobes et hydrophiles (**Figure 34**). Une association d'interactions entre le VEGFR1 D2 et tous ces sites d'interaction du VEGF est responsable de la forte affinité.

Hélice- α 1: 13EVVKFMDVYQRSYCH27	Boucle β 3- β 4 : 57CGGCCNDEGLECV69	Boucle β 5- β 6 : 76ITMQIMRIKPHQGQHIGEMS95

Figure 34. 3 fragments en interaction avec VEGFR1 D2, les « hotspots » sont en rouge.

1.2 Résumé des travaux antérieurs développement

d'antagonistes du VEGFR1

Plusieurs équipes de recherche ont travaillé sur la conception rationnelle d'inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR1, notamment les inhibiteurs qui miment les sites d'interaction du VEGF pour bloquer le récepteur. Ces travaux sont basés sur les séquences naturelles des 3 fragments du VEGF décrits ci-dessus.

1.2.1 Inhibiteurs peptidiques mimant l'hélice- α 1

L'hélice- α 1 est très importante dans l'interaction du VEGF avec le domaine D2 des VEGFR1 et VEGFR2. Elle possède 3 résidus « Hot spot » dans la séquence : **F17**, **Y21** et **Y25**. Ces 3 résidus contribuent à des interactions hydrophobes majeures avec le récepteur. Les chaînes latérales de ces trois résidus aromatiques sont orientées parallèlement dans l'hélice.

Plusieurs études ont été réalisées pour développer des inhibiteurs peptidiques en mimant l'hélice- α 1 du VEGF afin d'inhiber l'interaction VEGF/VEGFR. L'équipe de D'Andrea a décrit deux peptides mimétiques à partir de la séquence originale de l'hélice- α 1 du VEGF :

¹⁴ VVK F MDV Y QRS Y CHP ²⁸
Ac-KLT W QEL Y QLK Y KGI-NH ₂ ¹⁹⁶
Ac-KLT W MEL Y QLA Y KGI-NH ₂ ¹⁶⁰

Ces deux peptides contiennent 3 résidus aromatiques essentiels (**W4**, **Y8**, **Y12**) aux mêmes positions que celles de l'hélice- α 1 du VEGF (**F17**, **Y21**, **Y25**). Le premier résidu Phe a été remplacé par un Trp, plus hydrophobe, pour favoriser l'interaction hydrophobe avec le récepteur. Les autres résidus ont été remplacés pour stabiliser la conformation hélice du peptide (**L2/T3**, **K13/G14/I15**) ou des résidus favorisant l'hélice (**L7**, **L10**). Puis, leur structure a été étudiée par RNM. Les deux peptides développés sont tous les deux capables de se fixer sur les VEGFRs (VEGFR1 et VEGFR2). En revanche, le peptide (Ac-KLT**W**QEL**Y**QLK**Y**KGI-NH₂) a un effet pro-angiogénique similaire à l'effet du VEGF ¹⁹⁶, et le peptide (Ac-KLT**W**MEL**Y**QLA**Y**KGI-NH₂) possède un effet opposé anti-angiogénique.

¹⁹⁶ D'Andrea LD, Iaccarino G, Fattorusso R, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2005**, 102, 14215-14220

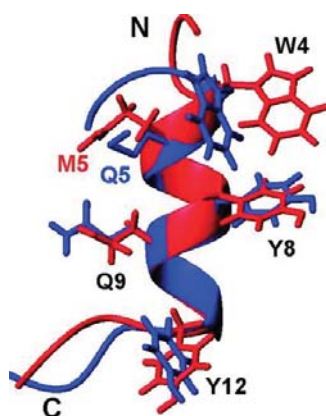


Figure 35. Structure RMN des deux peptides conçu par l'équipe de D'Andrea. Peptide (Ac-KLTWQELYQLKYKGI-NH₂) en bleu, peptide (Ac-KLTWMELYQLAYKGI-NH₂) en rouge.

L'équipe de Pérez de Vega a aussi étudié les inhibiteurs peptidiques mimant l'hélice- α 1 du VEGF. Une série de peptides a été synthétisée et évaluée pour son affinité de fixation sur le VEGFR1. Cette série de peptides respecte plus la séquence naturelle de l'hélice- α 1. Le peptide (Ac-EVVKFMDVYQRSY-NH₂) possède la séquence naturelle de l'hélice- α 1. Dans le peptide (Ac-EVQKFLEVYLRLY-NH₂) ont été introduit des **Leu** pour favoriser la conformation en hélice. En parallèle, un pont lactame entre les chaînes latérales a été introduit pour favoriser la conformation en hélice des peptides (Ac-EVc[EKFMK]VYQRSY-NH₂ et Ac-EVVKFMc[EVYQK]SY-NH₂)¹⁶¹ :

¹³ EVVKFMDVYQRSYCHP ₂₈
Ac-EVVKFMDVYQRSY-NH ₂
Ac-EVQKFLEVYLRLY-NH ₂
Ac-EVc[EKFMK]VYQRSY-NH ₂
Ac-EVVKFMc[EVYQK]SY-NH ₂

1.2.2 Inhibiteurs peptidiques mimant la boucle β 5- β 6

La boucle β 5- β 6 a aussi été étudiée dans le développement des antagonistes de VEGFRs. La boucle β 5- β 6 est sous forme d'épingle de feuillets- β dans la structure cristallographique du VEGF. Elle a des interactions hydrophobes et hydrophiles avec le VEGFR1 D2.

Le premier inhibiteur peptidique mimant la boucle β 5- β 6 est le peptide cyclo-VEGI¹⁵⁹, un peptide cyclique tête à queue avec le résidu N-terminal de configuration R (f : D-phénylalanine) :

⁷⁸ MQIMRIKPHQGQHIGE ₉₃
(cyclo[fPQIMRIKPHQGQHIGE])

Ce peptide a été décrit comme un inhibiteur des VEGFR1 et VEGFR2. Il est capable de se fixer sur les VEGFR1 et VEGFR2 pour bloquer l'interaction VEGF/VEGFRs et l'angiogenèse provoquée par ces interactions.

Puis un autre peptide modifié de la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ a été décrit comme capable d'inhiber l'angiogenèse induite plus spécifiquement par le VEGFR2¹⁹⁷:

⁷⁶ ITMQIMRIKPHQGQHIGEMSF ₉₆
ITMQc[CGIHQQGHPKIRMIC]EMSF

L'équipe de Pérez de Vega cherche également des inhibiteurs mimant la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ du VEGF. Ils ont développé une petite bibliothèque d'inhibiteurs basée sur la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$. Leur capacité d'inhibition de l'interaction VEGF/VEGFR1 a été confirmée par un test de déplacement de type ELISA¹⁶⁴ :

⁷⁶ ITMQIMRIKPHQGQHIGEMSF ₉₆
Ac- MAIIGIKPHQGQAII GI-NH ₂
Ac- MEc[GIKPHGQG] I-NH ₂
Ac- Mc[GIKPHQQG] I-NH ₂
Ac- MRAIIGKPHQGAIIGHI -NH ₂

1.2.3 Inhibiteurs peptidiques précédemment conçus au laboratoire

Dans le laboratoire, Goncalves *et al* ont également développé des inhibiteurs mimant les fragments du VEGF¹⁶². Ils ont d'abord synthétisé deux peptides issus de la séquence naturelle de la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ et de l'hélice- $\alpha 1$, puis un peptide cyclique issu de la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$. Ces peptides peuvent inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1 (évalués par un test de déplacement de type ELISA), mais avec une faible capacité de déplacement¹⁶² :

⁶¹ CNDEGLEC ₆₈	¹⁶ KFMDVYQRSYCH ₂₇
SNDEGLES	KFMDVYQRSYCH -NH ₂
Ac-c[CNDEGLEC]-NH ₂	

Des nouveaux inhibiteurs peptidiques ont ensuite été conçus, basés sur ces deux sites d'interaction. L'observation de la surface du VEGF a montré que la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ est relativement proche de l'hélice- $\alpha 1$. Il est possible de concevoir un peptide cyclique pour mimer en même temps la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ et l'hélice- $\alpha 1$. Les résidus de la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ sont plutôt hydrophiles. Dans le complexe du VEGF et VEGFR1 D2, la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ du VEGF a des interactions hydrophiles avec le VEGFR1 D2, notamment le résidu **D63**. Les chaînes latérales de **C61** et **N62** sont proches de celles des deux **Tyr** de l'hélice- $\alpha 1$. En conséquence, une série de peptides cycliques a été conçue et synthétisée. Deux résidus aromatiques ont été introduits dans la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ en

¹⁹⁷ Vicari D, Foy KC, Liotta EM, et al. *J Biol Chem.* **2011**, 286, 13612-13625

remplaçant la **C61** et l'**N62**, puis les peptides ont été cyclisés de la tête à la chaîne latérale de Glu en C-terminal qui remplace la **C68**¹⁶²:

₆₁ CNDEGLEC ₆₈
c[FFDEGLEE]-NH ₂
c[YYDEGLEE]-NH ₂
c[YWDEGLEE]-NH ₂

Les peptides ainsi obtenus ont montré une affinité améliorée pour déplacer l'interaction VEGF/VEGFR1 dans le test ELISA, en particulier le peptide c[**YYDEGLEE**]-NH₂.

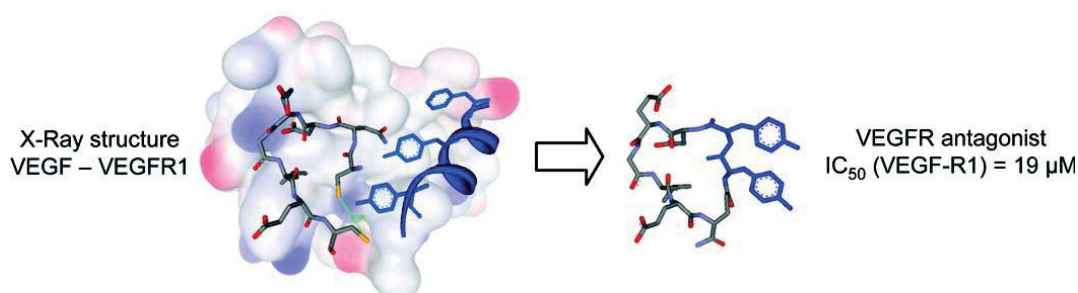


Figure 36. Développement du peptide c[**YYDEGLEE**]-NH₂ comme l'antagonistes du VEGFR1.

Un « Ala-Scanning » a ensuite été réalisé pour identifier les résidus importants¹⁶² pour l'interaction des peptides avec le VEGFR1. Seules la première **Tyr** et la **Leu** sont essentiels. La 2^e **Tyr** et la **Gly** peuvent être remplacés par un résidu **Lys**. En effet, le peptide c[**YKDEGLEE**]-NH₂ avec la deuxième **Tyr** remplacée par une **Lys** avait une affinité similaire à celle du peptide c[**YYDEGLEE**]-NH₂. Le remplacement par la **Lys** a pour but de pouvoir marquer le peptide cyclique par un chromophore ou un cyclène pour des études d'imagerie.

Enfin, l'étude par RMN du peptide c[**YYDEGLEE**]-NH₂ avec le VEGFR1 D2 marqué en ¹⁵N a confirmé l'interaction entre ce peptide et le VEGFR1 D2. Des résidus en interaction avec ce peptide ont été identifiés dans le modèle du VEGFR1 D2 (**Figure 37**).

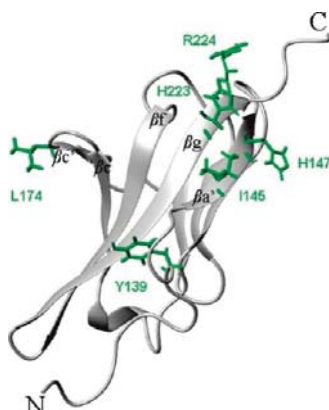


Figure 37. Structure modèle du VEGFR1 D2 avec des résidus (en vert) en interaction avec le peptide c[**YYDEGLEE**]-NH₂.

Des études biologiques ont confirmé que ce peptide est capable d'inhiber la phosphorylation des VEGFR1 et VEGFR2 et la phosphorylation de MAPK initiée par le VEGF en comparant avec un peptide connu (SP5.2¹⁹⁸).

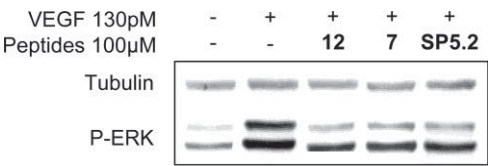


Figure 38. Inhibition de la phosphorylation par le peptide c[YYDEGLEE]-NH₂ (correspondant numéro 7) et un autre peptide de la série (numéro 12) en comparant avec un peptide connu SP5.2.

De plus, il est capable d'inhiber *in vitro* la migration des HUVE induite par le VEGF et la formation de microtubules, confirmant l'effet anti-angiogénique.

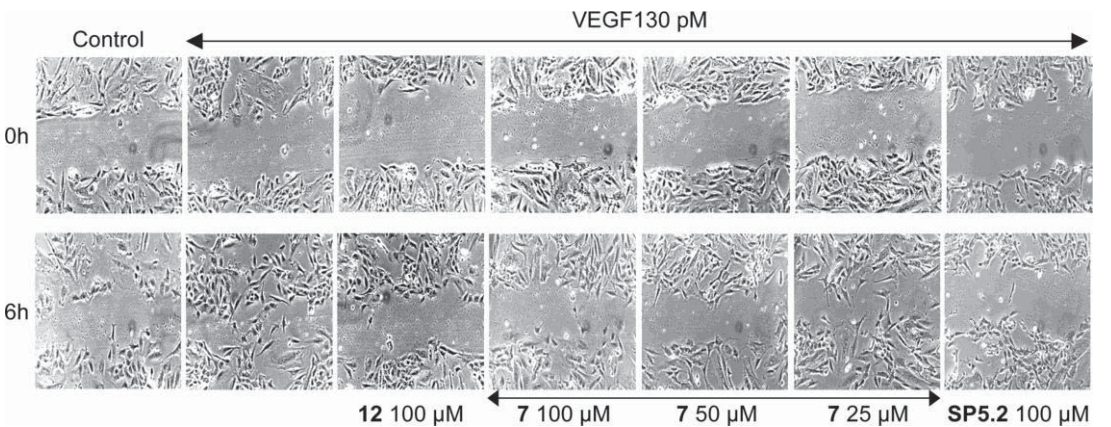


Figure 39. Inhibition de la migration de cellule HUVE par le peptide c[YYDEGLEE]-NH₂ (numéro 7) et un autre peptide de la série (numéro 12) en comparant avec un peptide connu SP5.2.

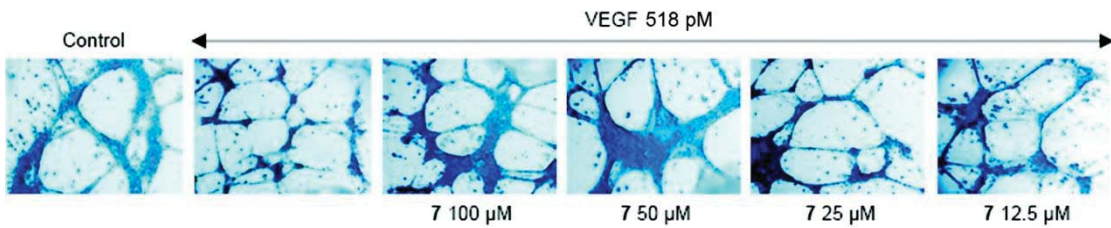


Figure 40. Inhibition de la formation de microtubule de cellules HUVE sur Matrigel par le peptide c[YYDEGLEE]-NH₂ (numéro 7).

¹⁹⁸ El-Mousawi M, Tchistiakova L, Yurchenko L, et al. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 46681-46691

II. Développement de peptides cycliques modifiés en position C-terminale

Articles:

La conception de ces peptides cycliques modifié en C-terminal et leur synthèse avec une autre voie puis l'évaluation biologique par le test ELISA ont été publié :

Article 1 :

- “Design and Synthesis of C-Terminal Modified Cyclic Peptides as VEGFR1 Antagonists.” **Wang L**, Gagey-Eilstein N, Broussy S, Reille-Seroussi M, Huguenot F, Vidal M, Liu WQ. *Molecules* 2014, 19, 15391-15407.

Article 2:

- “Inhibition of VEGF/VEGFR1 interaction by a series of C-terminal modified cyclic peptides.” **Wang L**, Broussy S, Gagey-Eilstein N, Reille-Seroussi M, Huguenot F, Vidal M, Liu WQ. *Research Highlight, Receptors & Clinical Investigation*, 2015, 2: e534. doi: 10.14800/rci.534 (invited).

Article

Design and Synthesis of C-Terminal Modified Cyclic Peptides as VEGFR1 Antagonists

Lei Wang ¹, Nathalie Gagey-Eilstein ¹, Sylvain Broussy ¹, Marie Reille-Seroussi ¹,
Florent Huguenot ¹, Michel Vidal ^{1,2,*} and Wang-Qing Liu ^{1,*}

¹ UMR 8638 CNRS, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4 avenue de l'observatoire, Paris 75006, France; E-Mails: lei.wang1@etu.parisdescartes.fr (L.W.); nathalie.eilstein@parisdescartes.fr (N.G.-E.); sylvain.broussy@parisdescartes.fr (S.B.); marie.reille@etu.parisdescartes.fr (M.R.-S.); florent.huguenot@parisdescartes.fr (F.H.)

² UF Pharmacocinétique et pharmacochimie, hôpital Cochin, AP-HP, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, Paris 75014, France

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: michel.vidal@parisdescartes.fr or michel.vidal@cch.aphp.fr (M.V.); wangqing.liu@parisdescartes.fr (W.-Q.L.); Tel.: +33-1-5373-1564 (M.V. & W.-Q.L.); Fax: +33-1-4329-1403 (M.V. & W.-Q.L.).

External Editor: Philippe Belmont

Received: 7 August 2014; in revised form: 12 September 2014 / Accepted: 17 September 2014 /

Published: 26 September 2014

Abstract: Previously designed cyclic peptide antagonist c[YYDEGLEE]-NH₂ disrupts the interaction between vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (VEGFRs). It represents a promising tool in the fight against cancer and age-related macular degeneration. We described in this paper the optimization of the lead peptide by C-terminal modification. A new strategy for the synthesis of cyclic peptides is developed, improving the cyclisation efficiency. At 100 µM, several new peptides with an aromatic group flexibly linked at C-terminal end showed significantly increased receptor binding affinities in competition ELISA test. The most active peptide carrying a coumarin group may be a useful tool in anti-angiogenic biological studies.

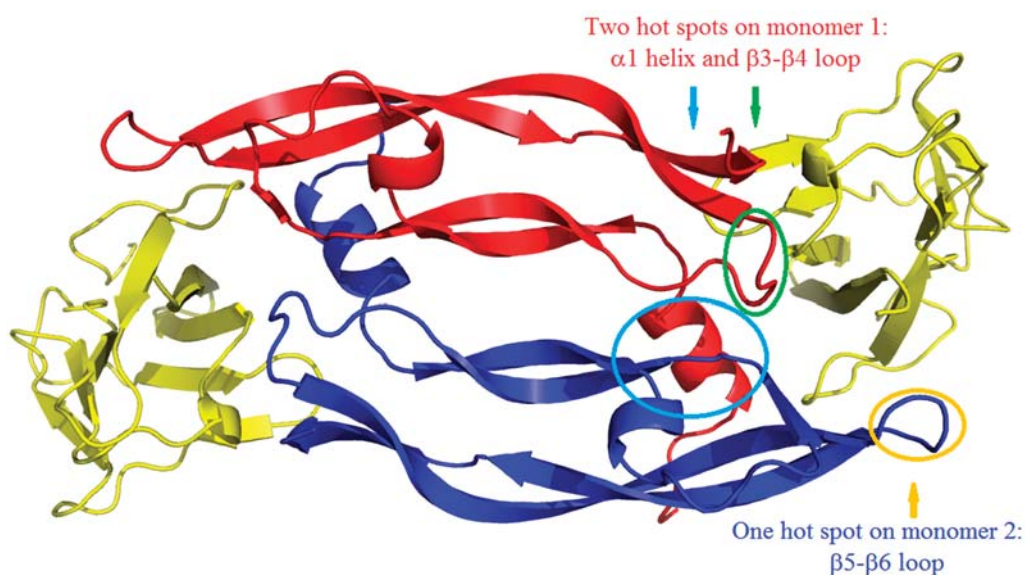
Keywords: VEGF; VEGFR; angiogenesis; cyclic peptides

1. Introduction

Angiogenesis, a complex multistep process, occurs in embryogenesis, wound repair and during the female menstrual cycle. It is tightly controlled by pro- and anti-angiogenic factors and the shift of equilibrium is associated with several human diseases, as age-related macular degeneration, psoriasis, rheumatoid arthritis, or malignant tumors [1]. Its regulation depends on inhibitory and activating factors, such as vascular endothelial growth factors (VEGF). VEGFs are secreted proteins that bind to transmembrane receptors on the surface of endothelial cells (EC), inducing their dimerization, tyrosine kinase activation and the downstream serine/threonine kinase signal transduction pathways [2,3]. The VEGF receptors include VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, and two co-receptors, neuropilin 1 and neuropilin 2, which amplify the VEGF induced pro-angiogenic effects [4]. While VEGFR3 is involved in lymphangiogenesis, we focused on pro-angiogenic receptors VEGFR1 and VEGFR2, which are validated anticancer targets [5].

In clinical practice, the targeting of VEGFR pathways is performed either with antibodies (for example bevacizumab, targeting the VEGF) or tyrosine kinase inhibitors (for example sunitinib or sorafenib, targeting VEGFR). Nevertheless, antibodies, which are very specific, have a high variability in their pharmacokinetic properties, while tyrosine kinase inhibitors, which have a good bioavailability and are orally active, are not specific because of the high homology among kinase domains, and constitute multi kinase inhibitors [6]. Consequently, an original approach to block the kinase activity of VEGFR, and therefore downstream kinase cascades, is to conceive VEGFR antagonists, which bind to VEGFR and compete with VEGF [7]. Such antagonists, indirectly inhibiting protein kinase activity, are in the category of inhibitors of protein-protein interactions (PPIs), a field that has drawn great interests in the last decade, leading to clinical trials of several compounds [8,9]. Our approach is based on structural data of the binding between VEGF and VEGFR (Figure 1).

Figure 1. Complex of a VEGF-A dimer with two D2 domains of VEGFR1. The two VEGF-A monomers are presented in red and in blue, the two D2 are in gold. The binding sites on VEGF are circled [10].



VEGFR is constituted of seven extracellular domains, one transmembrane domain and a cytosolic kinase domain. Among these domains, domain 2 (D2) is the main VEGF binding site. Structures of VEGF or PlGF (placental growth factor) in complex with D2 of VEGFRs have been solved [10–13]. As can be seen on the VEGF dimer/D2-VEGFR1 complex, the binding sites concern the $\alpha 1$ helix and the $\beta 3$ - $\beta 4$ loop of one VEGF monomer and the $\beta 5$ - $\beta 6$ loop of the second VEGF monomer (Figure 1). Many efforts have been pursued in the search of antagonists of VEGF/VEGFR interactions based on the available structural data. From both the $\alpha 1$ helix sequence VEGF_{16–25} (KFMDVYQRSY) and the $\beta 5$ - $\beta 6$ loop hairpin sequence VEGF_{79–96} (QIMRIKPHQGQHIGEMSF), linear or cyclic peptides and peptidomimetics have been developed [14–21]. Some of them have shown anti-angiogenic effects on *in vivo* assays and tumor growth inhibition on animal model [16,20–23], however, surprisingly, some designed peptides showed pro-angiogenic effects [21,24]. From the $\beta 3$ - $\beta 4$ loop, we have designed in our laboratory a cyclic peptide mimicking simultaneously the $\beta 3$ - $\beta 4$ loop and two important tyrosine residues of the $\alpha 1$ helix [25,26]. Some of these rationally designed peptides/peptidomimetics have been shown capable of antagonizing VEGF binding to VEGFR1. On cellular assays, they inhibit VEGF induced receptors autophosphorylation, intracellular signal pathways, such as ERK or Akt phosphorylations, and also cell proliferation and migration.

In this paper, we describe the optimization of the last $\beta 3$ - $\beta 4$ loop (green circled site on Figure 1) derived cyclic peptide, by C-terminal modification and consequently the synthesis and biochemical evaluation on VEGFR1 binding of these new peptides.

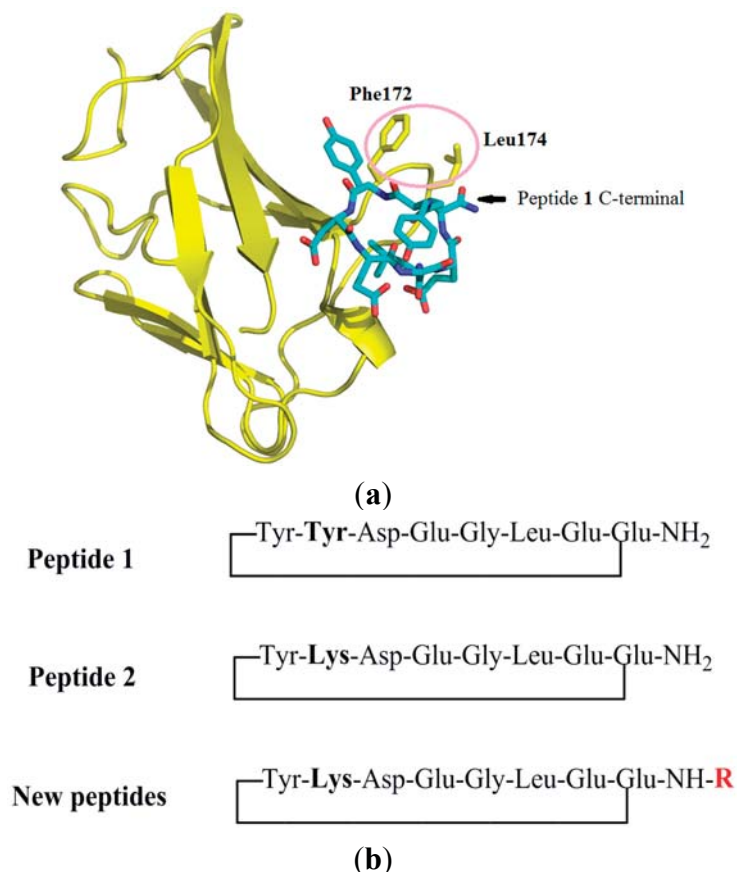
2. Results and Discussion

2.1. Design of Peptides

In the laboratory, a series of cyclic octapeptides has been developed [25]. Such peptides, mimicking the VEGF $\beta 3$ - $\beta 4$ loop and two aromatic residues of the $\alpha 1$ helix, have been shown able to compete with VEGF binding to VEGFR1. In cellular assays, these peptides inhibit VEGFR phosphorylation and downstream MAP kinases phosphorylation. They reduce HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial cells) proliferation and migration. NMR studies have proved that the peptide **1** interacts with the D2 domain of VEGFR1.

Manual docking followed by energy minimization of peptide **1** (c[YYDEGLEE]-NH₂) with the VEGFR1 D2 domain is shown in Figure 2a. Two hydrophobic residues of D2 (Phe172 and Leu174) are nearby the C-terminal amide of peptide **1**. We suppose that C-terminal amide modifications might better mimic the hydrophobic Tyr25 residue of the $\alpha 1$ helix as in the original conception (Figure 2a). Alanine-scan and lysine-scan has shown that only the first Tyr is essential, the second one can be replaced by a Lys residue, leading to peptide **2** [26]. Although leading to a slight loss of affinity, the lysine residue in peptide **2** improves peptide solubility and provides a potential molecular labeling site as well. Moreover, peptide C- or N-terminal modifications have been proven efficient as peptide optimization strategies [27,28]. We, thus, decided to cap the C-terminal end of cyclic peptide **2** by aliphatic and aromatic groups, expecting to create new receptor binding interactions with hydrophobic residues of D2 domain, such as Phe172 and Leu174 (Figure 2a,b).

Figure 2. (a) Docking model of peptide **1** (in cyan) with the VEGFR1 D2 domain (in gold) [25]. The C-terminal amide is indicated by an arrow. (b) Optimization of peptide **1**. Peptide **2** with Tyr replaced by a Lys retains peptide's receptor binding affinity but with improved solubility and creates a potential labeling site [26]. New peptides are designed with C-terminal substitutions expected to create interactions with Phe172 and Leu174 (circled in pink) belonging to the VEGFR1 D2 domain.

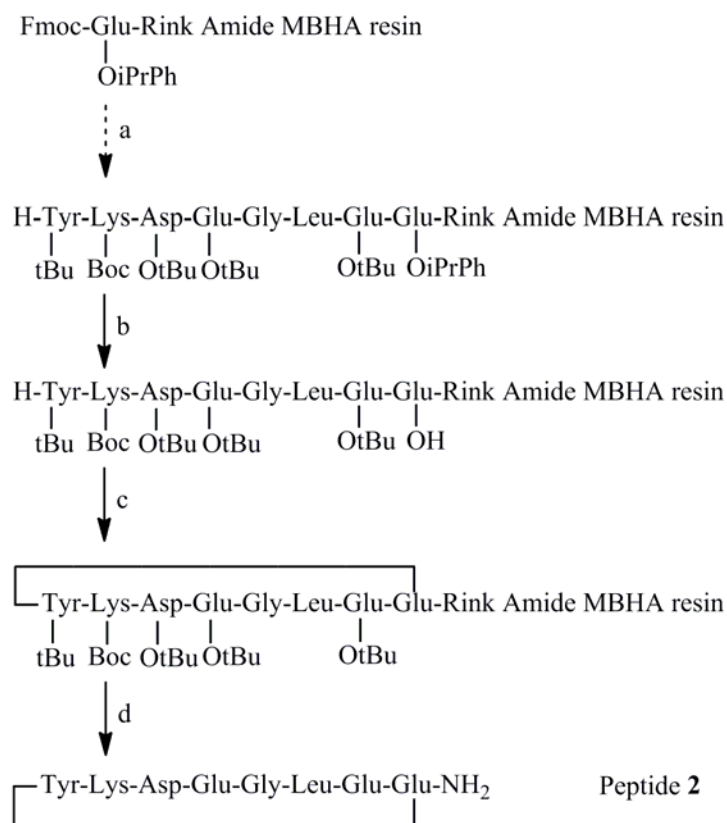


2.2. Synthesis of Peptides

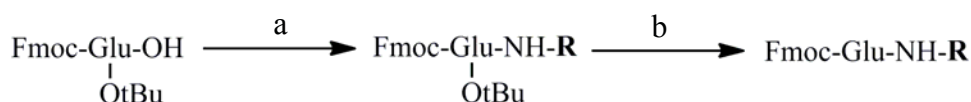
Firstly, the reference peptide **2**, was prepared for comparison. In the previous synthetic route, the side chain of C-terminal Glu residue was protected in allyl ester and was removed by Pd⁰ after peptide elongation before on resin cyclisation to the N-terminal Tyr NH₂ group [25,26]. We recently found that trace amounts of Pd might greatly influence biochemical and biological assay results [29]. Gautier *et al.* had tried using a Dmab protecting group instead of an allyl group, but the Dmab could not be completely removed in the reported conditions [26,30]. We, thus, followed the same synthetic pathway to prepare the peptide **2**, but replacing the Dmab or allyl ester side chain protection with an acid labile 2-(phenyl)isopropyl (PhiPr) ester group [31] (Scheme 1). After linear peptide synthesis on Rink amide MBHA resin, the PhiPr group was removed gently by 2% TFA containing 5% triisopropylsilane (TIPS) in CH₂Cl₂, and cyclized by HBTU/HOBt/DIEA as described [25]. Despite the use of PhiPr protection, such on-resin cyclization encountered the problem of free amino terminus capping through guanidine formation (step c in Scheme 1) [26,32].

In order to synthesize the series of new peptides, we prepared modified Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) protected glutamic acids suitable for solid-phase peptide synthesis (Scheme 2).

Scheme 1. (a) SPPS with HBTU/DIEA coupling method. (b) 2% TFA with 5% TIPS in CH₂Cl₂. (c) HBTU/HOBt/DIEA in DMF. (d) TFA with 2.5% TIPS and 2.5% water.



Scheme 2. (a) R-NH₂, HBTU/HOBt/DIEA in DMF. (b) 50% TFA in CH₂Cl₂, 1 h.

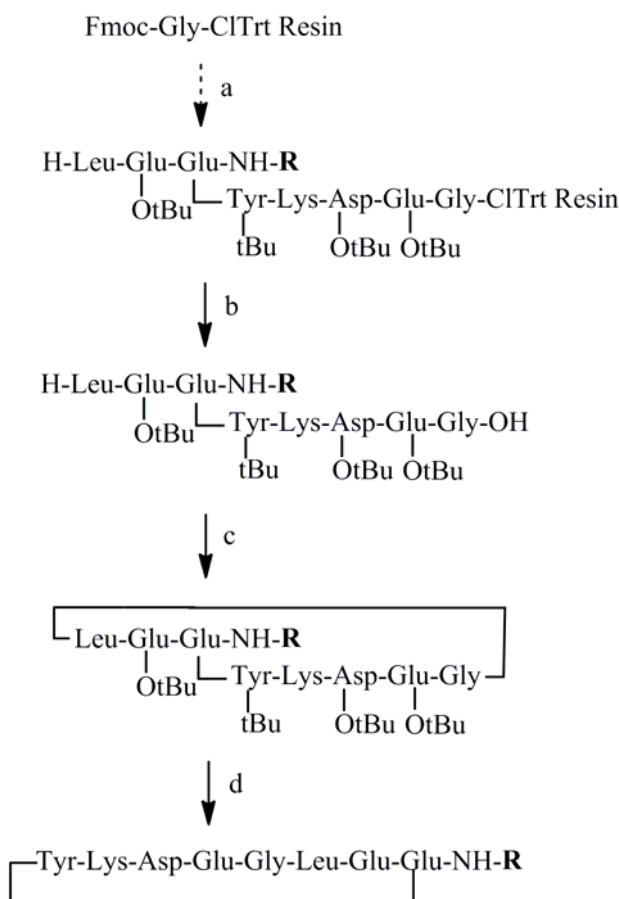


Fmoc-Glu(OtBu)-OH was coupled with various amines by conventional 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate/1-hydroxybenzotriazole/diisopropylethylamine (HBTU/HOBt/DIEA) coupling reagents in *N,N*-dimethylformamide (DMF), then the side chain *t*Bu ester was deprotected by 50% trifluoroacetic acid (TFA) in dichloromethane to give the desired Fmoc-Glu-NHR in good overall yields (50%–90%). The commercially non-available amine 4-(aminomethyl)-7-methoxy-2*H*-chromen-2-one was prepared following the described Delépine method for the 6,7-dimethoxycoumarin analog [33]. It has been reported that the Fmoc group is sensitive to organic bases and can be removed, not only by secondary amines, such as piperidine, but also by primary amines, such as cyclohexylamine and ethanolamine, especially in the polar solvent DMF [34]. Thus, the Fmoc-Glu-(OtBu)-OH was preactivated 30 min by HBTU/HOBt/DIEA before the addition of 1.8 equivalents of amine.

Because the series of new peptides designed has the C-terminal amide capped, the same synthetic pathway cannot be applied. Although it is possible to envision on-resin cyclization by loading the resin

on the side chains of Asp or Glu in the peptide sequence, we decided to realize the cyclization in the solution phase between two small amino acid residues Gly/Leu [35], to minimize the guanidine formation cited above (Scheme 3).

Scheme 3. (a) SPPS with HBTU/DIEA coupling method. (b) 2% TFA with 5% TIPS in CH₂Cl₂. (c) DIC/HOAt in DMF 1–3 days. (d) 50% TFA in CH₂Cl₂ 2 h.

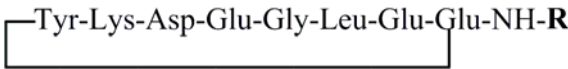
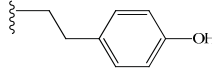
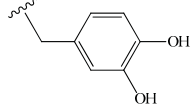
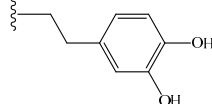
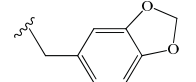
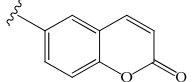
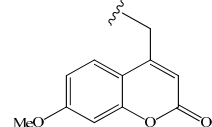


Peptides were synthesized with microwave irradiation during coupling and Fmoc-deprotection. Starting from acid labile 2-chlorotrityl resin, the first Fmoc-Gly residue was loaded in the presence of DIEA, the subsequent Fmoc-protected amino acids were introduced stepwise. Due to the instability of the 2-chlorotrityl resin, the synthesis was programmed with weak microwave irradiation (50 °C). HBTU/DIEA was used as coupling method to keep the acid sensitive resin in basic conditions. This classic method gave better results than a more recently developed diisopropylcarbodiimide (DIC)/OxymaPure coupling method [36], since OxymaPure is a weak acid (pK_a 4.6) and may slightly cleave the peptide from the chlorotrityl resin at each coupling step [37]. After the final Fmoc deprotection, the side chain-protected peptides were freed from resin by 2% TFA, then cyclized in DMF with DIC/1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) (3 eq each) as coupling agents. The cyclisation was checked by HPLC analysis. After completion, generally overnight or two to three days, DMF was removed by evaporation and the peptide was precipitated in water and washed thoroughly with aqueous NaHCO₃ solution to removed diisopropylurea and HOAt. Then, the peptide was fully deprotected by 50% TFA in the presence of 2% of TIPS and purified by HPLC. Generally, this synthetic pathway gives satisfactory total yield.

2.3. Evaluation of the Inhibitory Effect of Peptides on the VEGF-VEGFR1 Interaction

Peptides VEGFR1 binding ability was determined by a competition ELISA test [38]. Briefly, recombinant human VEGFR1 extracellular domains (ECD) were adsorbed on the surface of a 96-well microplate. After washing and BSA blocking, the plate was incubated with different compounds at 100 μ M in competition with biotinylated VEGF (btVEGF). After additional washing steps, the remaining btVEGF was detected by chemiluminescence, via an HRP-conjugated streptavidin. The results in Table 1 are presented in percentages of VEGF displaced compared to the value without peptide competitor.

Table 1. Cyclic peptides with C-terminal substitutions. Displacement represents the percentage of btVEGF displaced by the peptides at 100 μ M. The values are the average of at least 3 tests each in triplicate.

					
Peptide	R	Displacement 100 μ M (%)	Peptide	R	Displacement 100 μ M (%)
2	H [26]	12	11	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -Ph	12
3	pentyl	19	12	-CH ₂ -CH(Ph) ₂	20
4	isobutyl	11	13	(1-naphthalene)methyl	24
5	allyl	35	14		40
6	(2-hydroxy)ethyl	23	15		58
7	cyclohexyl	9	16		53
8	(cyclohexyl)methyl	7	17		42
9	-CH ₂ -Ph (benzyl)	39	18		14
10	-CH ₂ -CH ₂ -Ph	43	19		68

Addition of aliphatic groups at the C-terminal position had little effect on the peptide's receptor binding affinity (peptides **3–8**). Sterically hindered groups like cyclohexyl decreased the percentage of VEGF displaced. However, allyl or hydroxyl groups, more electron-rich, increased slightly the value (peptides **5** and **6**).

Among the aromatic substituents, benzyl groups linked through one or two methylene were beneficial (peptides **9** and **10**), but a three methylene linker was detrimental (peptide **11**). Two phenyl groups (peptide **12**) showed also a weak effect. These results suggest that the targeted pocket believed to interact with the C-terminal group is near as expected, but not big or deep. Following the result of peptide **6**, we then were interested by hydroxyl substitution on the phenyl group. Hydroxy or oxygen ester/ether

substitutions were beneficial for receptor binding. Although peptide **14** showed similar affinity as peptide **10**, peptides **15** and **16** were, effectively, much more active. We suppose that because a hydroxyl group is both a hydrogen bond acceptor and donor group, it may create new interactions with some receptor residue especially when it is at the *meta* position. This is supported by the fact that cyclization of two hydroxyl groups in peptide **15** by a methylene decreased the affinity (peptide **17**). As in the case of aliphatic substitutions, direct aromatic substitution decreased greatly the peptide's affinity (peptide **18**). However, when the coumarinyl group was linked by a rotatable methylene (peptide **19**), we recovered the peptide's affinity, suggesting both a hydrophobic pocket on the VEGFR1 D2 domain and the importance of hydrogen bond.

We have to stress here that the commercial btVEGF does not have the same VEGF biotinylation level for different batches. The quantity of btVEGF used for each assay must be verified in order to reach the same signal level (in relative light units). If the VEGF biotinylation level is low, we have to introduce more btVEGF (containing unbiotinylated VEGF), which may give a lower peptide inhibition value. Thus, peptide **2** did not give the same displacement value as previously reported (45% in reference 26). Peptide **1** in reference 25 and 26 did not have the same inhibition (57% and 73% respectively). All the peptides have to be compared using the same btVEGF batch, which is the case in Table 1. The determination of IC₅₀ of these peptides by ELISA revealed uncertain values. The problem was also observed by the group of Barker who works on an anti-angiogenic peptide derived from tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) capable of binding to VEGFR2 ECD [39]. In their study, incomplete btVEGF displacement has also been obtained in their ELISA assay. The authors suggested that increasing inhibitor in high concentrations led to non-specific binding of btVEGF to the plate. To confirm that our peptide's affinity is not a non-specific binding, peptides **15**, **16**, and **19** were assayed at three different concentrations (Table 2).

Table 2. Dose dependent inhibition of selected peptides on VEGFR1 binding measured by ELISA. The values are the average of at least 3 tests each in triplicate. NA means no activity.

Peptide	Displacement (%)		
	100 μ M	50 μ M	30 μ M
15	58	37	14
16	53	31	NA
19	68	41	11

Indeed, all three peptides dose dependently inhibit VEGF/VEGFR1 binding, highlighting a targeted VEGFR1 binding. Over 100 μ M, peptides gave sometimes-lower btVEGF displacement due to peptide precipitation and aggregation in addition to the non-specific btVEGF effect.

Initial reference peptide **1** had been studied by NMR in complex with the D2 domain of VEGFR1 and had been proved to share with VEGF [10] a common binding site on D2 (His223, Arg224) [25]. Moreover, immobilized peptide **2**, through the lysine side chain, can pull down VEGFR1 D2, VEGFR1 ECD, and VEGFR2 ECD, and do not bind to VEGF co-receptor neuropilin 1 [26]. In fact, neuropiline 1 binds to the extreme C-terminal domains (exons 7 and 8 encoded) of VEGF₁₆₅, the dominant isoform responsible for pathological angiogenesis, while VEGFR1 and VEGFR2 bind to the domains encoded by exons 2–5 [40]. Based on the results obtained in References [25] and [26], we believed that our new

cyclic peptides do mimic VEGF to interact with the domain D2 of VEGFR. Peptides **15**, **16**, and **19** with improved receptor binding affinities in this study are now in further structural studies and cellular evaluations. We cannot yet define their binding pocket on D2, but we suppose that this C-terminal group may establish new interactions with Leu174 and Phe172 of the D2 domain by hydrophobic and hydrogen bond interactions. A detailed NMR study is underway to confirm this hypothesis and validate the conception. Peptide **19**, carrying a hydrophobic fluorescent coumarinyl group at the C-terminal end, although slightly less water soluble than **15** and **16**, will be very helpful in co-crystallization and biological imaging studies.

3. Experimental Section

All conventionally protected amino acids, peptide synthesis reagents and organic solvents were from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France) and other chemical products from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) or Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA). Fmoc-Glu(O-2-PhiPr)-OH was from Novabiochem® (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). ¹H-NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer (300 MHz) and were internally referenced to residual protonated solvent signals. Mass spectrometry spectra were recorded on a Waters ZQ 2000 spectrometer. Peptides were synthesized in solid phase using Fmoc chemistry on microwave assisted CEM-Liberty 1 synthesizer. DMF was used as solvent. Crude peptides were purified on a Waters 600 semi-preparative HPLC system using a GRACE Vydac Protein and Peptide 218TP column (10 × 250 mm) with a linear A-B gradient at a flow rate of 2 mL/min. Mobile phase A was 0.1% TFA aqueous, and B was 0.09% TFA in 70% acetonitrile aqueous solutions. Peptides were analyzed on a Shimadzu Prominence LC-20AD HPLC using a GRACE Vydac Protein and Peptide 218TP column (4.6 × 250 mm) with a linear A-B gradient at a flow rate of 1 mL/min where solvents A and B were as described above. Absorbance signals of peptides were detected at 214 nm. The purity of the peptides was verified by analytical HPLC as described above, and the purified peptides were further characterized by mass spectrometry.

3.1. Preparation of 4-Aminomethyl-7-methoxy-chromen-2-one Hydrochloride

4-Bromomethyl-7-methoxy-chromen-2-one (0.84 g, 2.7 mmol) was dissolved in 30 mL chloroform, hexamethylenetetramine (0.57 g, 4.0 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature during 24 h. The resulting precipitate was filtered, washed with CHCl₃ dried to yield 1-[(7-methoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl]-3,5,7-triaza-1-azoniatricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane bromide as a yellow solid. This intermediate was then dissolved in 20 mL ethanol containing 3 mL of concentrate HCl (37%) and refluxed until the yellow mixture gradually turned white, indicating the completion of the hydrolysis. The reaction mixture was cooled and the precipitate was collected by filtration. The white solid was washed with ethanol and dried to give 4-aminomethyl-7-methoxy-chromen-2-one hydrochloride (0.29 g, yield 53.5%). Its spectroscopic and analytical properties were identical to those reported [41]. ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 3.87 (s, 3H, OCH₃), δ 4.35 (s, 2H, CH₂-N), δ 6.44 (s, 1H, H-3), δ 6.95 (dd, 1H, H-6), δ 7.00 (d, 1H, H-8), δ 7.51 (d, 1H, H-5), δ 9.06 (s, 3H, NH₃⁺).

3.2. General Method for the Preparation of Substituted Glutamic Amides (Compounds 1–17)

Fmoc-Glu(OtBu)-OH (1.28 g, 3 mmol) was dissolved in 15 mL DMF, HBTU (1.36 g, 3.6 mmol), and HOBt (0.48 g, 3.6 mmol) were added. After complete dissolution, DIEA (1.05 mL, 6 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature 30 min before addition of R-NH₂ (5.4 mmol). The completion of the reaction was checked by TLC. Then DMF was evaporated *in vacuo* and the residue was triturated in water to give a precipitate, which was thoroughly washed successively with 10% Na₂CO₃ solution, 10% citric acid solution, and water. If the product was not solidified, the residue was taken in ethyl acetate and washed successively with 10% Na₂CO₃ solution, 10% citric acid solution, and water, dried and evaporated to give the crude Fmoc-Glu(OtBu)-NHR. Generally, without further purification, the crude Fmoc-Glu(OtBu)-NHR was treated with 50% TFA in CH₂Cl₂ containing 2.5% TIPS at room temperature during 1 h. After removal of TFA and solvent, the residue was solidified in ether/cyclohexane and collected by filtration. Purification by chromatography on silica gel with CH₂Cl₂ containing 1%–5% of methanol and 0.1% of acetic acid gave Fmoc-Glu-NHR for further peptide synthesis. Trace amounts of acetic acid must be removed by lyophilization of the final product's aqueous suspension before being used in peptide synthesis, to avoid peptide acetyl capping. The total yields were 50%–90% in two steps.

¹H-NMR chemical shifts for Fmoc protected glutamic amide are in ppm. The black values are for various R groups, and gray italic for the same Fmoc and glutamic core groups.

Fmoc-Glu-NH-(CH₂)₄CH₃ (1): yield 94%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 0.8 (t, 3H, CH₃), 1.2 (m, 4H, 2 × CH₂), 1.4 (m, 2H, CH₂), 3.90 (m, 2H, CH₂-N), 7.85 (d, 1H, NH). 1.8 (m, 2H, CH₂β), 2.2 (m, 2H, CH₂γ), 4.0 (m, 1H, CHα), 4.3 (m, 3H, 9-H, CH₂Fmoc), 7.32 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.4 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.5 (d, 1H, NH), 7.75 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 12.1 (s, 1H, CO₂H).

Fmoc-Glu-NH-CH₂CH(CH₃)₂ (2): yield 82%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 0.8 (d, 6H, 2 × CH₃), 1.7 (m, 1H, CH), 2.9 (m, 2H, CH₂-N), 7.85 (d, 1H, NH). 1.8 (m, 2H, CH₂β), 2.2 (m, 2H, CH₂γ), 4.0 (m, 1H, CHα), 4.3 (m, 3H, 9-H, CH₂Fmoc), 7.32 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.4 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.5 (d, 1H, NH), 7.75 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 12.1 (s, 1H, CO₂H).

Fmoc-Glu-NH-CH₂CH=CH₂ (3): yield 90%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 3.7 (m, 2H, CH₂-N), 5.0–5.2 (m, 2H, CH₂), 5.75 (m, 1H, CH), 8.05 (t, 1H, NH). 1.8 (m, 2H, CH₂β), 2.25 (m, 2H, CH₂γ), 4.0 (m, 1H, CHα), 4.3 (m, 3H, 9-H, CH₂Fmoc), 7.3 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.4 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.55 (d, 1H, NH), 7.75 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 12.1 (s, 1H, CO₂H). MS 431 (M+Na⁺) found.

Fmoc-Glu-NH-CH₂CH₂OH (4): yield 86%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 3.1 (m, 2H, CH₂-N), 3.4 (m, 2H, CH₂-O), 4.65 (t, 1H, OH), 1.8 (m, 2H, CH₂β), 2.2 (m, 2H, CH₂γ), 4.0 (m, 1H, CHα), 4.2 (m, 3H, 9-H, CH₂Fmoc), 7.32 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.41 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.55 (d, 1H, NH), 7.75 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 11.9 (s, 1H, CO₂H). MS 413 (M+H⁺) found.

Fmoc-Glu-NH-cyclohexyl (5): yield 63%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 1.1 (m, 3H, H-hex), 1.2 (m, 3H, H-hex), 1.7 (m, 4H, H-hex), 3.5 (m, 1H, H-hex), 2.0 (m, 2H, CH₂β), 2.2 (m, 2H, CH₂γ), 4.0 (m, 1H, CHα), 4.2

(m, 3H, 9-H, CH₂-Fmoc), 7.3 (t, 2H, H_{Ar}-Fmoc), 7.4 (t, 2H, H_{Ar}-Fmoc), 7.55 (d, 1H, NH), 7.8 (m, 3H, H_{Ar}-Fmoc, NH), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}-Fmoc), 12.2 (s, 1H, CO₂H).

Fmoc-Glu-NH-CH₂-cyclohexyl (**6**): yield 53%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 0.8 (m, 2H, H-hex), 1.1 (m, 3H, H-Hex), 1.35 (m, 1H, H-hex), 1.65 (m, 5H, H-Hex), 2.9 (m, 2H, CH₂-N), 7.85 (t, 1H, NH), 1.85 (m, 2H, CH₂β), 2.25 (m, 2H, CH₂γ), 4.0 (m, 1H, CHα), 4.2 (m, 3H, 9-H, CH₂Fmoc), 7.3 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.4 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.55 (d, 1H, NH), 7.75 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 12.1 (s, 1H, CO₂H).

Fmoc-Glu-NH-CH₂Ph (**7**): yield 57%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 4.3 (m, 2H, CH₂-N), 7.2 (m, 5H, H_{Ar}), 8.45 (t, 1H, NH), 1.9 (m, 2H, CH₂β), 2.25 (m, 2H, CH₂γ), 4.0 (m, 1H, CHα), 4.2 (m, 3H, 9-H, CH₂Fmoc), 7.3 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.4 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.6 (d, 1H, NH), 7.75 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 12 (s, 1H, CO₂H).

Fmoc-Glu-NH-(CH₂)₂Ph (**8**): yield 77%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 2.7 (t, 2H, CH₂-Ar), 4.2 (m, 2H, CH₂-N), 7.2 (m, 5H, H_{Ar}), 8.0 (t, 1H, NH), 1.9 (m, 2H, CH₂β), 2.25 (m, 2H, CH₂γ), 4.0 (m, 1H, CHα), 4.3 (m, 3H, 9-H, CH₂-Fmoc), 7.3 (t, 2H, H_{Ar}-Fmoc), 7.4 (t, 2H, H_{Ar}-Fmoc), 7.5 (d, 1H, NH), 7.8 (d, 2H, H_{Ar}-Fmoc), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}-Fmoc), 12.2 (s, 1H, CO₂H).

Fmoc-Glu-NH-(CH₂)₃Ph (**9**): yield 50%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 1.65 (m, 2H, CH₂), 2.6 (t, 2H, CH₂-Ar), 3.05 (m, 2H, CH₂-N), 7.2 (m, 5H, H_{Ar}), 7.95 (t, 1H, NH), 1.95 (m, 2H, CH₂β), 2.25 (m, 2H, CH₂γ), 4.0 (m, 1H, CHα), 4.2 (m, 3H, 9-H, CH₂Fmoc), 7.3 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.4 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.55 (d, 1H, NH), 7.75 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 12.1 (s, 1H, CO₂H).

Fmoc-Glu-NH-CH₂CH(Ph)₂ (**10**): yield 71%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 3.6 (m, 1H, CH-Ar), 3.8 (m, 2H, CH₂-N), 7.15 (m, 2H, H_{Ar}), 7.25 (m, 8H, H_{Ar}), 7.9 (t, 1H, NH), 1.65 (m, 2H, CH₂β), 2.1 (m, 2H, CH₂γ), 3.9 (m, 1H, CHα), 4.2 (m, 3H, 9-H, CH₂Fmoc), 7.3 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.4 (m, 3H, H_{Ar}Fmoc, NH), 7.8 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 12 (s, 1H, CO₂H).

Fmoc-Glu-NH-CH₂-(1-naphthyl) (**11**): yield 94%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 4.8 (m, 2H, CH₂), 7.4-8 (m, 8H_{Ar}-naph), 8.5 (t, 1H, NH), 1.85 (m, 2H, CH₂β), 2.25 (m, 2H, CH₂γ), 4.0 (m, 1H, CHα), 4.2 (m, 3H, 9-H, CH₂Fmoc), 7.3 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.4 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.55 (d, 1H, NH), 7.75 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 12.1 (s, 1H, CO₂H).

Fmoc-Glu-NH-(CH₂)₂(Ph(4-OH)) (**12**): yield 76%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 2.6 (t, 2H, CH₂-Ar), 3.2 (m, 2H, CH₂-N), 6.6 (d, 2H, H_{Ar}), 6.9 (d, 2H, H_{Ar}), 7.9 (t, 1H, NH), 8.2 (s, 1H, OH), 1.8 (m, 2H, CH₂β), 2.2 (m, 2H, CH₂γ), 4.0 (m, 1H, CHα), 4.25 (m, 3H, 9-H, CH₂Fmoc), 7.3 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.4 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.55 (d, 1H, NH), 7.8 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 12 (s, 1H, CO₂H).

Fmoc-Glu-NH-CH₂(Ph(3,4-OH)₂) (**13**): yield 78%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 4.1 (t, 2H, CH₂-Ar), 6.5 (d, 1H, H_{Ar}), 6.7 (m, 2H, H_{Ar}), 8.25 (t, 1H, NH), 8.8 (s, 2H, 2 × OH), 1.9 (m, 2H, CH₂β), 2.25 (m, 2H, CH₂γ), 4.0 (m, 1H, CHα), 4.25 (m, 3H, 9-H, CH₂-Fmoc), 7.3 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.4 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.55 (d, 1H, NH), 7.8 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 12 (s, 1H, CO₂H). MS 491 (M+H⁺) found.

Fmoc-Glu-NH-CH₂CH₂(Ph(3,4-OH)₂) (14): yield 77%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 2.5 (m, 2H, CH₂-Ar), 3.2 (m, 2H, CH₂-N), 6.4 (d, 1H, H_{Ar}), 6.6 (m, 2H, H_{Ar}), 7.9 (t, 1H, NH), 8.7 (s, 2H, 2 × OH). 1.8 (m, 2H, CH₂β), 2.2 (m, 2H, CH₂γ), 4.0 (m, 1H, CHα), 4.25 (m, 3H, 9-H, CH₂Fmoc), 7.3 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.4 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.55 (d, 1H, NH), 7.8 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 12 (s, 1H, CO₂H). MS 505 (M+H⁺) found.

Fmoc-Glu-NH-piperonyl (15): yield 77%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 6.82 (d, 1H, 7'-H), 6.8 (s, 1H, 3'-H), 6.76 (d, 1H, 6'-H), 8.4 (t, 1H, NH). 1.95 (m, 2H, CH₂β), 2.35 (m, 2H, CH₂γ), 4.0 (m, 1H, CHα), 4.3 (m, 3H, 9-H, CH₂Fmoc), 7.3 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.4 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.6 (d, 1H, NH), 7.75 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 12 (s, 1H, CO₂H).

Fmoc-Glu-NH-(8-coumarinyl) (16): yield 47%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.7 (m, 3H, 4',5',7'-H), 10.3 (s, 1H, NH), 7.4 (m, 1H, 8'-H), 6.5 (d, 1H, 3'-H). 1.95 (m, 2H, CH₂β), 2.25 (m, 2H, CH₂γ), 4.0 (m, 1H, CHα), 4.3 (m, 3H, 9-H, CH₂Fmoc), 7.3 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.4 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.6 (d, 1H, NH), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 8.1 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 12 (s, 1H, CO₂H).

Fmoc-Glu-NH-CH₂-4-(7-MeO-coumarinyl) (17): yield 74%. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 3.8 (s, 3H, CH₃O), 4.5 (m, 2H, 4'-CH₂), 6.15 (s, 1H, 3'-H), 6.92, 6.95 (dd, 1H, 6'-H), 7.0 (d, 1H, 8'-H), 7.7 (m, 1H, 5'-H), 8.5 (t, 1H, NH). 1.9 (m, 2H, CH₂β), 2.3 (m, 2H, CH₂γ), 4.1 (m, 1H, CHα), 4.3 (m, 3H, 9-H, CH₂Fmoc), 7.3 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.4 (t, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.6 (d, 1H, NH), 7.7 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 7.9 (d, 2H, H_{Ar}Fmoc), 12 (s, 1H, CO₂H).

3.3. New Synthesis of Reference Peptide 2

Starting from Rink amide MBHA resin (200 mg, 0.45 mmol/g), the synthesis of linear peptides were conducted by CEM-Liberty 1 synthesizer with Fmoc chemistry at 0.1 mmol scale. The coupling was realized at 50 °C for 10 min with microwave irradiation, with HBTU/DIEA as coupling reagents. Fmoc deprotection was conducted at 50 °C for 5 min. Then the peptidyl resin was placed in a syringe adapted with a frit and a stopper. After the washing steps with CH₂Cl₂, a solution of 2% TFA and 5% TIPS in CH₂Cl₂ (20 mL in total) was added, and the syringe was shaken for 5 min before draining. This procedure was repeated one time to insure complete deprotection. Then the resin was washed with CH₂Cl₂ and swollen in DMF (5 mL). HBTU/HOBt/DIEA (1.5/1.5/4.5 equivalents to resin loading) were added and the resulting suspension was shaken overnight on a wheel. After draining and washing steps with DMF and CH₂Cl₂, the peptidyl resin was dried and cleaved by a solution of 2.5% TIPS and 2.5% water in TFA for 2 h. The resin was then removed by filtration and the filtrate was condensed by evaporation. The residue was precipitated in ether and centrifuged. The precipitate was washed two times with ether and collected by centrifugation. The crude cyclic peptide was then purified by semi-preparative HPLC. The fractions were checked by analytical HPLC analysis, collected and lyophilized. The peptide identity was confirmed by mass spectrometry analysis.

3.4. Synthesis of C-Terminal Substituted Cyclic Peptides (Peptides 3–19)

Starting from Fmoc-Gly-Cl Trt resin, the synthesis of linear peptides were conducted on a CEM-Liberty 1 synthesizer with Fmoc chemistry at 0.1 mmol scale. The coupling was realized at 50 °C

for 10 min with microwave irradiation, with HBTU/DIEA as coupling reagents. Fmoc deprotection was conducted at 50 °C for 5 min. The linear peptide was then cleaved from resin by treatment with 2% TFA and 5% TIPS in CH₂Cl₂ (10 mL) during 1 h. The suspension was filtered to 10% pyridine methanol solution (4 mL). After solvents evaporation, the residue was triturated with water and the precipitate collected and dried to give the side chain protected linear peptide. This crude peptide was then dissolved in 50 mL of DMF, HOAt (41 mg, 0.3 mmol) and DIC (46 µL, 0.3 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature during 1–3 days following HPLC check. The color change of HOAt, yellow-colorless-yellow, helped to indicate also the completion of the cyclisation. DMF was then removed by evaporation and the residue precipitated in water, washed thoroughly with an aqueous NaHCO₃ solution to remove diisopropylurea and HOAt, and dried. The crude cyclic protected peptide was then treated with 50% TFA in CH₂Cl₂ (10 mL in total) with 2% TIPS during 2 h. After evaporation, the residue was precipitated in ether and centrifuged. The precipitate was washed two times with ether and collected by centrifugation. The crude cyclic peptide was then purified by semi-preparative HPLC. The fractions were checked by analytical HPLC analysis, collected, and lyophilized. The peptide identity was finally confirmed by mass spectrometry analysis. Analytical results are represented in Table 3.

Table 3. Cyclic peptides with C-terminal modifications. Yield is the total yield of linear peptide synthesis and its cyclization. MS is obtained by ESI⁺ method. HPLC retention times (Rt) obtained by the gradient indicated (mobile phases A: 0.1% TFA aqueous; B: 0.09% TFA in 70% acetonitrile aqueous solutions). All numbers of peptides refers to Table 1.

Peptide	Yield (%)	MS Found	Rt (Minutes)
2	10 (8.8 [26])	963 (M+H ⁺)	12.5 (10%–60% B in 30 min)
3	29.0	1034 (M+H ⁺)	14.8 (20%–80% B in 30 min)
4	12.7	1020 (M+H ⁺)	15.1 (20%–80% B in 30 min)
5	3.5	1004 (M+H ⁺)	10.2 (20%–70% B in 20 min)
6	7.8	1008 (M+H ⁺)	11.0 (10%–60% B in 20 min)
7	23.4	1046 (M+H ⁺)	18.0 (10%–60% B in 20 min)
8	10.5	1060 (M+H ⁺)	15.4 (20%–70% B in 20 min)
9	6.5	1054 (M+H ⁺)	13.0 (20%–70% B in 20 min)
10	30.9	1067 (M+H ⁺)	14.0 (20%–80% B in 30 min)
11	15.5	1081 (M+H ⁺)	15.7 (20%–70% B in 20 min)
12	11.8	1144 (M+H ⁺)	17.9 (20%–70% B in 20 min)
13	37	1125 (M+Na ⁺)	18.5 (20%–80% B in 30 min)
14	20.3	1083 (M+H ⁺)	13.7 (20%–80% B in 30 min)
15	11.1	1085 (M+H ⁺)	13.5 (10%–60% B in 20 min)
16	30.8	1099 (M+H ⁺)	14.4 (10%–60% B in 20 min)
17	29.2	1098 (M+H ⁺)	12.8 (20%–70% B in 20 min)
18	3.3	1108 (M+H ⁺)	12.2 (20%–70% B in 20 min)
19	26.6	1152 (M+H ⁺)	13.5 (20%–70% B in 20 min)

3.5. ELISA VEGF-VEGFR1 Binding Inhibition Assay

The 96-well plates were coated with humanized extracellular domains (ECD) of VEGFR-1 (R&D Systems, Abingdon, UK) in PBS (20 ng/well) overnight at 4 °C. On the following day, the plates were

washed with 250 µL wash buffer (PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20) three times and treated with blocking buffer (PBS containing 3% (w/v) BSA) at 37 °C for 2 h, followed by three washes with wash buffer. 50 µL of peptides solution at twice the desired final concentration (in PBS containing 2% DMSO) were added in triplicate wells and the plate was kept at 37 °C for 1 h. A solution of btVEGF-A₁₆₅ (R & D Systems, Abingdon, UK) at twice the desired final concentration (typically 100 pM) in 50 µL PBS was added. After 2 h incubation, the plates were washed four times with wash buffer. 100 µL of Streptavidin-Horseradish Peroxidase (Amersham, Pittsburgh, PA, USA) diluted 1:8000 w in PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 and 0.3% (w/v) BSA) were then added to each well to detect the btVEGF-A₁₆₅ bound to the ECD of VEGFR1. After 45 min incubation at 37 °C and in the dark, the plate was washed five times with wash buffer. A volume of 100 µL of SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA) was added and the chemiluminescence was quantified with a Perkin Elmer Victor 2 spectrophotometer (Victor Wallac Multilabel reader). The percentages of displacement were calculated by the following formula: $100 \times [1 - (S - NS)/(MS - NS)]$ where S is the signal measured, NS is the nonspecific binding signal defined as the signal measured in the absence of coated receptor on the microplate, and MS is the maximum binding signal obtained with (bt)-VEGF-A₁₆₅ without competitor.

4. Conclusions

We described here the optimization of a cyclic peptide developed in our laboratory. The best peptides are in further cellular assays to evaluate their anti-angiogenic abilities. In particular, peptide **19** carrying a fluorescent coumarin group can be used as a biological marker tool for imaging applications, and could also be useful for X-ray co-structure studies.

Acknowledgments

This research was supported by the University Paris Descartes, the Centre National de la Recherche Scientifique (Chaire de partenariat CNRS-UPD to S. Broussy) and the ANR (ANR-2010-BLAN-1533-03). L. Wang acknowledges the China Scholarship Council for the donation of a scholarship. M. Reille-Seroussi acknowledges the ARC for the donation of a scholarship (grant DOC2013 0606849). We thank Pascale Leproux for the mass spectra analysis.

Author Contributions

WQL and MV co-directed this work. LW, WQL and SB performed chemical synthesis. LW, NGE and MRS performed biochemical assay. FH participated scientific discussions. All authors wrote this paper and have given approval to the final version of the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

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

2. Kowanetz, M.; Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: Therapeutic perspective. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *17*, 5018–5022.
3. Kieran, M.W.; Kalluri, R.; Cho, Y.J. The VEGF pathway in cancer and disease: Responses, resistance, and the path forward. *CSH-Perspect. Med.* **2012**, *5*, doi:10.1101/cshperspect.a006593.
4. Ferrara, N.; Gerber, H.P.; LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 669–676.
5. Ferrara, N.; Kerbel, R.S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **2005**, *438*, 967–974.
6. Shibuya, M. VEGF-VEGFR signals in health and disease. *Biomol. Ther.* **2014**, *22*, 1–9.
7. Goncalves, V.; Gautier, B.; Lenoir, C.; Garbay, C.; Vidal, M.; Inguibert, N. Peptides as antagonists of the VEGF receptors. *Pharmachem* **2006**. Available online: http://www.b5srl.com/articles_pharmachem.php?search_ok=1&year_search=32042&OrderFld=3&ot=R&az=A&author_search=2590&company_search=+&num_search=32142&topic_search=31655&x=17&y=10 (accessed on 23 September 2014).
8. Mullard, A. Protein-protein interaction inhibitors get into the groove. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 173–175.
9. Aeluri, M.; Chamakuri, S.; Dasari, B.; Guduru, S.K.R.; Jimmidi, R.; Jogula, S.; Arya, P. Small molecule modulators of protein-protein interactions: Selected case studies. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4640–4694.
10. Wiesmann, C.; Fuh, G.; Christinger, H.W.; Eigenbrot, C.; Wells, J.A.; de Vos, A.M. Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* **1997**, *91*, 695–704.
11. Christinger, H.W.; Germaine, F.; de Vos, A.M.; Wiesmann, C. Crystal structure of PlGF in complex with domain 2 of VEGFR1. *J. Biol. Chem.* **2003**, *279*, 10382–10388.
12. Iyer, S.; Darley, P.I.; Acharya, K.R. Structural insights into the binding of vascular endothelial growth factor-B by VEGFR-1(D2): Recognition and specificity. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 23779–23789.
13. Leppänen, V.M.; Prota, A.E.; Jeltsch, M.; Anisimov, A.; Kalkkinen, N.; Strandin, T.; Lankinen, H.; Goldman, A.; Ballmer-Hofer, K.; Alitalo, K. Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 2425–2430.
14. D’Andrea, L.D.; Iaccarino, G.; Fattorusso, R.; Sorriento, D.; Carannante, C.; Capasso, D.; Trimarco, B.; Pedone, C. Targeting angiogenesis: Structural characterization and biological properties of a de novo engineered VEGF mimicking peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 14215–14220.
15. Goncalves, V.; Gautier, B.; Garbay, C.; Vidal, M.; Inguibert, N. Structure-based design of a bicyclic peptide antagonist of the vascular endothelial growth factor receptors. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 767–772.
16. García-Aranda, M.I.; González-López, S.; Santiveri, C.M.; Gagey-Eilstein, N.; Reille-Seroussi, M.; Martín-Martínez, M.; Inguibert, N.; Vidal, M.; García-López, M.T.; Jiménez, M.A.; *et al.* Helical peptides from VEGF and Vammin hotspots for modulating the VEGF-VEGFR interaction. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1896–1905.
17. Vicari, D.; Foy, K.C.; Liotta, E.M.; Kaumaya, P.T. Engineered conformation-dependent VEGF peptide mimics are effective in inhibiting VEGF signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 13612–13625.

18. Zilberberg, L.; Shinkaruk, S.; Lequin, O.; Rousseau, B.; Hagedorn, M.; Costa, F.; Caronzolo, D.; Balke, M.; Cannon, X.; Convert, O.; *et al.* Structure and inhibitory effects on angiogenesis and tumor development of a new vascular endothelial growth inhibitor. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35564–35573.
19. García-Aranda, M.I.; Marrero, P.; Gautier, B.; Martín-Martínez, M.; Inguibert, N.; Vidal, M.; García-López, M.T.; Jiménez, M.A.; González-Muñiz, R.; Pérez de Vega, M.J. Parallel solid-phase synthesis of a small library of linear and hydrocarbon-bridged analogues of VEGF(81–91): Potential biological tools for studying the VEGF/VEGFR-1 interaction. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1978–1986.
20. García-Aranda, M.I.; Mirassou, Y.; Gautier, B.; Martín-Martínez, M.; Inguibert, N.; Vidal, M.; García-López, M.T.; Jiménez, M.A.; González-Muñiz, R.; Pérez de Vega, M.J. Disulfide and amide-bridged cyclic peptide analogues of the VEGF_{81–91} fragment: Synthesis, conformational analysis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 7526–7533.
21. Diana, D.; Basile, A.; de Rosa, L.; di Stasi, R.; Auriemma, S.; Arra, C.; Pedone, C.; Turco, M.C.; Fattorusso, R.; D’Andrea, L.D. β -Hairpin peptide that targets vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors: Design, NMR characterization, and biological activity. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 41680–41691.
22. Bello, L.; Lucini, V.; Costa, F.; Pluderi, M.; Giussani, C.; Acerbi, F.; Carrabba, G.; Pannacci, M.; Caronzolo, D.; Grosso, S.; *et al.* Combinatorial administration of molecules that simultaneously inhibit angiogenesis and invasion leads to increased therapeutic efficacy in mouse models of malignant glioma. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 4527–4537.
23. Basile, A.; Del Gatto, A.; Diana, D.; di Stasi, R.; Falco, A.; Festa, M.; Rosati, A.; Barbieri, A.; Franco, R.; Arra, C.; *et al.* Characterization of a designed vascular endothelial growth factor receptor antagonist helical peptide with antiangiogenic activity *in vivo*. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1391–1400.
24. Finetti, F.; Basile, A.; Capasso, D.; di Gaetano, S.; di Stasi, R.; Pascale, M.; Turco, C.M.; Ziche, M.; Morbidelli, L.; D’Andrea, L.D. Functional and pharmacological characterization of a VEGF mimetic peptide on reparative angiogenesis. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 303–311.
25. Goncalves, V.; Gautier, B.; Coric, P.; Bouaziz, S.; Lenoir, C.; Garbay, C.; Vidal, M.; Inguibert, N. Rational design, structure, and biological evaluation of cyclic peptides mimicking the vascular endothelial growth factor. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5135–5146.
26. Gautier, B.; Goncalves, V.; Diana, D.; di Stasi, R.; Teillet, F.; Lenoir, C.; Huguenot, F.; Garbay, C.; Fattorusso, R.; D’Andrea, L.D.; *et al.* Biochemical and structural analysis of the binding determinants of a vascular endothelial growth factor receptor peptidic antagonist. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4428–4440.
27. Jia, H.; Aqil, R.; Cheng, L.; Chapman, C.; Shaikh, S.; Jarvis, A.; Chan, A.W.; Hartzoulakis, B.; Evans, I.M.; Frolov, A.; *et al.* N-terminal modification of VEGF-A C terminus-derived peptides delineates structural features involved in neuropilin-1 binding and functional activity. *ChemBioChem* **2014**, *26*, 1161–1170.
28. Yamamoto, T.; Nair, P.; Davis, P.; Ma, S.W.; Navratilova, E.; Moye, S.; Tumati, S.; Lai, J.; Vanderah, T.W.; Yamamura, H.I.; *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of novel bifunctional C-terminal-modified peptides for delta/mu opioid receptor agonists and neurokinin-1 receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2779–2786.

29. Gaucher, J.F.; Reille-Seroussi, M.; Gagey-Eilstein, N.; Broussy, S.; Coric, P.; Seijo, B.; Lascombe, M.-B.; Gautier, B.; Liu, W.-Q.; Huguenot, F.; *et al.* Metal-Induced vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Dimerization Competes with VEGF-A Binding. *J. Biol. Chem.* **2014**, submitted.
30. Johnson, T.; Liley, M.J.; Cheeseright, T.J.; Begum, F. Problems in the synthesis of cyclic peptides through use of the Dmab protecting group. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, *43*, 2811–2820.
31. Reczek, J.J.; Rebolini, E.; Urbach, A.R. Solid-phase synthesis of peptide-Viologen conjugates. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2111–2114.
32. Gausepohl, H.; Pieleles, U.; Frank, R. Schiff base analog formation during *in situ* activation by HBTU and TBTU. In *Peptides, Chemistry and Biology*, Proceedings of the 12th American Peptide Symposium, Cambridge, MA, USA, 16–21 June 1991; Smith, J.A., Rivier, J.E., Eds.; ESCOM: Leiden, The Netherlands, 1992; pp. 523–524.
33. Lim, N.C.; Pavlova, S.V.; Brückner, C. Squaramide hydroxamate-based chemidosimeter responding to iron(III) with a fluorescence intensity increase. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 1173–1182.
34. Chang, C.-D.; Waki, M.; Ahmad, M.; Meienhofer, J.; Lundell, E.O.; Haug, J.D. Preparation and properties of N^α-9-fluorenylmethyloxycarbonyl-amino acids bearing *tert*.-butyl side chain protection. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1980**, *15*, 59–66.
35. Ye, Y.-H.; Gao, X.-M.; Liu, M.; Tang, Y.-C.; Tian, G.-L. Studies on the synthetic methodology of head to tail cyclization of linear peptides. *Lett. Pept. Sci.* **2003**, *10*, 571–579.
36. Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxyma: An efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9394–9403.
37. Spengler, J.; Fernandez-Llamazares, A.-I.; Albericio, F. Use of an internal reference for the quantitative HPLC-UV analysis of solid-phase reactions: A case study of 2-chlorotriyl chloride resin. *ACS Comb. Sci.* **2013**, *15*, 229–234.
38. Goncalves, V.; Gautier, B.; Garbay, C.; Vidal, M.; Inguibert, N. Development of a chemiluminescent screening assay for detection of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligands. *Anal. Biochem.* **2007**, *366*, 108–110.
39. Chen, Y.-Y.; Brown, N.J.; Jones, R.; Lewis, C.E.; Mujamammi, A.H.; Muthana, M.; Seed, M.P.; Barker, M.D. A peptide derived from TIMP-3 inhibits multiple angiogenic growth factor receptors and tumour growth and inflammatory arthritis in mice. *Angiogenesis* **2014**, *17*, 207–219.
40. Djordjevic, S.; Driscoll, P.C. Targeting VEGF signaling via the neuropilin co-receptor. *Drug Discov. Today* **2013**, *18*, 447–455.
41. Nakamura, K.; Hanna, I.H.; Cai, H.; Nishimura, Y.; Williams, K.M.; Guengerich, F.P. Coumarin substrates for cytochrome P450 2D6 fluorescence assays. *Anal. Biochem.* **2001**, *292*, 280–286.

Sample Availability: Samples of the compounds and peptides are available from the authors.

RESEARCH HIGHLIGHT

Inhibition of VEGF/VEGFR1 interaction by a series of C-terminal modified cyclic peptides

Lei Wang¹, Sylvain Broussy¹, Nathalie Gagey-Eilstein¹, Marie Reille-Seroussi¹, Florent Huguenot¹, Michel Vidal^{1, 2}, Wang-Qing Liu¹

¹UMR 8638 CNRS, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4 avenue de l'Observatoire, Paris 75006, France

²UF Pharmacocinétique et pharmacochimie, hôpital Cochin, AP-HP, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, Paris 75014, France

Correspondence: Lei Wang and Wang-Qing Liu

E-mail: lei.wang1@etu.parisdescartes.fr and wangqing.liu@parisdescartes.fr

Received: January 19, 2015

Published online: February 11, 2015

Inhibition of the interaction between vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (VEGFRs) is a validated therapeutic strategy of anti-cancer treatment. This approach consists in indirect blockage of the kinase activity on VEGFR with inhibitors of protein-protein interactions, which showed great interests in oncology. The FDA approved anti-cancer agents bevacizumab (Avastin®) and ziv-aflibercept (Zaltrap®) bind specifically to VEGF are from anti-VEGF strategy. The very recently approved agent ramucirumab (Cyramza®), a recombinant humanized monoclonal antibody that specifically binds to VEGFR2 is from anti-VEGFR strategy. Based on a cyclic peptide antagonist of VEGFR1 designed from VEGF fragments, we developed, by a new synthesis process, a series of C-terminal modified cyclic peptides to improve their receptor binding ability. Three of such peptides with aromatic groups showed greatly increased VEGFR1 binding affinity in a competition ELISA-based test. This research highlight discusses the processing and findings of the recent study.

Keywords: VEGF; VEGFR; angiogenesis; cyclic peptides

To cite this article: Lei Wang, et al. Inhibition of VEGF/VEGFR1 interaction by a series of C-terminal modified cyclic peptides. Receptor Clin Invest 2015; 2: e534. doi: 10.14800/rci.534.

Cancer is characterized by uncontrolled cell proliferation with an ability to spread from one organ or part to another, leading to the formation of tumor mass and metastasis. Cancer is one of the most dangerous threats to human health. At the same time, anti-cancer research has continuously improved, evolving during the past decades from the use of nonspecific cytotoxic agents to the development of selective, mechanism-based targeted therapeutics ^[1]. Since tumor growth and metastasis require new blood vessels formation (angiogenesis) for the supply of nutrients and oxygen and the removal of waste products, angiogenesis constitutes a new target in anti-cancer research ^[2].

Angiogenesis, involving the migration, growth, and

differentiation of endothelial cells, which line the inside wall of blood vessels, plays an important role in cancer progression and has been recognized as one of the six hallmarks of cancer ^[3]. It is regulated tightly by pro- and anti-angiogenic factors. The pro-angiogenic factors include vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), placenta growth factor (PlGF), angiogenin, transforming growth factor (TGF)- α , TGF- β and tumor necrosis factor (TNF)- α ^[4]. The binding of these factors to their receptors induce receptor dimerization, resulting in the tyrosine kinase domain activation and downstream signalization to eventually cell progression ^[5]. Among these pro-angiogenic factors, the VEGF and their receptors (VEGFR1 and VEGFR2) play a critical role in the

field of neoplastic vascularization^[6].

Anti-angiogenic therapy interferes with various steps in this process. For example, at the level of VEGF, bevacizumab (Avastin®) is a humanized monoclonal antibody that specifically recognizes and binds to VEGF^[7]. Similarly, ziv-aflibercept (Zaltrap®) is a recombinant fusion protein consisting of the extracellular domains of human VEGFR1 and VEGFR2, which binds VEGF and PlGF^[8]. When VEGF or PlGF is attached to these inhibitors, it is unable to activate the VEGF receptors and their downstream signaling pathways. At the level of receptors, ramucirumab (Cyramza®) approved by FDA in 2014 is a recombinant humanized monoclonal antibody that specifically binds to VEGFR2 and blocks the receptor to interact with VEGF^[9]. Other angiogenesis inhibitors, including sorafenib (Nexavar®), sunitinib (Sutent®) and pazopanib (Votrient®) inhibit VEGFR1 and VEGFR2 and also some other receptors tyrosine kinase activity^[10, 11]. In the clinic, anti-angiogenic therapy reduces tumor progression and metastasis in various types of cancers. However, antibodies or tyrosine kinase inhibitors have their proper drawbacks either with a high pharmacokinetic variability (antibodies) or a low specificity (tyrosine kinase inhibitors)^[12]. Angiogenesis inhibition therapy does not necessarily kill tumor cells but instead may prevent tumors from growing, and most frequently, it is combined with additional therapies, especially chemotherapy^[13, 14].

The development of small antagonists blocking protein-protein interaction thus draws more and more attention^[15]. Such antagonists include rationally designed peptides^[16] and library screened peptides or non-peptidic chemical molecules^[17]. Peptides resembling more the natural protein would have higher specificity for the target protein and lower cellular toxicity. Driven by the progress of protein-protein interaction structure determination, computer homology modeling and also the chemical synthesis technology, many anti-angiogenic peptides have been developed^[18]. Several peptides have shown activity in pre-clinical models of cancer or have been tested in clinical trials. Based on structural data of the complex of VEGF binding on the second domain (D2) of VEGFR1^[19], which is the main VEGF binding site, rational design^[20-22] and library screening^[23-25] have been pursued to develop antagonists of VEGF/VEGFR. The molecules optimized from the hits thus designed or identified have shown effective anti-angiogenic and anti-cancer activities.

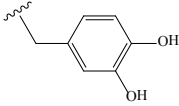
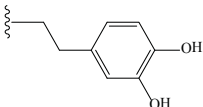
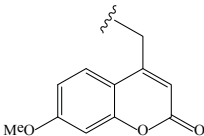
In our laboratory, we particularly focused on $\alpha 1$ helix and $\beta 3$ - $\beta 4$ loop of VEGF implicated in VEGFR1 binding^[20]. Our previous work has led to a cyclic peptide antagonist c[YYDEGLEE]-NH₂, combining the residues of $\beta 3$ - $\beta 4$ loop

and two important tyrosine residues of the $\alpha 1$ helix of VEGF. This cyclic peptide has been shown capable of antagonizing VEGF binding to VEGFR1 and inhibit VEGF induced receptors phosphorylation, endothelial cell signalization pathway, cell migration and capillary-like tube formation^[20, 21]. Starting from this cyclic peptide, we described in our recent study entitled "Design and Synthesis of C-Terminal Modified Cyclic Peptides as VEGFR1 Antagonists" the optimization of synthesis process, the design of new peptides and the evaluation of peptides VEGFR1 binding ability and the study of the structure-activity relation^[26].

Based on the cyclic peptide c[YYDEGLEE]-NH₂ binding with VEGFR1 D2 domain model after manual docking and energy minimization^[20] and the mutation of the second Tyr by a Lys residue^[21], we designed and synthesized a series of peptides c[YKDEGLEE]-NH-R with modifications on the C-terminal end by aliphatic and aromatic groups (R). The C-terminal elongation is expected to create new interactions with the D2 domain of VEGFR1. A new synthetic pathway combining solid phase peptide synthesis and solution phase cyclization was described. The synthesis began with the first Gly residue loaded on an acid labile 2-chlorotrityl resin. The second glutamic acid derivative (Fmoc-Glu-NH-R) prepared in solution and the following residues were coupled to the resin following microwave-assisted solid phase peptide synthesis procedure. Then, the peptides were cleaved by 2% TFA in dichloromethane, cyclized in solution, and fully side chain deprotected at the final step. This synthetic process eliminated guanidine formation during on-resin cyclization^[21] and avoided the use metal catalyst (Pd⁰) required in the previous synthesis pathway^[20, 21]. We have recently shown that trace of metal ions would greatly influence biochemical and biological assay results^[27].

About two dozen peptides with additional aliphatic or aromatic groups at the C-terminal position of the parent peptide have been obtained. A competition ELISA type test was applied to determine the peptide VEGFR1 binding ability^[28]. The assay permitted peptides and biotinylated VEGF to bind competitively with recombinant human VEGFR1 extracellular domains, which were adsorbed beforehand on the surface of a 96-well microplate. Then the percentages of biotinylated VEGF displaced by peptides were calculated according to chemiluminescence detected of the remaining biotinylated VEGF via an HRP-conjugated streptavidin. Among these modified peptides, three peptides showed greatly increased binding affinity: two peptides with C-terminal substitution of benzyl groups linked through one (Peptide 1) or two methylene (Peptide 2) and the third peptide with C-terminal substitution of a coumarinyl group linked by a methylene (Peptide 3). All three peptides have shown dose dependent inhibition of VEGF/VEGFR1 binding

Table 1. Dose dependent inhibition of selected peptides on VEGFR1 binding measured by ELISA. The values are the average of at least 3 tests each in triplicate. NA means no activity

Tyr-Lys-Asp-Glu-Gly-Leu-Glu-NH-R				
Peptide	R	Displacement (%)		
		100 μ M	50 μ M	30 μ M
Ref	H	12	7	NA
1		58	37	14
2		53	31	NA
3		68	41	11

(Table 1). Structure-activity relationship was discussed in our published paper ^[26].

The structure of peptide **2** (Table 1) alone in solution has been studied recently by NMR, and the determination of the structure of its complex with the D2 domain of VEGFR1 is now in progress. Compared with the previously published docking complex of the parent peptide c[YYDEGLEE]-NH₂ with D2-VEGFR1, this new peptide (peptide **2**) mimics better the β 3- β 4 loop of VEGF in the new docking model, and interestingly, it creates one more hydrogen bond with D2 VEGFR1 than the parent peptide. Furthermore, the peptide **3** featuring a fluorescent coumarinyl group at the C-terminal end will be a useful tool in co-crystallization and biological imaging studies. These peptides have also been shown recently able to inhibit VEGF-induced endothelial cell tube formation. Further anti-angiogenic and anti-tumor cellular assays are now undergoing. The structure and biological results will be published later.

Acknowledgments

This research was supported by the University Paris Descartes, the Centre National de la Recherche Scientifique (Chaire de partenariat CNRS-UPD to S. Broussy) and the

ANR (ANR-2010-BLAN-1533-03). L. Wang acknowledges the China Scholarship Council for the donation of a scholarship. M. Reille-Seroussi acknowledges the ARC for the donation of a scholarship (grant DOC2013 0606849).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Matthew V, Glenn D. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:237-251.
- Folkman J. Tumor angiogenesis therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-1186.
- Hanahan D, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-674.
- Naoyo N, Hirohisa Y, Takashi N, Toshiharu K, Masamichi K. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2006; 2:213-219.
- Kowanetz M, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res* 2006; 17:5018-5022.
- Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669-676.

7. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333:328-335.
8. Clement C, Nisha P. Ziv-aflibercept: A novel angiogenesis inhibitor for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Am J Health Syst Pharm* 2013; 70: 1887-1896.
9. Fontanella C, Ongaro E, Bolzonello S, Guardascione M, Fasola G, Aprille G. Clinical advances in the development of novel VEGFR2 inhibitors. *Ann Transl Med* 2014; 2:123-132.
10. Grandinetti CA, Goldspiel BR. Sorafenib and sunitinib: novel targeted therapies for renal cell cancer. *Pharmacotherapy* 2007; 27:1125-1144.
11. Ranieri G, Mammi M, Donato Di Paola E, Russo E, Gallelli L, Citraro R, et al. Pazopanib a tyrosine kinase inhibitor with strong anti-angiogenic activity: a new treatment for metastatic soft tissue sarcoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014; 89:22-329.
12. Shibuya, M. VEGF-VEGFR signals in health and disease. *Biomol Ther* 2014; 22:1-9.
13. Aravantinos G, Pectasides D. Bevacizumab in combination with chemotherapy for the treatment of advanced ovarian cancer: a systematic review. *J Ovarian Res* 2014; 7:57-69.
14. Digklia A, Voutsadakis IA. Combinations of vascular endothelial growth factor pathway inhibitors with metronomic chemotherapy: rational and current status. *World J Exp Med* 2014; 4:58-67.
15. Mullard A. Protein-protein interaction inhibitors get into the groove. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11:173-175.
16. Jamieson AG, Boutard N, Sabatino D, Lubell WD. Peptide scanning for studying structure-activity relationships in drug discovery. *Chem Biol Drug Des* 2013; 81:148-165.
17. Milroy LG, Grossmann TN, Hennig S, Brunsveld L, Ottmann C. Modulators of protein-protein interactions. *Chem Rev* 2014; 114:4695-4748.
18. Elena VR, Jacob EK, Corban GR, Niranjana BP, Amir PT, Aleksander SP. Anti-angiogenic peptides for cancer therapeutics. *Curr Pharm Biotechnol* 2011; 12:1101-1116.
19. Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, Eigenbrot C, Wells JA, de Vos AM. Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* 1997; 91:695-704.
20. Goncalves V, Gautier B, Coric P, Bouaziz S, Lenoir C, Garbay C, et al. Rational design, structure, and biological evaluation of cyclic peptides mimicking the vascular endothelial growth factor. *J Med Chem* 2007; 50:5135-5146.
21. Gautier B, Goncalves V, Diana D, di Stasi R, Teillet F, Lenoir C, et al. Biochemical and structural analysis of the binding determinants of a vascular endothelial growth factor receptor peptidic antagonist. *J Med Chem* 2010; 53:4428-4440.
22. Donatella D, Russomanno A, De Rosa L, Di Stasi R, Capasso D, Di Gaetano S, et al. Functional binding surface of a hairpin VEGF receptor targeting peptide determined by NMR spectroscopy in living cells. *Chem Eur J* 2014; 20:1-6.
23. Fairbrother WJ, Christinger HW, Cochran AG, Fuh G, Keenan CJ, Quan C, et al. Novel peptides selected to bind vascular endothelial growth factor target the receptor-binding site. *Biochemistry* 1998; 37:17754-17764.
24. Fedorova A, Zobel K, Gill HS, Ogasawara A, Flores JE, Tinianow JN, et al. The development of peptide-based tools for the analysis of angiogenesis. *Chem Biol* 2011; 18:839-845.
25. Gautier B, Miteva MA, Goncalves V, Huguenot F, Coric P, Bouaziz S, et al. Targeting the proangiogenic VEGF-VEGFR protein-protein interface with drug-like compounds by in silico and in vitro screening. *Chem Biol* 2011; 18:1631-1639.
26. Wang L, Gagey-Eilstein N, Broussy S, Reille-Seroussi M, Huguenot F, Vidal M, et al. Design and synthesis of C-terminal modified cyclic peptides as VEGFR1 antagonists. *Molecules* 2014; 19:15391-15407.
27. Gaucher JF, Reille-Seroussi M, Gagey-Eilstein N, Broussy S, Coric P, Seijo B, et al. Metal-induced vascular endothelial growth factor receptor 1 dimerization competes with VEGF-A binding. *J Biol Chem* 2015; under revision.
28. Goncalves V, Gautier B, Garbay C, Vidal M, Inguimbert N. Development of a chemiluminescent screening assay for detection of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligands. *Anal Biochem* 2007; 366:108-110.

2.1 Résumé de l'Article 1

2.1.1 Conception de peptides cycliques modifiés en C-terminal

Le peptide c[YYDEGLEE]-NH₂ mimant à la fois la boucle β3-β4 et l'hélice-α1 a été confirmé comme capable d'interagir avec le VEGFR1 D2 et d'inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1. Cependant, la modélisation moléculaire a montré que la position de fixation de ce peptide cyclique était un peu décalée par rapport à la position de la boucle β3-β4 du VEGF. De plus, les deux **Tyr** dans le peptide c[YYDEGLEE]-NH₂ ne peuvent pas adopter une bonne orientation en même temps.

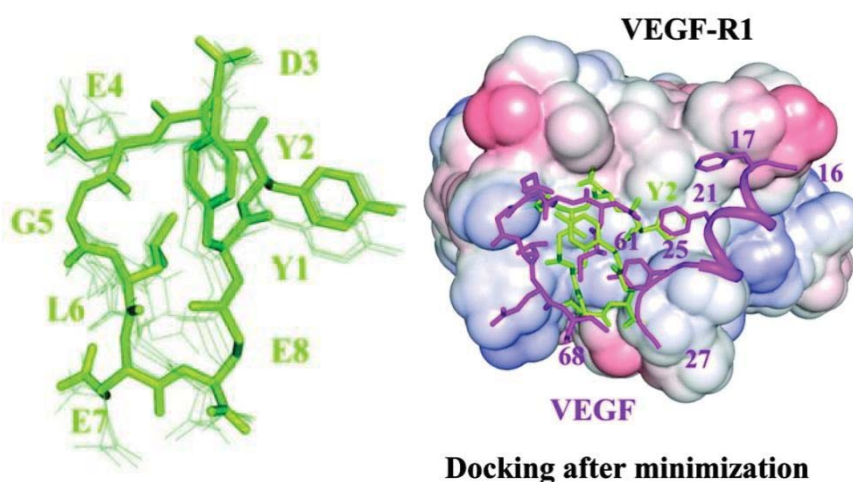


Figure 41. Structure RMN du peptide c[YYDEGLEE]-NH₂ (vert) et modèle de docking après minimisation d'énergie dans le VEGFR1 D2 en comparant avec la boucle β3-β4 et hélice-α1 du VEGF (violet).

Selon le modèle de docking du peptide c[YYDEGLEE]-NH₂ dans l'interaction VEGF/VEGFR1 D2, l'extrémité C-terminale de ce peptide est orientée vers le site d'interaction de l'hélice-α du VEGF sur le VEGFR1 D2. Des modifications en position C-terminale de ce peptide pourraient donc permettre de créer des nouvelles interactions avec le récepteur.

Le peptide c[YKDEGLEE]-NH₂ avec le remplacement de la deuxième **Tyr** par une **Lys** est aussi capable d'inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1 avec une affinité seulement légèrement diminuée. Par contre, ce remplacement de **Tyr** par une **Lys** augmente la solubilité. Par conséquent, les peptides modifiés en C-terminal c[YKDEGLEE]-NHR sont basés sur le peptide c[YKDEGLEE]-NH₂. L'affinité des nouveaux peptides est comparée à celle de ce peptide de référence.

2.1.2 Proposition de voie de synthèse pour ces nouveaux peptides

Goncalves *et al.* ont synthétisé la série de peptide cyclique par une voie de synthèse en phase solide (**Schéma 3**). L'acide aminé **Glu** en position C-terminale, portant un groupement O-Allyle sur sa chaîne latérale comme groupement protecteur orthogonal, a été chargé sur la résine Rink amide MBHA. L'introduction de tous les acides aminés a été effectuée progressivement. Puis, le groupement O-Allyle du **Glu** a été enlevé par le catalyseur $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ et le groupement N-terminal Fmoc par la piperidine. Enfin, le peptide a été cyclisé par un couplage peptidique et clivé de la résine.

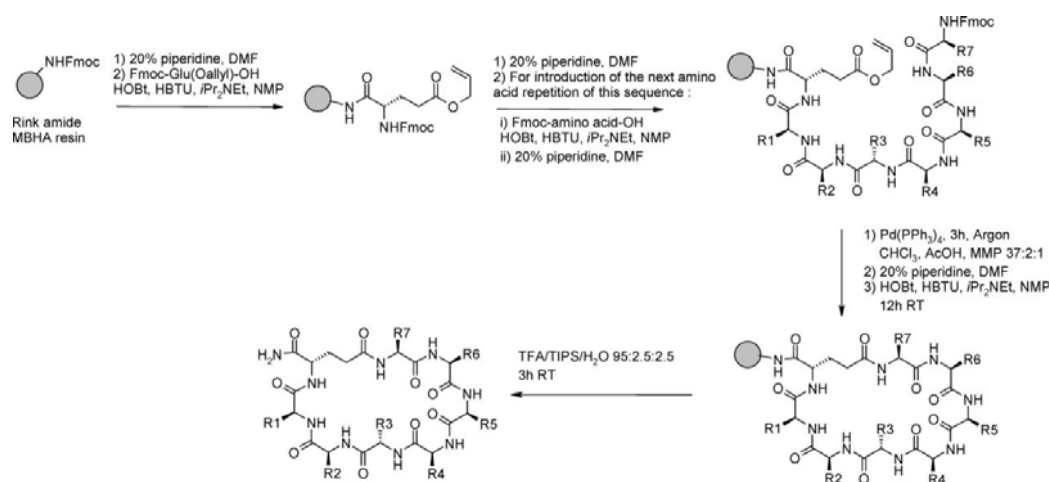


Schéma 3. Voie de synthèse pour les peptides cycliques selon Goncalves *et al.*¹⁶².

Cette voie de synthèse a été efficace pour synthétiser ces peptides cycliques. Cependant, dans le laboratoire, Reille-Seroussi M et al, ont remarqué que la trace de Pd^{2+} présent dans le produit perturbe fortement les résultats de notre test de déplacement ELISA. Le Pd^{2+} a montré une forte capacité de déplacement de l'interaction VEGF/VEGFR1 (IC_{50} d'environ 300 nM). Dans l'article présenté ici (Molécules 2014), nous avons décrit une nouvelle voie de synthèse, en remplaçant la protection O-Allyle du Glu par un groupement O-2-PhIPr¹⁹⁹. Ce dernier groupement protecteur est acido-labile et peut être enlevé par un traitement à 2% de TFA avant la cyclisation sur le support solide.

Bien que le catalyseur de Pd^0 a été écarté dans cette nouvelle voie de synthèse, V. Goncalves et nous avons observé une guanidinylation importante de l'amine N-terminale par l'agent de couplage de type uronium (HBTU, par exemple) pendant la cyclisation sur support solide. En plus, la modification en C-terminal limite l'utilisation de la même voie de synthèse.

¹⁹⁹ Reczek JJ, Rebolini E, Urbach AR. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 2111-2114

Pour cette nouvelle série de peptides c[YKDEGLEE]-NHR, nous avons conçu une voie de synthèse avec une cyclisation tête à queue effectuée en solution. Pour ce faire, la résine est accrochée au premier acide aminé **Glu** par la chaîne latérale de ce dernier. Le premier résidu Fmoc-Glu-NHR a été préalablement préparé.

Une amine **R-NH₂** avec le groupement **R** varié est d'abord couplée au Fmoc-Glu(OtBu)-OH. Puis la fonction acide de la chaîne latérale est libérée pour pouvoir charger cet acide aminé sur la résine. Une série de **Glu** modifiés a été préparée selon la voie de synthèse ci-dessous.

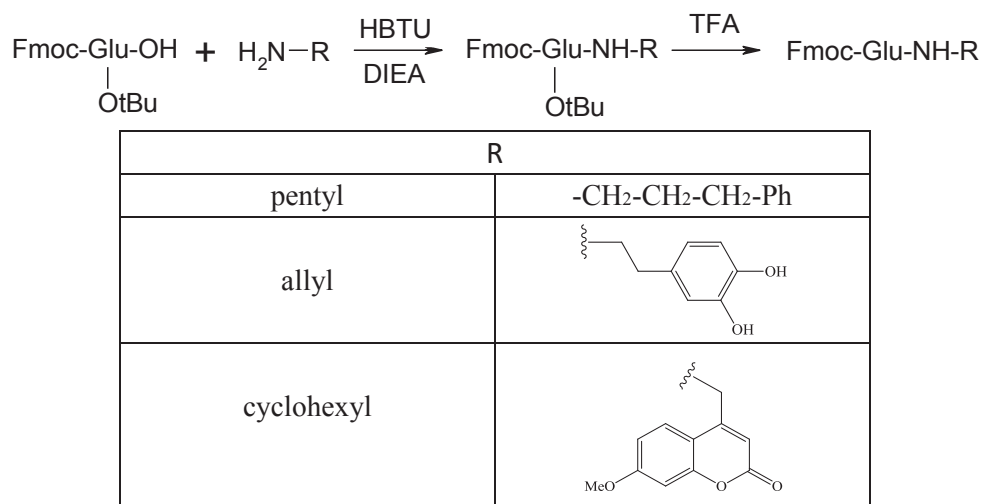


Schéma 4. Synthèse de Fmoc-Glu-NH-R modifié.

La plupart des aminés utilisés étaient commerciaux sauf le chlorhydrate de 4-Aminomethyl-7-methoxy-chromen-2-one. Il a été synthétisé selon le **Schéma 5**.

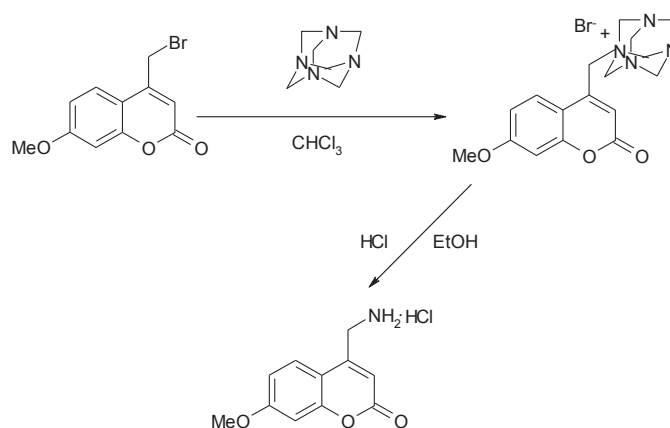


Schéma 5. Synthèse du chlorhydrate de 4-Aminomethyl-7-methoxy-chromen-2-one.

Pour faciliter la cyclisation en solution, nous avons choisi de réaliser la cyclisation entre deux petits résidus **Gly** sans chaîne latérale et **Leu**. La résine chlorure de 2-chlorotrityle acide labile a été choisie pour la synthèse de cette série de peptides. Enfin, ces peptides ont été synthétisés selon le **Schéma 6**.

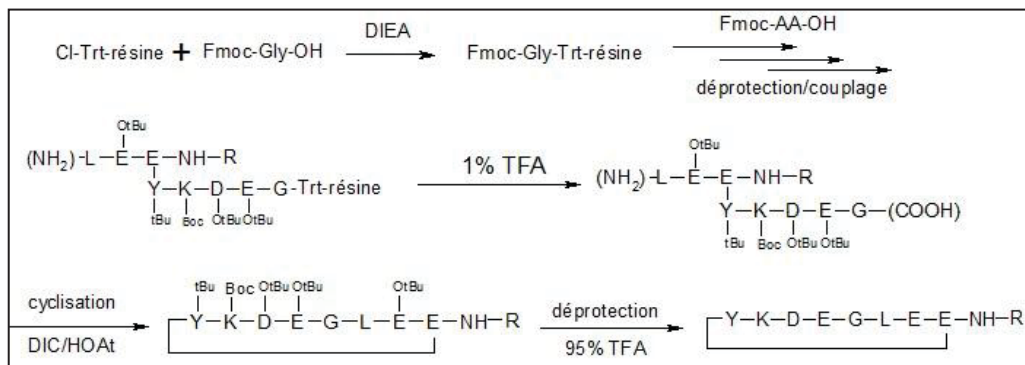


Schéma 6. Synthèse de peptide modifié en C-terminal.

2.1.3 Évaluation par un test de déplacement ELISA

Cette série de peptides cycliques modifiés en C-terminal (c[YKDEGLEE]-NHR) a été évaluée par le test ELISA développé dans le laboratoire. D'après les résultats du test ELISA, l'ajout d'un groupement aromatique a permis de gagner en affinité par rapport à un groupement aliphatique. Notamment, trois peptides **15**, **16** et **19** (numéro selon **Article 1**) ont une affinité bien améliorée. Les peptides **15** et **16** ont un groupement hydrophobe et deux hydroxyles en C-terminal. Ils créent peut-être des interactions hydrophobes et hydrogène avec le récepteur. Le peptide **19** a un groupement coumarinyle qui peut induire des interactions hydrophobes avec le récepteur.

2.2 Résultats supplémentaires

2.2.1 Autre peptide modifié en C-terminal

D'autres peptides ont été synthétisés à partir du modèle obtenu par docking du peptide (c[YYDEGLEE]-NH₂) : les peptides **58** (c[YYNDEGLEE]-NH-CH₂-CH₂-Ph-(3,4-OH)) et **59** (c[YhFDEGLEE]-NH-CH₂-CH₂-Ph-(3,4-OH)). Leur groupement C-terminal est identique à celui du peptide **16**. Pour le peptide **58**, le résidu **Lys** a été remplacé par un résidu aromatique **Tyr**, un résidu **Asn** en plus a été ajouté pour augmenter la taille de cycle car le cycle semblait plus petit que la boucle β3-β4 du VEGF. Pour le peptide **59**, la deuxième Tyr a été remplacé par un homo **Phe** pour qu'il puisse plus s'adapter au site d'interaction. Malheureusement, ces deux peptides n'ont pas gagné affinité. Le peptide **58** a une affinité similaire (54% de déplacement à 100 μM) au peptide **16**, le peptide **59** a perdu son affinité (12% de déplacement à 100 μM).

2.2.2 Études de l'interaction du peptide (16) avec le VEGFR1 D2 par RMN

Le peptide (c[YYDEGLEE]-NH₂) a été étudié par RMN en interaction avec du VEGFR1 D2 N¹⁵, en collaboration avec l'équipe du Dr. Serge Bouaziz, laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, et l'équipe de D'Andrea. L'analyse des déplacements chimiques en RMN des résidus du D2 VEGFR1 marqué ¹⁵N par l'ajout de peptide permet l'identification des résidus impliqués dans l'interaction (**Figure 37**).

Nous avons fait la même étude en choisissant un des meilleurs peptides (**16** : c[YKDEGLEE]-NH-CH₂-CH₂-Ph-(3,4-OH)), en collaboration avec l'équipe du Dr. Serge Bouaziz pour l'analyse en RMN et l'équipe de Pr. Luca Domenico D'Andrea en Italie pour l'expression du VEGFR1 D2 ¹⁵N.

Dans un premier temps, la structure du peptide **16** a été analysée par RMN. 10 meilleures structures avec les plus basses valeurs d'énergie calculées par le logiciel Insight ont été sélectionnées à partir de 200 structures calculées.

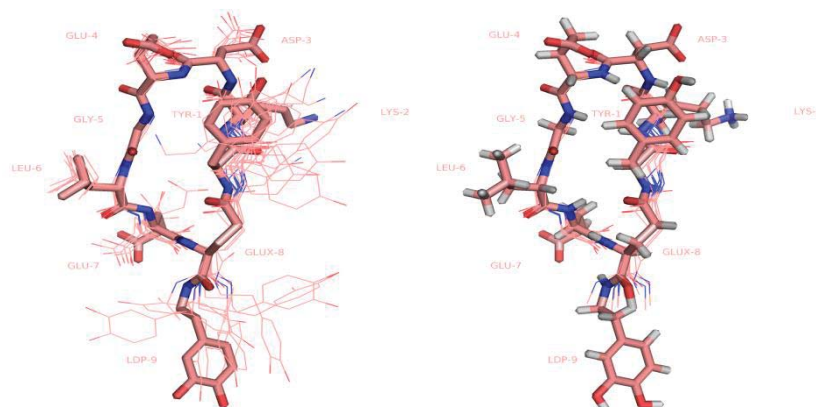


Figure 42. Structure RMN du peptide **16**. 10 meilleures structures avec les plus basses valeurs d'énergie calculées (gauche) ; la structure moyenne de peptide **16** (droite).

La structure moyenne du peptide **16** a été comparée avec celle du peptide (c[YYDEGLEE]-NH₂). Les chaînes principales de ces deux peptides sont superposables, la modification en C-terminal n'a pas beaucoup changé la structure. Le groupement ajouté en C-terminal est très flexible, il pourrait créer des nouvelles interactions avec le récepteur.

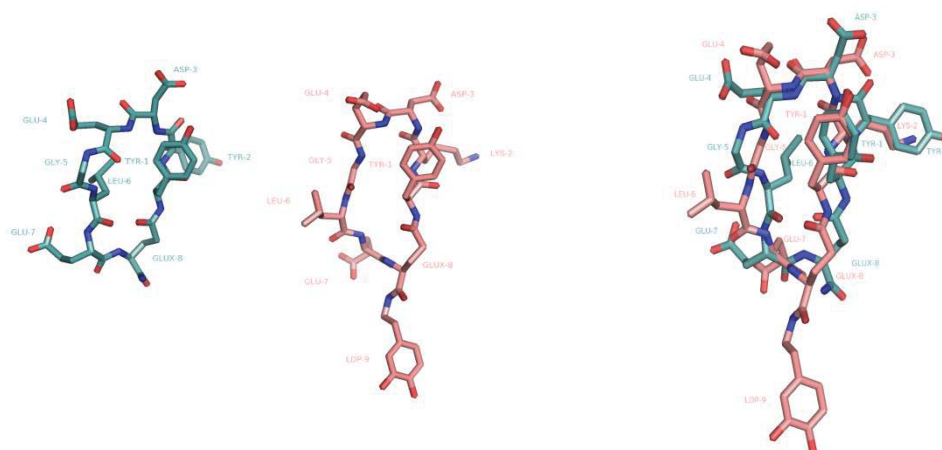


Figure 43. Structure RMN du peptide (c[YYDEGLEE]-NH₂) (vert), peptide **16** (rose) et leur superposition (à droite).

Un docking après minimisation d'une position possible de ce peptide dans l'interaction avec le VEGFR1 D2 a montré que le groupement en C-terminal du peptide **16** pourrait créer des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes avec le récepteur (**L174**, **D175**) (**Figure 44**).

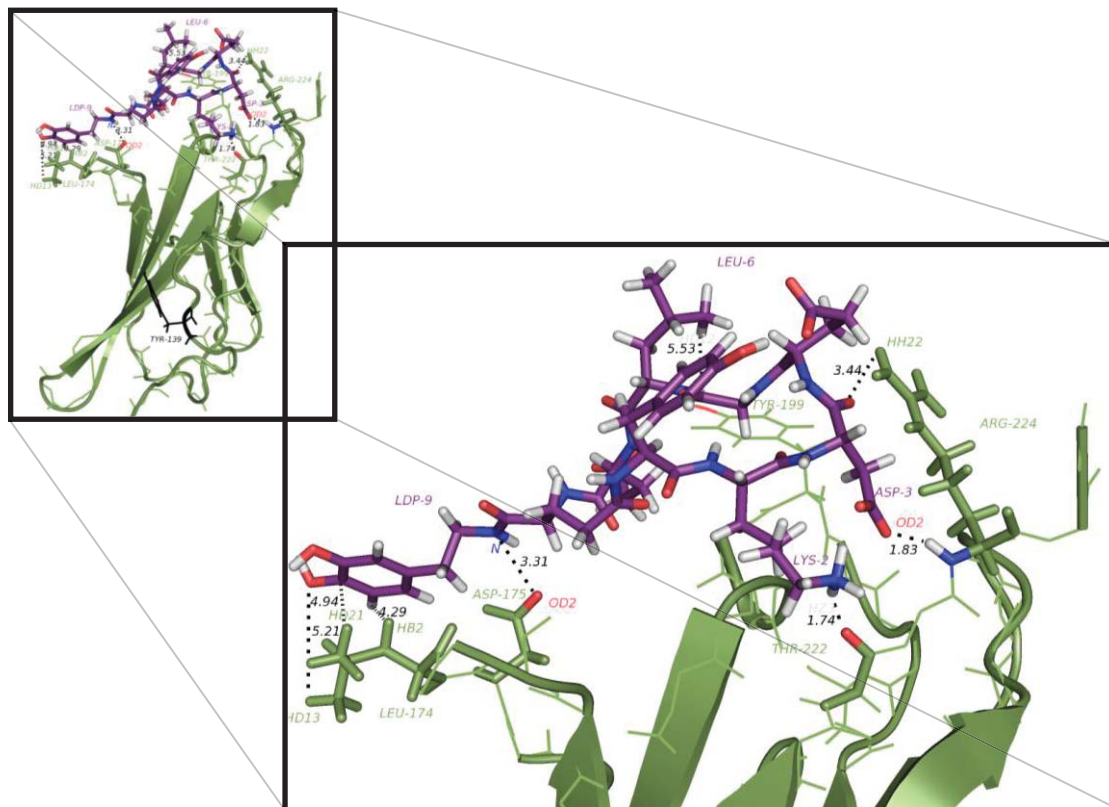


Figure 44. Docking après minimisation de peptide **16** (violet) avec VEGFR1 D2 (vert).

Bien que la modélisation a permis de proposer une possibilité d'interaction du peptide avec le VEGFR1 D2, cette proposition ne reflète pas toujours les interactions réelles en solution. Nous avons donc analysé en RMN le spectre 2D TROSY du VEGFR1 D2 ^{15}N en ajoutant progressivement le peptide **16**. L'interaction du peptide avec VEGFR1 D2 ^{15}N induit des variations des déplacements chimiques des NH des liaisons amides du récepteur en réponse aux différentes concentrations de peptide. Cette analyse RMN a permis d'identifier les résidus qui participent à l'interaction avec le peptide.

La variation de déplacement chimique ($\Delta\delta$) des NH du récepteur à chaque ratio peptide/D2 par apport au δ sans peptide a été calculée. Certains résidus ont montré des variations importantes, tels que **E144**, **I145**, **I146**, **R183**, **N196**, **T198**, **E201**, **G203**, **Y220**, **L221**, **H223** du VEGFR1 D2. Le peptide **16** pourrait avoir des interactions avec ces résidus.

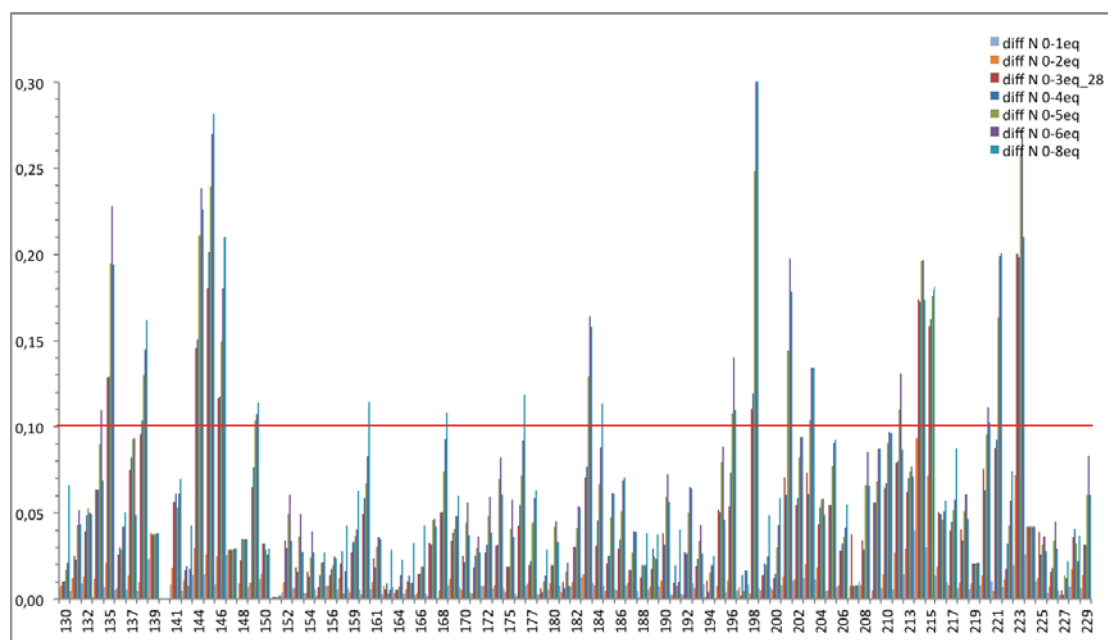


Figure 46. Variation de déplacement chimique ($\Delta\delta$) des NH du récepteur à chaque concentration du peptide **16**.

Les variations de déplacement chimique de ces résidus sont calculées et présentées en histogramme (**Figure 47**).

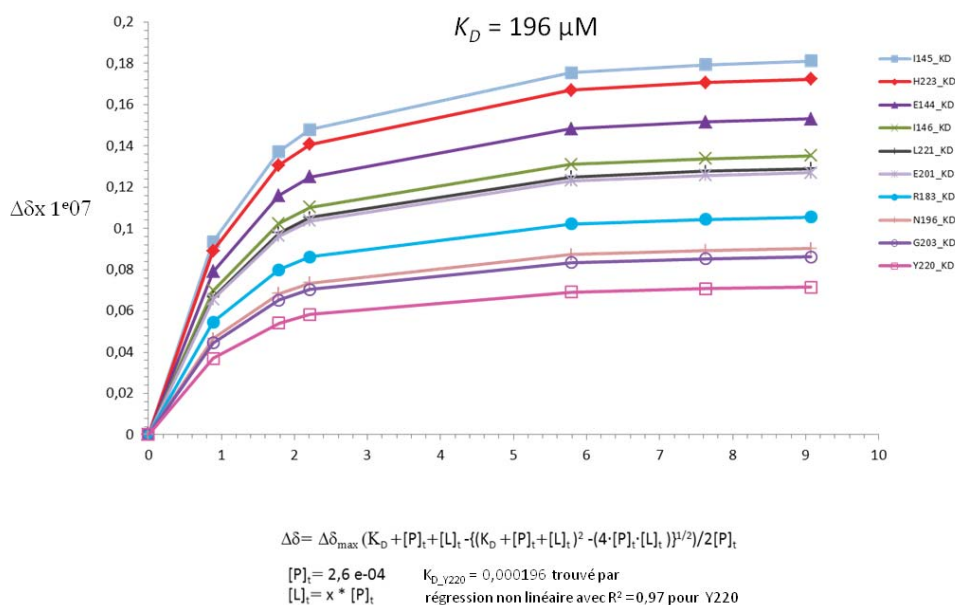


Figure 47. Variation de déplacement chimique ($\Delta\delta$) calculé selon l'équation.

Cette analyse RMN avec le VEGFR1 D2 ^{15}N a aussi permis de calculer le K_d (constante dissociation) de ce peptide. Un K_d de 196 μM a été calculé selon les variations de déplacement chimique de Y220 qui a un square standardisation ($R^2 = 0.97$) plus haut. Le peptide (**16** : c[YKDEGLEE]-NH-CH₂-CH₂-Ph-(3,4-OH)) était l'un des peptides les plus actifs de la série. Son IC_{50} estimée par le test ELISA est de $196.3 \pm 35.4 \mu\text{M}$.

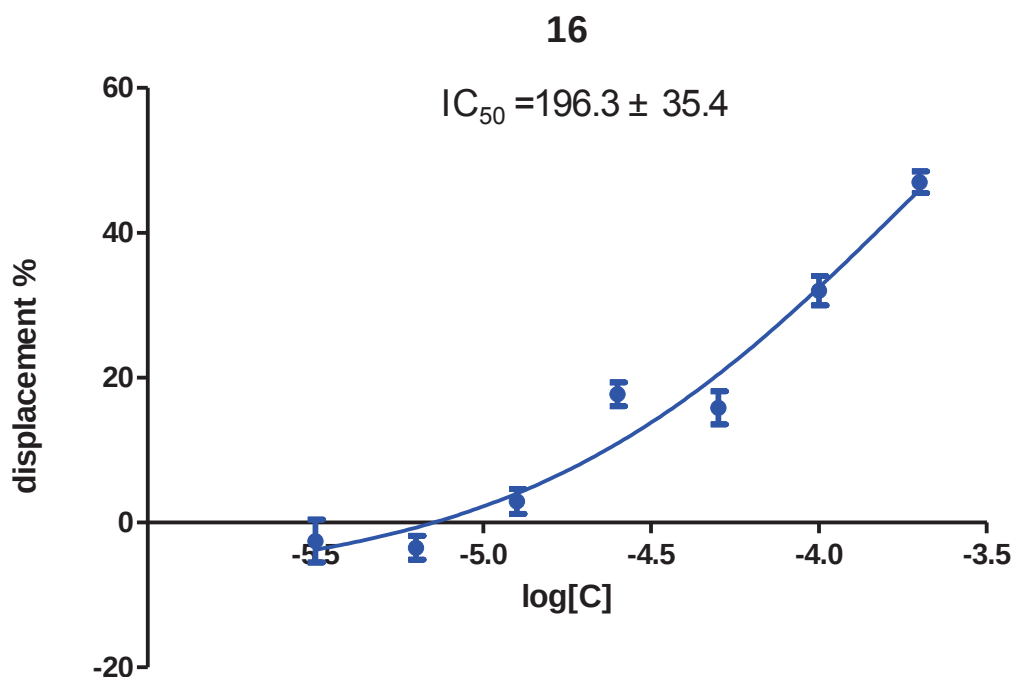


Figure 48. IC_{50} estimation pour le peptide **16** par le test de déplacement.

Bien que la valeur de K_d est relativement élevée, c'est la première fois au laboratoire que nous avons pu déterminer le K_d d'un peptide antagoniste du VEGFR1 D2. Ce K_d peut nous renseigner sur l'affinité relative des autres peptides, puisque la valeur d' IC_{50} du test ELISA dépend de plusieurs facteurs variables.

Une fois les résidus perturbés du VEGFR1-D2 repérés, Nous avons observé deux zones séparées sur le récepteur.

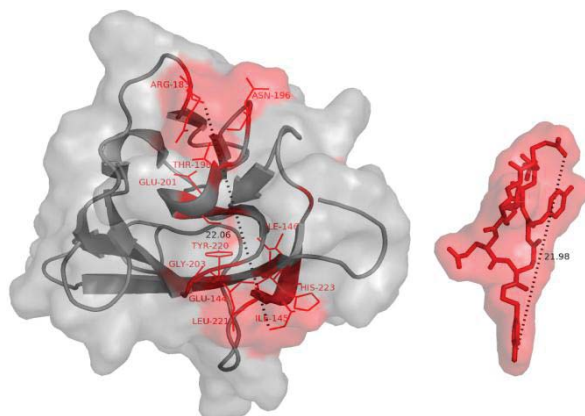


Figure 49. Résidus influencés sur VEGFR1 D2 par l'ajoute du peptide **16**.

Ces deux sites ne sont pas les zones identifiées dans le complexe VEGF/VEGFR1-D2. Le peptide n'est pas fixé sur les sites d'interactions de la boucle $\beta 3-\beta 4$ ni l'interface de l'hélice $\alpha 1$ (zone 1). La zone d'interaction sur le VEGFR1 D2 en commun pour le peptide **16** et le VEGF est la zone 3, qui a des interactions avec le N-terminal de l'hélice $\alpha 1$ et la boucle $\beta 5-\beta 6$ (résidu I145, L221, H223 du VEGFR1 D2). La zone 2 est hors du site d'interaction avec le VEGF. La fixation de peptide **16** sur la zone 2 ne bloque normalement pas l'interaction VEGF/VEGFR1 D2.

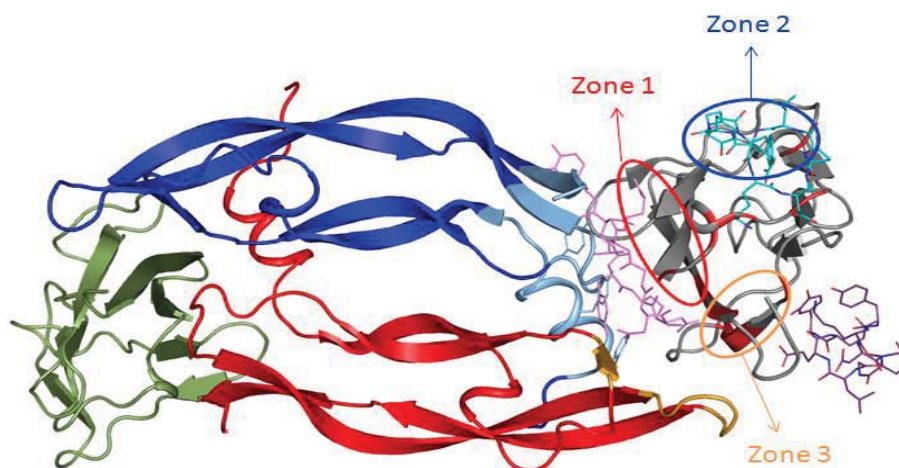


Figure 50. Zone d'interaction sur VEGFR1 D2 proposé (zone 1) et déterminé (zone 2 et 3) pour le peptide **16**.

Le docking de départ avait été effectué en disposant le peptide **16** sur le site de fixation du VEGF (zone 1). Cependant, le peptide ne peut pas se poser sur le D2 pour interagir en même temps avec les deux sites identifiés par RMN. La modélisation moléculaire a proposé deux modes d'interaction : soit avec la zone 2 supérieure (peptide en bleu clair), soit avec la zone 3 inférieure (peptide en bleu foncé). La zone 2 étant la zone de dimérisation du D2 en solution, d'après une étude RMN de VEGFR1 D2 avec les ions métalliques²⁰⁰, nous sommes en train d'approfondir nos études pour confirmer le mode de fixation du peptide.

En conclusion, les études RNM du peptide **16** (c[YKDEGLEE]-NH-CH₂-CH₂-Ph-(3,4-OH)) ont confirmé que cet inhibiteur peptidique a des interactions spécifiques avec le VEGFR1. Cette interaction permet d'inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1, car le peptide se fixe sur un site d'interaction en commun avec le VEGF en VEGFR1 D2. Nous avons montré que ce site d'interaction n'est pas principalement le site classique d'interaction proposé dans la conception de ce peptide.

²⁰⁰ Reille-Seroucci M. **2014**, thèse d'université Paris Descartes.

2.2.3 Inhibition de la formation de microtubule

L'effet anti-angiogénique sur cellule des peptides antagonistes du VEGFR1 a été évalué en collaboration par l'équipe de Pr. Lili Ji à Shanghai. Le test de la formation de microtubules sur Matrigel avec des cellules HUVE permet d'évaluer l'activité de molécules à inhiber la formation de microtubules par des cellules stimulées par du VEGF.

Deux meilleurs peptides ont été choisis pour ce test : les peptides **16** (c[YKDEGLEE]-NH-CH₂-CH₂-Ph-(3,4-OH)) et **19** (c[YKDEGLEE]-NH-(CH₂-coumarine-7-OMe)). Ils ont une affinité similaire dans le test ELISA. Les deux peptides ont été testés à la concentration de 50 μ M en présence de VEGF à 30 ng/ml dans le milieu. Trois contrôles ont été testés en même temps. Le contrôle négatif : milieu sans VEGF ni peptide ; le contrôle positif : avec VEGF à 30 ng/ml ; le contrôle Avastin : un inhibiteur d'interaction VEGF/VEGFR du côté VEGF à 50 μ M en présence de VEGF à 30 ng/ml.

Le contrôle négatif avait une petite quantité de formation de microtubules dû à la présence de faible quantité du VEGF dans le sérum utilisé dans la culture cellulaire. Le contrôle positif avec VEGF a stimulé la formation de microtubules. L'Avastin était connu pour inhiber l'interaction VEGF/VEGFR, il a montré une forte inhibition de la formation de microtubule par rapport au contrôle positif, et même moins de microtubules formés que le contrôle négatif. Les deux peptides **16** et **19** ont montré une inhibition importante de formation de microtubules à 50 μ M. L'activité anti-angiogénique du test Matrigel de ces deux peptides et leurs déplacements obtenus par test ELISA sont corrélés.

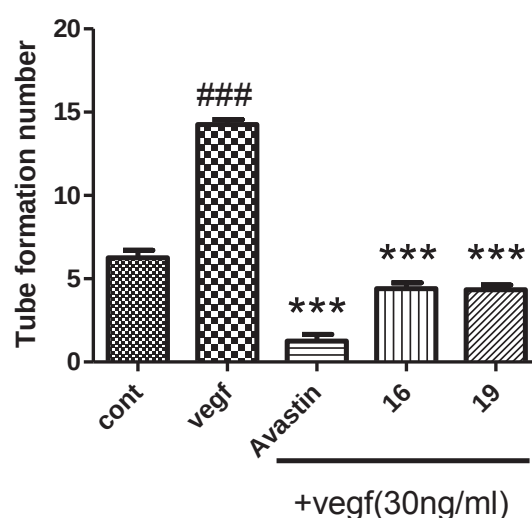


Figure 51. Inhibition de nombre la formation de microtubules sur Matrigel avec cellules HUVE pour le peptide **16** et **19** en comparant avec Avastin.

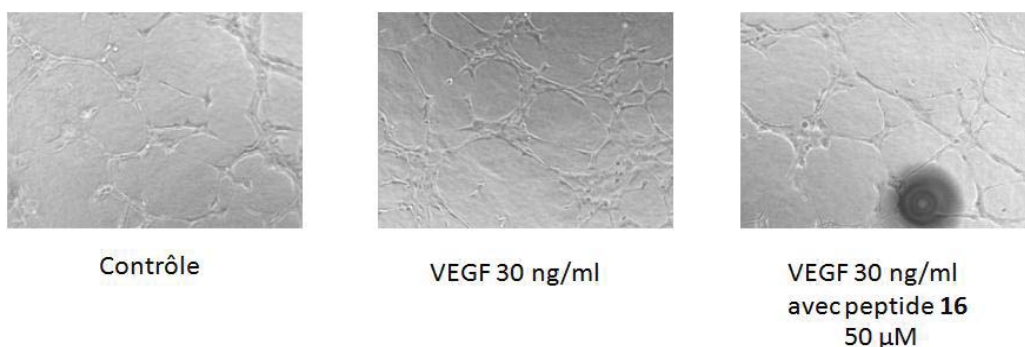


Figure 52. Photo d'inhibition de la formation de microtubules sur Matrigel avec cellules HUVE pour le peptide **16** à 50 µM.

2.2.4 Conclusion

En conclusion, ces deux peptides cycliques modifiés en C-terminal, dérivés de deux sites différents d'interaction du VEGF avec le D2 ont montré un effet anti-angiogénique sur les cellules HUVE. Cet effet anti-angiogénique est normalement dû à l'inhibition de l'interaction VEGF/VEGFRs sur le côté récepteur car les peptides se fixent sur le VEGFR1 D2 (analyse RMN). Les affinités de ces deux peptides sont assez faibles, notamment celle du peptide **16**, qui a une $IC_{50} = 196.3 \pm 35.4 \mu M$ dans le test ELISA compétitif et un $K_d \approx 196 \mu M$ dans les études RMN. Pourtant, il a une activité importante dans le test de formation de microtubules. Une raison possible est que le peptide peut probablement inhiber l'interaction du VEGF/VEGFR2 aussi dans les cellules. Ce résultat est corrélé aux travaux de Benoit Gautier et al., qui ont montré que le peptide c[**YYDEGLEE**]-NH₂ pouvait aussi se fixer sur le VEGFR2 par un test de pull-down¹⁶³.

III. Développement d'antagonistes ciblant les domaines

D2-D3 du VEGFR1 en mimant des fragments des

VEGF-A, VEGF-B et PlGF

Article :

Le développement d'antagonistes du VEGFR1 peut non seulement se baser sur l'interaction avec le VEGF-A, mais aussi son interaction avec les autres facteurs comme VEGF-B et PlGF. Les résultats de la conception et l'évaluation de ces peptides issus de différents facteurs de VEGFR1 sont en cours de préparer pour un autre article.

Article 3 :

- “Identification of peptidic antagonists of vascular endothelial growth factor receptor 1 by scanning the binding epitopes of its ligands.” Wang L, Zhou LY, Reille-Seroussi M, Gagey-Eilstein N, Broussy S, Ji LL, Vidal M, Liu WQ. (en préparation)

Identification of peptidic antagonists of vascular endothelial growth factor receptor 1 by scanning the binding epitopes of its ligands.

Lei Wang[†], Lingyu Zhou[#], Marie Reille-Seroussi[†], Nathalie Gagey-Eilstein[†], Sylvain Broussy[†], Lili Ji[#], Michel Vidal^{†, ‡, *} and Wang-Qing Liu^{†, *}

[†] UMR 8638 CNRS, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 4 avenue de l'Observatoire, Paris 75006, France.

[#] Shanghai Key Laboratory of Complex Prescription and The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, 1200 Cailun Road, Shanghai 201203, China.

[‡] UF Pharmacocinétique et pharmacochimie, hôpital Cochin, AP-HP, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, Paris 75014, France.

ABSTRACT

Cancer angiogenesis is mainly initiated by the vascular endothelial growth factors (VEGFs). Based on the reported crystal structures of three natural ligands (VEGF-A, -B and PlGF) with the major receptors VEGFR-1 and VEGFR-2, we scanned receptor-binding epitopes of these ligands by designing linear and cyclic peptides in aim to disrupt the VEGF-A/VEGFR-1 interaction, which is implicated in cancer development. The ability of peptides to inhibit such interaction was evaluated by an ELISA-based assay. Several peptides, especially those mimicking one loop of these ligands that bind primarily to domain D3 of VEGFRs, have demonstrated the higher inhibition for VEGF/VEGFR-1 binding. They have also shown inhibitory effects on VEGF-induced tube formation in HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). These results validate the domain D3 of VEGFRs as an efficient target for the design of VEGFRs antagonists.

INTRODUCTION

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from preexisting vasculature, is a normal physiological process, which allows the diffusion of the nutrients and oxygen to all tissues. It is tightly regulated by pro- and anti-angiogenic factors. Among pro-angiogenic ones, the family of vascular endothelial growth factors (VEGFs) plays a crucial role. They are homo- or hetero-dimeric signaling glycoproteins that bind to transmembrane receptors located on the surface of endothelial cells (EC), such as tyrosine kinase receptors (VEGFR-1, -2 and -3) and co-receptors neuropilins (NRP-1 and -2) lacking cytosolic catalytic activity.¹ This specific binding induces downstream signal transduction pathways and finally cell survival, proliferation, migration.² Either excessive or scarce pro-angiogenic signals lead to a deregulation of angiogenesis and causes cancer growth, ischemic and inflammatory diseases.³ Therapeutic approach to block the interaction between VEGF and its receptors has been an intense research subject during the past decade, and has nowadays reached to clinic treatments. Antibody drugs targeting either VEGF (bevacizumab) or VEGFR (ramucirumab) and tyrosine kinase inhibitors (sunitinib, sorafenib, pazopanib) have benefited hundreds of thousands of patients in the cancer treatment.⁴ Nevertheless, antibodies with high pharmacokinetic variability, and tyrosine kinase inhibitors with low specificity are their proper drawbacks, which remain unresolved challenges.^{5, 6} On the other hand, the development of small molecules to block other protein-protein interaction has now advanced in clinical trials, especially those (RG7112, RG7388, MI-77301/SAR405838 and AMG 232) that inhibit MDM-2 for cancer treatments.⁷ Rationally designed peptides and phage display derived peptides have been developed targeting either VEGF or its receptors.^{8, 9} Small non peptidic

molecules have been identified by screening against VEGF receptors including co-receptor NRPs.^{10, 11} Our group¹²⁻¹⁵ and co-workers¹⁶⁻¹⁸ have developed a certain number of anti-angiogenic peptides targeting the VEGF or VEGFR in the recent years.

VEGFR-1 and VEGFR-2 are structurally related homologs, consisting of seven extracellular Immunoglobulin (Ig)-like domains (D1-D7) and two intracellular kinase domains. VEGFR-2 is commonly considered as the main receptor mediating VEGF family-induced angiogenesis in physiology,^{19, 20} on account of the high signaling transduction after activation. VEGFR-1 is mostly known as a negative regulator of angiogenesis, due to its high VEGF binding affinity and low signaling transduction ability.^{4, 21} Nevertheless, it has been postulated as a potential target for anti-angiogenic therapy as soon as 2008.²² Some others researches have shown that both are necessary for human tumor growth and metastasis.^{23, 24} Moreover, VEGFR-1 has been shown to play an important role in tumor angiogenesis under pathological conditions.²⁵ We thus focus our researches more particularly on VEGFR-1 inhibition.

The ligands specifically binding to VEGFR-1 include VEGF-A, -B and PlGF, while those binding to VEGFR-2 are VEGF-C, -D and -E. Wiesmann and co-workers have solved the first complex between a VEGF-A dimer and the D2 domain of VEGFR-1 (PDB: 1FLT).²⁶ Later, other structures of different growth factors in complex with either VEGFR-1 or VEGFR-2 fragments have been determined, such as VEGF-B dimer with D2 of VEGFR-1 (PDB: 2XAC),²⁷ PlGF dimer with D2 of VEGFR-1 (PDB: 1RV6),²⁸ VEGF-A, -C and -E dimer with D2-D3 of VEGFR-2 (PDB: 3V2A, 2X1W, 3V6B).^{29, 30} They are very similar albeit slight differences in certain binding hot spots explain the binding specificity. The three complexes

of VEGF-A, -B or PlGF with VEGFR-1 showed three major hot spots on dimeric ligands, two binding sites on one monomer (the α 1 helix and the loop 2), one binding sites on the other monomer (loop 3).²⁶⁻²⁸ The structure of VEGF-A with VEGFR-2 D2-D3 domains has been resolved more recently (PDB: 3V2A). It showed the same binding sites on D2 domain with VEGFR-1, but very interestingly, it also showed an additional interaction between the loop 1 (L1) of VEGF-A and the D3 domain of VEGFR-2 (Figure 1).²⁹ Based on these crystal structure data, many VEGFR inhibitors have been designed and developed.^{13, 17, 18} We describe in this article our design of linear and cyclic peptides derived from three VEGFR-1 ligands: VEGF-A, -B and PlGF. No data is yet available for VEGFR-1 D3. Therefore, we based our design of peptides derived from the loop L1 of VEGF on its complex of VEGFR-2 D3.

RESULTS AND DISCUSSION

Peptide design. The VEGFR-1 binds not only to VEGF-A but also to VEGF-B and PlGF with high affinity.^{31, 32} These ligands have high homology in sequence and 3D structures (Figure 2). They bind similarly to the VEGFR-1-D2 domain. The binding epitopes of these homodimeric ligands to the VEGFR concern an $\alpha 1$ helix and two loops. The $\alpha 1$ helix binds with VEGFR-1-D2 mostly by hydrophobic interactions. The loop 2 (L2, also called the $\beta 3$ - $\beta 4$ loop) of VEGF-A, -B and PlGF have extremely similar short sequences, and contribute majorly polar interactions with the receptor. The loop 3 (L3, also called $\beta 5$ - $\beta 6$ loop) shows a β -sheet hairpin conformation contributing both hydrophobic and polar interactions with the receptor, but this loop has been shown more implicated in VEGFR-2-D2 binding.³³ The loop 1 (L1, also called $\alpha 2$ - $\beta 3$ loop) had not been identified until the resolution of structures of VEGFR-2 D2-D3 in complex with VEGFA and with VEGFC.²⁹ In fact, the L1 of VEGF-A interacts with VEGFR-2 D3, while the interaction between VEGF-A L1 with VEGFR-1 D3 has not yet been reported. The superimposition of these ligands shows that the backbones of $\alpha 1$ helix and L2 are perfectly superimposed, while these of L1 and L3 have larger differences (Figure 2). The alignment of binding epitopes of these three VEGFR1 binding factors is shown in table 1. L1 of VEGF-B is slightly bigger than the two other factors, so a longer sequence was included.

To search peptide antagonists that inhibit interaction of VEGFA/VEGFR-1, we designed peptides that mimic different binding epitopes of VEGF-A, -B and PlGF. The native sequence of VEGF-A L2 induced only a slight inhibition of the VEGF/VEGFR-1 binding.¹³ Therefore, we did not investigate further in this paper on L2 since we have developed a series of cyclic

peptides combining the binding information from the L2 and the $\alpha 1$ helix of VEGF-A.¹³⁻¹⁵

We thus focused on comparing peptides derived from $\alpha 1$ helix, L1 and L3 sequences of VEGF-A, -B and PlGF to explore new templates for further design of VEGFR-1 antagonists. All the peptides were derived from these sequences, as linear or cyclic peptides. They were tested for their capacity to block the VEGF-A/ VEGFR-1 interaction in a displacement assay.

Inhibitory effect of peptide in VEGF-A/VEGFR-1 displacement assay. All synthesized peptides were evaluated in an ELISA-based assay (table 2). Briefly, the compounds were tested for their competitive binding with biotinylated VEGF-A₁₆₅ (btVEGF₁₆₅) to recombinant VEGFR-1_{ECD} (VEGFR-1 extracellular domains) in a chemiluminescent displacement assay.³⁴ The calculated percentage of displacement represents the inhibitory affinity of peptides. Generally, peptides were tested at 100 μ M and 50 μ M to compare their inhibitory properties on VEGF/VEGFR-1 interaction. IC₅₀ of peptides which exhibit more than 50 % displacement at 100 μ M were determined.

Peptide antagonists derived from $\alpha 1$ helix of VEGF-A, VEGF-B and PlGF. In the first place, we compared the native fragments of $\alpha 1$ helix of VEGF-A₁₆₋₂₅, -B₁₆₋₂₅ and PlGF₂₄₋₃₃ (numbered according to PDB: 1FLT, 2XAC, 1RV6). As shown in table 1, the $\alpha 1$ helices of the three growth factors can be well aligned. They have two or three aromatic residues at $i/i+4/i+8$ positions: F17/Y21/Y25 in VEGF-A; W17/Y21 in VEGF-B and F25/W29/Y33 in PlGF (colored in red). In 3D structures, all these aromatic residues are oriented in parallel and are key residues in the interaction with the receptors (Figure 3). Additionally, all of them have an acidic residue at $i+2$ (colored in orange) and a basic arginine at $i+6$ (colored in light blue), which might stabilize helical conformation by intramolecular

ionic interaction.

Many efforts have been strived to develop antagonists derived from the $\alpha 1$ helix. D'Andrea and co-workers have reported a series of peptides based on the structure of the $\alpha 1$ helix of VEGF-A₁₄₋₂₇ (VVKFMDVYQRSYCH). Two peptides Ac-KLTWMELYQLAYKGI-NH₂ and Ac-KLTWQELYQLKYKGI-NH₂ were obtained and they both bind to the membrane of endothelial cells. However, they have opposite properties, the first one has pro-angiogenic properties,^{35, 36} while the second one has anti-angiogenic properties.¹⁷ Pérez de Vega and co-workers have reported a series of peptides designed from the $\alpha 1$ helix of VEGF-A₁₃₋₂₅(EVVKFMDVYQRSY). Two cyclic peptides, through replacing either V15 and D19 or D19 and R23 by respectively a glutamic acid and a lysine then cyclized at their side chains, have shown increased affinity for VEGFR-1 correlated with better helical conformation comparing to the corresponding linear peptides.¹⁸

We aimed to compare the binding epitopes of different ligands. C-amidation and N-acetylation of peptide have been considered to promote the helical conformation of peptide in solution.³⁷ Therefore, peptides issued from the $\alpha 1$ helix were synthesized as amide at the C-terminal, while N-terminal was acetylated or free. Nevertheless, N-acetylation decreases greatly the solubility of some peptides in aqueous media. Then all these peptides (**1-6**) were tested in the ELISA test at two concentrations (100 μ M and 50 μ M). The percentage of inhibition of the interaction between btVEGF-A₁₆₅ and VEGFR-1 are presented in table 2. The most active peptides at these concentrations were tested in dose-effect relationship to determine their IC₅₀.

All these α 1 helix mimic peptides inhibit the interaction of VEGF-A/VEGFR-1 with different affinities. Generally, N-terminal acetylated peptide has better affinity than its N-terminal free analog. Peptide **1** and **2** derived from α 1 helix of VEGF-A inhibit slightly the binding of VEGF-A/VEGFR-1 in this test as already reported.^{13,18} They have shorter sequence than the two reported peptides: KFMDVYQRSYCH-NH₂¹³ and Ac-EVVKFMDVYQRSY-NH₂.¹⁸ Peptides derived from α 1 helix of VEGF-B (**3**, **4**) and PlGF (**5**, **6**) showed better inhibition activities. Comparing the aromatic residues of the α 1 helix of VEGF-A (**1**, **2**), -B (**3**, **4**) and PlGF (**5**, **6**), F₁₇/Y₂₁/Y₂₅ in VEGF-A, W₁₇/Y₂₁ in VEGF-B and F₂₅/W₂₉/Y₃₃ in PlGF, which are the main binding residues with receptor, the more hydrophobic tryptophan residue at the first and second aromatic position seems to increase the inhibitory effect of peptide. This observation is correlated with the two peptides Ac-KLTWMELYQLAYKGI-NH₂ and Ac-KLTWQELYQLKYKGI-NH₂ developed by D'Andréa *et al.*^{35, 36} A basic residue at the N-terminal position, peptide **1** issued from VEGF-A, showed very low inhibition ability. N-terminal acetylation is favorable (peptide **2** versus peptide **1**). Acetylation has less effect on peptide **3** and peptide **5** (table 2).

Peptide antagonists derived from L3 of VEGF-A, VEGF-B and PlGF. The L3 sequences of the three ligands have less homology whereas they all formed a β -sheet hairpin conformation. All peptides (**7-12**) that we synthesized are described in table 2. Firstly, 3 linear peptides **7**, **11** and **12** of natural sequences issued from VEGF-A₈₁₋₉₆, -B₈₀₋₉₆ and PlGF₈₈₋₁₀₄ were prepared. These linear peptides inhibit slightly the interaction of VEGF-A/VEGFR-1 (table 2). Peptide **7** of VEGF-A was then constrained by macrocyclization, attempting to improve the binding affinity.

L3 loops (also called β 5- β 6 loops) of all three ligands adopt a β -hairpin conformation in receptor-binding complexes. In the case of L3 of VEGF-A, $_{80}\text{IMRIKPHQGQHIGEMSF}_{96}$, the side chains of R_{82} and H_{90} (colored in violet in Figure 4) are close in space and not in the VEGFR interaction pocket. To constrain this peptide, we thus replaced these two residues by two cysteine residues and cyclized them through a disulfide bond. However the small cyclic peptide **8** thus obtained lost its displacement capacity. Additionally, the side chains of I_{80} and G_{92} (colored in blue in Figure 4) are also close and the same approach led to peptide **9** conserving the C-terminal residues. Finally, residues P_{85} , H_{86} , Q_{87} at the position of hairpin turn position of peptide **9** were replaced by a (D)-proline-(L)-proline template that had been reported capable to stabilize the structure of β -hairpin.³⁸ Peptide **10** seems to have gained some inhibitory activity at 100 μM and at 50 μM . However, in a dose-effect study from 3 μM to 200 μM , it displaced nearly the same ratio (about 40 %) of btVEGF_{165} in ELISA test which probably indicate the non-specific binding of peptide **10** with btVEGF_{165} (Table 2).

Peptide **7-12** designed from L3 did not have significant inhibition in our binding assay (table 2). However, the cyclo-VEGI peptide reported by Zilberberg *et al.* designed from L3 of VEGF-A_{79-93} showed favorable inhibition of VEGF_{165} binding to VEGFR-1 and VEGFR-2, as well as VEGFRs induced signals transition, cell proliferation and migration.³⁹ While only the cyclic peptide has anti-angiogenic effect rather than linear peptide indicated that the structure of peptide mimic L3 was extremely important. García-Aranda *et al.* have developed a series of VEGF-A L3 $_{81}\text{MRIKPHQGQHI}_{91}$ mimic peptides. Some of the modified peptides showed improved binding affinity with VEGFR-1.⁴⁰ The L3 has been considered binds more selectively to VEGFR-2 than to VEGFR-1.³³ As a result, we cannot specifically select the

peptides designed from L3 since our ELISA assay is based on the binding of peptide with VEGFR-1.

Peptide antagonists derived from L1 of VEGF-A, VEGF-B and PlGF. It has been reported that D2 of VEGFR-1 is sufficient for the high binding of VEGF (K_d 113 pM), while D1-D3 is 17-fold more efficient (K_d 6.7 pM).²¹ The deletion of VEGFR-2-D3 results in a 1000-fold decrease in VEGF-A binding affinity.²⁸ Ziv-aflibercept (Zaltrap®) used in the treatment of metastatic colorectal cancer is a recombinant fusion protein composed of the extracellular domains of human VEGFR-1 D2 and VEGFR-2 D3⁴¹. It binds to VEGF and PlGF to inhibit tumor angiogenesis. Thus, the D3 of VEGFR-1 is probably also important as the D2 for the VEGF binding. Ballmer-Hofer and co-workers have recently solved the crystal structure of VEGF-A with domain 2 and 3 (D2-D3) of VEGFR-2 (PDB: 3V2A).³¹ In this complex, the importance of D2 in the VEGF-A binding was confirmed. VEGF-A presents three major VEGFR-2 D2 binding sites: the α 1 helix, the loop 2 (L2) and the loop 3 (L3). Moreover, it has also been clearly shown that D3 of VEGFR-2 interacts with an additional loop of VEGF-A (Loop 1, L1) (Figure 1).

While the structures of VEGFs with VEGFR-1 D3 or VEGFR-1 D2-D3 are not available actually, we based on the structures of ligands alone and their complexes with VEGFR-2 D2-D3 to design L1 loop derived peptide antagonists of VEGFR-1 (Figure 5). These peptides (**13-19**) are also listed in Table 2. The linear peptide **13** issued from VEGF-A₃₅₋₄₇, displaced 45% of btVEGF₁₆₅ at 100 μ M and 14 % at 50 μ M, which suggest that the peptide **13** might adopt proper conformation and inhibit the VEGF-A/VEGFR-1 interaction but with limited efficiency. The same cyclization approach as we described above

was then used to design conformationally constrained peptides. Peptide **14** was obtained by cyclizing between side chains of cysteines replacing Phe36 and Phe46 and peptide **15** by cyclizing Ile35 and Phe46 cysteine replacement. Peptide **14** had significantly increased affinity, up to 67% displacement of btVEGF₁₆₅ detected at 100 μ M and 52% at 50 μ M (table 2). Whereas peptide **15**, with the macrocycle containing only one more amino acid residue, showed less improvement in VEGFR-1 binding comparing to its linear analogue. IC₅₀ values were 50 μ M for peptide **14** and 157 μ M for peptide **15**. Lys/Glu replacement followed by side chain cyclization led to analogue peptide **16**, which retained VEGFR-1 binding affinity: 55% displacement of btVEGF₁₆₅ at 100 μ M and 38% at 50 μ M. Surprisingly, addition of three more residues of peptide **15** leading to peptide **17** (one Asp at the N-terminal and Pro-Ser at the C-terminal) dramatically reduced peptide's activity (8% btVEGF₁₆₅ displacement at 100 μ M versus 55% for peptide **15**). We suppose that a possible ionic interaction between N-term Asp and the C-term Lys might create perturbations of the peptide's conformation for receptor binding. L1 loop of VEGF-B is slightly bigger than that of the two other factors VEGF-A and PlGF, so a longer sequence was included in the peptide design. The cyclic peptides derived from L1 of VEGF-B and PlGF, peptide **18** and **19**, showed interestingly outstanding inhibition of VEGF/VEGFR-1 interaction, with 70% and 72% btVEGF₁₆₅ displacement at 100 μ M and 67% and 42% at 50 μ M (Table 2).

Comparison of peptide antagonists designed from different fragments of 3 ligands, VEGF-A, -B and PlGF in the same displacement assay. The VEGFR-1 binding ELISA-based assay developed in our laboratory allows us to select the most active peptides that inhibit the VEGF-A/VEGFR-1 interaction. However, this test is very sensitive to reagents

and conditions. Different batches of commercial VEGFR-1-ECD or btVEGF-A₁₆₅ may modify the absolute values of percentage of displacement. For example, peptide c[YKDEGLEE]-NH₂ designed from L2 and α 1 helix of VEGF-A showed different inhibition level at 100 μ M with one batch of protein reagents¹⁴ and with another batch.¹⁵ Moreover, due to non specific binding, the peptides are unable to displace totally btVEGF-A in the test which was also observed by other researcher.¹⁵ Therefore, different series of designed peptides were firstly tested separately in the displacement assay at concentrations of 100 μ M and 50 μ M (Table 2). The most interesting acetylated α 1 helix derived peptides **4**, **6** and especially L1 derived peptides **14-19** were then tested with the same batches of assay reagents (VEGFR-1-ECD and btVEGF-A₁₆₅) to determine and compare accurately their IC₅₀ values (Figure 6). The L3 derived peptides showed weak and non-specific affinities were not tested again. All peptides selected showed btVEGF-A displacement in a dose-dependent manner. Peptide **4** and **6**, derived from α 1 helix have IC₅₀ of 271 μ M and 129 μ M, higher than those of peptides derived from L1. Gratifyingly, the activity of α 1 helix mimic peptides related closely to their helical conformations, we will soon present our studies on the design of α 1 helix mimetics and the stabilization of helical conformation. Peptide **18**, derived from VEGF-B L1 showed an IC₅₀ of 10 μ M, lowest value among all peptides described, which proposed that D3 domain may be a very interesting target for the design of VEGFRs antagonists.

Inhibition of capillary tube formation on matrigel induced by VEGF₁₆₅. In the literature, peptidic mimics of VEGF α 1 helix had already been reported showing anti-angiogenic effects in biological assays.^{17, 36} Otherwise, no peptide designed from L1 targeting VEGFR D3 domain had been reported till now. The peptides derived from L1

described here showed the best inhibition of the interaction of VEGF-A/VEGFR-1 in our displacement assay. In order to confirm the anti-angiogenic effect of these peptides, we selected three peptides (**14**, **15** and **18**) of IC_{50} respectively 50 μ M, 157 μ M and 10 μ M to evaluate their inhibition activities on HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) capillary tube formation on Matrigel, using anti-VEGF antibody Bevacizumab (Avastin®) as positive control.

According to the results of this microtubule formation assay, the VEGF-A (30 ng/mL) had significantly increased the formation of HUVEC tubule. The Bevacizumab, an antibody binding to VEGF which inhibits the interaction of VEGF/VEGFRs, showed at 50 μ M an excellent ability to inhibit the VEGF induced microtubule formation. All three peptides derived from L1 of VEGF-A and VEGF-B showed an inhibitory effect on HUVEC capillary tube formation at 50 μ M. While peptide **15** showed only moderate inhibitory effect, peptide **14** had higher inhibitory activity. Peptide **18**, designed from VEGF-B L1 showed high inhibition activity in this test, similar to Bevacizumab. More importantly, their inhibitory activities on HUVEC microtubule formation are related to their VEGFR-1 binding affinities in ELISA assay (Figure 7). Besides, according to the representative pictures from the microtubule formation assay, peptide **18** has obviously inhibited the VEGF-A-induced formation of microtubules.

CONCLUSION

The peptides mimicking the native sequence of the $\alpha 1$ helix of VEGF-A, -B and PlGF showed important binding affinities to VEGFR-1, particularly when acetylated at the N-terminal end. Peptides mimicking the L3 loop, both linear and cyclic, have low or non-specific binding affinities to VEGFR-1 in our study. Nevertheless, peptides mimicking L1 demonstrated high binding affinities to VEGFR-1, with peptide **18** showing an IC_{50} of 10 μM , the most active among our epitope-derived peptides. Moreover, peptide **18** showed most effective *in vitro* anti-angiogenic activity in capillary tube formation assay. We demonstrated in this paper that the L1 loop of these ligands had a significant role in the binding of VEGFR-1. The D3 domain of VEGFRs might constitute an interesting target. Peptide **18** can serve as a new peptidic template for further design of molecules targeting the interaction of VEGF with VEGFRs.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemical reagents. All Fmoc protected amino acids and peptide synthesis reagents were purchased from Novabiochem[®] (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Other chemical reagents and solvents are from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France).

Peptide design. The design of peptides antagonists based on co-crystallized structure of VEGF-A with VEGFR-1 D2 (PDB: 1FLT), VEGF-B with VEGFR-1 D2 (PDB: 2XAC), PlGF with VEGFR-1 D2 (PDB: 1rv6) and VEGF-A with VEGFR-2 D2-D3 (PDB: 3V2A), using software BIOVIA Discovery Studio Visualization. The figures of superimposition, interaction visualization and fragment isolation were performed and output by this software.

Peptide synthesis. The synthesis of peptides were performed in solid phase using Fmoc chemistry and Rink amide MBHA polystyrene resin (0.1 mmol, 0.45 mmol/g) on microwave assisted CEM-Liberty 1 synthesizer, with HBTU /DIEA or DIC /Oxyma Pure (Ethyl (hydroxyimino)cyanoacetate) as coupling reagents. Fmoc deprotection was achieved by 20% piperidine in DMF or 20% piperidine in DMF containing 0.1 M Oxyma Pure. For peptides acetylated at the N-terminal, the peptide was finally coupled with acetic acid in the presence of coupling reagents. All peptides except peptide **16** were then cleaved from resin with simultaneous removal of side chain protecting groups by treatment with a 10 mL solution containing 95% TFA, 2.5% H₂O and 2.5% TIPS (triisopropylsilane) for the peptides without cysteine residues or 94% TFA, 2.5% H₂O, 1% TIPS and 2.5% EDT for the peptides with cysteine during 3 h at room temperature. The resin was then filtered off and the filtrate was evaporated, precipitated in cold diethyl ester, and collected by centrifugation.

Purification and HPLC analysis. Crude peptides were first analyzed on a Shimadzu Prominence LC-20AD HPLC using a GRACE Vydac Protein and Peptide 218TP column (4.6×250 mm), with dual UV detection at 214 nm and 254 nm and a linear A-B gradient (A: 0.1% TFA aqueous; B: 0.09% TFA in 70% acetonitrile aqueous) at a flow rate of 1 mL/min. Then the peptides were purified on Shimadzu semi-preparative HPLC system using a GRACE Vydac Protein and Peptide 218TP column (10×250 mm) at flow rate of 2 mL/min. Fractions were rechecked by analytical HPLC as described, the pure fractions were collected and lyophilized to give white solid peptides.

Cyclization of cysteine-containing peptides. Purified and lyophilized linear peptides containing free thiol groups were dissolved in 0.1 M NH_4HCO_3 solution at a concentration of 1 mM. Cyclisation was realized by air oxidation at room temperature for 48h and controlled by HPLC for the complete oxidation. The solution was then lyophilized, and the crude cyclic peptides were purified by semi-preparative HPLC as described.

Synthesis of peptide 16. The synthesis of linear peptide **16** was performed in solid phase using Fmoc chemistry, Rink amide MBHA resin (200 mg, 0.45 mmol/g) and two acids amines with side chain protected particularly on C-terminal and N-terminal, Fmoc-Lys(MTT)-OH and Fmoc-Glu(iprph)-OH. The synthesis was realized on microwave assisted CEM-Liberty 1 synthesizer, with HBTU/DIEA as coupling reagents. Fmoc deprotection was achieved by 20 % piperidine in DMF. The N-terminal of peptide **16** was finally acetylated by coupling with acetic acid in the presence of coupling reagents. Then, the two protection groups MTT and ipophe were removed with 2 % TFA in CH_2Cl_2 . The cyclization was performed on resin with Pybop/DIEA as coupling reagents. At last, peptide **16** was cleaved from resin with

simultaneous removal of side chain protections by treatment with a 10 mL solution contain 95 % TFA, 2.5% H₂O and 2.5% TIPS, and filtered off. The filtrate was evaporated, precipitated in cold diethyl ester, collected by centrifugation and then followed purification process.

MALDI-TOF mass spectrometry analysis. The finally purified peptides were analyzed by MALDI-TOF. A mixture of 2 μ L matrix solution (in 50% acetonitrile aqueous solution) and 2 μ L peptide (approximately 50 μ M in acetonitrile aqueous solution) was loaded on the 96-well plate. After solvent evaporation, the sample was analyzed by MALDI mass spectrometry (Voyager-DETM PRO BiospectrometryTM Workstation, PerSeptive Biosystems). Analytical results of mass spectrometry and a final yield of purified peptide are given in table 3.

Table 3. Peptides derived from receptor-binding epitopes of VEGF-A, -B and PlGF. Yield is the total yield of peptide synthesis. MS is obtained by MALDI-TOF. HPLC retention times (Rt) obtained by the gradient indicated (mobile phases A: 0.1% TFA aqueous; B: 0.09% TFA in 70% acetonitrile aqueous solutions). All numbers of peptides refers to Table 2.

Peptide	Yield (%)	MS Found	RT (min)
1	9.5	1336 (M+H ⁺)	16.3 (10-100% B in 30 min)
2	6.2	1378 (M+H ⁺)	17.4 (10-100% B in 30 min)
3	26.6	1211 (M+H ⁺)	17.5 (10-100% B in 30 min)
4	10.3	1252 (M+H ⁺)	19.8 (10-100% B in 30 min)
5	24.2	1289 (M+Na ⁺)	17.1 (10-100% B in 30 min)
6	17.8	1309 (M+H ⁺)	19.8 (10-100% B in 30 min)
7	9.8	1896 (M+H ⁺)	18.7 (10-100% B in 30 min)
8	15.4	1010 (M+H ⁺)	13.5 (5-45% B in 20 min)
9	14.3	2043 (M+H ⁺)	13.8 (10-100% B in 30 min)
10	12.0	1873 (M+H ⁺)	17.0 (10-100% B in 30 min)

11	8.9	1994 (M+H ⁺)	16.1 (20-70% B in 20 min)
12	7.0	1965 (M+H ⁺)	15.4 (20-70% B in 20 min)
13	6.5	1705 (M+H ⁺)	21.2 (10-100% B in 30 min)
14	18.2	1629 (M+H ⁺)	14.1 (20-60% B in 20 min)
15	14.3	1776 (M+H ⁺)	13.5 (20-80% B in 20 min)
16	20.5	1706 (M+H ⁺)	16.0 (20-80% B in 30 min)
17	11.4	2075 (M+H ⁺)	11.7 (20-60% B in 20 min)
18	11.2	1729 (M+H ⁺)	20.6 (20-80% B in 30 min)
19	7.7	1498 (M+H ⁺)	11.6 (20-60% B in 20 min)

VEGFR-1 binding assay. The high-binding 96-well (Corning Life Sciences, Netherlands) plates was coated with humanized extracellular domains (ECD) of VEGFR-1 (R&D Systems, Abingdon, UK) (20 ng/well) in phosphate-buffered saline solution (PBS 1X, pH 7.4) at 4 °C overnight. Then the plates were washed three times with 200 µL per well washing buffer (PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20, buffer A) and treated with PBS containing 3% (w/v) BSA at 37 °C for 2 h. After three washing steps with buffer A, 50 µL of peptides solution at twice the desired final concentration (in PBS 1X containing 2% DMSO) were added in triplicate wells and the plates were incubated at 37 °C for 1 h, followed by a 50 µL solution of (0.1 ng/well) btVEGF-A₁₆₅ (R&D Systems, Abingdon, UK) in PBS containing 2% DMSO. The final mixture was kept for 2 h at 37 °C and washed four times with buffer A. A solution of diluted 1:8000 (v/v) in PBS (containing 0.1% (v/v) Tween 20 and 0.3% (w/v) BSA) Streptavidin-Horseradish Peroxidase (Amersham, Pittsburgh, PA, USA) 100 µL were then added to each well which recognize specifically the btVEGF-A₁₆₅ bound. After 45 minutes incubation at 37 °C and in the dark, the plates were washed five times with buffer A. 100 µL SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA) was added and the chemiluminescence was quantified with a Perkin Elmer Victor 2 spectrophotometer (Victor Wallac Multilabel reader). The percentages of displacement were calculated by the

following formula: $100 \times [1 - (S - NS)/(MS - NS)]$ where S is the signal measured, NS is the nonspecific binding signal defined as the signal measured in the absence of coated receptor on the microplate, and MS is the maximum binding signal obtained with btVEGF-A₁₆₅ without competitor.

Cell line and culture.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were purchased from ScienCell Research Laboratories, inc. (Carlsbad, CA). HUVECs were cultured in ECM supplemented with 5% [v/v] fetal bovine serum and 1% ECGS, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. Experiments were performed on HUVECs from passage 3 to 6.

Capillary tube formation assay.

HUVECs were starved in ECM containing 0.1% BSA for 4 h. Cells were treated with different drugs (50 μ M) for 15 min and then seeded into 96-well plates precoated with Matrigel and incubated with ECM containing 0.1% BSA with or without 30 ng/ml VEGF-A for 4 h. Images were taken with the inverted microscope and tubes forming intact networks were counted in a blind manner.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*For W.-Q.L: phone, +33-1-5373-1564, E-mail, wangqing.liu@parisdescartes.fr.

*For M.V: phone, +33-1-5373-1564, E-mail, michel.vidal@parisdescartes.fr.

Author Contributions

WQL and MV co-directed this work. LW, WQL and SB performed peptide design and synthesis. LW, MRS and NGE performed biochemical assay. LYZ and LLJ performed biological assay. All authors wrote this paper and have given approval to the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS.

This research was supported by the University Paris Descartes, the Centre National de la Recherche Scientifique (Chaire de partenariat CNRS-UPD to S. Broussy) and the ANR (ANR-2010-BLAN-1533-03). L. Wang acknowledges the China Scholarship Council for the donation of a scholarship. We thank the group of Prof Laprévote for the access of MALDI-TOF instrument and the group of Prof. Sherman for spectrophotometerplate-reader instrument.

ABBREVIATIONS USED

DIEA (N,N-Diisopropylethylamine), DIC (N,N-Diisopropylcarbodiimide), DMF (N,N-dimethylformamide), EDT (1,1-ethanedithiol), ECM (Extracellular matrix), HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate), TFA (Trifluoroacetic acid), TIPS (triisopropylsilane)

REFERENCES

1. Ferrara, N.; Gerber, H. P.; LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* **2003**, *9*, 669–676.
2. Kowanzetz, M.; Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res.* **2006**, *12*, 5018-5022.
3. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* **2003**, *9*, 653–660.
4. Potente, M.; Gerhardt, H.; Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* **2011**, *146*, 873-887.
5. Shibuya, M. VEGF-VEGFR signals in health and disease. *Biomol Ther.* **2014**, *22*, 1–9.
6. Carmeliet, P.; Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* **2011**, *473*, 298-307.
7. Zhao, Y.; Aguilar, A.; Bernard, D.; Wang S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction (MDM2 Inhibitors) in clinical trials for cancer treatment. *J Med Chem.* **2015**, *58*, 1038-1052.
8. Aeluri, M.; Chamakuri, S.; Dasari, B.; Guduru, S. K.; Jimmidi, R.; Jogula, S.; Arya, P. Small molecule modulators of protein-protein interactions: selected case studies. *Chem Rev.* **2014**, *114*, 4640–4694.
9. Mullard, A. Protein-protein interaction inhibitors get into the groove. *Nat Rev Drug Discov.* **2012**, *11*, 173–175.
10. Borriello, L.; Montès, M.; Lepelletier, Y.; Leforban, B.; Liu, W. Q.; Demange, L.; Delhomme, B.; Pavoni, S.; Jarray, R.; Boucher, J. L.; Dufour, S.; Hermine, O.; Garbay, C.; Hadj-Slimane, R.; Raynaud, F. Structure-based discovery of a small non-peptidic Neuropilins antagonist exerting in vitro and in vivo anti-tumor activity on breast cancer model. *Cancer Lett.* **2014**, *349*, 120-127.
11. 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*, 2215-2226.

12. Reille-Seroussi, M.; Gaucher, J. F.; Desole, C.; Gagey-Eilstein, N.; Brachet, F.; Broutin, I.; Vidal, M.; Broussy, S. Vascular Endothelial Growth Factor Peptide Ligands Explored by Competition Assay and Isothermal Titration Calorimetry. *Biochemistry*. **2015**, *54*, 5147-5156.
13. Goncalves, V.; Gautier, B.; Coric, P.; Bouaziz, S.; Lenoir, C.; Garbay, C.; Vidal, M.; Inguimbert, N. Rational design, structure, and biological evaluation of cyclic peptides mimicking the vascular endothelial growth factor. *J Med Chem*. **2007**, *50*, 5135-5146.
14. Gautier, B.; Goncalves, V.; Diana, D.; Di Stasi, R.; Teillet, F.; Lenoir, C.; Huguenot, F.; Garbay, C.; Fattorusso, R.; D'Andrea, L. D.; Vidal, M.; Inguimbert, N. Biochemical and structural analysis of the binding determinants of a vascular endothelial growth factor receptor peptidic antagonist. *J Med Chem*. **2010**, *53*, 4428-4440.
15. Wang, L.; Gagey-Eilstein, N.; Broussy, S.; Reille-Seroussi, M.; Huguenot, F.; Vidal, M.; Liu, W. Q. Design and synthesis of C-terminal modified cyclic peptides as VEGFR-1 antagonists. *Molecules*. **2014**, *19*, 15391-15407.
16. Vicari, D.; Foy, K. C.; Liotta, E. M.; Kaumaya, P. T. Engineered conformation-dependent VEGF peptide mimics are effective in inhibiting VEGF signaling pathways. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 13612-13625.
17. Basile, A.; Del Gatto, A.; Diana, D.; Di Stasi, R.; Falco, A.; Festa, M.; Rosati, A.; Barbieri, A.; Franco, R.; Arra, C.; Pedone, C.; Fattorusso, R.; Turco, M. C.; D'Andrea, L. D. Characterization of a designed vascular endothelial growth factor receptor antagonist helical peptide with antiangiogenic activity in vivo. *J Med Chem*. **2011**, *54*, 1391-1400.
18. García-Aranda, M. I.; González-López, S.; Santiveri, C. M.; Gagey-Eilstein, N.; Reille-Seroussi, M.; Martín-Martínez, M.; Inguimbert, N.; Vidal, M.; García-López, M. T.; Jiménez, M. A.; González-Muñiz, R.; Pérez de Vega, M. J. Helical peptides from VEGF and Vammin hotspots for modulating the VEGF-VEGFR interaction. *Org Biomol Chem*. **2013**, *11*, 1896-1905.
19. Shibuya, M.; Claesson-Welsh, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res*. **2006**, *312*, 549–560.
20. Sakurai, Y.; Ohgimoto, K.; Kataoka, Y.; Yoshida, N.; Shibuya, M. Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2005**, *102*, 1076–1081.

21. Koch, S.; Claesson-Welsh, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2012**.
22. Fischer, C.; Mazzone, M.; Jonckx, B.; Carmeliet, P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer* **2008**, *8*, 942-956.
23. Gille, J.; Heidenreich, R.; Pinter, A.; Schmitz, J.; Boehme, B.; Hicklin, D. J.; Henschler, R.; Breier, G. Simultaneous blockade of VEGFR-1 and VEGFR-2 activation is necessary to efficiently inhibit experimental melanoma growth and metastasis formation. *Int J Cancer.* **2007**, *120*, 1899-1908.
24. Karashima, T.; Inoue, K.; Fukata, S.; Iiyama, T.; Kurabayashi, A.; Kawada, C.; Shuin, T. Blockade of the vascular endothelial growth factor-receptor 2 pathway inhibits the growth of human renal cell carcinoma, RBM1-IT4, in the kidney but not in the bone of nude mice. *Int J Oncol.* **2007**, *30*, 937-945.
25. Takahashi, H.; Shibuya, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci.* **2005**, *109*, 227-241.
26. Wiesmann, C.; Fuh, G.; Christinger, H. W.; Eigenbrot, C.; Wells, J. A.; de Vos, A. M. Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell.* **1997**, *91*, 695-704.
27. Iyer, S.; Darley, P. I.; Acharya, K. R. Structural insights into the binding of vascular endothelial growth factor-B by VEGFR-1(D2): recognition and specificity. *J Biol Chem.* **2010**, *285*, 23779-23789.
28. Christinger, H. W.; Fuh, G.; de Vos, A. M.; Wiesmann, C. The crystal structure of placental growth factor in complex with domain 2 of vascular endothelial growth factor receptor-1. *J Biol Chem.* **2004**, *279*, 10382-10388.
29. Brozzo, M. S.; Bjelić, S.; Kisko, K.; Schleier, T.; Leppänen, V. M.; Alitalo, K.; Winkler, F. K.; Ballmer-Hofer, K. Thermodynamic and structural description of allosterically regulated VEGFR-2 dimerization. *Blood.* **2012**, *119*, 1781-1788.
30. Leppänen, V. M.; Prota, A. E.; Jeltsch, M.; Anisimov, A.; Kalkkinen, N.; Strandin, T.; Lankinen, H.; Goldman, A.; Ballmer-Hofer, K.; Alitalo, K. Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2010**, *107*,

2425-2430.

31. Sawano, A.; Takahashi, T.; Yamaguchi, S.; Aonuma, M.; Shibuya, M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ.* **1996**, 7, 213-221.
32. Waltenberger, J.; Claesson-Welsh, L.; Siegbahn, A.; Shibuya, M.; Heldin, C. H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* **1994**, 269, 26988-26995.
33. Li, B.; Fuh, G.; Meng, G.; Xin, X.; Gerritsen, M. E.; Cunningham, B.; de Vos, A. M. *J Biol Chem.* **2000**, 275, 29823-29828.
34. Goncalves, V.; Gautier, B.; Garbay, C.; Vidal, M.; Inguibert, N. Development of a chemiluminescent screening assay for detection of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligands. *Anal Biochem.* **2007**, 366, 108-110.
35. Ziaco, B.; Diana, D.; Capasso, D.; Palumbo, R.; Celentano, V.; Di Stasi, R.; Fattorusso, R.; D'Andrea, L. D. C-terminal truncation of Vascular Endothelial Growth Factor mimetic helical peptide preserves structural and receptor binding properties. *Biochem Biophys Res Commun.* **2012**, 424, 290-294.
36. D'Andrea, L. D.; Iaccarino, G.; Fattorusso, R.; Sorriento, D.; Carannante, C.; Capasso, D.; Trimarco, B.; Pedone, C. Targeting angiogenesis: structural characterization and biological properties of a de novo engineered VEGF mimicking peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005**, 102, 14215-14220.
37. Greenfield, N. J.; Stafford, W. F.; Hitchcock-DeGregori, S. E. The effect of N-terminal acetylation on the structure of an N-terminal tropomyosin peptide and alpha-tropomyosin. *Protein Sci.* **1994**, 3, 402-410.
38. Moehle, K.; Athanassiou, Z.; Patora, K.; Davidson, A.; Varani, G.; Robinson, J. A. Design of beta-hairpin peptidomimetics that inhibit binding of alpha-helical HIV-1 Rev protein to the rev response element RNA. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2007**, 46, 9101-9104.
39. Zilberberg, L.; Shinkaruk, S.; Lequin, O.; Rousseau, B.; Hagedorn, M.; Costa, F.; Caronzolo, D.; Balke, M.; Canron, X.; Convert, O.; Laïn, G.; Gionnet, K.; Goncalves, M.; Bayle, M.; Bello, L.; Chassaing, G.; Deleris, G.; Bikfalvi, A. Structure and inhibitory effects on angiogenesis and tumor development of a new vascular endothelial growth inhibitor. *J Biol*

Chem. **2003**, 278, 35564-35573.

40. García-Aranda, M. I.; Marrero, P.; Gautier, B.; Martín-Martínez, M.; Inguibert, N.; Vidal, M.; García-López, M. T.; Jiménez, M. A.; González-Muñiz, R.; Pérez de Vega, M. J. Parallel solid-phase synthesis of a small library of linear and hydrocarbon-bridged analogues of VEGF(81-91): potential biological tools for studying the VEGF/VEGFR-1 interaction. *Bioorg Med Chem.* **2011**, 19, 1978-1986.

41. Holash, J.; Davis, S.; Papadopoulos, N.; Croll, S. D.; Ho, L.; Russell, M.; Boland, P.; Leidich, R.; Hylton, D.; Burova, E.; Ioffe, E.; Huang, T.; Radziejewski, C.; Bailey, K.; Fandl, J. P.; Daly, T.; Wiegand, S. J.; Yancopoulos, G. D.; Rudge, J. S. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**, 99, 11393-11398.

Figure Legends

Figure 1. Complex of one VEGF-A dimer with one D2-D3 monomer of VEGFR-2. The VEGF-A dimer are presented in green, the D2 of VEGFR-2 in gold and the D3 in cyan. The binding sites on VEGF are colored: $\alpha 1$ helix in red, loop 2 (L2) in magenta and loop 3 (L3) in blue, all of them bind to D2. While loop 1 (L1), colored in orange, binds to D3 of VEGFR-2 (PDB:3V2A) ²⁹.

Figure 2. Superimposition of VEGF-A, -B and PlGF with VEGFR-1 D2. VEGF-A is presented in green, VEGF-B in purple, PlGF in blue and VEGFR-1 D2 in gold. Their four major receptor binding sites are circled.

Figure 3. Superimposition of isolated $\alpha 1$ helix of VEGF-A (green), -B (purple) and PlGF (blue) in binding with VEGFR-1-D2 (gold). The residues $i/i+4/i+8$ and their side chains are in red, the residues $i+2/i+6$ and their side chains are in cyan.

Figure 4. L3 of VEGF-A (green) in binding with VEGFR-1-D2 (gold). The residues replaced by cysteins for the design of cyclic peptides are colored, R⁸² and H⁹⁰ in purple (peptide **8**), I⁸⁰ and G⁹² in blue (peptide **9** and **10**).

Figure 5. L1 structure of VEGF-A, -B and PlGF. a) The interaction between L1 of VEGF-A (green) and VEGFR2-D3 (cyan). b) The structures of isolated L1 of VEGF-A (green), VEGF-B (purple) and PlGF (blue). The residues replaced for the design of cyclic peptides are presented in gold (peptide **14-19**).

Figure 6. IC₅₀ determination of peptides (**4**, **6**, **14**, **15**, **16**, **18** and **19**). All peptides were prepared at concentration 200 µM then diluted successively by a factor 2 to 3.125 µM. The percentage of btVEGF-A₁₆₅ displaced at each concentration of peptides was determined. The curves and IC₅₀ values of each peptide were finally obtained in GraphPad Prism.

Figure 7. The inhibitory effects of peptides (**14**, **15** and **18**) for HUVEC capillary tube formation on Matrigel. a) All three peptides (**14**, **15** and **18**) at 50 µM and the Bevacizumab decreased the number of formed capillary tube induced by VEGF. Peptide **18** showed a similar inhibitory effect to the Bevacizumab. b) Representative photos of the inhibitory effect of peptide **18** in HUVEC capillary tube formation.

Table 1. Sequence alignment of four receptor binding sites of VEGF-A, -B and PlGF (PDB: 1FLT, 2XAC, 1RV6).

	α 1 helix	Loop 1 (L1)	Loop 2 (L2)	Loop 3 (L3)
VEGF-A	¹⁴ VVKFMDVYQRSYCH ₂₇	³³ VDIFQEYPDEIEYIFKPS ₅₁	⁶¹ CNDEGLEC ₆₈	⁷⁹ QIMRIKPHQQHIGEMSF ₉₈ LQ ₉₈
VEGF-B	¹⁴ VVSWIDVYTRATCQ ₂₇	³³ VPLTVELMGTVAKQLVPSC ₅₁	⁶¹ CPDDGLEC ₆₈	⁷⁹ QILMIRYPSSQLGEMSL ₉₈ EEH ₉₈
PlGF	²² VVPFQEVWGRSYCR ₃₅	⁴² DVVSEYPSEVEHMFSPSCV ₆₀	⁶⁹ CGDENLHC ₇₆	⁸⁷ QLLKIRSGDRPSYVELTFSQ ₁₀₆

Table 2. Evaluation of peptide antagonists derived from different interaction site of VEGF-A, -B and PlGF by ELISA assay (VEGF-A165/VEGFR-1 ECD binding inhibition at 100 μ M and 50 μ M). The values are the average of at least 3 tests each in triplicate. “-” represent no activity or negative value.

Interaction site	Ligand	Peptide	Sequence	Activity on VEGFR-1 _{ECD} assay at 100 μ M	Activity on VEGFR-1 _{ECD} assay at 50 μ M
α 1 helix	VEGF-A 16KFMDVYQRSY ₂₅	1	KFMDVYQRSY-NH ₂	14.5 $\pm$ 3.8	3.4 $\pm$ 1.7
		2	Ac-KFMDVYQRSY-NH ₂	33.6 $\pm$ 5.6	25.2 $\pm$ 2.8
	VEGF-B 16SWIDVYTRAT ₂₅	3	SWIDVYTRAT-NH ₂	42.5 $\pm$ 6.9	27.5 $\pm$ 4.4
		4	Ac-SWIDVYTRAT-NH ₂	48.8 $\pm$ 7.5	33.4 $\pm$ 8.7
	PlGF 24PFQEVWGRSY ₃₃	5	PFQEVWGRSY-NH ₂	42.1 $\pm$ 1.6	18.4 $\pm$ 2.2
		6	Ac-PFQEVWGRSY-NH ₂	57.9 $\pm$ 4.1	32.5 $\pm$ 4.8
Loop 3		7	MRIKPHQGQHIGEMSF-NH ₂	14.1 $\pm$ 3.0	6.0 $\pm$ 1.2

	VEGF-A 81 ¹ MRIKPHQGQHIGEMSF ₉₆	8	[CIKPHQGGQC]-NH ₂	2.4 ± 5.6	-
		9	[CMRIKPHQGGQHIC]EMSF-NH ₂	8.9 ± 3.6	5.0 ± 2.7
		10	[CMRIK _(d) PPGQHIC]EMSF-NH ₂	43.4 ± 3.7	42.8 ± 2.4
	VEGF-B 80 ¹ ILMIRYPSSQLGEMSL E ₉₆	11	ILMIRYPSSQLGEMSL E-NH ₂	26.0 ± 3.8	-
		12	LLKIRSGDRPSYVELTF-NH ₂	27.9 ± 4.5	7.3 ± 6.7
		13	IFQEYPDEIEYIF-NH ₂	45.3 ± 0.9	14.9 ± 1.7
Loop 1	VEGF-A 35 ¹ IFQEYPDEIEYIFKPS ₅₀	14	[CQEYPDEIEYIC]K-NH ₂	67.2 ± 5.6	52.3 ± 1.4
		15	[CFQEYPDEIEYIC]K-NH ₂	54.9 ± 3.6	18.7 ± 2.4
		16	Ac-[KQEYPDEIEYIE]K-NH ₂	55.0 ± 3.1	38.8 ± 3.2
		17	D[CFQEYPDEIEYIC]KPS-NH ₂	8.6 ± 2.4	-

	VEGF-B 35LTVELMGTVAKQLVPSC ₅₁	18	Ac-[CTVELMGTVAKQLVPC]-NH ₂	70.7 ± 1.7	67.4 ± 1.8
	PIGF 44VSEYPSEVEHMF ₅₆ S	19	[CSEYPSEVEHMC]S-NH ₂	72.6 ± 5.1	42.6 ± 2.8

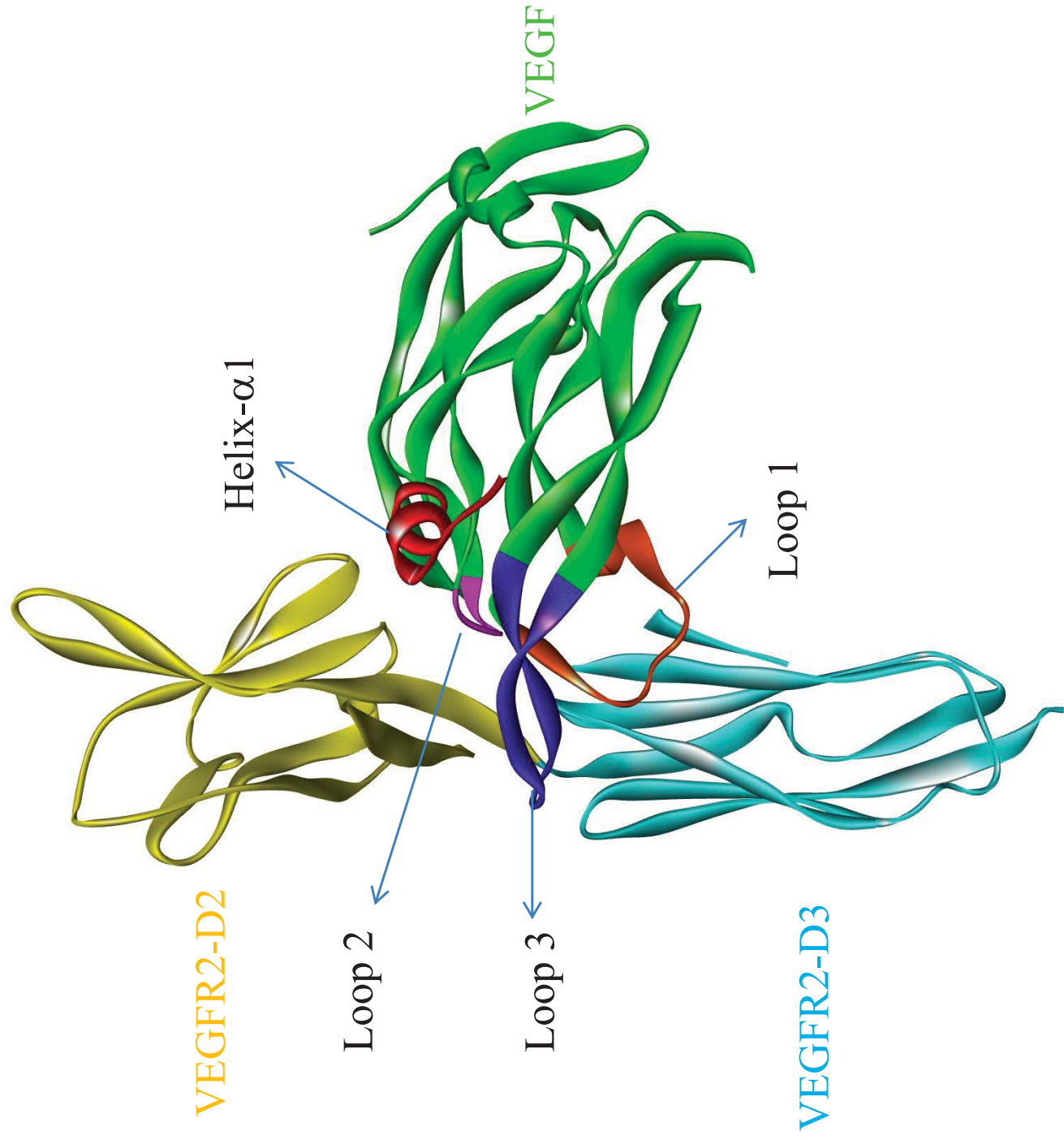


Figure 1

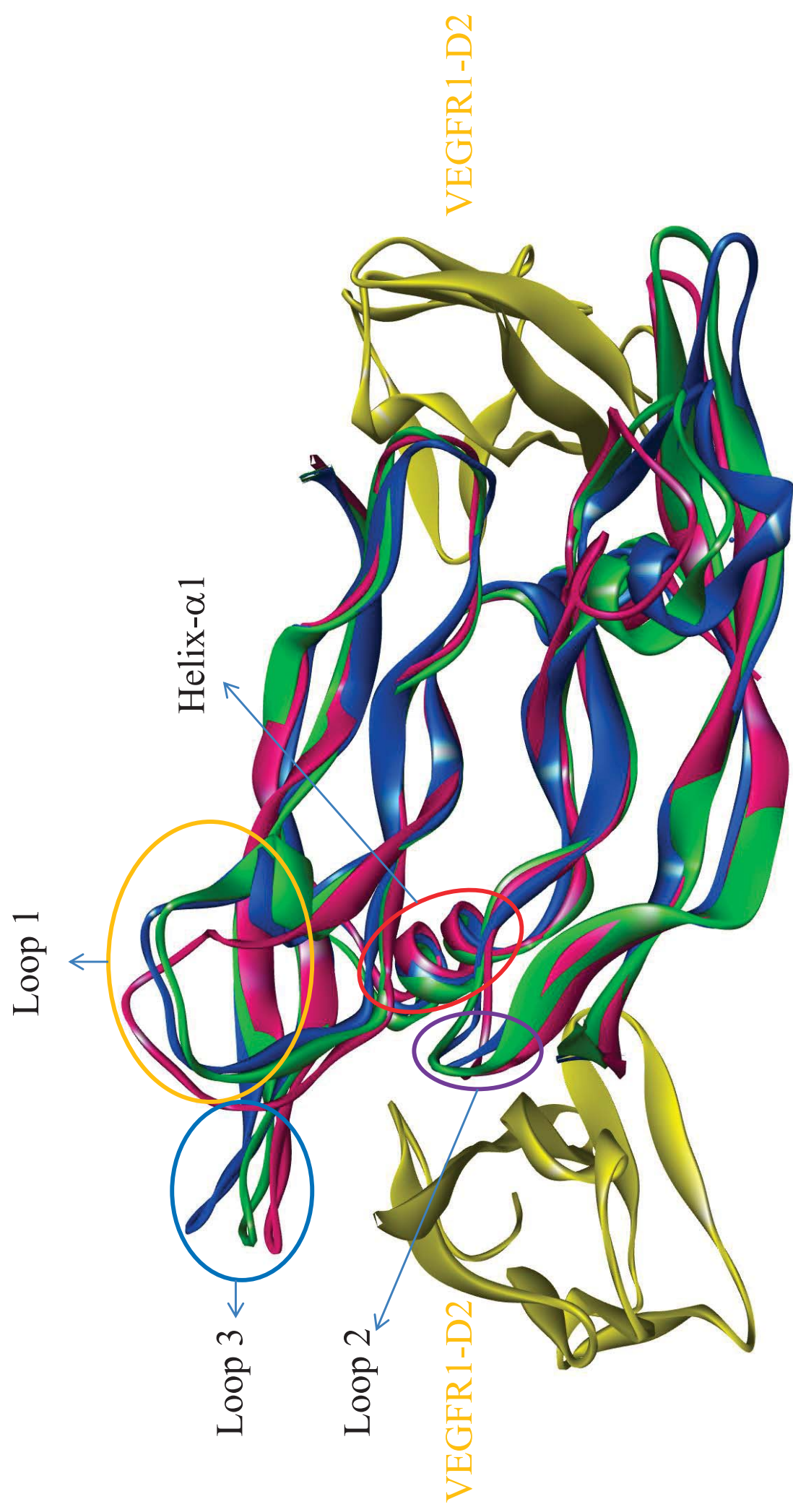


Figure 2



Figure 3

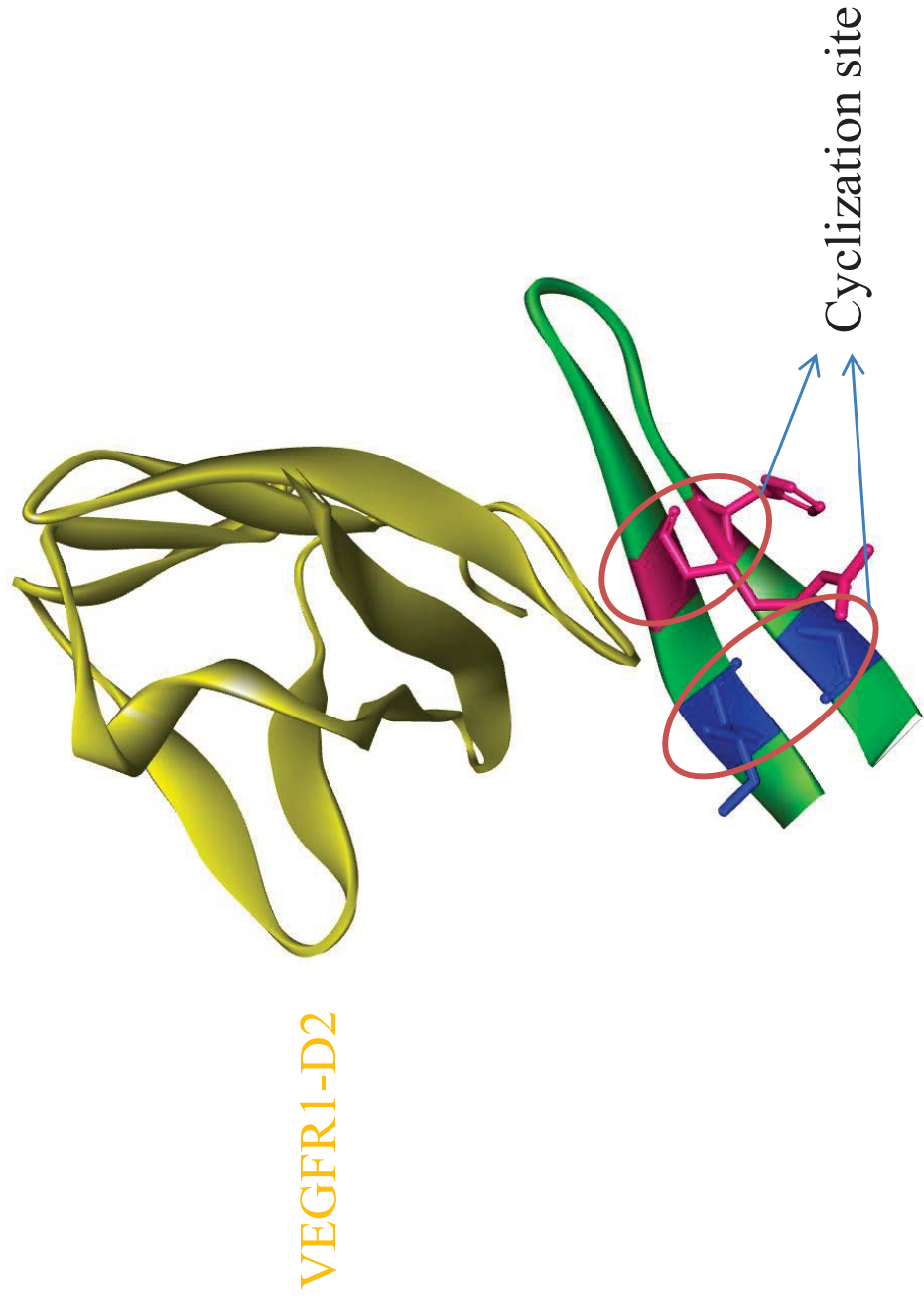


Figure 4

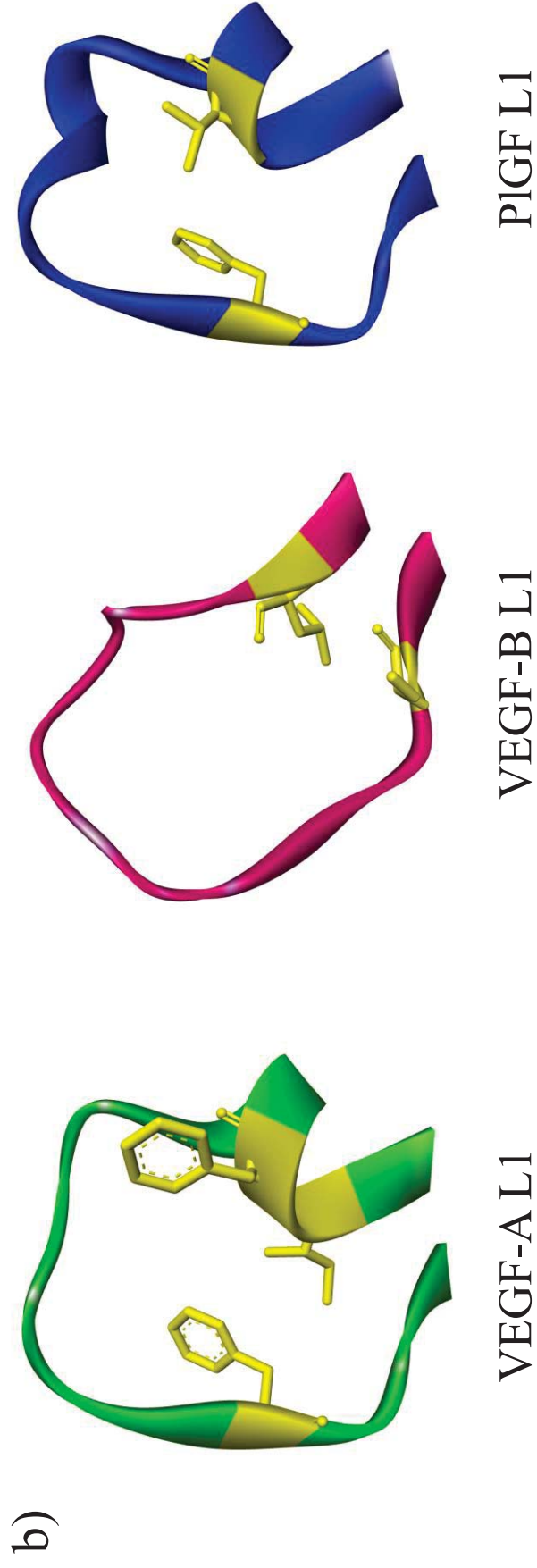
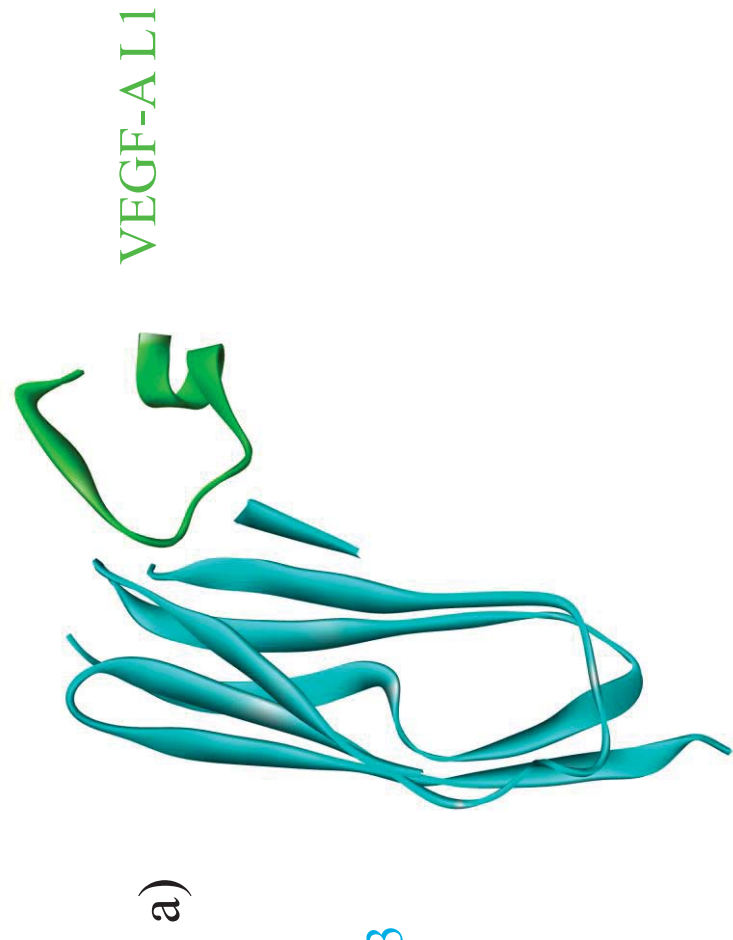
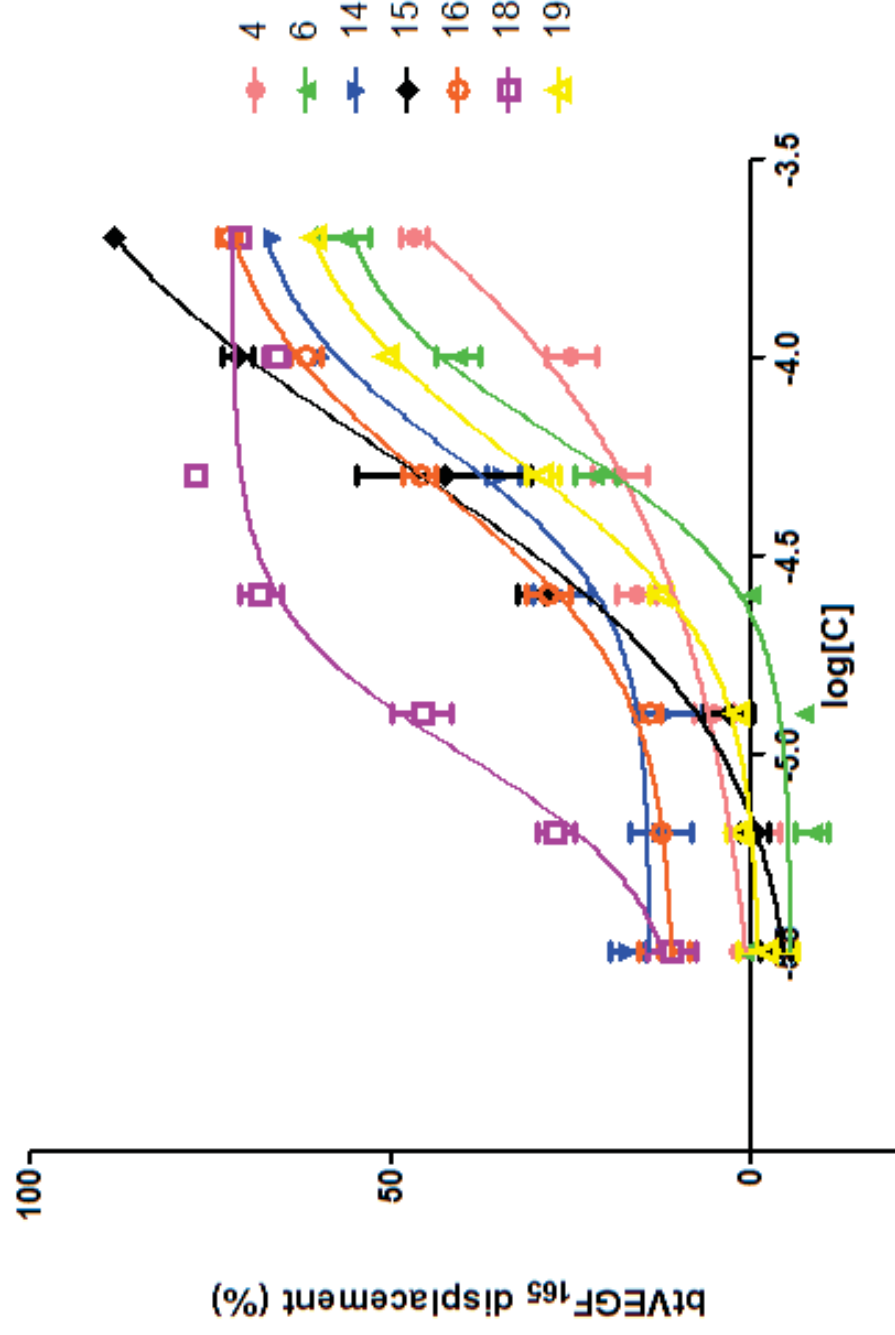


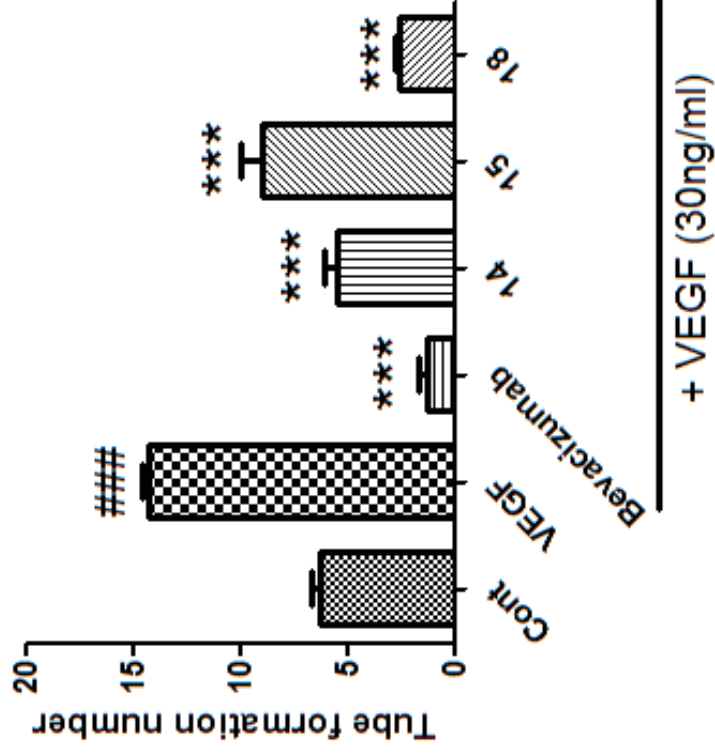
Figure 5



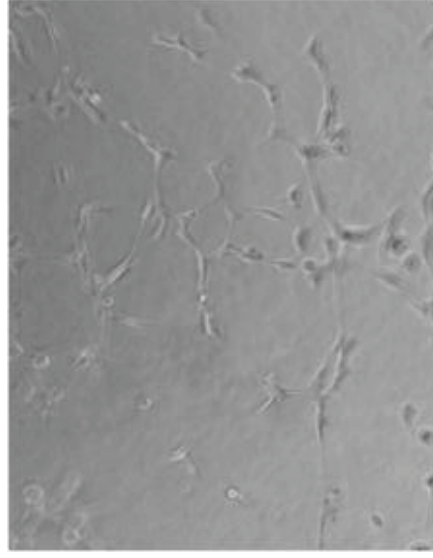
Peptide	IC ₅₀ (μM)
4	271.1 ± 30.5
6	129.5 ± 22.6
14	50.4 ± 11.5
15	157.4 ± 26.3
16	75.1 ± 14.0
18	10.4 ± 2.8
19	56.0 ± 11.4

Figure 6

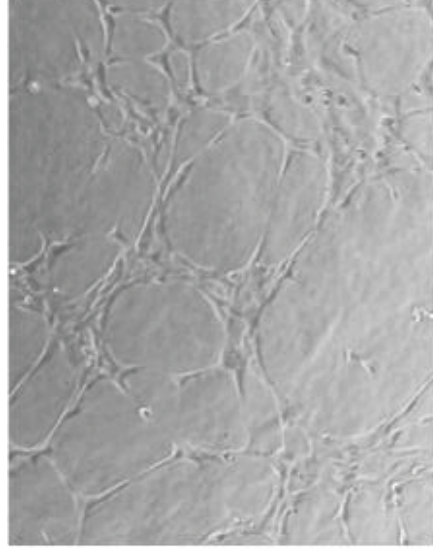
a)



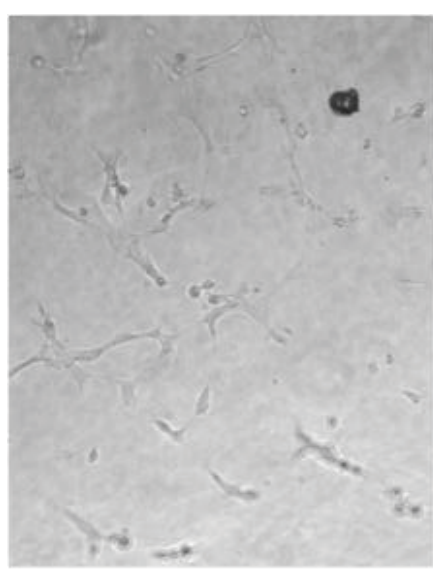
b)



Cont



VEGF



Peptide 18
+ VEGF

Figure 7

3.1 Résumé de l'Article 3

3.1.1 Introduction

Le rôle du VEGF-A est résumé dans les parties précédentes. Le VEGF-B et le PlGF se fixent aussi sur les VEGFRs, le PlGF se fixe sur le VEGFR1 et sur le VEGFR2, mais le VEGF-B se fixe uniquement sur le VEGFR1. Nous nous sommes intéressé à développer et à comparer des inhibiteurs issus des sites d'interaction de ces facteurs pour bloquer le VEGFR1.

Le VEGFR1 a des interactions fortes avec les VEGF-A, -B et le PlGF. Les structures des VEGF-A, -B et PlGF en complexe avec le VEGFR1 D2 ont été résolues et paraissent similaires^{147,201,202}. La superposition de ces trois facteurs en interaction avec le VEGFR1 D2 a montré que leur interaction avec le VEGFR1 D2 sont très similaires, principalement sur 3 parties : l'hélice- α 1, la boucle β 3- β 4 et la boucle β 5- β 6. Ces trois sites d'interaction contribuent à l'interaction forte de chaque facteur avec le VEGFR1.

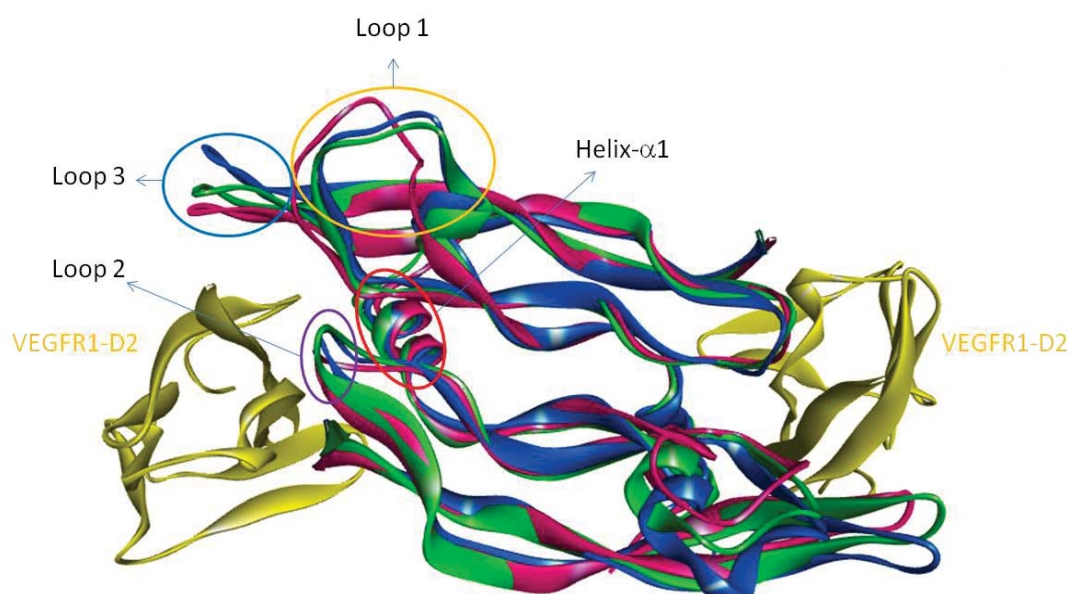


Figure 53. Superposition de VEGF-A (vert), -B (violet) et PlGF (Bleu) en interaction avec le VEGFR1-D2 (or).

²⁰¹ Iyer S, Darley PI, Acharya KR. *J Biol Chem.* **2010**, 285, 23779-23789.

²⁰² Christinger HW, Fuh G, de Vos AM et al. *J Biol Chem.* **2004**, 279, 10382-10388.

Généralement, les interactions entre ces facteurs avec les VEGFRs ne sont pas uniquement sur le domaine D2 des récepteurs. L'ensemble D1-D3 des VEGFRs sont des domaines de fixation. Selon les études de mutation pour l'interaction du VEGF-A avec le VEGFR1, Wiesmann C *et al.* ont montré que la délétion de D1 n'induit pas beaucoup de perte d'affinité par rapport à l'ensemble D1-D3. Mais la délétion de D3 a diminué de 20 fois l'affinité. Le domaine D3 du VEGFR1 semble donc important pour l'interaction VEGF-A/VEGFR1. Pourtant, la cristallographie du VEGF-A avec le VEGFR1 D3 seul n'est pas encore disponible, ni la cristallographie de VEGF-A avec le VEGFR1 D1-D3 ou D2-D3. Il est donc difficile de concevoir de façon rationnelle des peptides inhibant l'interaction VEGF-A/VEGFR1 en ciblant le domaine D3 du VEGFR1.

Le VEGFR2 a une affinité plus faible pour le VEGFA que le VEGFR1. Le domaine D2 du VEGFR2 n'est pas suffisant pour une interaction forte avec le VEGF-A. La suppression du domaine D3 du VEGFR2 a causé une diminution d'affinité de 1000 fois avec le VEGF-A²⁰³. Le Zaltrap® (Aflibercept)²⁰⁴, utilisé récemment comme traitement anti-cancéreux est une protéine fusionnée du domaine D2 du VEGFR1 et du domaine D3 du VEGFR2, est aussi une preuve de l'importance du domaine D3 du VEGFR2 dans l'interaction avec le VEGF-A. Si le domaine D3 est important pour l'interaction VEGFR2/VEGF-A, cela peut signifier qu'il y a une partie du VEGF-A qui se fixe sur le domaine D3 du VEGFR2.

La première structure tridimensionnelle déterminée impliquant le domaine D3 du VEGFR2 est le dimère du VEGF-C en complexe avec ses domaines D2-D3 a été publiée la première²⁰⁵. Puis le VEGF-A dimère a été cristallisé avec le VEGFR2 D2-D3¹⁵⁸. Dans cette dernière cristallographie, les 3 parties du VEGF-A, hélice- α 1, boucle β 3- β 4 et boucle β 5- β 6, interagissent avec le domaine D2 du VEGFR2 comme dans le complexe du VEGFA avec le domaine D2 seul du VEGFR1 et du VEGFR2. Cependant, la boucle β 5- β 6 a des interactions supplémentaires avec le domaine D3 du VEGFR2. Plus particulièrement, une autre partie constituée de l'hélice- α 2 et de la boucle L1 du VEGF-A, a des interactions avec le domaine D3 du VEGFR2. En plus de trois fragments (hélice α 1, boucle β 3- β 4 et boucle β 5- β 6) du VEGF-A importants pour son interaction avec le VEGFR2, un nouveau fragment a été identifié et constitue un nouveau site pour la conception d'antagonistes des VEGFR.

²⁰³ Fuh G, Li B, Crowley C, et al. *J Biol Chem.* **1998**, 273, 11197-11204

²⁰⁴ Holash J, Davis S, Papadopoulos N, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**, 99, 11393-11398

²⁰⁵ Brozzo MS, Bjelić S, Kisko K, et al. *Blood.* **2012**, 119, 1781-1788

Dans le laboratoire, nous travaillons sur l'inhibition du VEGFR1. Malheureusement, les structures des complexes des facteurs de croissance avec les domaines D2-D3 ne sont pas encore disponibles. Nous devons donc nous baser sur la structure du VEGF-A avec le VEGFR2 D2-D3 pour concevoir nos inhibiteurs.

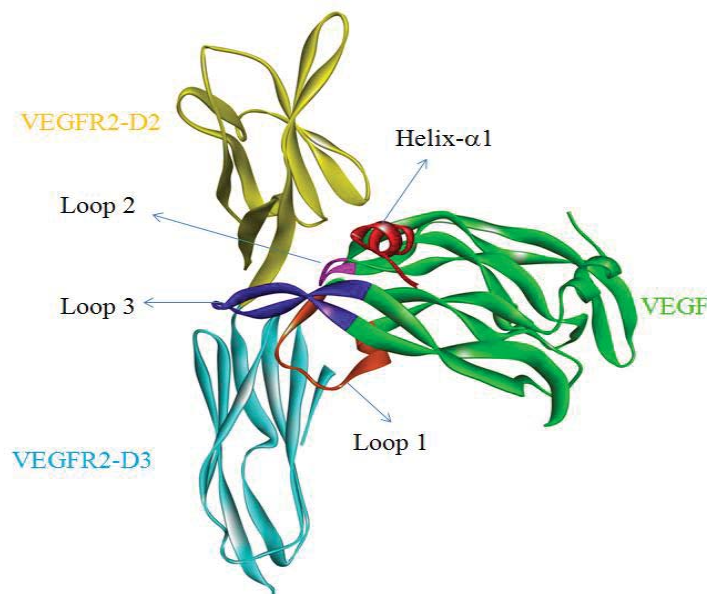


Figure 54. Cristallographie du VEGF-A dimère avec les domaines D2-D3 du VEGFR2. Les sites d'interaction sont colorés avec différentes couleurs : hélice- $\alpha 1$ (rouge), boucle $\beta 3\text{-}\beta 4/L2$ (violet), boucle $\beta 5\text{-}\beta 6/L3$ (bleu), boucle L1 (orange).

3.1.2 Conception et synthèse d'inhibiteurs

Plusieurs études ont été faites pour développer des inhibiteurs d'interaction VEGF/VEGFR en mimant l'hélice- $\alpha 1$ ^{160,161,206}, la boucle $\beta 3\text{-}\beta 4/L2$ ^{162,163} et la boucle $\beta 5\text{-}\beta 6/L3$ ^{159,164} du VEGF-A. Nous nous sommes intéressés à la comparaison des inhibiteurs mimant différents sites d'interaction de 3 facteurs (VEGF-A, -B et PlGF) afin d'identifier la meilleure séquence pour la conception de peptidomimétiques. De plus, nous avons introduit la boucle L1 potentiellement en interaction avec le D3 du VEGFR1 dans nos réflexions. Aucune molécule issue de cette dernière boucle n'a été décrite dans la littérature comme inhibiteur des interactions VEGF/VEGFR.

Un alignement de séquence d'après la superposition de trois facteurs a permis de comparer les résidus entre les mêmes sites d'interaction des 3 facteurs. La boucle $\beta 3\text{-}\beta 4$ (L2) a la séquence la plus conservée ; les séquences de l'hélice- $\alpha 1$ sont aussi similaires, notamment les résidus aromatiques qui participent à l'interaction avec le récepteur ; la boucle $\beta 5\text{-}\beta 6$ (L3) et la boucle L1 sont moins identiques en séquence, la superposition de L3 et L1 ont les différences les plus marquées.

²⁰⁶ Ziaco B, Diana D, Capasso D et al. *Biochem Biophys Res Commun.* **2012**, 424, 290-294.

Tableau 4. Alignement de séquence de différents sites d'interaction du VEGF-A, -B et PlGF.

	$\alpha 1$ helix	Loop 1 (L1)	Loop 2 (L2)	Loop 3 (L3)
VEGF-A	¹⁴ VVKFMDVYQ ²⁷ RSYCH ₂₇	³³ VDIFQEYPDEIEYIFK ⁵¹ PSC ₅₁	⁶¹ CNDEGLEC ₆₈	⁷⁹ QIMRIKPHQGQHIGEMSFLQ ₉₈
VEGF-B	¹⁴ VVSWIDVY ²⁷ TRATCQ ₂₇	³³ VPLTVELMGTVAKQLVPSC ₅₁	⁶¹ CPDDGLEC ₆₈	⁷⁹ QILMIRYPSSQLGEMSLEE ₉₈
PlGF	²² VVPFQEVW ³⁵ GSYCR ₃₅	⁴² DVVSEYPSEVEHMFSPSCV ₆₀	⁶⁹ CGDENLHC ₇₆	⁸⁷ QLLKIRSGDRPSYVELTFSQ ₁₀₆

Puis, pour chaque site d'interaction, nous avons proposé des peptides linéaires ou cycliques basé sur la séquence naturelle du site d'interaction.

- La boucle L2 toute seule a été testée et a peu d'activité dans le test de déplacement. Les nombreuses recherches décrites précédemment au laboratoire ont portées sur la boucle L2 combinée avec l'hélice- $\alpha 1$, donc nous n'avons pas comparé les boucles L2 seules de ces 3 facteurs.
- L'hélice $\alpha 1$ a des séquences similaires avec des résidus aromatiques qui sont impliqués dans l'interaction avec les récepteurs. Mais ils ont différents résidus aromatiques dans la même position. Le **Trp** est normalement plus hydrophobe que la **Tyr** ou la **Phe**, la **Tyr** a une fonction OH qui peut avoir des liaisons hydrogènes avec les récepteurs. Donc, des peptides linéaires avec des séquences naturelles d'hélice- $\alpha 1$ ont été synthétisés (peptide **1**, **3** et **5**, numéro selon [Article 3](#)), une partie des peptides linéaires a été acétylé en position N-terminale pour avoir des peptides plus structurés (peptide **2**, **4** et **6**).
- L3 est sous forme d'épingle de feuillet- β dans les protéines. Nous avons proposé de comparer les peptides linéaires issus des L3 de ces trois facteurs (peptide **7**, **11** et **12**). Puis, basé sur le peptide linéaire de VEGF-A (peptide **7**), nous avons proposé des modifications et des cyclisations (peptide **8**, **9** et **10**).
- L1 est un site d'interaction récemment découvert par la détermination de la structure de VEGF-A/VEGFR2 D2-D3. Le premier peptide (peptide **13**) conçu était un peptide linéaire de la séquence naturelle du VEGF-A. Selon les résultats du test ELISA, il avait une bonne capacité à inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1. Des modifications et cyclisations ont été proposées basé sur ce peptide linéaire (peptide **14**, **15**, **16** et **17**). Les peptides produits ont montré des meilleures affinités que le peptide linéaire. Finalement, deux peptides cycliques mimant L1 du VEGF-B et du PlGF (peptide **18** et **19**) ont aussi été synthétisés et évalués par test ELISA. Ils ont montré de très bonnes inhibitions de l'interaction VEGF/VEGFR1.

Enfin, nous avons préparé 19 peptides dérivés des 3 sites d'interaction (hélice $\alpha 1$, L3 et L1) du VEGF-A, VEGF-B et PlGF, sous forme linéaire ou cyclique selon leur conformation dans les complexes.

3.1.3 Évaluation biologique

Les peptides sont ensuite évalués pour leurs capacités à inhiber l'interaction VEGF-A/VEGFR1 par le test ELISA décrit dans le chapitre 2, à deux concentrations de peptide, 100 μ M et 50 μ M (**Figure 55**).

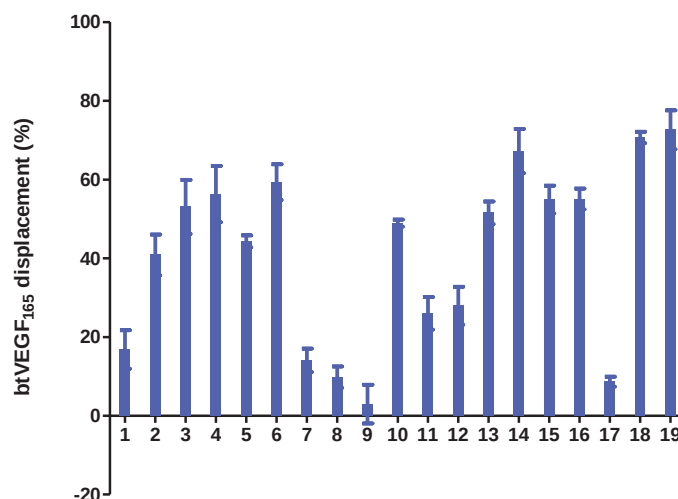


Figure 55. Capacité à déplacer le btVEGF₁₆₅ dans son interaction avec le VEGFR1 ECD par les peptide **1** à **19** à 100 μ M.

Les résultats des tests ELISA ont montré que les peptides conçus à partir des sites d'interaction des VEGF-A, -B et PlGF pouvaient inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1. Notamment les inhibiteurs conçus à partir de l'hélice- α 1 (peptide **4** et **6**) et de la boucle L1 (peptide **14**, **15**, **16**, **18** et **19**) ont une meilleure affinité. L' IC_{50} des peptides les plus actifs a ensuite été déterminée par relation effet dose en test ELISA. Le peptide **18**, conçu à partir de L1 du VEGF-B a l' IC_{50} la plus basse (de 10,4 μ M).

Enfin, les meilleurs peptides ont été évalués par un test d'inhibition de la formation de microtubules des cellules HUVE en Matrigel comme déjà décrit dans le chapitre 2. Cependant, les peptides mimant l'hélice- α 1 ont été beaucoup étudiés, certains ont un effet anti-angiogénique. Les peptides conçus à partir de L1 n'ont jamais été publiés. Nous avons testé trois peptides **14**, **15** et **18** dans le test de formation de microtubules sur Matrigel en collaboration avec le Pr. Lili Ji à Shanghai. Les résultats ont montré que ces trois peptides conçus à partir de L1 inhibent la formation de microtubules suite à l'interaction VEGF/VEGFR.

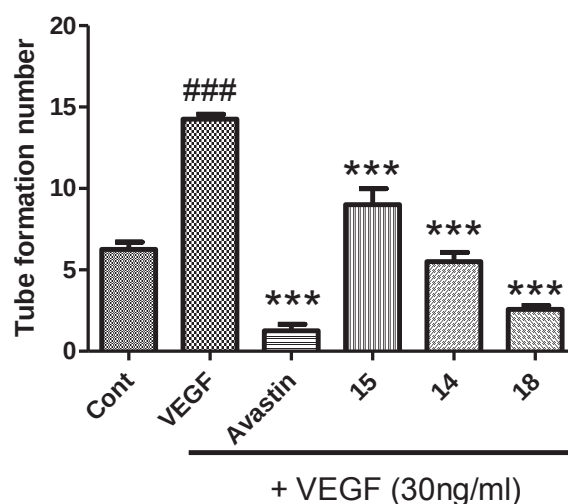


Figure 56. Inhibition de la formation de microtubules sur Matrigel (cellules HUVE) pour les peptides **14**, **15** et **18** en comparaison à l'Avastin®.

3.1.4 Conclusions

Ces résultats démontrent notre hypothèse de départ et le fait que des antagonistes des VEGFR peuvent être conçus à partir de différents ligands des VEGFR. Ces inhibiteurs peptidiques conçus à partir de différents sites d'interaction des VEGF-A, -B et PlGF inhibent l'interaction VEGF/VEGFR1. Notamment, les peptides conçus à partir de la boucle L1 de ces trois facteurs, site d'interaction entre le ligand et le domaine D3 du VEGFR, ont une meilleure affinité. C'est la première fois que des peptides conçus à partir de L1 conduisent à des inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR1 avec une très bonne affinité. L'effet anti-angiogénique de certains peptides a été confirmé et démontre la preuve de concept.

IV. Les études d'antagonistes peptidiques mimant

l'hélice- α 1 du VEGF-A

Beaucoup d'études ont été faites pour développer des antagonistes du VEGFR en mimant l'hélice- α 1 du VEGF-A^{159,162,163}. Nous avons proposé une étude de minimisation et optimisation de la séquence, une étude de modification de résidu et une étude de stabilisation de la conformation en hélice en nous basant sur la séquence de l'hélice- α 1 du VEGF-A.

4.1 Étude de minimisation et optimisation de peptides mimant

l'hélice- α 1 du VEGF-A

Selon la cristallographie du VEGF-A, l'hélice- α 1 est un fragment court avec deux tours d'hélice. Les résidus essentiels qui ont des interactions avec les récepteurs sont les trois résidus aromatiques **F17**, **Y21** et **Y25**. Ils sont présents dans l'hélice- α 1 du VEGF-A en position i , $i + 4$ et $i + 8$. Donc, un inhibiteur conçu à partir de l'hélice- α 1 du VEGF-A doit contenir au moins 9 acides aminés pour avoir ces trois résidus aromatiques (**Figure 57**).

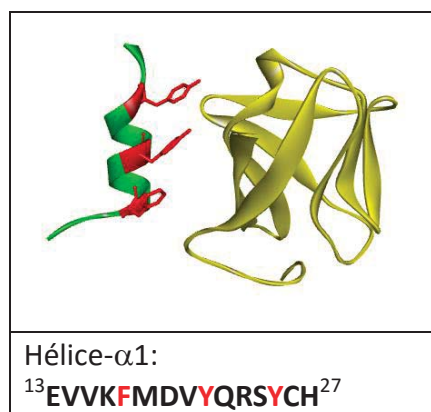


Figure 57. Interaction entre l'hélice- α 1 du VEGF et le VEGFR1 D2.

Les peptides développés par l'équipe de D'Andrea avaient une séquence à 15 acides aminés (Ac-KLT**WMELYQLAY**KGI-NH₂)¹⁶⁰, avec une prolongation en C-terminal et en N-terminal. Les peptides développés par l'équipe de Pérez de Vega avaient une séquence à 13 acides aminés (Ac-E**VQKFLEVYLR**LY-NH₂)¹⁶¹, qui ont 4 résidus de plus en N-terminal. Nous avons voulu chercher une séquence minimisée et optimisée en termes d'activité et de solubilité.

Une série de peptides basés sur la séquence naturelle de l'hélice- α 1 du VEGF-A a été synthétisée avec différentes longueurs. Le peptide **20** avait un minimum de résidus, mais il était très hydrophobe et difficile à solubiliser pour les tests biologiques dans un tampon aqueux. L'ajout d'un résidu **Lys** en N-terminal a augmenté la solubilité (peptide **21**). Le peptide **22** a été synthétisé en même temps que le peptide **21** sans acétylation en N-terminal, et il avait une solubilité meilleure que celle du peptide **21**. Le peptide **23** avait une séquence beaucoup plus longue sans acétylation en N-terminal, il avait aussi une bonne solubilité. Nous avons préparé également deux peptides fonctionnalisés avec un groupement coumarine en N-terminal. Ce groupement coumarine méthylé inséré en C-terminal du peptide cyclique décrit précédemment avait augmenté l'affinité de ce dernier. Ce résidu a été inséré pour remplacer le résidu **Phe** pour former le peptide **24** ou ajouté en N-terminal du peptide **22** pour former le peptide **25** :

20	Ac-FMDVYQRSY-NH ₂
21	Ac-KFMDVYQRSY-NH ₂
22	KFMDVYQRSY-NH ₂
23	EVVKFMDVYQRSYSEP-NH ₂
24	Coumarin-MDVYQRSY-NH ₂
25	Coumarin-KFMDVYQRSY-NH ₂

Ensuite, ces peptides ont été évalués par le test ELISA (**figure 58**). Le peptide **20** a la capacité d'inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1, et l'ajout d'une **Lys** (peptide **21**) en N-terminal a diminué légèrement l'affinité. L'acétylation en C-terminal a permis d'augmenter légèrement l'affinité. Le peptide **23** a une affinité bien meilleure que celle des autres peptides, qui est peut-être due aux résidus hydrophobes (deux **Val**) en N-terminal. Le remplacement de la **Phe** par le groupement coumarine (peptide **24**) a induit une affinité similaire à celle du peptide de référence **20**, mais le peptide **25** avec ce groupement en N-terminal avait perdu de l'affinité.

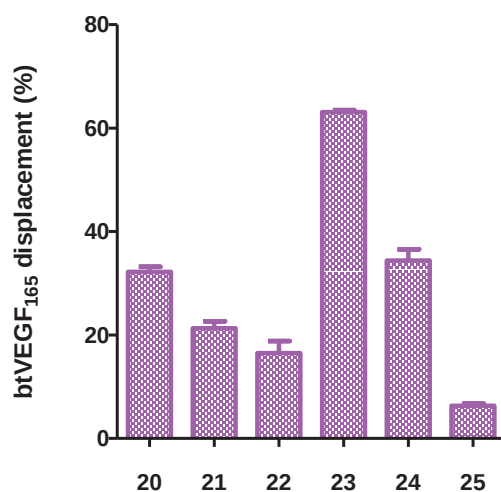


Figure 58. Capacité à déplacer l'interaction btVEGF₁₆₅/VEGFR1 ECD par les peptides **20-25** à 100 μ M.

4.2 Étude de modification de la séquence de peptides mimant

l'hélice- α 1 du VEGF-A

Une autre série de peptides avec des modifications de la séquence a été proposée et préparée par le Dr. Wangqing Liu au laboratoire :

26	KFMDVYQRS- Y(Ph) -NH ₂
27	KFMDVYQRS-(2) Naph -NH ₂
28	KFMDVYQRS-(1) Naph -NH ₂
29	KFMDVY- Q* -RSY-NH ₂
30	KF- Thi -DVYQRSY-NH ₂
31	KF- Thi -DVY- Q* -RSY-NH ₂

Thi (dérivé de thiophène) et Q* (dérivé de glutamine) (**Figure 60**)

Trois peptides (**26-28**) ont été préparés dans le but d'augmenter l'hydrophobicité de la **Y25** afin d'avoir une meilleure affinité.

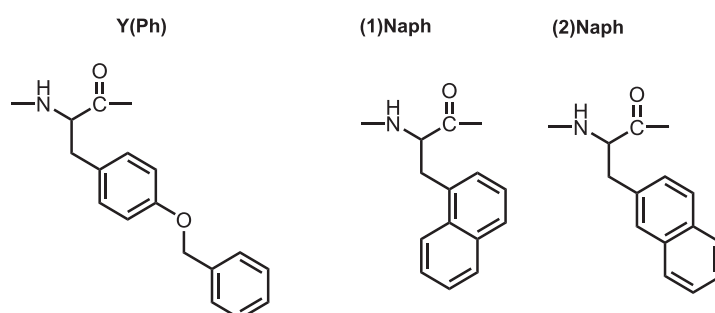


Figure 59. Acides aminés remplaçant la **Tyr 25**.

Par ailleurs, une étude précédente avait permis à l'équipe d'identifier par criblage in silico une molécule, appelée SR4321, inhibant l'interaction VEGF/VEGFR1 avec une affinité forte ($IC_{50} = 17,4 \mu M$). Cette molécule se fixe, selon la modélisation moléculaire, sur une zone proche de celle qui est en interaction avec l'hélice α 1 du VEGF. Nous avons conçu des peptides incorporant les motifs de cette molécule en divisant cette dernière en deux parties : une partie thiophène remplaçant la **Met** et une autre partie benzyléthylamine couplée sur la chaîne latérale de la **Gln**. Trois peptides (**29-31**) ont été préparés avec cette modification.

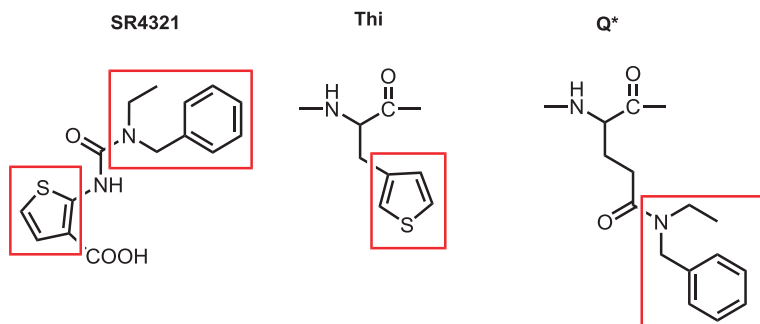


Figure 60. Molécule SR4321 et groupements (**Thi** et **Q***) mimant les deux parties de SR4321.

Puis, ces peptides ont été aussi évalués par le test ELISA du laboratoire en les comparant avec le peptide **22**. Les résultats ont montré que les modifications de la Y25 avec des résidus plus hydrophobes n'ont pas permis de gagner de l'affinité (peptide **26-28**). La modification avec le groupement thiophène seul (peptide **29**) ou avec la benzyléthylamine seule (peptide **30**) n'a pas permis d'améliorer l'affinité. Cependant, le peptide **31** avec les deux modifications possède une meilleure affinité.

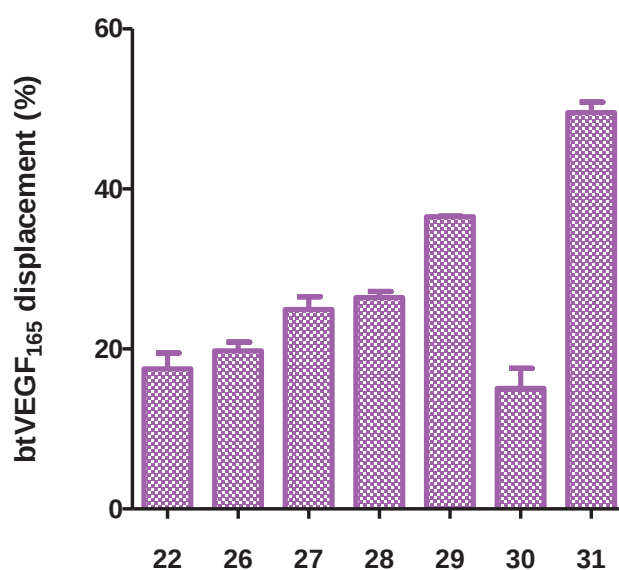


Figure 61. Capacité de déplacer le btVEGF₁₆₅ dans l'interaction avec le VEGFR1 ECD par les peptides **26-31** à 100 μ M en comparant avec le peptide de référence **22**.

L'optimisation de séquence n'avait pas donné les résultats attendus, nous supposons qu'une séquence courte ne se structure pas toute seule en hélice, nous nous orientons donc vers la stabilisation de la conformation en hélice α .

4.3 Étude de stabilisation de la conformation en hélice de peptides mimant l'hélice- α 1 du VEGF-A

4.3.1 Conception de peptides monocyclique et bicyclique

Le grand problème des inhibiteurs mimant l'hélice α est que le peptide préparé ne forme pas la structure en hélice désirée en solution. Les peptides mimant l'hélice- α 1 du VEGF-A décrits dans la partie précédente étaient des séquences linéaires. Dans la séquence naturelle de l'hélice- α 1 (**KFM****D****VYQRSY**), il y a deux résidus (**D19** et **R23**), en position i et $i + 4$, qui pourraient avoir une interaction par leurs chaînes latérales pour stabiliser l'hélice α . Mais cette interaction est facilement dissociée en solution aqueuse. Le but de cette partie est de chercher une méthode générale de stabilisation de la conformation en hélice en nous basant sur la séquence de l'hélice- α 1 du VEGF.

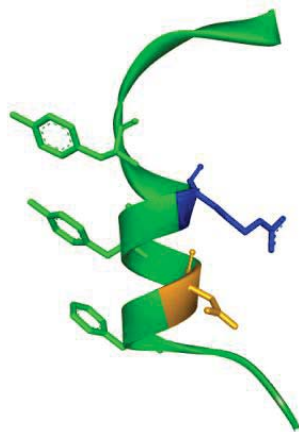


Figure 62. Structure de l'hélice- α 1 du VEGF.

Dans les études de Pérez de Vega, un peptide a déjà été synthétisé en remplaçant les résidus **D19** et **R23** par un Glu et une Lys, puis cyclisé par les chaînes latérales de ces deux résidus pour stabiliser la conformation hélice α du peptide. Ce peptide a été décrit pour avoir une meilleure affinité en déplaçant l'interaction VEGF/VEGFR1¹⁶¹. Cette méthode de cyclisation des chaînes latérales était connue pour stabiliser les hélices α .

D'autres types de cyclisation ont également été développés, notamment l'étude de Verdine sur une méthode utilisant un linker de type alcène pour stabiliser les hélices α ²⁰⁷. Ils ont travaillé depuis des années sur la méthode de stabilisation d'hélice α par introduction de chaîne sur les carbone α puis cyclisation par métathèse des chaînes latérales des résidus i et $i + 4$ ou i et $i + 7$ ^{116,117}. Puis ils ont développé un type de peptide bicyclique avec un cycle entre les résidus $i / i + 4$, et un autre cycle entre $i + 4 / i + 7$ ou $i + 4 / i + 10$. Ces peptides bicycliques avaient une structure encore plus contrainte et favorable en hélice α .

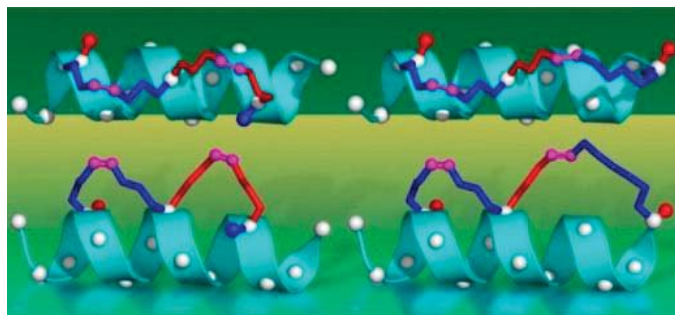


Figure 63. Stratégie de bicyclisation par métathèse sur carbone- α des résidus i et $i + 4$, $i + 4$ et $i + 7$ / $i + 10$ pour stabiliser une hélice α ²⁰⁷.

De plus, dans une des études de Heinis, ils ont utilisé des acides aspartiques modifiés sur la chaîne latérale avec deux fonctions thiols, afin de synthétiser des peptides bicycliques par deux liaisons disulfures. Le but de leurs travaux était de remplacer deux **Cys** dans la séquence des peptides par un de ces acides aspartiques modifiés afin de former un nouveau peptide bicyclique²⁰⁸.

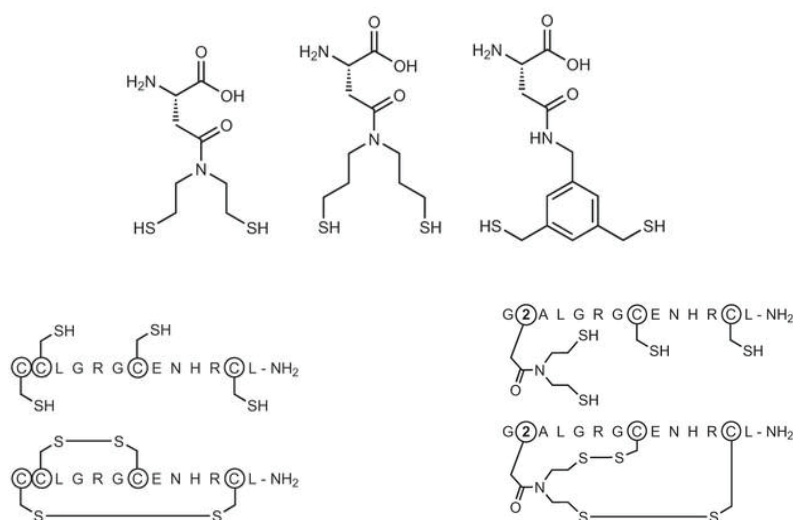


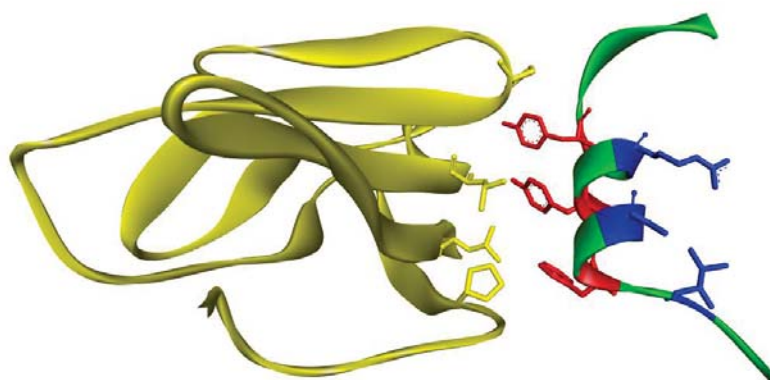
Figure 64. Stratégie de remplacement de deux **Cys** de la séquence par un acide aminé modifié avec deux fonctions thiols afin d'avoir un nouveau peptide bicyclique²⁰⁸.

²⁰⁷ Hilinski GJ, Kim YW, Hong J, et al. *J Am Chem Soc.* **2014**, 136, 12314-12322

²⁰⁸ Chen S, Gopalakrishnan R, Schaer T, et al. *Nat Chem.* **2014**, 6, 1009-1016

Ces études nous ont donné une idée pour utiliser ces acides aspartiques modifiés ou même des acides glutamiques modifiés dans un peptide de l'hélice $\alpha 1$ pour stabiliser sa structure secondaire.

Pour concevoir ce peptide bicyclique, nous avons observé l'hélice $\alpha 1$ du VEGF en interaction avec le VEGFR1-D2 à l'aide du logiciel Discovery Studio (**Figure 65**). Trois résidus aromatiques (en rouge) étaient en interaction avec le VEGFR1-D2. Cependant, trois résidus (**V15**, **D19** et **R23**, en bleu) étaient du côté opposé, et n'avaient donc pas d'interaction directe avec le récepteur. Nous pouvions ainsi les remplacer par d'autres résidus sans prendre de grands risques. L'idée du peptide bicyclique était de mettre un acide aspartique modifié ou glutamique modifié portant deux fonctions thiols à la place du résidu **D19** et de remplacer la **V15** et la **R23** par deux **Cys**. Puis la cyclisation entre les chaînes latérales à la fin conduit au peptide bicyclique. Nous espérons que ce type de peptide contraint bicyclique pourrait stabiliser la structure en hélice α .



¹³EVVKFMDVYQRSYCH²⁷

Figure 65. L'hélice $\alpha 1$ du VEGF dans l'interaction avec le VEGFR1 D2. Les « hotspots » sont en rouge, les résidus proposés pour être remplacés pour effectuer une bicyclisation sont en bleu.

En même temps, nous avons aussi envisagé de préparer des acides aspartiques modifiés ou des acides glutamiques modifiés avec une seule fonction thiol et remplacer **V15** ou **R23** par une **Cys** afin d'avoir un peptide monocyclique (si jamais le bicyclique se révélait trop rigide).

4.3.2 Synthèse des acides aspartiques modifiés

Pour les premières études, nous avons d'abord synthétisé 3 acides aminés en modifiant le Fmoc-Asp-OH.

Les deux amines : bis((2-(triphenylmethyl)sulfanyl)ethyl))amine et bis((3-(triphenylmethyl)sulfanyl)propyl))amine ont été synthétisées par une substitution nucléophile du bis(2-chloroéthyl)amine ou bis(2-chloropropyl)amine par le triphenylméthanethiol. Puis, elles ont été couplées avec le Fmoc-Asp-O-Allyl sur la chaîne latérale, sur la fonction acide libre de la chaîne latérale. Enfin, la fonction acide de la chaîne principale a été libérée par déprotection du groupement O-Allyl afin de pouvoir les utiliser dans la synthèse de peptide sur support solide (**schéma 7**).

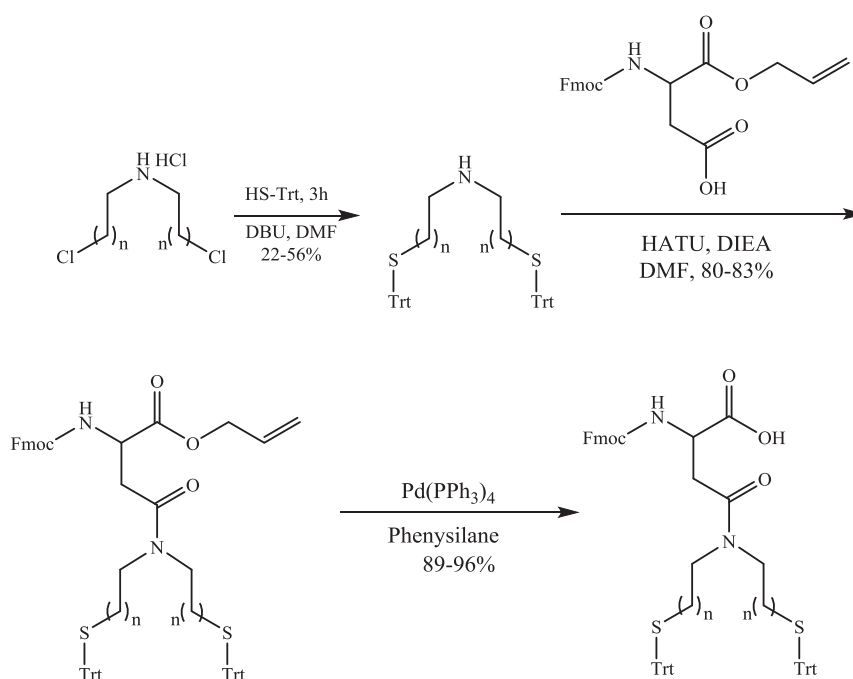


Schéma 7. Synthèse de Fmoc-Asp-OH et Fmoc-Glu-OH modifiés avec deux fonctions thiols.

L'acide aminé modifié **134** a été synthétisé pour avoir un peptide stabilisé avec un monocycle. La 2-(triphénylméthyl)sulfanyléthylamine a été formée par substitution entre la 2-mercaptoéthylamine et le chlorure de trityle.

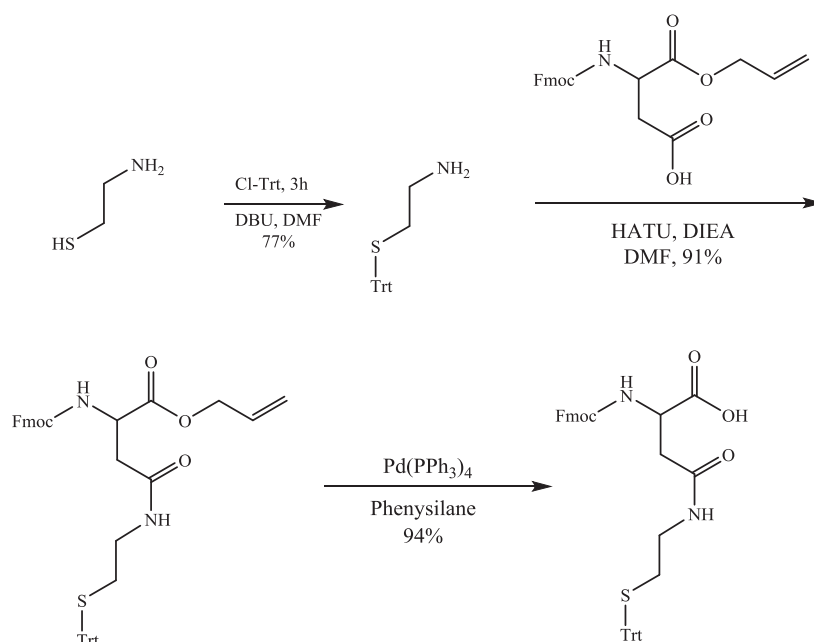


Schéma 8. Synthèse de Fmoc-Asp-OH **134** modifié avec une fonction thiol.

Enfin, ces 3 acides aminés ont été obtenus avec les rendements indiqués dans la figure 66.

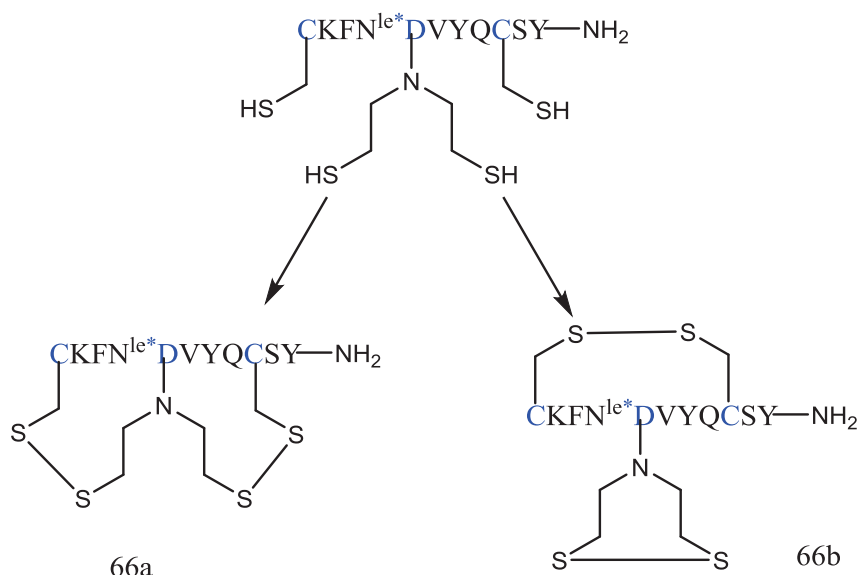
114 , Rdm : 41.4%	134 , Rdm : 65.3%	124 , Rdm : 16.8%

Figure 66. 3 Fmoc-Asp-OH (***D**) modifiés avec le rendement total de la synthèse.

4.3.3 Synthèse, étude structurale et évaluation biologique de peptides bicycliques et monocycliques

Pour cette série de peptides, la séquence a été choisie de V16 à Y25 (${}_{16}\text{VKFMDVYQRSY}_{25}$), et la M19 était remplacée par une Nle (norleucine) pour éviter l'oxydation, dans les peptides bicycliques : $[\text{CKFN}^{\text{le}*}\text{DVYQC}]\text{SY}$. Pour le peptide monocyclique, nous avons décidé de le cycliser en N-terminal : $[\text{CKFN}^{\text{le}*}\text{D}]\text{VYQRSY}$.

La synthèse de ces peptides linéaires a été réalisée par SPPS, la cyclisation a été réalisée en solution par oxydation à l'air. Le premier peptide de cette série était le peptide bicyclique **66** avec le composé **114**. Ce peptide linéaire a été bien obtenu par SPPS avec la résine Rink MBHA, il a été clivé de la résine et purifié par HPLC semi préparative. Ensuite, la cyclisation pouvait former deux peptides bicycliques différents **66a** et **66b**, ce dernier étant normalement moins stable.



Après la cyclisation, selon l'analyse par HPLC, un seul produit était obtenu à la fin, puis la spectrométrie de masse a montré que ce produit était le peptide bicyclique soit **66a** soit **66b** (car sa masse molaire était moins 4 par rapport au peptide linéaire). Selon les études de Heinis, ils ont obtenu les deux isomères après la cyclisation. Les sites de cyclisations ont été déterminés par clivage du peptide par la trypsine, qui pouvait cliver la liaison peptidique spécifiquement au niveau des résidus basiques tels **Arg** ou **Lys**.

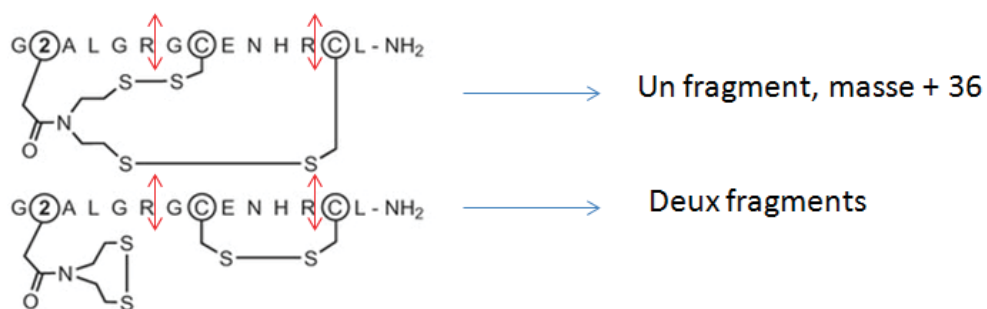


Schéma 10. Trypsine clivage détermine la conformation de peptide bicyclique²⁰⁸.

Dans notre cas, cette enzyme n'aurait pas permis la différenciation **66a/66b** car le clivage par la trypsine aurait donné la même masse.

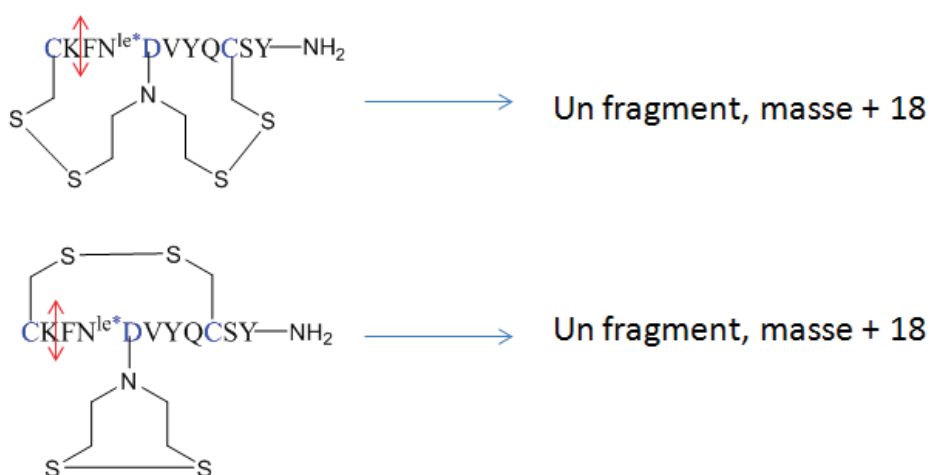


Schéma 11. Proposition de clivage par la trypsine pour déterminer la structure des peptides **66a** et **66b**.

Nous avons donc choisi une autre enzyme, la chymotrypsine, qui est capable de cliver spécifiquement la liaison peptidique après un résidu hydrophobe aromatique.

66a et **66b** ont 3 résidus hydrophobes, le test de clivage avec la chymotrypsine permet de confirmer la structure de ce peptide bicyclique. Enfin, selon l'analyse par spectrométrie de masse après le clivage par la chymotrypsine, deux fragments ont été identifiés : c[CKF...QC]SY-OH (masse calculée : 893 ; masse trouvée : $[M+K]^+$ 932) et N^{le}D*VY (masse calculée : 625 ; masse trouvée : $[M+K]^+$ 664). Aucun fragment avec une masse +36 n'a été observé. Donc, le peptide **66** est le **66b**, qui n'était malheureusement pas le peptide bicyclique désiré.

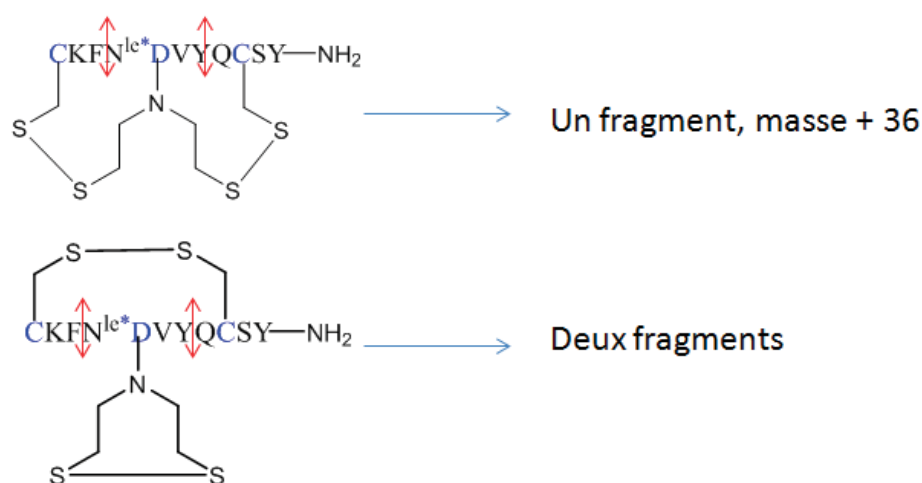
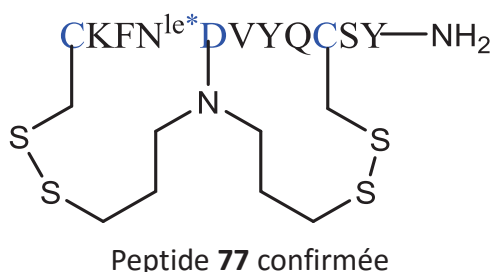


Schéma 12. Clivage par la chymotrypsine pour déterminer la structure des peptides **66a** et **66b**.

De plus, nous avons synthétisé un autre peptide bicyclique **77** avec l'acide aspartique modifié (composé **124**) ayant un CH₂ en plus sur chaque branche de sa chaîne latérale. La cyclisation a conduit à un peptide et celui-ci a aussi été soumis au clivage enzymatique par la chymotrypsine. Un seul produit a été détecté par HPLC après digestion enzymatique et sa masse molaire a bien 36 unités de masse de plus que le peptide cyclique. Ces résultats confirment que ce peptide **77** a bien la structure attendue.



Ce peptide contraint a montré plusieurs effets NOE dans l'étude en RMN. Certains étaient caractéristiques d'une hélice α .

Une étude de modélisation moléculaire a été réalisée par le Dr. Sylvain Broussy au laboratoire avec le logiciel Discovery Studio. Une minimisation d'énergie suivie d'une dynamique moléculaire a été effectuée avec le champ de force CHARMM. Selon la structure prépondérante obtenue au cours de la trajectoire, ce peptide bicyclique **77** a une structure contrainte et la chaîne principale du peptide présente une structure en hélice. Les deux résidus **F17** et **Y21** sont bien situés du même côté, mais pas la **Y25**.

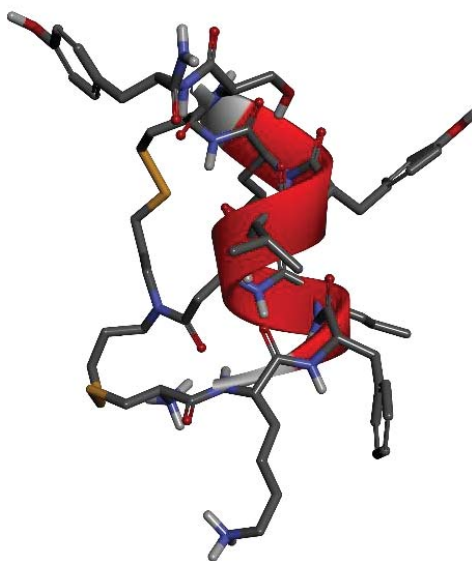
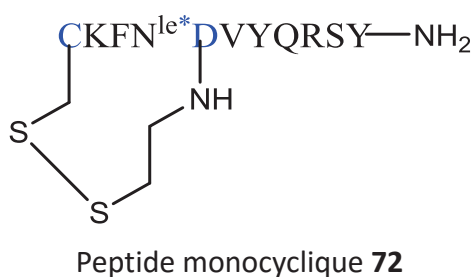


Figure 67. Structure obtenue d'après la modélisation moléculaire du peptide **77**.

En même temps, un peptide monocyclique **72** a été synthétisé avec le composé **134**.



Puis, ces deux peptides ont été étudiés par dichroïsme circulaire en les comparant avec un peptide linéaire (**22** : **KFMDVYQRSY-NH₂**). Le peptide monocyclique **72** présente une structure plus favorable en hélice α . Le peptide bicyclique est contraint et plus structuré que le peptide **22**, mais moins favorable en hélice α par rapport au peptide **72** (Figure 68).

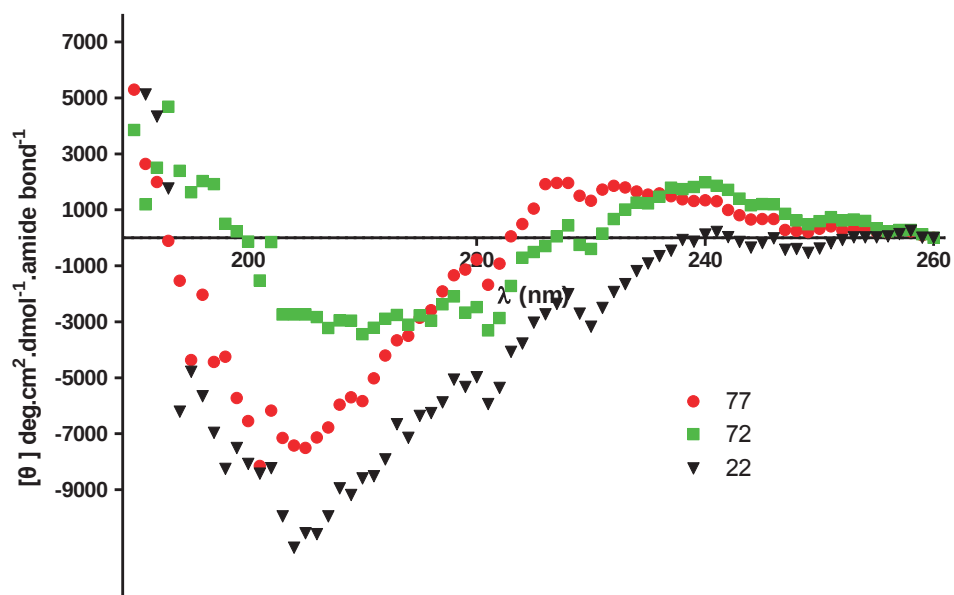


Figure 68. Analyse par dichroïsme circulaire des peptides **72** et **77** en les comparants avec le peptide **22** sans modification.

Enfin, cette série de peptides **66**, **72** et **77** ont été testés par le test ELISA du laboratoire. Le peptide monocyclique **72** a une meilleure affinité ($IC_{50} = 21 \mu M$) dans ce test de déplacement. La cyclisation entre **Cys** et **Asp** modifié en N-terminal induit une augmentation de la structure en hélice pour le peptide **72**. Le peptide bicyclique **77** était moins actif ($IC_{50} = 170 \mu M$) peut-être dû à sa structure très rigide. L'observation d'effet NOE par RMN peut être dû à la structure contrainte de bicyclisation du peptide **77**. Pourtant, le CD a montré qu'il était moins structuré en hélice α que le peptide **72**. En plus, la modélisation moléculaire a montré que la **Y25** n'était pas du même côté que les deux autres résidus aromatiques. Le peptide **66** n'avait pas la cyclisation désirée, mais il avait aussi une affinité importante ($IC_{50} = 67 \mu M$). La cyclisation intramoléculaire du résidu aspartique modifié a formé un cycle hydrophobe, qui pourrait également avoir des interactions avec le récepteur.

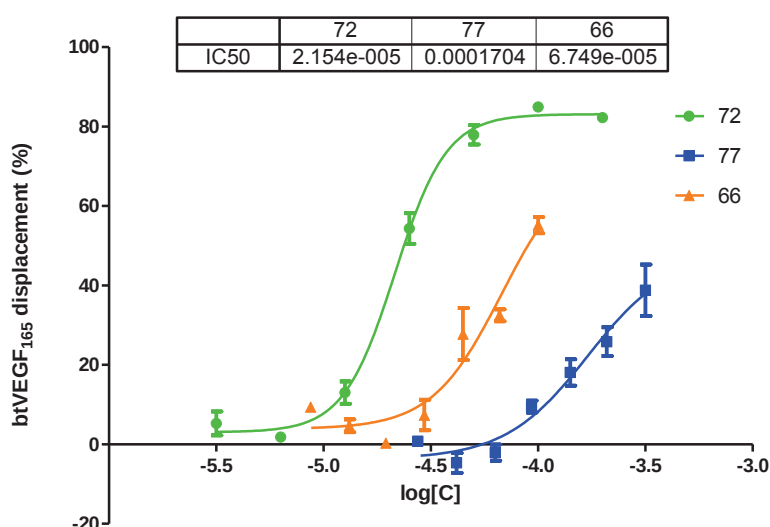


Figure 69. Détermination des IC_{50} pour les peptides **66**, **72** et **77** par le test de déplacement.

Un autre peptide (**145**) bicyclique avec un Fmoc-Glu-OH modifié a été synthétisé pour augmenter la taille des deux cycles. Ce peptide a une affinité similaire à celle du peptide **77** (32% de déplacement à $100 \mu M$). Puis, nous avons aussi remplacé la **V15** par une homo **Cys** pour avoir un cycle plus grand que le peptide monocyclique (**144**) avec l'acide aminé **134**, il a aussi une bonne affinité dans le test de déplacement (67% de déplacement à $100 \mu M$).

En effet, cette stratégie de stabilisation d'hélice α par monocyclisation ou bicyclisation, peut être appliquée dans les autres études de développement d'inhibiteurs peptidiques mimes d'hélice α . Elle est différente de la stratégie de bicyclisation de Verdine. Le partage de la chaîne latérale de **Asp** ou **Glu** pour les deux cycles entraîne une structure extrêmement contrainte. Nous devrions augmenter la taille de cycle pour éviter de former un bicycle trop rigide. Plus de travaux sont nécessaire pour compléter cette étude. En plus, utilisation de la molécule de Heinis avec deux fonctions thiols sur le benzène²⁰⁸ dans la chaîne latérale sera aussi intéressante.

V. Développement d'antagonistes peptidiques par approche combinée

Dans les parties précédentes, nous avons étudié séparément des peptides qui miment les sites d'interaction du VEGF avec le VEGFR1. Les peptides modifiés en C-terminal conçus à partir de la boucle $\beta 3\text{-}\beta 4$ et de l'hélice $\alpha 1$ se révèlent capables de se fixer sur le VEGFR1 D2 avec une affinité faible (K_d environ 200 μM pour un des peptides les plus actifs) afin de bloquer l'interaction VEGF/VEGFR, et d'inhiber l'angiogenèse (Chapitre 3, partie II). Les études du développement d'antagonistes peptidiques selon l'interaction de différents ligands avec le VEGFR1 ont identifié des peptides mimant L1. Ces peptides qui interagissent avec le domaine D3 du VEGFR induisent une inhibition importante de l'interaction VEGF/VEGFR et de l'angiogenèse (Chapitre 3, partie III). Les études de la stabilisation d'hélice α des peptides mimant l'hélice $\alpha 1$ du VEGF ont montré que l'activité de ces peptides était liée à leur conformation (Chapitre 3, partie IV). De plus, nous avons également préparé des peptides en associant ces différents sites d'interaction.

La boucle $\beta 3\text{-}\beta 4$ et l'hélice $\alpha 1$ du même monomère de VEGF sont très proches. Il est donc envisageable de lier la boucle $\beta 3\text{-}\beta 4$ en C-terminal et l'hélice $\alpha 1$ avec un linker. Par ailleurs, la distance entre les positions C-terminales des deux hélices $\alpha 1$ des deux monomères du VEGF est environ de 20 Å. Chaque branche a une interaction importante avec le VEGFR1 D2. Nous avons donc également envisagé de lier les deux hélices $\alpha 1$ avec un linker pour créer un peptide dimère dans le but d'inhiber l'interaction VEGF/VEGFR et d'étudier son effet.

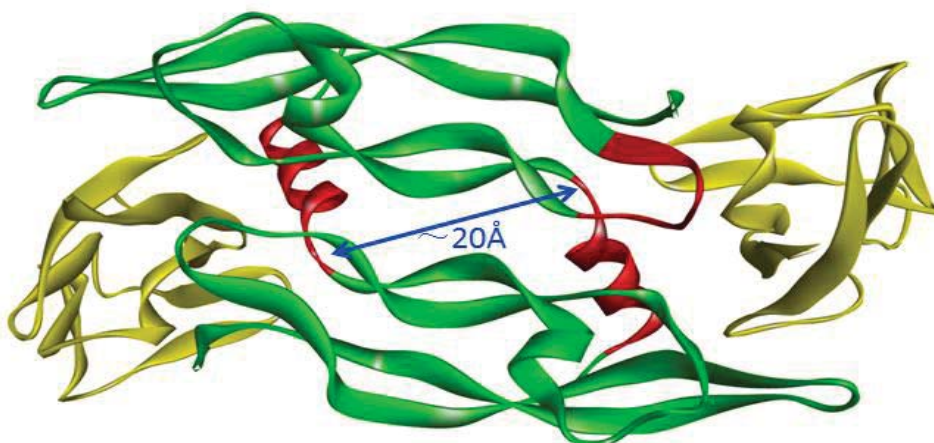
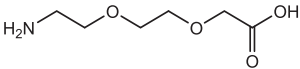


Figure 70. La boucle $\beta 3\text{-}\beta 4$ et l'hélice $\alpha 1$ d'un monomère du VEGF sont proches et la distance entre deux branches hélices $\alpha 1$ dans l'interaction VEGF/VEGFR1 D2 est environ de 20 Å.

Ainsi, deux peptides combinés de l'hélice $\alpha 1$ et de la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ avec la séquence naturelle ont été synthétisés en variant le linker : le peptide **33** avec un linker de type Ahx et le peptide **34** avec un linker de type **Pro**. Trois peptides avec deux branches de l'hélice $\alpha 1$ ont aussi été synthétisés en prolongeant en même temps le N-terminal et la chaîne latérale d'une **Lys** : les peptides **35** et **37** avaient une **Lys** mais avec différentes résines pour avoir le C-terminal en amide ou acide ; un linker **PEG** était introduit pour le peptide **36**, non seulement pour prolonger la chaîne mais aussi pour augmenter la solubilité du peptide.

Hélice α + boucle $\beta 3$ - $\beta 4$	33	Ac-KFMDVYQRSY-Ahx-c[CNDEGLEC]-NH ₂	
	34	Ac-KFMDVYQRSY-Pro-c[CNDEGLEC]-NH ₂	
Dimère peptide Hélice α	35	(Ac-KFMDVYQRSY) ₂ =K-NH ₂	
	36	(Ac-KFMDVYQTSY-PEG) ₂ =K-NH ₂	PEG: 
	37	(Ac-KFMDVYQRSY) ₂ =K-OH	

L'évaluation biologique par le test de déplacement a montré que ces peptides n'avaient pas significativement gagné d'activité par rapport aux peptides mimant une branche de l'hélice α . Les peptides **33** et **34** ont leur affinité légèrement augmentée, mais elle reste encore assez faible par rapport aux autres peptides dérivés de l'hélice α_1 modifiés (**66**, **72**) ou les peptides cycliques modifié en C-terminal (**16**, **19**, numéro d'après **Article 1**). Les peptides **35**, **36** et **37**) ne présentent pas une meilleure affinité que le monomère correspondant. Ceci est peut-être dû à un problème de la flexibilité ou de conformation des peptides. Une autre raison pourrait être que dans le test ELISA, les récepteurs étant fixés sur la plaque, ils ne peuvent pas s'approcher pour lier un dimère peptidique, empêchant ainsi ces dimères de bloquer deux récepteurs en même temps dans ce test ELISA.

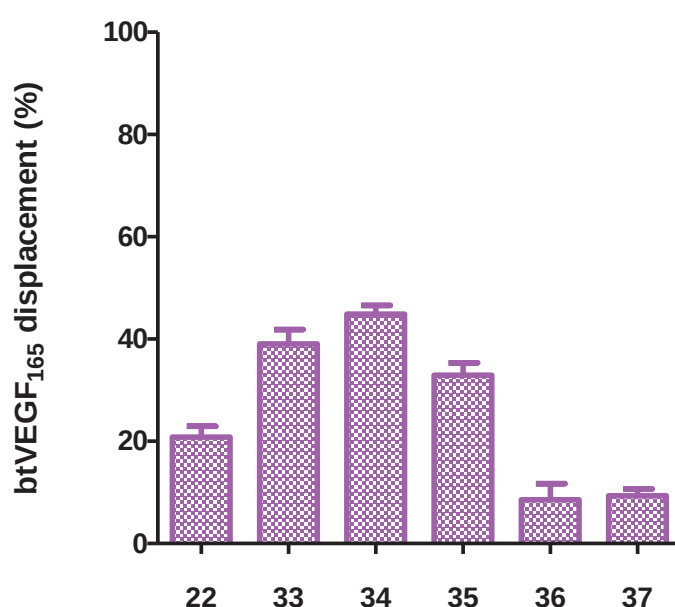


Figure 71. Capacité à déplacer le btVEGF₁₆₅ dans l'interaction avec le VEGFR1 ECD par les peptides **33-37** à 100 μ M, en comparant avec le peptide **22**.

VI. Conclusions

Ces travaux sur le développement d'inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR ciblant le VEGFR par conception rationnelle nous ont permis de développer une petite banque d'antagonistes peptidiques du VEGFR.

Les peptides modifiés en C-terminal étaient basés sur les résultats obtenus précédemment. Une baisse d'activité a été observée pour les deux peptides de référence, re-synthétisés avec une nouvelle voie de synthèse. Cette différence peut être due à des traces de Pd⁽⁰⁾ dans les peptides finaux. Mais ils avaient toujours la capacité d'inhiber l'interaction VEGF/VEGFR. La modification en C-terminal nous a permis d'avoir une série de peptides cycliques. Certains peptides (**15**, **16** et **19**, numéro d'après l'Article 1) modifiés par un groupement hydrophobe aromatique portant des fonctions OH avaient favorisé l'activité. Les études RMN ont confirmé l'interaction du peptide **19** avec le VEGFR1 D2, la constante de dissociation (K_d) a été estimée à 196 μ M. L'effet anti-angiogénique des peptides **16** et **19** a été confirmée par un test d'inhibition de la formation de microtubules dans les cellules HUVE.

D'après les études de conception d'inhibiteurs de différents ligands du VEGFR1, nous avons identifié des peptides (**14**, **18** et **19**, numéro d'après l'Article 3) mimant la boucle L1 de trois ligands (VEGF-A, -B et PlGF) du VEGFR1. Ils ont une capacité à inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1 ainsi que la formation de tubes. Les boucles L1 de ces ligands interagissent normalement avec le domaine D3 du VEGFR. En effet, ces études ont montré aussi l'importance du domaine D3 du VEGFR.

Les études sur la modification et la stabilisation de peptides mimant l'hélice α 1 ont décrit une nouvelle façon de stabiliser l'hélice α . L'utilisation des molécules connues (**114** et **124**) pour synthétiser de nouveaux peptides bicycliques (**66**, **77** et **145**) dans le but de stabiliser une hélice α a été décrite. Finalement, le peptide monocyclique (**72**) possède la meilleure affinité pour inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1. Les études RMN de ce peptide monocyclique avec le VEGFR1 D2 ¹⁵N sont en cours.

Les peptides combinés à partir de différents sites d'interaction n'ont pas abouti à une meilleure affinité.

Enfin, tous les peptides étudiés dans ces travaux enrichissent l'étude de développement d'antagonistes du VEGFR par la conception rationnelle. Certains peptides (**14**, **18**, numéro d'après l'Article 3 et **72**) qui ont une activité anti-angiogénique peuvent constituer un point de départ pour développer un agent thérapeutique anticancéreux.

Chapitre 4 : Développement de peptides macrocycliques

pour favoriser la structuration en hélice α

La stratégie HBS « hydrogen-bond surrogate » (remplacement d'une liaison hydrogène) pour stabiliser hélice α a été introduite dans la partie "Introduction". Ce remplacement de liaison hydrogène par une liaison covalente forme un macrocycle à 13 atomes. Ce type de macrocycle placé en position N-terminale a la capacité d'initier la structuration en hélice de peptides²⁰⁹.

I. Introduction : la stratégie HBS

L'hélice α est une structure secondaire très importante dans les protéines. Elle participe au repliement des protéines, et aussi aux interactions protéine-protéine. Elle est stabilisée par un réseau de liaisons hydrogènes formé entre les résidus i et $i + 4$ (**Schéma 13**). Cependant, l'isolement d'un fragment d'hélice α dans une protéine conduit souvent à une perte de sa conformation. La stabilisation d'hélice α est devenue un sujet intense de recherche en chimie peptidique.

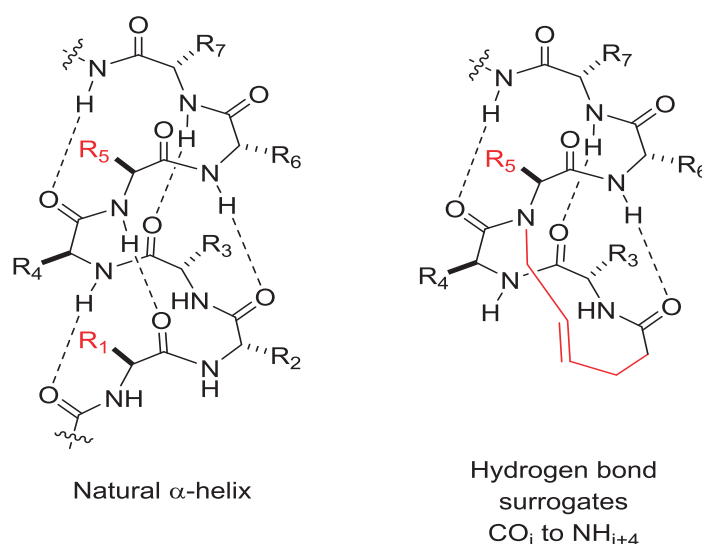


Schéma 13. Liaisons hydrogènes d'hélice α (à gauche) naturelle et stratégie HBS (à droite).

²⁰⁹ Cabezas E, Satterthwait A. C. J. Am. Chem. Soc. **1999**, 121, 3862-3875.

Plusieurs méthodes de stabilisation d'hélice α ont été résumées dans la partie « Introduction ». Ici, nous nous concentrerons sur la stratégie HBS. Cette stratégie avait été initiée par Cabezas et Satterthwait en remplaçant une liaison hydrogène par une liaison covalente de type hydrazone. Ce remplacement de liaison hydrogène conduit à la formation d'un macrocycle à 13 atomes. La synthèse de ce premier peptide macrocyclique nécessitait la synthèse de deux acides aminés modifiés par la synthèse organique. Puis, les auteurs ont synthétisé un peptide avec le macrocycle en position N-terminal et ont comparé sa structure avec le peptide linéaire correspondant. Les études structurales ont montré que le remplacement d'une liaison hydrogène pouvait augmenter la structure en hélice α ²⁰⁹.

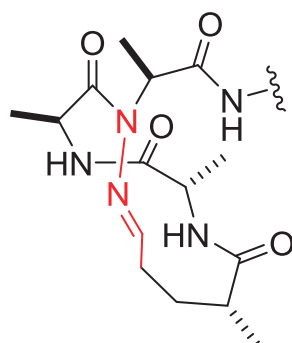


Schéma 14. Un macrocycle à 13 atomes par remplacement d'une liaison hydrogène par une liaison hydrazone²⁰⁹.

En se basant sur cette stratégie, l'équipe d'Arora a largement renforcé le travail sur les peptides macrocycliques à 13 atomes. Plusieurs types de macrocycles ont été développés dans ce but en remplaçant la liaison hydrogène soit par une liaison alcène, une liaison alcane, une liaison thioéther ou une liaison disulfure (**Schéma 15**).

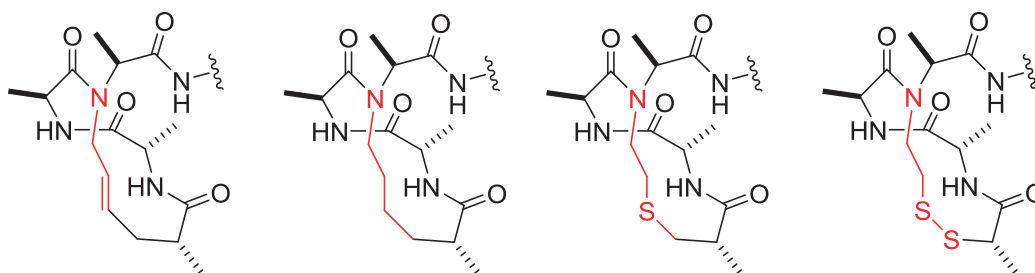


Schéma 15. Différents macrocycles à 13 atomes par remplacement d'une liaison hydrogène par différents liaisons covalentes.

Le premier peptide macrocyclique développé par l'équipe d'Arora était le macrocycle avec une liaison alcène. Ce type de macrocycle a ensuite été très étudié. La synthèse de ce macrocycle était basée sur la métathèse de deux doubles liaisons.

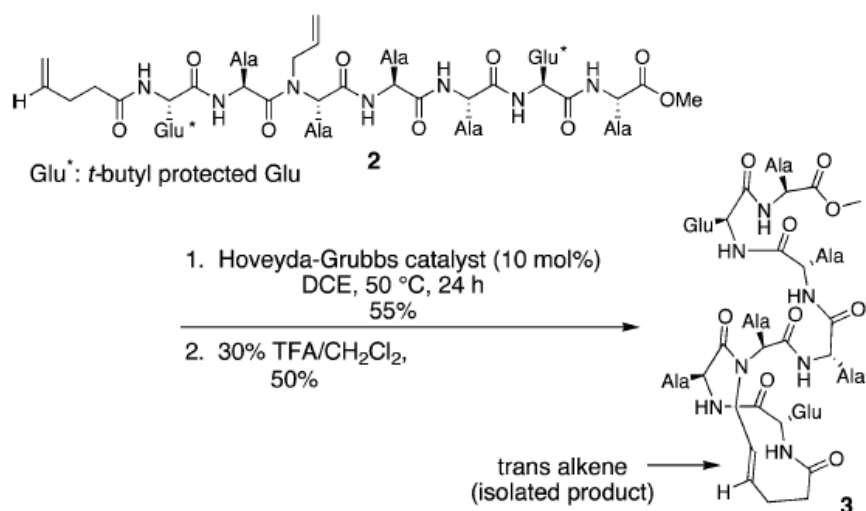


Schéma 16. Synthèse d'un peptide avec un macrocycle HBS en remplaçant une liaison hydrogène par une liaison alcène²¹⁰.

Dans un premier temps, des études structurales par RMN et CD ont été réalisées en comparant un peptide modèle linéaire avec son analogue comportant un macrocycle²¹⁰. Ce macrocycle a la capacité de stabiliser une structure d'hélice α pour le peptide modèle selon les études structurales. Puis, un autre peptide avec ce macrocycle a été cristallisé pour l'analyse de la structure. La cristallographie de ce peptide a montré une structure stable en hélice α ²¹¹.

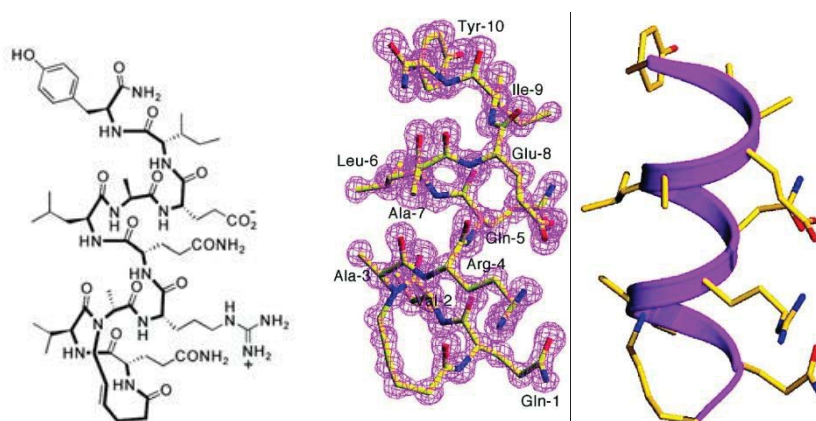


Figure 72. Cristallographie d'un peptide avec un macrocycle HBS en remplaçant une liaison hydrogène par une liaison alcène²¹¹.

²¹⁰ Chapman RN, Dimartino G, Arora PS. *J Am Chem Soc.* **2004**, 126, 12252-12253

²¹¹ Liu J, Wang D, Zheng Q, et al. *J Am Chem Soc.* **2008**, 130, 4334-4337

D'autres travaux ont été réalisés par la suite par l'équipe d'Arora pour l'optimisation de la synthèse des macrocycles^{212,213,214} et l'application de ces macrocycles dans les peptides avec fonction biologique^{215,216}. Enfin, une voie de synthèse sur support solide a été développée pour la synthèse de peptides avec macrocycles²⁰⁶. Cette méthode a permis de faciliter la synthèse de peptides possédant des fonctions biologiques.

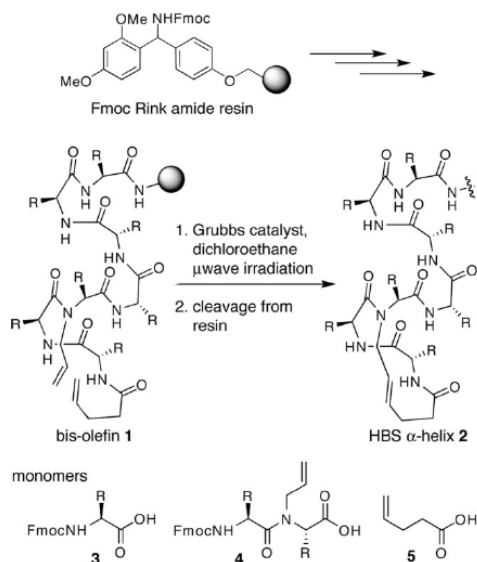


Schéma 17. Synthèse sur phase solide de peptide avec un macrocycle HBS en remplaçant une liaison hydrogène par une liaison alcène.²⁰⁶

Une étude sur l'inhibition de l'interaction entre HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) et un co-activateur de transcription (CBP/p300) par des peptides en hélice stabilisés par ce macrocycle a été réalisée²¹⁷. Un fragment en hélice de HIF-1 α a des interactions importantes avec le co-activateur p300²¹⁸. L'étude a montré l'activité des peptides à inhiber cette interaction en comparant les peptides avec macrocycle et un peptide linéaire.

Selon les résultats obtenus par les auteurs, les trois peptides comportant le macrocycle ont une structure en hélice favorable par rapport au peptide linéaire. Certains ont une meilleure affinité que le peptide linéaire²¹⁸.

Ac-TAADCEYNAR-NH ₂
c[XTA*A]DCEYNA-NH ₂
c[XTA*A]DCEYNAR-NH ₂
c[XTA*A]DREYNAR-NH ₂

²¹² Chapman RN, Arora PS. *Org Lett.* **2006**, 8, 5825-5828

²¹³ Dimartino G, Wang D, Chapman RN, et al. *Org Lett.* **2005**, 7, 2389-2392

²¹⁴ Patgiri A, Witten MR, Arora PS. *Org Biomol Chem.* **2010**, 8, 1773-1776

²¹⁵ Wang D, Chen K, Kulp III JL et al. *J Am Chem Soc.* **2006**, 128, 9248-9256

²¹⁶ Patgiri A, Jochim AL, Arora PS. *Acc Chem Res.* **2008**, 41, 1289-1300

²¹⁷ Henchey LK, Kushal S, Dubey R, et al. *J Am Chem Soc.* **2010**, 132, 941-943

²¹⁸ Dames SA, Martinez-Yamout M, De Guzman RN, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**, 99, 5271-5276

D'autres macrocycles ont été également développés et étudiés. Le peptide avec le macrocycle thioéther (teHBS α -helix) a également montré une structure en hélice²¹⁹.

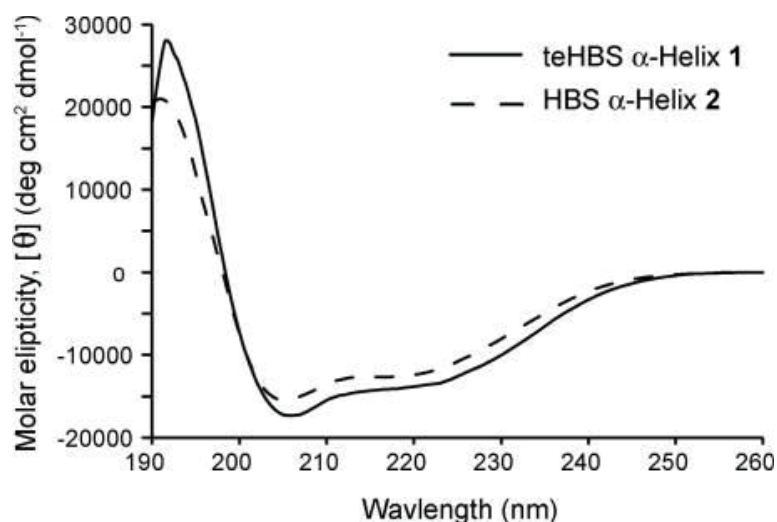


Figure 73. Spectres dichroïsme circulaire pour comparer la structure d'un peptide avec l'approche thioéther HBS (teHBS, numéro 1) et alcène HBS (numéro 2)²¹⁹.

Un autre macrocycle à 13 atomes récemment développé par l'équipe d'Arora était basé sur une liaison disulfure, nommé « dsHBS α -helix »²²⁰. Ce macrocycle a permis aussi de stabiliser l'hélice α comme les autres macrocycles. La cyclisation à la fin était réalisée par l'oxydation de deux groupements thiols²²¹.

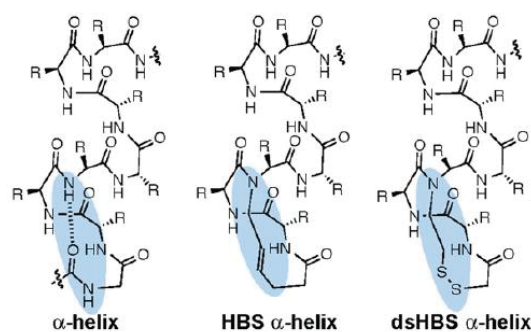


Figure 74. Comparaison de dsHBS macrocycle avec HBS macrocycle et le coude α naturel²²¹.

Un remplacement de la liaison hydrogène par une liaison alcane ou alcène a été aussi étudié²²². Dans cette étude, les auteurs ont essayé d'augmenter la taille du macrocycle de 13 atomes à 14 atomes. Cependant, les peptides avec un macrocycle à 14 atomes ont montré une structure moins favorable en hélice α que les peptides à 13 atomes.

²¹⁹ Mahon AB, Arora PS. *Chem Commun (Camb)*. 2012, 48, 1416-1418

²²⁰ Miller SE, Kallenbach NR, Arora PS. *Tetrahedron*. 2012, 68, 4434-4437

²²¹ Miller SE, Watkins AM, Kallenbach NR, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014, 111, 6636-6641

²²² Wang D, Chen K, Dimartino G, et al. *Org Biomol Chem*. 2006, 4, 4074-4081

L'équipe d'Alewood a développé un autre macrocycle à 13 atomes dans le même but de stabilisation des hélices α ²²³. Ce macrocycle peut être inséré en N-terminal ou au milieu du peptide.

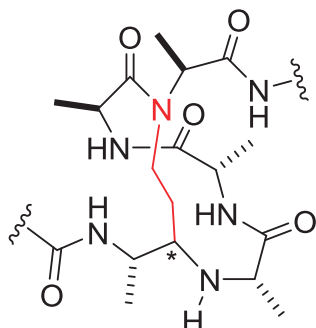


Schéma 18. Un macrocycle à 13 atomes en remplaçant d'une liaison hydrogène par une liaison alcane²²³.

Les études structurales ont confirmé que ce macrocycle seul était structuré en un coude α .

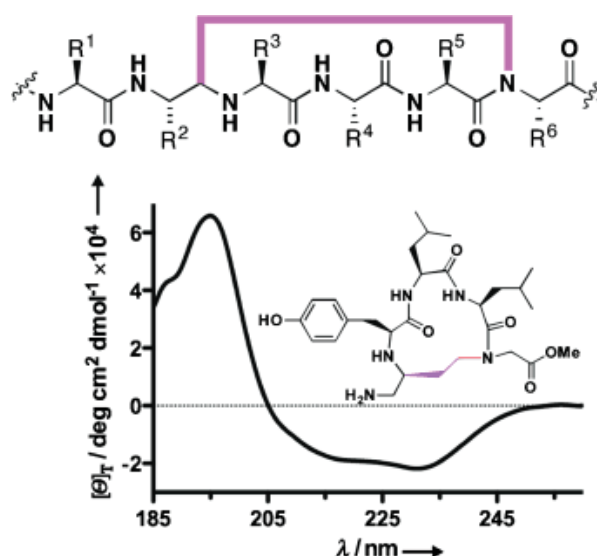


Figure 75. Stratégie de remplacement d'une liaison hydrogène par une liaison alcane pour stabiliser l'hélice α et un spectre de dichroïsme circulaire d'un macrocycle de ce type²²³.

De plus, ce macrocycle possédait une fonction acide en C-terminal et une fonction amine en N-terminal. Il était donc développé comme un « Building block » qui pouvait être inséré dans des peptides plus longs. La synthèse de ce « Building block » a été effectuée en solution. L'étape de cyclisation a provoqué la formation de deux macrocycles diastéréoisomères.

²²³ Vernall AJ, Cassidy P, Alewood PF. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2009**, 48, 5675-5678

Ce macrocycle a ensuite été inséré dans un peptide biologiquement actif, en le comparant avec le peptide de séquence naturelle, la Galanin (Gal)₁₋₁₆. Ce peptide linéaire avait une structure en hélice α corrélée avec son activité biologique^{224,225}. Deux peptides ont été synthétisés, avec les deux diastéréoisomères macrocycliques. Les deux peptides incorporant ces macrocycles avaient effectivement une structure en hélice α favorisée par rapport au peptide linéaire. Le macrocycle possédant un lien de configuration (S) était plus favorable. En revanche, les deux peptides contenant le macrocycle avaient une activité biologique moins bonne que le peptide linéaire.

Cette stratégie HBS pour stabiliser les structures secondaires en hélices α est donc efficace. De plus, elle a permis dans beaucoup d'exemples d'augmenter l'activité biologique des peptides ainsi modifiés, par rapport aux peptides contrôles. Elle est en passe de devenir une stratégie très importante dans le développement de médicaments basés sur les peptides, notamment dans le développement rationnel d'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine.

²²⁴ Morris MB, Ralston GB, Biden TJ, et al. *Biochemistry*. **1995**, 34, 4538-4545.

²²⁵ Wiczak W, Rekowski P, Kupryszewski G, et al. *Biophys Chem*. **1996**, 58, 303-312

II. Conception de nouveaux macrocycles de type HBS

Les macrocycles développés par l'équipe d'Arora et l'équipe d'Alewood ont tous utilisé des acides aminés modifiés. Le macrocycle d'Alewood était synthétisé en phase liquide. Nous proposons de développer un autre macrocycle en utilisant uniquement des acides aminés naturels. Un linker alkyle introduit entre l'amine du résidu *i* et l'amine du résidu *i* + 3 forme un macrocycle à 13 atomes. Nous avons proposé de synthétiser ce macrocycle avec une voie de synthèse sur phase solide avec des acides aminés naturel et des groupements protecteurs usuels.

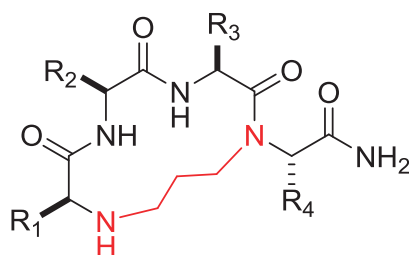


Schéma 19. Un macrocycle à 13 atomes en conception par remplacer d'une liaison hydrogène par une liaison alkyle.

Cette chaîne alkyle introduite sera liée à l'amine secondaire d'un acide aminé protégé en phase solide. Selon la recherche bibliographique, la réaction de Fukuyama-Mitsunobu induit une réaction de substitution nucléophile sur un alcool à l'aide d'un composé azo et d'une phosphine²²⁶. La réaction permet de sélectivement substituer le proton N-terminal qui est activé (c'est-à-dire rendu plus acide) par un groupement nitrobenzènesulfonyle (*o*- et *p*-nitrobenzènesulfonyle)^{227,228}. Les acides aminés avec amine libre sont facilement couplés avec les chlorures d'*o*- et *p*-nitrobenzènesulfonyle. Puis, ces groupements peuvent être sélectivement enlevés par une substitution nucléophile aromatique avec un thiophénol par exemple²²⁹ ou un thiol aliphatique. En conséquent, nous proposons d'introduire le linker alkyle par une réaction de Fukuyama-Mitsunobu avec du 1,3-propanediol et un acide aminé protégé par le *o*-nitrobenzènesulfonyle (*o*-Ns) sur phase solide.

²²⁶ Mitsunobu O. *Synthesis* **1981**,1, 1-28

²²⁷ Miller SC, Scanlan TS. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2301-2302

²²⁸ Miller SC, Scanlan TS. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 2690-2691

²²⁹ Fukuyama T, Jow C-K, Cheung M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6373-6374.

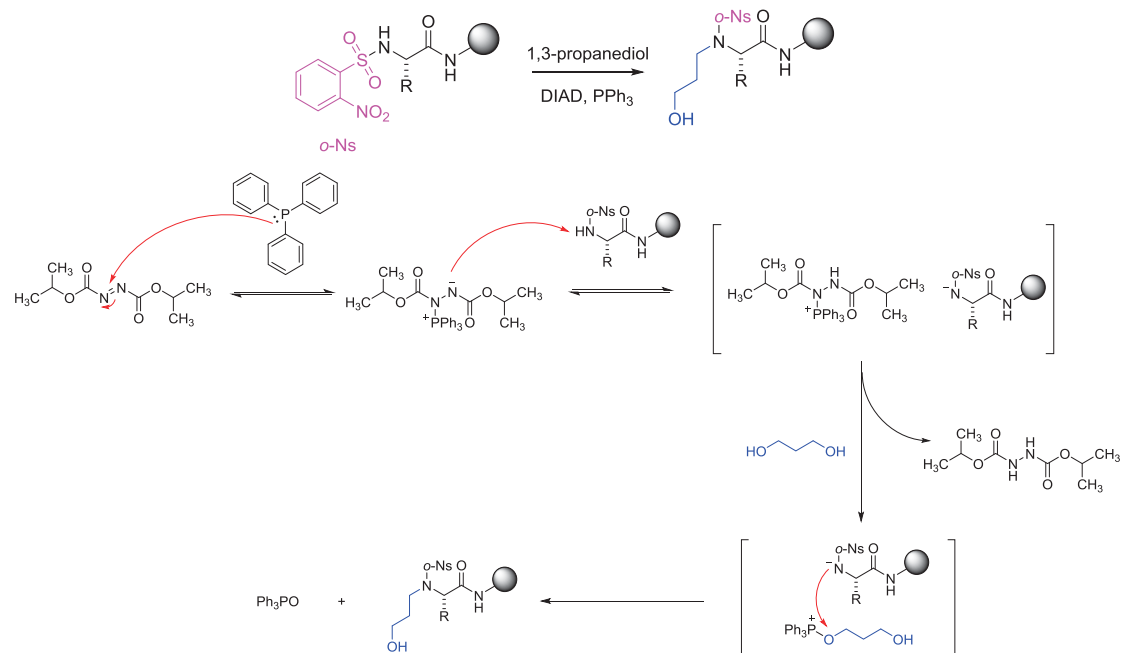


Schéma 20. Réaction de Fukuyama-Mitsunobu sur la résine avec 1,3-propanediol pour introduire le linker.

Après la déprotection du groupement *o*-Ns, la synthèse de peptide linéaire suit le protocole classique de synthèse de peptide sur phase solide (SPPS). La cyclisation à la fin sera une étape clé de la synthèse. Nous avons donc proposé deux façons de cyclisation pour la formation de macrocycle à la fin :

- Cyclisation par la réaction Fukuyama Mitsunobu intramoléculaire.

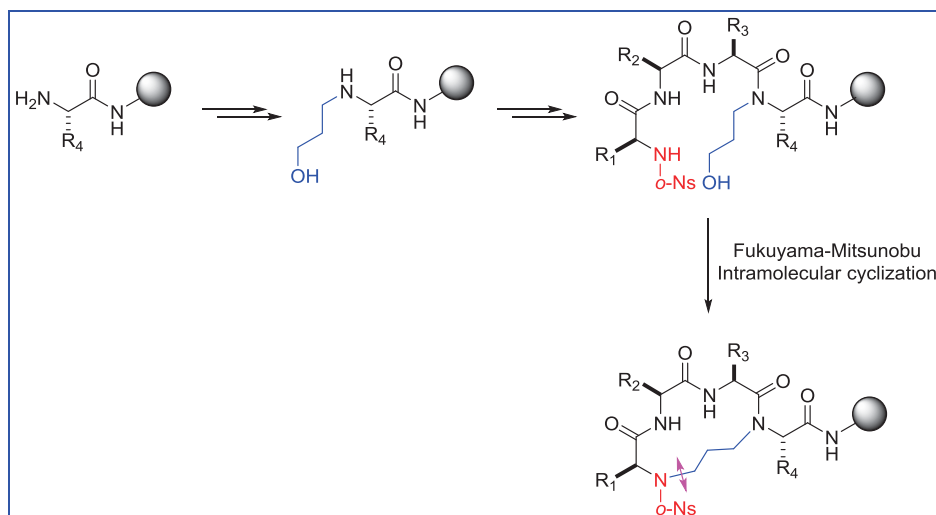


Schéma 21. Première voie de synthèse proposée.

- Cyclisation par un couplage peptidique intramoléculaire.

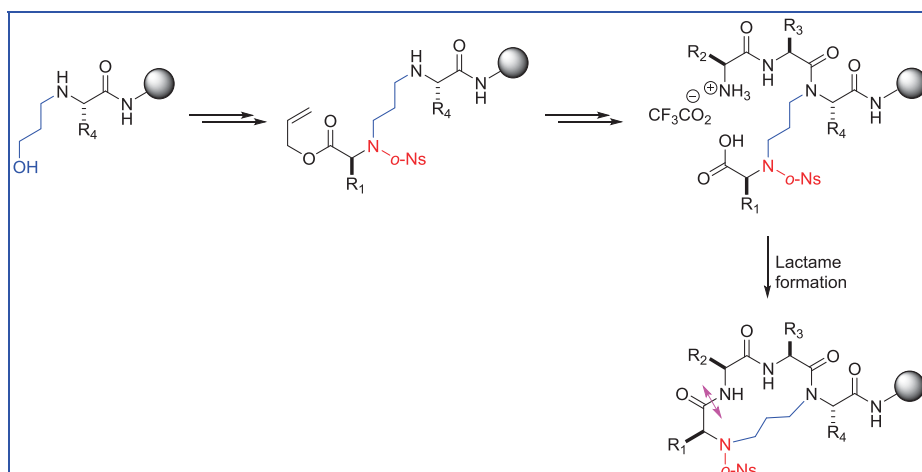


Schéma 22. Deuxième voie de synthèse proposée.

Les objectifs du travail sont :

- Le développement d'une voie de synthèse de macrocycles suivant les critères énoncés ci-dessus (sur support solide et avec des acides aminés facilement accessibles).
- L'étude structurale des peptides macrocycliques (par dichroïsme circulaire et RMN, aidé par de la modélisation moléculaire).
- L'application de ces macrocycles dans un peptide fonctionnalisé, avec évaluation d'une activité biologique.

III. Synthèse de nouveaux macrocycles de type HBS

Les deux voies de synthèse envisagées ci-dessus pour la construction du macrocycle emploient la réaction de Fukuyama-Mitsunobu. Pour la première voie de synthèse, cette réaction permet d'introduire le linker et de cycliser le peptide.

3.1 Première voie de synthèse (échec)

3.1.1 Synthèse d'acides aminés protégés avec un *o*-nitrobenzènesulfonyl en N-terminal

Pour la synthèse des premiers peptides macrocycliques, nous avons utilisé des acides aminés possédant des chaînes latérales non-fonctionnalisées pour faciliter l'étude. Nous avons donc utilisé l'alanine et la glycine. Les acides aminés *o*-Ns-Ala-OH et *o*-Ns-Gly-OH requis ont été préparés suivant la réaction ci-dessous, par substitution nucléophile sur le *o*-Ns-Cl en condition basique (**Schéma 23**).

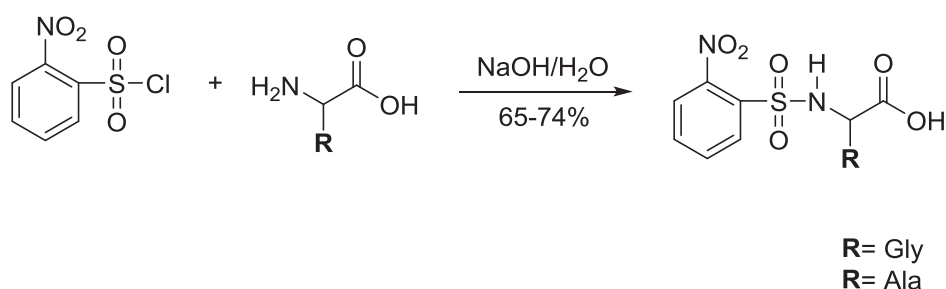


Schéma 23. Synthèse des acides aminés protégés par *o*-Ns.

L'acide aminé protégé peut être précipité après acidification de la solution et isolé par filtration.

3.1.2 Tentative de synthèse de macrocycles sur phase solide

Le premier macrocycle a été proposé avec une séquence : c[GAGA*]. Le premier acide aminé *o*-Ns-Ala-OH a été couplé sur la résine Rink amide MBHA par un couplage peptidique. Ensuite, la synthèse a suivi la voie proposée ci-dessous (Schéma 24).

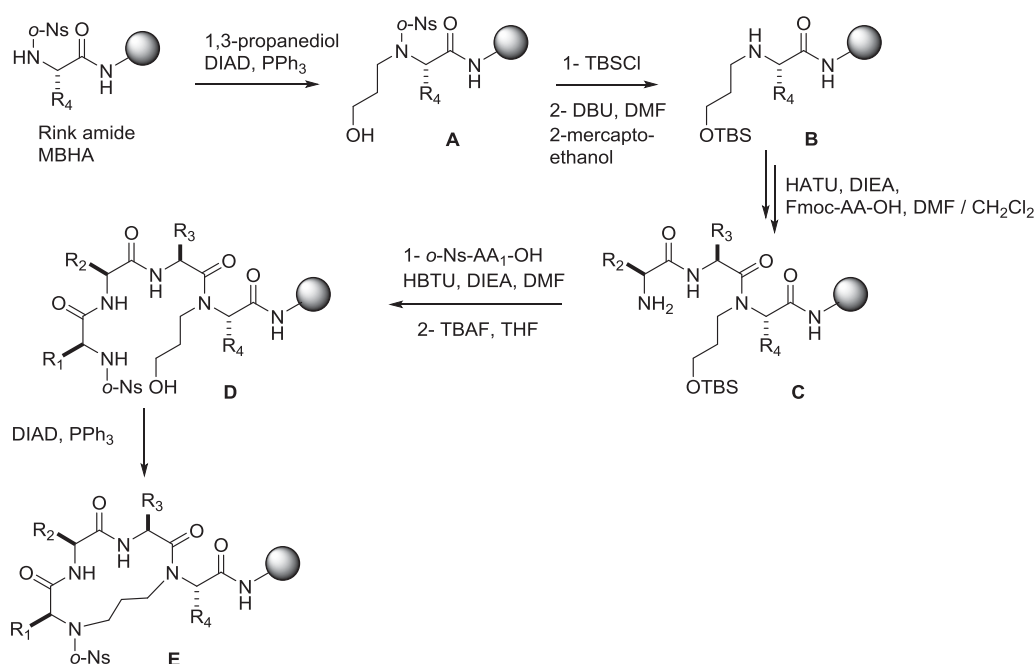
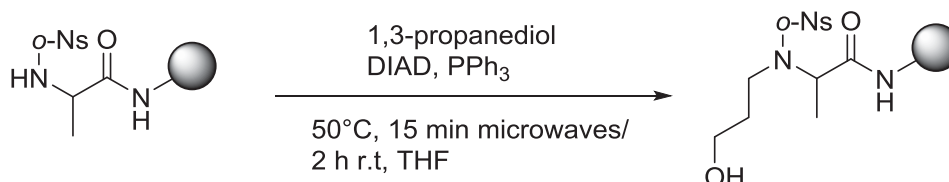
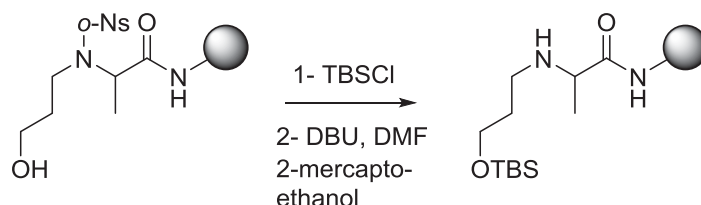


Schéma 24. Première voie de synthèse proposée pour la synthèse de macrocycle conçu.

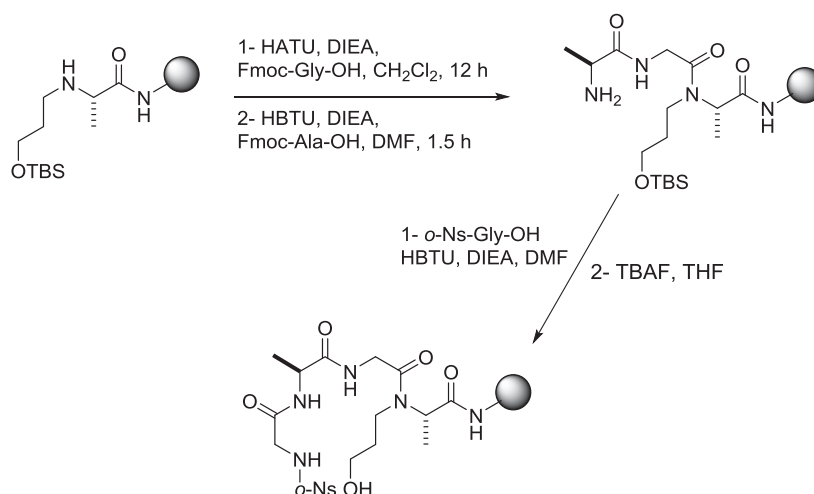
La première réaction Fukuyama-Mitsunobu a été réalisée sur la phase solide avec un excès de 1,3-propanediol pour éviter la réaction de polymérisation entre l'alcool libre du produit final avec la fonction amine d'un autre produit départ. Cette réaction pouvait être réalisée à température ambiante pendant 2 h. La réaction pouvait aussi être effectuée plus rapidement sous irradiation micro-onde en chauffant à 50 °C.



La fonction alcool de la chaîne introduite peut entraîner des réactions secondaires pendant la synthèse de la suite. Nous l'avons donc protégée avec un groupement *tert*-Butyldimethylsilyl (TBS) qui est stable en condition basique et peut être déprotégé sélectivement par le tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF) avant la cyclisation²³⁰. Après la protection du groupement alcool, la fonction amine a été libérée par la déprotection du groupement *o*-Ns en condition basique (1,8-Diazabicycloundec-7-ene, DBU) avec le 2-mercaptoéthanol.



Puis trois couplages peptidiques, dont deux avec Fmoc-Gly-OH et Fmoc-Ala-OH et un avec *o*-Ns-Gly-OH, ont produit le peptide linéaire sur la résine. Le premier couplage avec Fmoc-Gly-OH sur l'amine secondaire était similaire aux couplages requis dans les voies de synthèse de macrocycles d'Arora²¹². Ce couplage était décrit comme un couplage difficile. Nous avons essayé différents agents de couplage comme HBTU/DIEA et HATU/DIEA dans du DMF ou du CH₂Cl₂. Nous avons trouvé qu'il était préférable d'utiliser le CH₂Cl₂ comme solvant, avec le système HATU/DIEA comme agent de couplage. Les chaînes latérales des acides aminés impliqués ont une grande influence sur la vitesse de la réaction. Ce couplage difficile a été plus étudié dans la prochaine partie. Enfin, après la déprotection du groupement TBS, la fonction alcool de la chaîne introduite a été libérée.



²³⁰ Corey EJ, Snider BB. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 6190-6192

A notre connaissance, la cyclisation intramoléculaire par la réaction de Fukuyama-Mitsunobu d'un peptide macrocyclique à 13 atomes n'était pas décrite dans la littérature. Après plusieurs essais de cyclisation par la réaction de Fukuyama-Mitsunobu sur phase solide, nous n'avons pas obtenu le macrocycle désiré. De plus, après la réaction de Fukuyama-Mitsunobu, le clivage des peptides a montré plusieurs petits pics en HPLC analytique. Le peptide linéaire a été complètement consommé au cours de la réaction. Nous avons trouvé une explication possible dans des études ultérieures : le macrocycle formé avec le groupement o-Ns n'est pas stable dans des conditions de type acide fort. Par conséquent, même si la cyclisation sur phase solide par la réaction de Fukuyama-Mitsunobu a fonctionné, le macrocycle a pu être dégradé pendant le clivage. Nous avons également clivé le peptide linéaire de la résine et essayé la cyclisation en solution. Malheureusement, le macrocycle n'a pas pu être obtenu non plus. De façon encourageante, certains oligomères ont été détectés par HPLC et spectroscopie de masse.

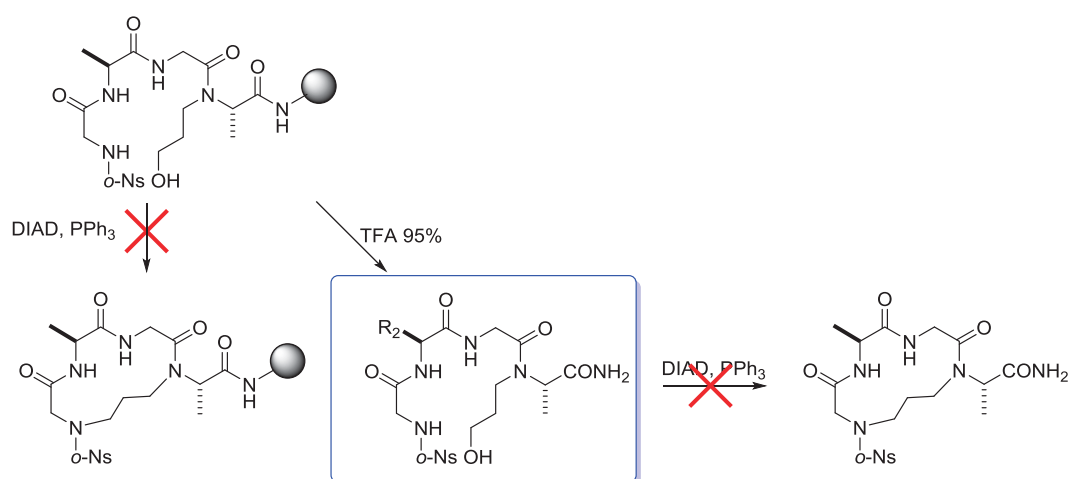


Schéma 25. Essai de la cyclisation sur la résine et en solution.

En conclusion, la synthèse de ce macrocycle avec cette première voie de synthèse a échoué. Cependant, la première réaction de Fukuyama-Mitsunobu a permis d'introduire le linker sur support solide. De plus, le couplage difficile sur l'amine secondaire a été faisable avec les conditions optimisées. Enfin, les essais de cyclisation en solution ayant permis d'obtenir des oligomères, ceci signifie que la réactivité de la réaction de Fukuyama-Mitsunobu est suffisante, mais peut-être que la conformation du peptide a empêché la cyclisation souhaitée.

3.2 Deuxième voie de synthèse

La deuxième voie de synthèse utilise aussi deux réactions de Fukuyama-Mitsunobu. Une première pour l'introduction de la chaîne alkyle et une deuxième avec un acide aminé protégé par le groupement *o*-Ns en N-terminal et un groupement O-Allyl en C-terminal. On suppose que la réaction de Fukuyama-Mitsunobu peut être réalisée entre le *o*-Ns-AA-O-Allyl et la deuxième fonction alcool de la chaîne. La cyclisation sera effectuée par la formation d'une liaison peptidique par un agent de couplage. La voie de synthèse proposée est donnée **Schéma 26**.

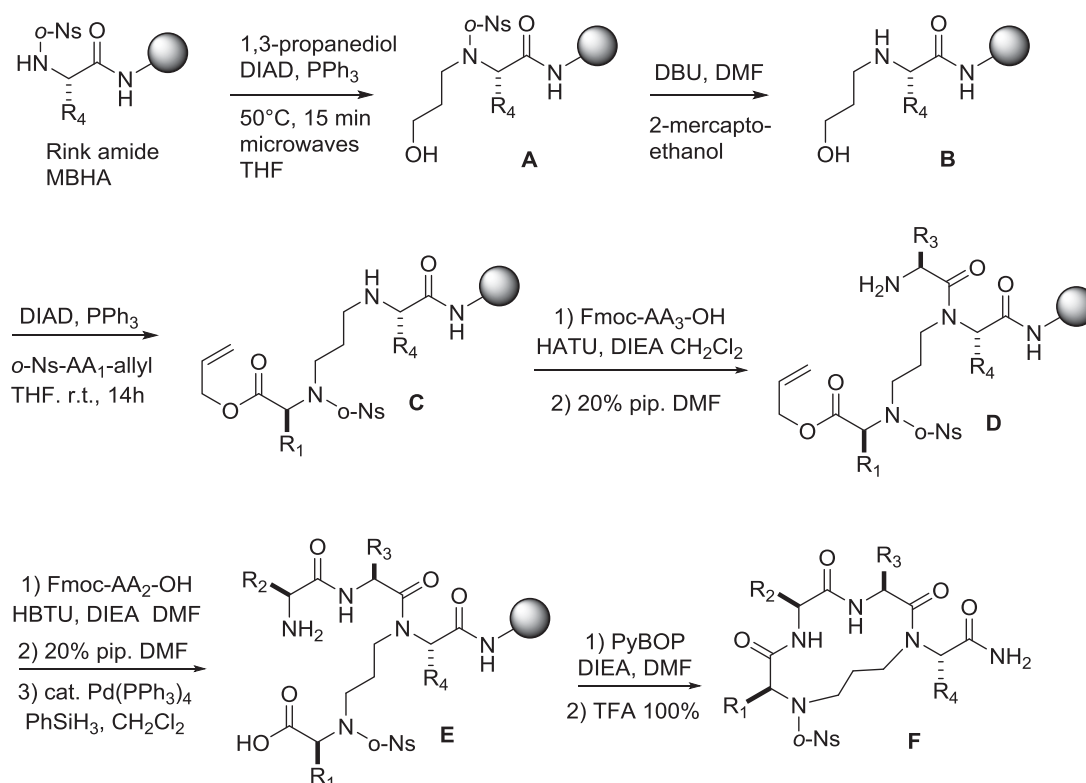


Schéma 26. Deuxième voie de synthèse proposée pour la synthèse de macrocycle.

3.2.1 Synthèse d'acides aminés protégés par *o*-Ns et OAllyl

La synthèse de *o*-Ns-AA-O-Allyl est une estérification entre le *o*-Ns-AA-OH et l'alcool allylique. Elle est réalisée avec l'agent de couplage 1,1'-Carbonyldiimidazole (CDI) dans le THF (**Schéma 27**).

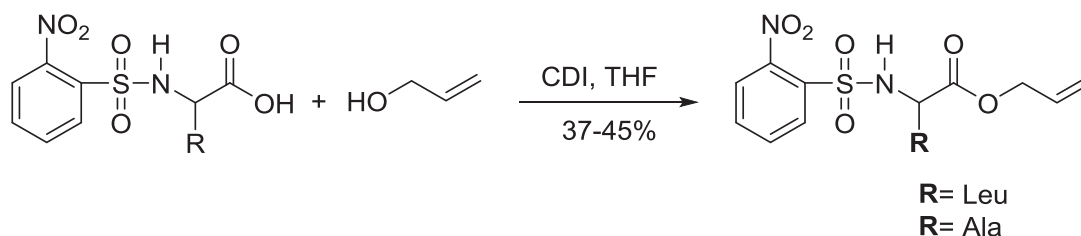
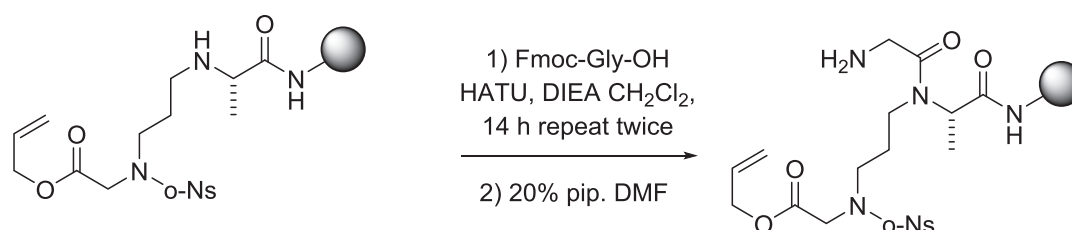


Schéma 27. Synthèse des acides aminés protégés par *o*-Ns et OAllyl.

3.2.2 Synthèse du macrocycle

Nous avons effectué la synthèse d'un premier peptide macrocyclique c[**GAGA***] avec cette deuxième voie de synthèse. L'introduction de la chaîne alkyle est effectuée de la même manière que pour la première voie de synthèse. Après la déprotection du groupement *o*-Ns, la deuxième réaction Fukuyama-Mitsunobu a permis de coupler le *o*-Ns-Gly-Oallyl sur la chaîne alkyle. Cependant, l'introduction du *o*-Ns-Gly-Oallyl sur la chaîne alkyle a rendu le couplage difficile avec l'amine secondaire (encore plus lent et difficile). Nous avons dû répéter deux fois le couplage avec la Fmoc-Gly-OH sur l'amine secondaire pendant 14h.



Ensuite, après un autre couplage avec la Fmoc-Ala-OH, nous avons obtenu le peptide linéaire sur la résine. Le groupement Fmoc a été déprotégé par 20 % de pipéridine et le groupement allyl a été enlevé sélectivement par le Tetrakis (triphenylphosphine)-palladium(0). Sans connaissance préalable de la stabilité du macrocycle avec le groupement o-Ns dans l'acide, nous avons essayé la cyclisation sur support solide avec l'agent de couplage PyBOP/DIEA. Malheureusement, nous n'avons pas obtenu le macrocycle par cette cyclisation sur support solide. Enfin, nous avons clivé le peptide linéaire de la résine et essayé la cyclisation en solution. Le macrocycle c[**GAGA***] a été obtenu par cette cyclisation en solution.

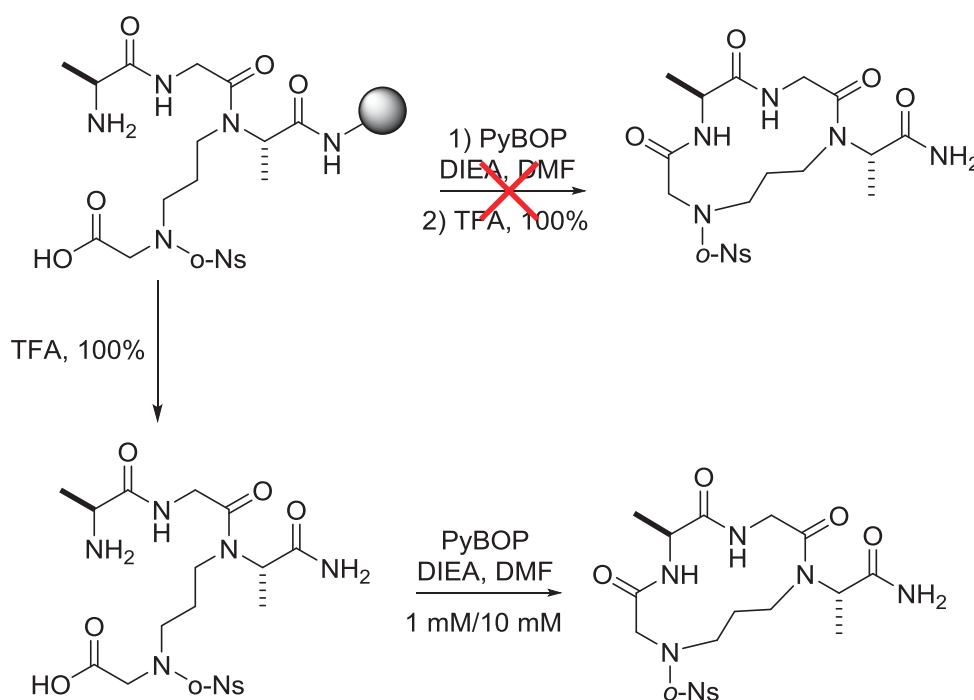


Schéma 28. Essai de la cyclisation sur la résine (échec) et en solution (réussi).

Le suivi de la réaction a été effectué par HPLC analytique. Le groupement o-Ns avec une forte absorption UV à 254 nm a aussi servi à faciliter le suivi de la réaction. Enfin, le peptide linéaire clivé et purifié a été analysé par HPLC analytique, spectroscopie de masse et RMN. La cyclisation a été réalisée à deux concentrations (1 mM et 10 mM). Un peptide dimère a été observé pendant la cyclisation. Comme attendu, la quantité de dimère formée à 1 mM était moins importante que celle formée à 10 mM.

3.2.3 Conclusions

Le peptide macrocyclique a finalement été obtenu par une voie de synthèse conçue au laboratoire en utilisant deux réactions de Fukuyama-Mitsunobu et des couplages peptidiques. Le groupement *o*-Ns utilisé pour la protection de la position N-terminale des acides aminés était connu en synthèse peptidique^{207,209,231}. Nous n'avons pas enlevé le groupement *o*-Ns parce qu'il facilitait le suivi de la réaction (forte absorption UV). Le macrocycle obtenu a été analysé par spectroscopie de masse et RMN. La cyclisation finale a échoué sur support solide mais a pu être effectuée en solution (**Schéma 29**).

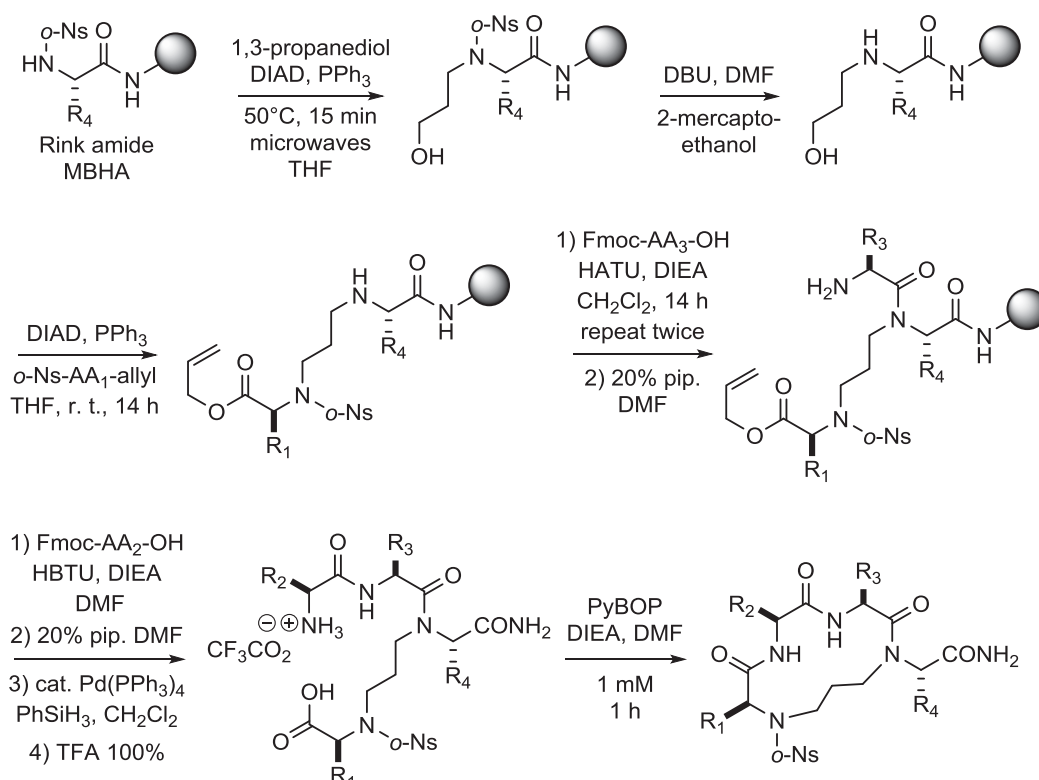


Schéma 29. Voie de la synthèse finale pour le peptide macrocyclique.

²³¹ Isidro-Llobet A, Alvarez M, Albericio F. *Chem Rev.* **2009**, 109, 2455-2504

3.2.4 Article 4

Avec cette voie de synthèse validée, nous avons synthétisé une série de peptides macrocycliques. Ce travail a été publié dans un article :

Article 4 :

- “Solid phase synthesis of constrained 13-membered peptide macrocycles employing Fukuyama–Mitsunobu alkylations.” **Wang L**, Liu WQ, Saraux N, Vidal M, and Broussy S. *Tetrahedron Lett.* 2015, 56, 2456–2459.



Contents lists available at ScienceDirect

Tetrahedron Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tetlet

Solid phase synthesis of constrained 13-membered peptide macrocycles employing Fukuyama–Mitsunobu alkylations

Lei Wang^a, Wang-Qing Liu^a, Noémie Saraux^a, Michel Vidal^{a,b}, Sylvain Broussy^{a,*}^a UMR 8638 CNRS, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie de Paris, Sorbonne Paris Cité, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France^b UF Pharmacocinétique et pharmacochimie, hôpital Cochin, Hôpitaux Universitaires Paris Centre, 27 rue du Faubourg St Jacques, 75014 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2015

Revised 15 March 2015

Accepted 20 March 2015

Available online 26 March 2015

Keywords:

Peptides
Peptidomimetics
Macrocycles
Alkylations

ABSTRACT

Efficient strategies for the solid phase synthesis of constrained macrocyclic peptides are valuable tools for the generation of potentially biologically active compound libraries. In particular, the use of covalent linkers as hydrogen bond surrogates for the initiation and stabilization of α -helical secondary structures, resulting in the formation of a 13-membered macrocycle, is a validated approach. For these purposes, a straightforward synthetic pathway was developed, employing natural amino acids bearing usual protecting groups and mediated through two Fukuyama–Mitsunobu alkylation reactions on unprotected 1,3-propanediol on solid phase. The linear precursors were obtained in good purity and moderate yields, and the final cyclization step was carried out in solution.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Macrocyclic peptides have been the subject of intense research due to their often enhanced affinity, biodisponibility and stability properties compared to their linear precursors.^{1–3} In particular, when constrained in defined secondary structures, they constitute useful tools as biological probes and lead to therapeutics, targeting in particular protein–protein interactions.^{4,5} Replacement of the hydrogen bond existing between residues *i* and *i*+4 of an α -helix by covalent bonds leads to the formation of 13-membered peptidic macrocycles. Such entities were shown to be able to propagate further structuration towards the extended C-terminal end. This strategy was initiated by Cabezas and Satterthwait⁶ and extensively developed by Arora and co-workers,^{7,8} as demonstrated by the synthesis of a variety of α -helical peptides displaying improved biological properties.^{9–11} Efficient solid phase strategies have been developed for the production of these macrocyclic peptides.^{12–15} Alewood and co-workers employed a solution phase strategy relying on a reductive amination reaction to produce 13-membered macrocyclic peptides of structure **A** (Fig. 1).¹⁶

Herein, with the objective to facilitate the production of libraries, a solid phase method for the synthesis of 13-membered macrocyclic peptides of structure **6** (Scheme 1) has been developed. They may serve as α -helix inducers when extended at the C-terminal extremity, or as simple turn mimetics. Ultimately, the

introduction of adequate side chains should produce potentially biologically active compounds.

The Fukuyama–Mitsunobu alkylation is a mild and very efficient procedure for the synthesis of secondary amines.¹⁷ It has been successfully employed on solid phase for the N-alkylation of amino acids, including backbone N-Et scan of Leu-enkephalin,¹⁸ synthesis of N-alkylated cyclic tripeptides,¹⁹ N-alkylation reactions assisted by microwaves,²⁰ and N-alkylation of an ornithine side chain.²¹ The preparation of 13-membered amine bridged macrocyclic enkephalin analogues using N-protected ethanolamine has also been reported.²² We envisioned a resin-supported synthetic strategy towards macrocyclic peptides of structure **6** (Scheme 1), relying on successive Fukuyama–Mitsunobu alkylations, in which 1,3-propanediol would serve as the covalent linker, and employing only α -amino acids. To exemplify our strategy, only amino acids non-functionalized on their side chains were chosen.

Results

Our synthesis started with the reaction of a resin-bound *o*-nitrobenzenesulfonyl (*o*-Ns) protected amino acid with excess unprotected 1,3-propanediol, DIAD (diisopropyl azodicarboxylate) and PPh₃ under controlled microwave irradiation (50 °C, 15 min) or at room temperature (14 h) in anhydrous THF. DIAD was used because it was shown to be superior to DEAD (diethyl azodicarboxylate) on solid phase.²² The desired N-alkylated amino acid **1** was obtained exclusively, as determined by HPLC and mass spectrometry analysis after cleavage of the resin with TFA.²³

* Corresponding author. Tel.: +33 1 53 73 15 64.

E-mail address: sylvain.broussy@parisdescartes.fr (S. Broussy).

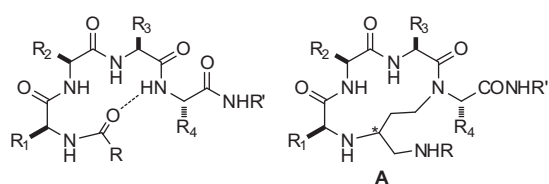
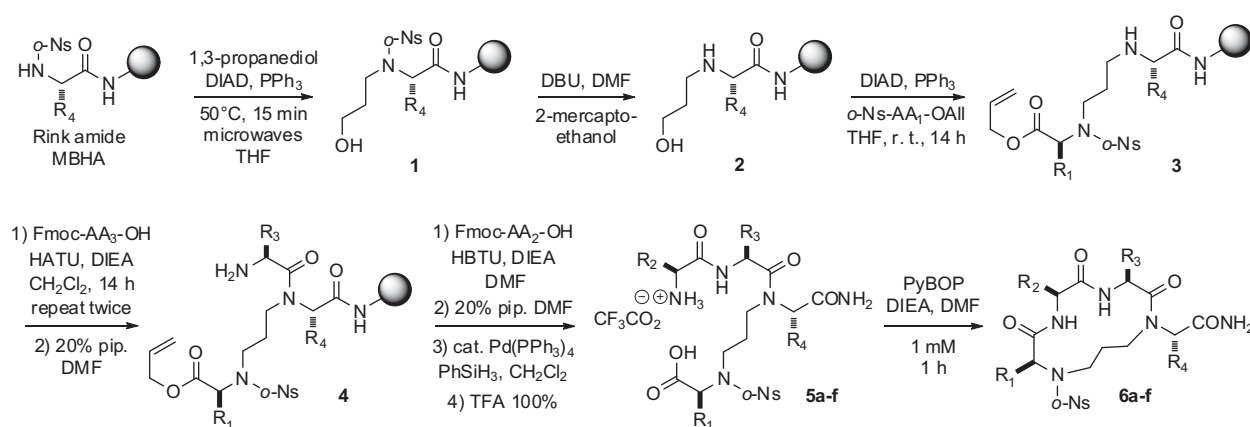


Figure 1. Hydrogen bond pattern of an α -helical turn between residues i and $i+4$ (left), and previously synthesized covalent mimetics **A** (right).¹⁶

Satisfyingly, intermolecular double alkylation was not observed, confirming that the separation of functional groups attached on solid phase (pseudo-dilution) was successfully exploited. Literature data indicate that, in solution phase, as expected, an additional hydroxyl protecting group was required for the synthesis of polyamines with symmetrical diols.²⁴ After o -Ns deprotection under standard conditions,^{25,26} a second Fukuyama–Mitsunobu alkylation on **2** with excess o -Ns/allyl protected amino acid allowed the construction of the diaminopropane motif **3**. We are aware of only one example of this type of ‘reverse’ setup in which the alcohol is bound to the resin and the acidic functional group in excess is in solution,²⁷ although a few intramolecular examples have been reported.²⁸ Because usual side reactions such as dehydration and substitution by deprotonated DIAD happen on the alcohol partner,²⁸ we were pleased to see that the reaction proceeded well. Indeed, cleavage from the resin and HPLC analysis indicated in all cases that the expected product was predominantly or exclusively obtained.

Chain extension to give the N -alkylated peptide of structure **4** is known to be a difficult coupling reaction, highly dependent on the steric bulk of the amino acid side chains.²⁰ The use of the HATU/DIEA system with 5 equiv of Fmoc protected amino acids in CH_2Cl_2 as a solvent gave satisfactory results, leading to full conversion after two 14 h coupling cycles for **4a–d**. However, approximately 30% remaining starting material were observed after three repeated cycles for **4e** and **4f**. Following further chain extension with Fmoc protected amino acids under standard conditions and removal of the Fmoc and allyl groups, the peptides were cleaved from the resin with neat TFA to obtain the linear precursors **5a–f**. Addition of water as a scavenger in the cleavage mixture was deleterious, resulting in the formation of some C-terminal acid contaminating the amide, in agreement with recent literature data.²⁹ Considering the very low yields described in the literature after a second alkylation step on solid-phase for the synthesis of polyamines,²⁷ the high purity of the crude mixtures and the moderate yields obtained after HPLC purification seemed satisfactory (Table 1).

The cyclization of resin-bound **5** was attempted with different solvents (DMF, CH_2Cl_2 and THF) and coupling agents (PyBOP, HATU and DIC). However, as evidenced by HPLC and MALDI mass spectroscopy analysis, only traces of products were obtained, along with dimer and trimer cyclic compounds and other unidentified side products. Fortunately, in solution, the cyclization step proceeded cleanly and in less than one hour with PyBOP/DIEA in DMF to give the desired products **6a–f**. This system gave slightly cleaner HPLC profiles than HATU/DIEA and shorter reaction times



Scheme 1. Synthetic pathway to 13-membered macrocyclic peptides.

Table 1
Outcome of the synthesis of **6a–f**

Sequences	5	6		
	% yields ^a	% from 10 mM of 5 ^b	% from 1 mM of 5 ^b	% yields from 1 mM of 5 ^c
GAGA* a	41 (57:43)	79 (21)	95 (5)	52 (>99:1)
GALA* b	31 (61:39)	26 (56)	69 (27)	42 (br)
GFLA* c	46 (70:30)	45 (53)	74 (19)	41 (br)
LALA* d	24 (57:43)	n.d.	75 (25)	35 (92:8)
LFAL* e	24 (61:39)	75 (24)	95 (<5)	53 (95:5)
LAAL* f	15 (51:49)	84 (8)	86 (<5)	31 (71:29)

X* denotes the N -propyl amino acid X (AA₄).

^a Isolated yields after cleavage from the resin and HPLC purification. The ratios between rotamers are given in parenthesis, as measured by ¹H NMR integration in d_6 -DMSO at 298 K.

^b The % macrocyclic products **6** formed are given as measured by HPLC at 220 nm at the indicated linear precursor **5** concentrations in DMF (% dimer are given in parenthesis; the remaining to 100% corresponds to unidentified products integrated at 220 nm).

^c Isolated yields from 1 mM reactions of **5** after HPLC purification. The ratios of rotamers are given in parenthesis, as measured by ¹H NMR integration in d_6 -DMSO at 298 K. br: broad signals observed in the ¹H NMR spectra due to conformational exchange.

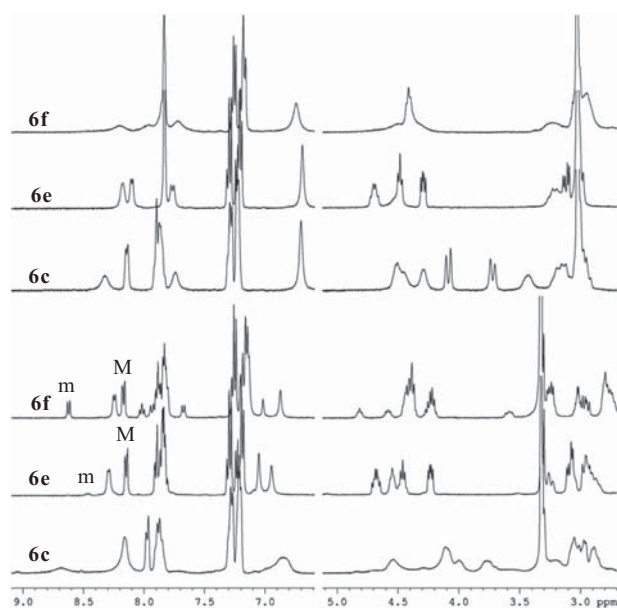


Figure 2. Selected regions from ^1H NMR spectra of compounds **6c**, **6e** and **6f**, recorded in d_6 -DMSO at 348 K (top) and 298 K (bottom). Major (M) and minor (m) o-Ns signals used for the determination of rotamer ratios are indicated.

than DIC/HOBt. As expected, the formation of dimeric products was highly dependent on the concentration of the linear precursor, and was predominant for **6b** and **6c** at 10 mM. At 1 mM, the isolated yields were moderate (Table 1), but high purities were obtained for all compounds. Some acid-catalysed hydrolysis of the C-terminal amide happened for macrocyclic peptides **6** when lyophilized from a 0.1% TFA in water/ CH_3CN solution. Such deamidation in the solid state had been previously observed and the conversion, generally limited to a few percents, corresponded to the amount of residual acid present in the powder.³⁰ Here, this conversion was not negligible, and gave rise to additional characteristic signals in the NMR spectra indicating the presence of an ammonium salt. Therefore, the final purification had to be carried out under neutral conditions, completely suppressing this side reaction.

NMR analysis was complicated by the presence of the *N,N*-disubstituted amide, giving rise to rotamer mixtures. As expected, all linear precursors **5a–f** displayed two sets of signals in their ^1H NMR spectra in d_6 -DMSO at 298 K. The rotamer ratios ranged from 7:3 to about 1:1 (Table 1) and the signals were sharp and well-defined for these linear compounds. However, among the six macrocycles **6a–f**, striking differences were observed. While **6a**, with two glycine residues at positions 1 and 3, apparently exhibited only one set of signals, most protons in **6b** and **6c**, with a single glycine residue at position 1, were broad and split, preventing accurate measurement of the rotamer ratios. These ratios could easily be determined for the three other products **6d–f**. At 348 K, split signals for all compounds had a tendency to collapse towards one set, resulting in a significant sharpening of the spectra of **6b** and **6c**. **6d** and **6e** displayed sharp bands at all temperatures, whereas the signals of **6f** became very broad at 348 K (Fig. 2 and Supporting information).

To completely rule out the occurrence of epimerization, a side reaction that could have happened at several steps of the synthesis, additional 2D ROESY experiments were carried out. They confirmed the presence of rotamers in equilibrium, as evidenced by cross correlation peaks the same phase as the diagonal (see Supporting information). Interestingly, for compound **6a**, the minor rotamer could be easily detected through the presence of

a strong correlation peak on the 2D ROESY spectra, whereas it is virtually invisible on the ^1H NMR spectra. The identification of rotamers based on 1D NOE effects has already been proposed as a useful method,³¹ and is particularly efficient in the present case with 2D experiments. All these NMR observations demonstrate that the conformation of the macrocycle is highly dependent on the nature of the amino acid side chains in DMSO. Further work is in progress for the synthesis of a set of water soluble peptides and their conformational study in aqueous media.

Conclusions

The method described herein constitutes an efficient solid-phase synthesis of macrocyclic peptides of structures **6**. It allows the introduction of a side chain at the *i*+1 position (R_1 , Fig. 1) and the presence of a protected N-terminal secondary amine. Importantly, the use of Fukuyama–Mitsunobu alkylations and peptide coupling reactions under mild conditions makes the method easy to implement and compatible with a number of functional groups. Although our strategy requires the use of an additional protecting group for a carboxylic acid, allyl-protected α -amino acids are either commercially available or easily synthesized, and the deprotection step is well optimized on solid phase and uses only a catalytic amount of palladium. In addition, the exclusive use of natural amino acids with usual protecting groups is suitable for solid phase synthesis, in which excesses of reagents are typically employed. Therefore, the method should prove useful for the synthesis of libraries of macrocyclic peptides. Finally, the cyclization step carried out in solution from the purified linear precursors gives the products with complete conversion and only a small amount of dimeric compounds at 1 mM concentration. Very pure final products are usually obtained, as noticed previously for peptide macrocycle formation in solution.³²

Nevertheless, as described previously, the peptide coupling reaction on *N*-alkylated residues, for the synthesis of **4**, is expected to be difficult with sterically hindered amino acids under standard coupling conditions.²⁰ In addition, we have been unable to achieve the final cyclization step on solid phase with a useful yield. Therefore, the number of subsequent steps that can be done for further peptide elaboration is limited. The optimization of the cyclization step on solid phase is currently underway in our laboratory. The synthesis and conformational study of water-soluble and biologically relevant peptides incorporating the herein described macrocycles in their N-terminal extremity should be greatly facilitated.

Author contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Acknowledgments

Financial support from the University Paris Descartes and the Centre National de la Recherche Scientifique ('Chaire de Partenariat CNRS' to S.B.) is acknowledged. L.W. acknowledges the China Scholarship Council for the donation of a scholarship. This project was also supported by the ANR (project SALSA, ANR2010-BLAN-1533-03).

Supplementary data

Synthetic procedures and spectroscopic characterization of the linear precursors **5a–f** and macrocyclic peptides **6a–f**.

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.03.091>.

References and notes

1. Driggers, E. M.; Hale, S. P.; Lee, J.; Terrett, N. K. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2008**, *7*, 608–624.
2. Marsault, E.; Peterson, M. L. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1961–2004.
3. Frost, J. R.; Smith, J. M.; Fasan, R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23*, 571–580.
4. Azzarito, V.; Long, K.; Murphy, N. S.; Wilson, A. J. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 161–173.
5. Hill, T. A.; Shepherd, N. E.; Diness, F.; Fairlie, D. P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 13020–13041.
6. Cabezas, E.; Satterthwait, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3862–3875.
7. Chapman, R. N.; Dimartino, G.; Arora, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12252–12253.
8. Patgiri, A.; Jochim, A. L.; Arora, P. S. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1289–1300.
9. Kushal, S.; Bullock Lao, B.; Henchey, L. K.; Dubey, R.; Mesallati, H.; Traaseth, N. J.; Olenyuk, B. Z.; Arora, P. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 15602–15607.
10. Wang, D.; Lu, M.; Arora, P. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 1879–1882.
11. Henchey, L. K.; Kushal, S.; Dubey, R.; Chapman, R. N.; Olenyuk, B. Z.; Arora, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 941–943.
12. Dimartino, G.; Wang, D.; Chapman, R. N.; Arora, P. S. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2389–2392.
13. Patgiri, A.; Menzenski, M. Z.; Mahon, A. B.; Arora, P. S. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1857–1865.
14. Mahon, A. B.; Arora, P. S. *Chem. Commun.* **2012**, 1416–1418.
15. Miller, S. E.; Kallenbach, N. R.; Arora, P. S. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4434–4437.
16. Vernall, A. J.; Cassidy, P.; Alewood, P. F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 5675–5678.
17. Fukuyama, T.; Jow, C.-K.; Cheung, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6373–6374.
18. Reichwein, J. F.; Liskamp, R. M. J. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1243–1246.
19. Wels, B.; Kruijtzter, J. A. W.; Liskamp, R. M. J. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2173–2176.
20. Patgiri, A.; Witten, M. R.; Arora, P. S. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1773–1776.
21. Demmer, O.; Dijkgraaf, I.; Schottelius, M.; Wester, H.-J.; Kessler, H. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2015–2018.
22. Rew, Y.; Goodman, M. J. *Org. Chem.* **2002**, *67*, 8820–8826.
23. We observed that under the acidic conditions required for resin cleavage, esterification of the remaining alcohol as a trifluoroacetate ester happened. Although unstable in aqueous solution and regenerating the alcohol in a few hours, the ester could be isolated and characterized in neutral organic solutions.
24. Olsen, C. A.; Jørgensen, M. R.; Witt, M.; Mellor, I. R.; Usherwood, P. N. R.; Jaroszewski, J. W.; Franzyk, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3288–3299.
25. Miller, S. C.; Scanlan, T. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2301–2302.
26. Miller, S. C.; Scanlan, T. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2690–2691.
27. Olsen, C. A.; Witt, M.; Hansen, S. H.; Jaroszewski, J. W.; Franzyk, H. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 6046–6055.
28. Kumara Swamy, K. C.; Bhuvan Kumar, N. N.; Balaraman, E.; Pavan Kumar, K. V. *P. Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551–2651.
29. Samaritoni, J. G.; Copes, A. T.; Crews, D. K.; Glos, C.; Thompson, A. L.; Wilson, C.; O'Donnell, M. J.; Scott, W. L. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3140–3151.
30. Ten Kortenaar, P. B. W.; Hendrix, B. M. M.; Van Nispen, J. W. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *36*, 231–235.
31. Hu, D. X.; Grice, P.; Ley, S. V. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 5198–5202.
32. Malesevic, M.; Strijowski, U.; Bächle, D.; Sewald, N. *J. Biotechnol.* **2004**, *112*, 73–77.

IV. Synthèse de macrocycles hydrosolubles et études structurales

Le but principal de la synthèse de ces peptides macrocycliques est la stabilisation d'hélices α de peptides plus longs. Afin de stabiliser l'hélice α dans des peptides longs, le macrocycle tout seul doit avoir une conformation favorisée par rapport au peptide linéaire. Un tour d'hélice dans un peptide d'hélice α contient au moins 4 résidus, et ces 4 résidus forment une structure coudée, qui est appelée coude α . Dans cette étude, nous avons étudié la conformation d'une série de nos peptides macrocycliques en les comparant avec le coude α idéal. Dans ce but, nous avons synthétisé une autre série de peptides macrocycliques hydrosolubles avec 5 résidus.

4.1 Synthèse de peptides macrocycliques hydrosolubles

Dans la première série de peptides macrocycliques nous avons conservé le groupement *o*-Ns. Ce groupement entraînait une insolubilité des macrocycles en solution aqueuse. Pour étudier la structure des macrocycles en phase aqueuse, on devait donc préparer des macrocycles hydrosolubles. On peut ajouter des acides aminés avec des chaînes latérales fonctionnalisées comme **Lys**, **Arg**, **Glu** pour augmenter la solubilité. Mais l'utilisation de ces acides aminés complique la synthèse.

Concernant la conception du macrocycle, le groupement *o*-Ns n'est pas obligatoire dans le macrocycle final. Donc, nous avons déprotégé le groupement *o*-Ns pour le macrocycle c[LALA*] pour étudier sa solubilité. Une augmentation de polarité a été observée d'après le temps de rétention du peptide en HPLC analytique. Après purification du macrocycle c[LALA*] sans groupement *o*-Ns, ce peptide a pu être dissous dans H₂O à 1 mM. Par conséquent, nous avons décidé de synthétiser trois peptides macrocycliques (c[GAGA*]F, c[GALA*]F, c[LALA*]F) en déprotégeant le groupement *o*-Ns à la fin. La Gly est connue pour défavoriser la structure hélice α . Cette étude a permis aussi d'observer l'influence de la **Gly** pour la conformation des macrocycles.

Ces peptides macrocycliques pouvaient être synthétisés suivant le **Schéma 29** et la déprotection du groupement *o*-Ns peut se faire après obtention des peptides cycliques. Pourtant, nous avons trouvé que l'utilisation de 2-mercaptoéthanol et de DBU dans la déprotection de *o*-Ns en solution entraînait des difficultés pour la purification du peptide final, car les réactifs étaient en excès et le DBU avait une forte absorption en HPLC. Puis, une étape de purification supplémentaire était ajoutée

après la déprotection de *o*-Ns, ce qui a diminué aussi le rendement d'obtention du peptide final.

Pour le peptide c[**GAGA***]F, nous avons réussi à déprotéger le groupement *o*-Ns du peptide linéaire précurseur sur la résine. Nous avons alors essayé la cyclisation sur support solide. Malheureusement, cette cyclisation sur support solide a également échoué. Enfin, le peptide linéaire a été clivé de la résine. La cyclisation a réussi en solution. Nous pouvons noter que l'amine secondaire libre du premier résidu n'a pas gêné la cyclisation (pas de produits secondaires détectés par HPLC). Enfin, les trois peptides macrocycliques hydrosolubles ont été synthétisés selon ces deux façons de cyclisation finale (**Schéma 30**).

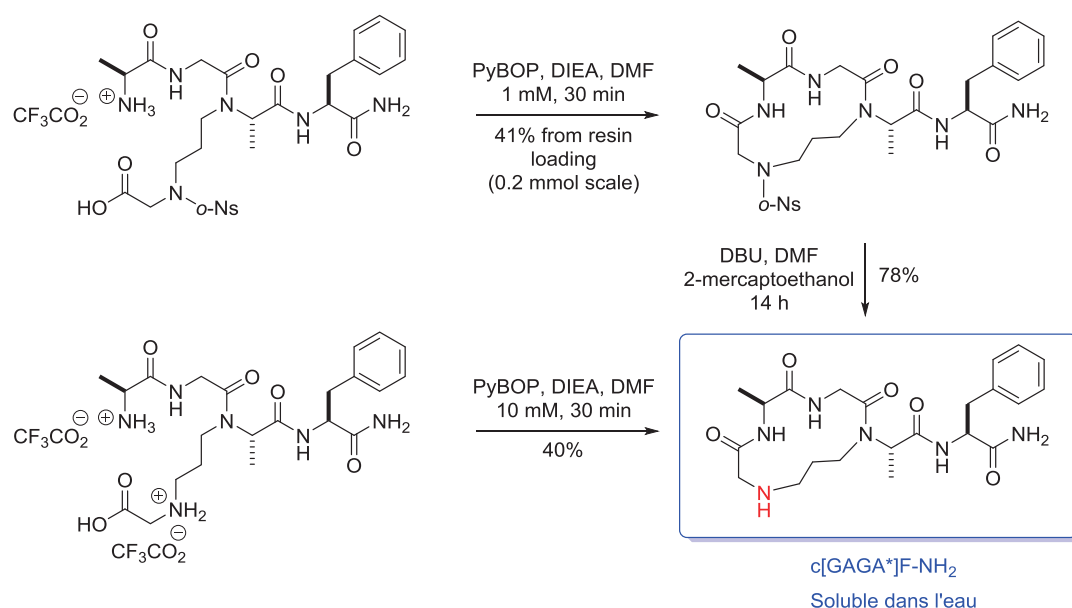


Schéma 30. Deux façons de cyclisation pour les peptides macrocycliques.

4.2 Études structurales de macrocycles hydrosolubles

Les études d'Arora pour les macrocycles HBS sont effectuées sur les peptides longs. Ils n'ont pas étudié la conformation des macrocycles seuls. L'étude d'Alewood a montré que le macrocycle HBS conçu seul avait une structure stable en coude α en solution aqueuse²²³. Peu de molécules ont été décrites pour avoir la capacité de mimer ou stabiliser un coude α ^{232,233}. Pourtant, ce type de structure secondaire est commun dans des sites d'interaction d'enzyme et des domaines de liaison aux métaux²³¹. Donc, il est important d'étudier la structure de nos peptides macrocycliques.

Trois types d'études ont été faites pour analyser la structure de cette petite série de peptides macrocycliques. L'étude RMN dans l'eau a permis non seulement de confirmer la séquence des peptides, mais a aussi donné des informations sur la distance de NH/NH des deuxième et troisième résidus (par analyse de spectres NOESY). L'effet NOE de ces deux résidus était dû à la proximité des liaisons amide. C'est une caractéristique d'un coude α . Un fort effet NOE entre les deuxième et troisième résidus a été observé pour le peptide c[GAGA*]F (**10a**, numéro selon l'[Article 5](#)) et c[GALA*]F (**10b**, numéro selon l'[Article 5](#)). Pourtant, l'effet NOE entre Ala et Leu du peptide c[LALA*]F (**10c**, numéro selon l'[Article 5](#)) était plus difficile à analyser car plusieurs pics de corrélation s'échangeaient entre différentes conformations de ce peptide.

L'étude par dichroïsme circulaire est aussi une méthode valable pour analyser la conformation en hélice α de protéines et de peptides. L'équipe d'Alewood a montré que le macrocycle HBS pourrait former une structure coude α . Nous avons aussi étudié ces trois peptides macrocycliques par CD. Les résultats ont montré que ces trois peptides avaient tous une structure favorisée en coude α . Notamment, le peptide c[LALA*]F (**10c**) qui a le ratio $\theta_{222} / \theta_{206}$ (2.4) le plus haut entre ces trois peptides.

La modélisation moléculaire est une méthode basée sur le calcul informatique. La structure de chaque macrocycle a été calculée en plaçant le peptide dans un champ de force. Les structures plus stables ont été sélectionnées par la dynamique moléculaire et la minimisation d'énergie. Enfin, une structure moyenne a été obtenue et comparé avec un coude α idéal. Cette étude a été réalisée avec le logiciel Discovery Studio (champs de force CHARMM) au laboratoire par le Dr. Sylvain Broussy. Les résultats ont montré que le peptide c[LALA*]F (**10c**) a la structure la plus similaire à un coude α naturel, avec un RMSD de 0.67 Å.

²³² Hoang HN, Driver RW, Beyer RL et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 11107-11111

²³³ Krishna Y, Sharma S, Ampapathi RS et al. *Org. Lett.* **2014**, 16, 2084-2087

4.3 Article 5

Tous ces résultats de synthèse de peptides macrocycliques hydrosolubles et les études structurales sont présentés dans un article à soumettre.

Article 5 :

- “Synthesis, spectroscopic study in water and molecular modeling of macrocyclic peptides designed for α -turn stabilization.” **Wang L**, Zhu KX, Liu WQ, Coric P, Bouaziz S, Vidal M, and Broussy S. (en préparation)

Synthesis, spectroscopic study in water and molecular modeling of macrocyclic peptides designed for α -turn stabilization

Lei Wang,^[a] Kexin Zhu,^[a] Wang-Qing Liu,^[a] Pascale Coric,^[b] Serge Bouaziz,^[b] Michel Vidal,^[a, c] Sylvain Broussy^{*[a]}

Abstract: Short peptides composed of naturally occurring amino acids are usually unstructured in aqueous media. The installation of covalent constraints within their side chains or backbones, resulting in the formation of macrocyclic peptides, is a validated approach to stabilize them in desired secondary structures. Towards this goal, we recently reported the solid-phase synthesis of 13-membered macrocyclic peptides. Their design was inspired by previous work using the replacement of a hydrogen bond by a covalent bond, for the stabilization of α -helical secondary structures. We report herein an optimized synthesis leading to three water soluble 13-membered macrocyclic peptides in good overall yields. Their characterization by CD and NMR spectroscopy in aqueous solution provided evidence for the presence of α -turn character in the conformational ensemble. Molecular modelling studies supported these experimental observations.

Introduction

There has been an increasing interest in the last years in the design and synthesis of constrained peptide macrocycles, with the objective to stabilize specific secondary structures. In particular, two main strategies have been pursued for the stabilization of α -helical secondary structures in small biologically active peptides.^[1] The first one relies on side chain cyclization in suitable positions, generally $i \rightarrow i+4$ and $i \rightarrow i+7$, through a variety of covalent linkers.^[2] The second one relies on backbone cyclization between the CO atoms at position i and the NH atoms at position $i+4$, resulting in the replacement of the α -turn hydrogen bond by a covalent bond (figure 1). This second strategy requires also the installation of a covalent linker.^[3] Based on the design by Alewood^[4] we developed a solid phase

synthesis of short peptides incorporating a diaminopropane linker.^[5] The resulting peptides may serve as α -helix inducers upon elongation of the chain at the C-terminal position. However, at an initial stage of project development, we intended to evaluate the potential stabilization of α -turn secondary structure in these short macrocyclic peptides. α -Turns, although not as widespread as β -turns, are often found in proteins and constitute an important structural motif. In addition to the well-known α -helical turn, nine different types of tight α -turns occurring in proteins have been identified.^{ref} Surprisingly, few molecules are known to mimic or stabilize single α -turns conformations. α -Helical turns have been stabilized by side chain cyclization^[2a] and with cyclic metalloptapeptides.^[6] Tight α -turns have been stabilized in cyclic tetrapeptides by side chain cyclization^[7] and by incorporation of a furan-based vinylogous γ -amino acid.^[8] We report herein an optimized synthesis and the spectroscopic characterization in aqueous media of three macrocyclic peptides constrained with a diaminopropane linker, designed to stabilize α -turn conformation (figure 1, right). Molecular modeling simulations were also carried out to evaluate the stability of the secondary structures.

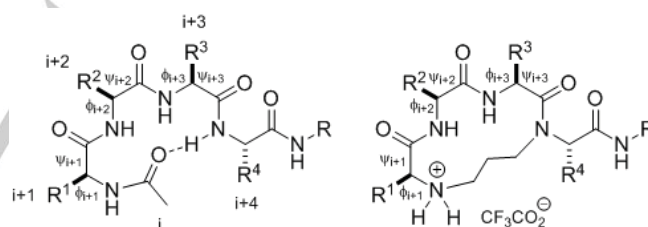


Figure 1. Structures of a natural α turn (left) and of synthetic macrocyclic peptides described herein (right).

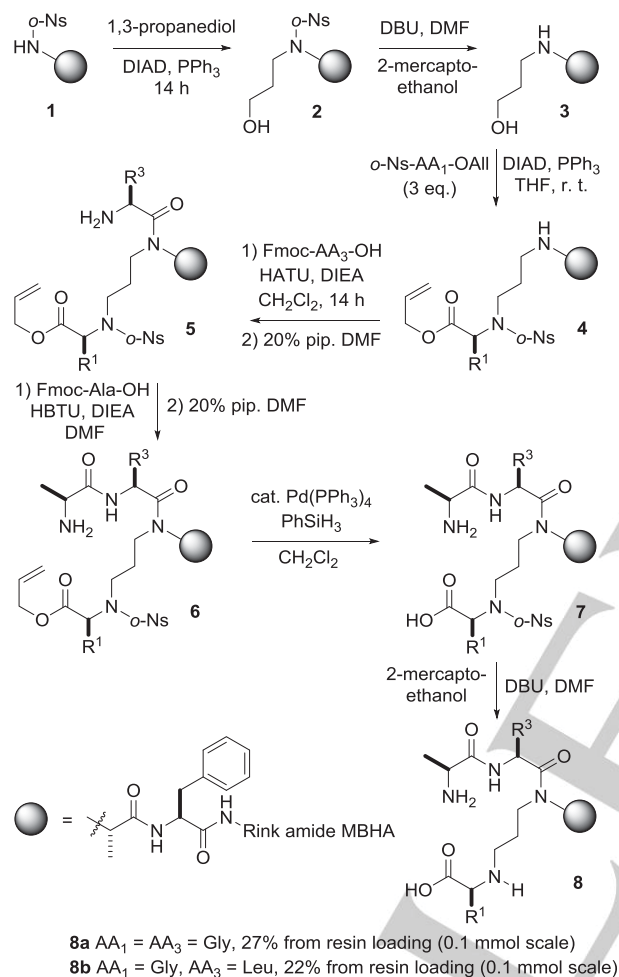
Results and Discussion

Synthesis.

The synthetic pathway on solid support leading to resin-bound **7** followed our previously described method employing two successive Fukuyama-Mitsunobu alkylation reactions for the introduction of a diaminopropane linker (scheme 1).^[5] To demonstrate the possibility of chain extension on resin at the C-terminal end, an additional phenylalanine residue was incorporated. An added benefit of the introduction of a phenylalanine residue was to increase the UV absorption of the final products, resulting in a more sensitive detection and easier purification by HPLC. Some improvements regarding reaction times and number of equivalents of reagents have been achieved. In particular, the second Fukuyama-Mitsunobu

- [a] L. Wang, K. Zhu, Dr. W.-Q. Liu, Prof. Dr. M. Vidal, Dr. S. Broussy
UMR COMETE 8638 CNRS
Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie de Paris,
Sorbonne Paris Cité
4 av. de l'Observatoire, Paris 75006, France
E-mail: sylvain.broussy@parisdescartes.fr
- [b] P. Coric, Dr. S. Bouaziz
UMR 8015 CNRS
Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie de Paris,
Sorbonne Paris Cité
4 av. de l'Observatoire, Paris 75006, France
- [c] Prof. Dr. M. Vidal
UF Pharmacocinétique et Pharmacochimie
Hôpital Cochin, AP-HP
27 rue du Faubourg Saint Jacques, Paris 75014, France

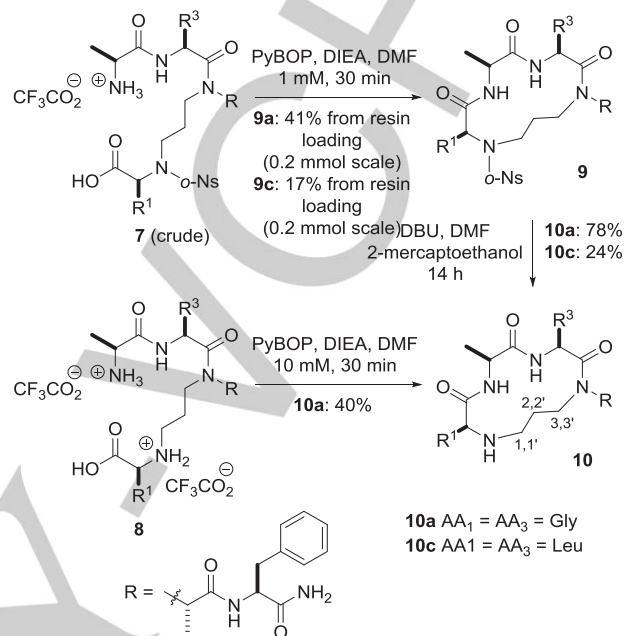
alkylation to give **4** ($R^1 = H$) was successfully carried out with only 3 equivalents of *o*-Ns-Gly-OAll. All resin-bound intermediates **1-7** ($R^1 = R^3 = H$) were cleaved from the resin and their purity evaluated by HPLC. Satisfyingly, all these intermediates were present as major products with high purity (HPLC traces in the supporting information). Cyclization of **7** with PyBOP/DIEA gave **9a** in good overall yield: 41% from nominal resin loading, i. e. 53 mg from 0.2 mmol resin (scheme 2).



Scheme 1. Solid-phase synthesis of linear peptides **8**.

The removal of the *o*-Ns protecting group was attempted both on solid phase from resin-bound linear **7** (scheme 1), and in solution from **9a** (scheme 2). Under standard conditions (DBU, 2-mercaptoethanol in DMF^[9]), **8a** was obtained after cleavage in 27% yield (from nominal resin loading). From cyclized compound **9a** under the same conditions, the desired macrocyclic peptide **10a** was obtained in 78% yield. Alternatively, the cyclization in solution of **8a** (PyBOP, DIEA in DMF) gave **10a** in 40% yield. Compounds **10b** and **10c** were obtained following the same procedure but the coupling of Fmoc-Leu-OH to give **5** ($R^3 = \text{isobutyl}$) repeated twice. 47% of **10b** were obtained from

8b and 24% of **10c** were obtained from **9c**. The linear peptide Ac-GAGAF-NH₂ **11** was synthesized following standard procedures to serve as a control peptide for the spectroscopic studies.



Scheme 2. Synthesis of macrocyclic peptides **10**.

Circular dichroism spectroscopy.

The interpretation of far-UV CD spectra of short helical peptides is difficult. Indeed, the wavelength and intensities of the bands are expected to depend strongly on helix length, and the peptides are usually present as mixtures of secondary structures, preventing accurate experimental determinations.^[6, 10] However, a qualitative interpretation will be proposed herein, in light of literature data. Circular dichroism spectra of peptides **10a-c** and **11** were recorded in phosphate buffer at pH 7.4. Peptide **11** appeared completely unstructured, with a weak minimum at 200 nm, as expected for a short linear peptide (supporting information). Satisfyingly, macrocyclic peptide **10a** displayed a minimum ellipticity (θ) at 206 nm with a shoulder at 215-225 nm, indicating some degree of α -helicity (figure 2). The shift to a lower wavelength (208 nm $\rightarrow$ 206 nm) compared to longer α -helical peptides has been observed for short peptides.^[2a, 10] The maximum wavelength of the $n \rightarrow \pi^*$ transition was unclear, because it was present as a shoulder. We chose to use the θ value at 222 nm for the following discussion, because it is the wavelength usually used to quantify helicity of longer peptides.^[11] In addition, the ratio $\theta_{222} / \theta_{208}$ is sometimes employed as an indicator of the nature of the helix.^[6, 12] For **10a**, the ratio $\theta_{222} / \theta_{206}$ of 0.52 confirmed the presence of α -helicity, but suggested that 3_{10} -helicity or other conformations may be predominant in the conformational ensemble. This heterogeneity

was expected, considering the presence of two glycine residues. In contrast to the intensity of the negative band and shoulder at 206 and 222 nm, the weakness of the positive band at 190 nm was surprising. Theoretical calculations predict that short α -helices should give weaker CD signals (per amide bond) than longer ones, lacking for example the negative band around 205 nm.^[10, 13] Experimental data from the literature confirmed this prediction and, interestingly, the intensity of the band at 190 nm was particularly decreased for short fixed-nucleus alanine helices.^[10] We note, however, that short side-chain constrained peptides studied by Fairlie exhibited CD spectra characteristic of α -helices with an intense transition at 190 nm.^[2a] In addition, for 13-membered macrocyclic peptides described by Alewood, the intensity of the transition at 190 nm was highly dependent on the stereochemistry of an added chiral center on the diaminopropane linker.^[4] Trifluoroethanol (TFE) is known to stabilize structures in peptides.^[14] For both **10a** and **11**, the addition of 30% TFE to the buffer induced localized modifications of the spectra (supporting information). An increase in ellipticity at 190 nm was observed for the linear peptide **11**, whereas more negative values at 220–225 nm were observed for the macrocyclic peptide **10a**. Interestingly, for the later, the ratio $\theta_{222} / \theta_{206}$ reached 0.74, suggesting an increase in α -helical character. Gratifyingly, the CD spectrum of **10c** displayed a very high ratio $\theta_{222} / \theta_{206}$ of 2.4, indicating a higher degree of helicity than **10a**. It resembled the spectra reported by Alewood for analogous 13-membered macrocyclic peptides.^[4] Interestingly, a high ratio $\theta_{222} / \theta_{206}$ of ca. 1.5 was also reported in CD spectra of small molecule mimetics of non- α -helical turns of type I- α_{RS} and II- α_{LU} .^[7] Macrocyclic peptide **10b** displayed a “mean” spectrum between **10a** and **10c**, with negative bands at both 208 and 225 nm.

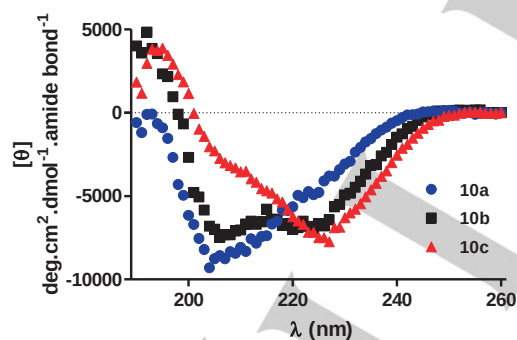


Figure 2. CD spectra of peptides **10a**, **10b** and **10c** in 10 mM phosphate buffer pH 7.4 at 293 K.

NMR spectroscopy.

In addition to CD spectroscopy, we characterized both the linear and the macrocyclic peptides by NMR spectroscopy. The introduction of the covalent constraint induced significant changes in the ^1H spectrum of **10a** compared to unconstrained **11**. The macrocyclic peptide was present as an 82:18 mixture of

two rotamers. The dispersion of the chemical shifts of the five amide protons of **11** was less than 0.4 ppm, as expected for an unordered peptide. For the three amide protons of **10a**, however, a large dispersion of about 1.4 ppm was observed. Similar dispersion of chemical shifts were observed for **10b** and **10c**. NH chemical shift dependence on temperature can be used to probe hydrogen bond formation in peptides.^[8] In **10a–c**, the F5 NH and the NH_2 at the C-terminal position may be involved in hydrogen bonding in an α -helical conformation. Therefore, we recorded a series of ^1H spectra over the range 298 to 328 K for **10a–c** and **11** (as a control). However, a similar dependence on temperature was observed for all NH protons with $|\Delta\delta_{\text{NH}}/T|$ greater than 6 ppb/K (see supporting information), indicating that the F5 amide protons are not significantly involved in hydrogen bonding interactions.

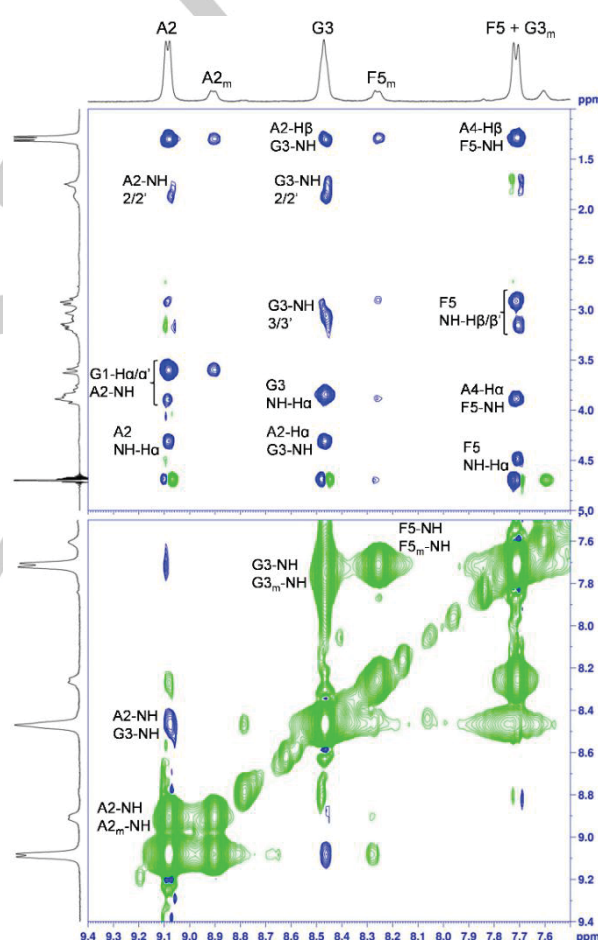


Figure 3. NH/H α and NH/NH regions of the NOESY spectrum of peptide **10a**. Selected cross-peaks are labelled according to the structure given in scheme 2. Subscript “m” indicates a minor conformer atom.

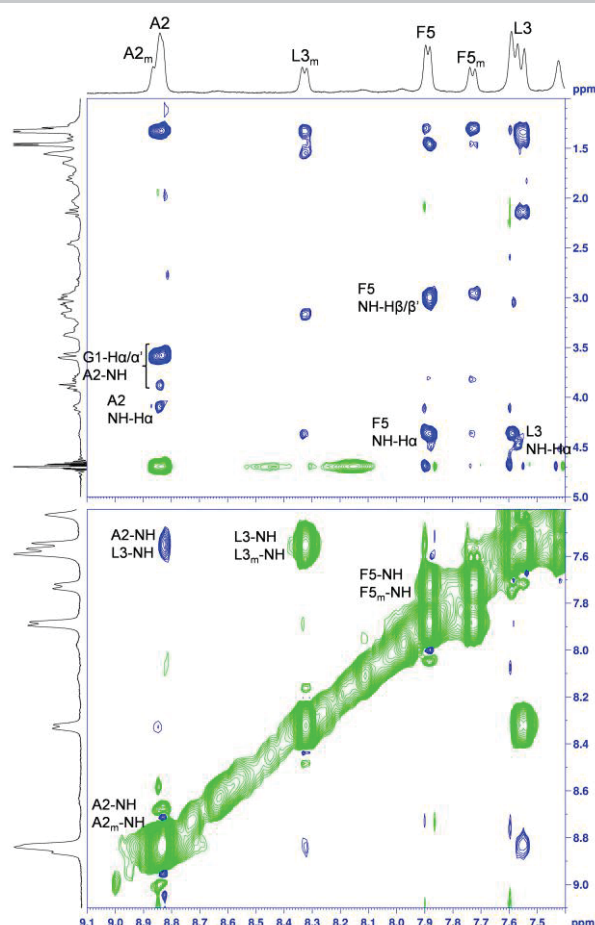


Figure 4. NH/Ha and NH/NH regions of the NOESY spectrum of peptide **10b**. Selected cross-peaks are labelled according to the structure given in scheme 2. Subscript "m" indicates a minor conformer atom.

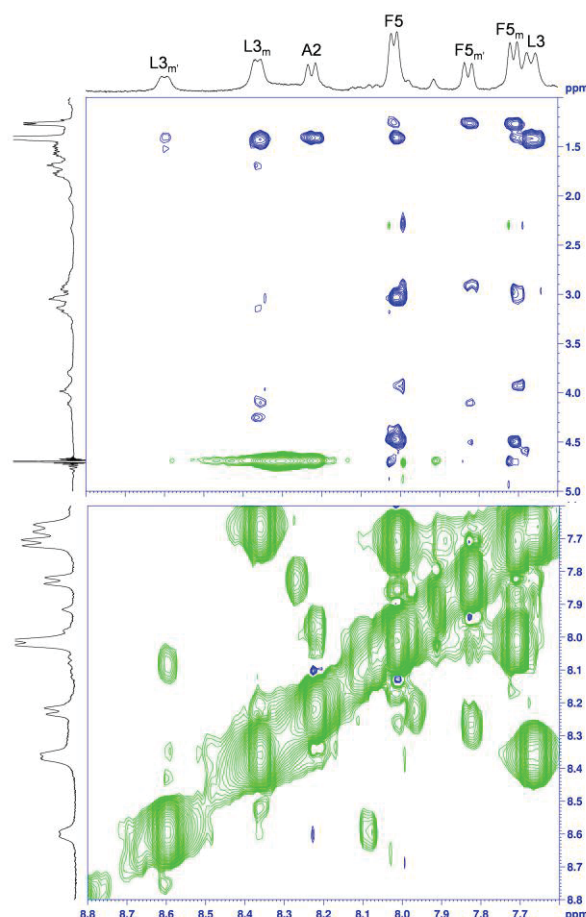


Figure 5. NH/Ha and NH/NH regions of the NOESY spectrum of peptide **10c**. Selected cross-peaks are labelled according to the structure given in scheme 2. Subscript "m" and "m" indicate minor conformer atoms.

The NOESY spectra of **10a**, **10b**, **10c** and **11** were recorded in water at pH 4 (figures 3-5). Strong conformational exchange signals between the rotamers were observed (same phase as the diagonal). For **10a** and **10b**, two main sets of signals were identified, whereas for **10c**, at least three sets were identified. Three sequential H_{α}/NH_{i+1} cross-peaks and several cross-peaks involving the propane linker and NH or Ha hydrogen atoms were identified. In addition, for **10a** and **10b**, the presence of strong A2-NH/G3-NH and A2-NH/G3-NH cross-peaks, respectively, was interesting, because it is characteristic of a helical conformation. For **10c**, large correlation peaks produced by conformational exchange in the NH region prevented the detection of such NOE. Because G1 and A4 lack an amide proton, this is the only possible NH_i/NH_{i+1} correlation. A NH_i/NH_{i+2} correlation between G3 (or L3) and F5 may be hidden by the large conformational exchange signals. The F5 residue was only involved in one inter-residue correlation, indicating that this residue is not in spatial proximity with the macrocycle, in agreement with variable temperature experiments showing the absence of hydrogen bonding interactions.

Molecular modeling.

NMR and CD spectroscopy studies gave information regarding averaged conformations of large populations of molecules over seconds. Molecular modeling constitutes a useful complement to study the conformational exchanges at the molecule level and on nanosecond time scales.^[15] Molecular models for peptides **10a-c** were generated and energy minimized in a water cluster with the CHARMM force field.^[16] *Trans* configurations were chosen at the N,N'-dialkyl amide function of all 3 peptides, and kept during all simulations, because they should constitute the major rotamers in aqueous solution. Molecular dynamic simulations were achieved at 300K during 100 ns. The RMSD of the 10,000 conformations were calculated versus the first conformation and considering the 13 atoms constituting the macrocycle (figure 6). A variety of conformations was obtained for **10a**, some of which had a RMSD greater than 1 Å. This value is rather high for a small macrocyclic molecule, indicating a high degree of flexibility. On the other hand, all conformations of **10c** stayed near 0.4 Å of the initial frame after about 10 ns. **10b** was similar to **10c** but with alternating conformations at approximately 0.2 and 0.4 Å of the initial frame.

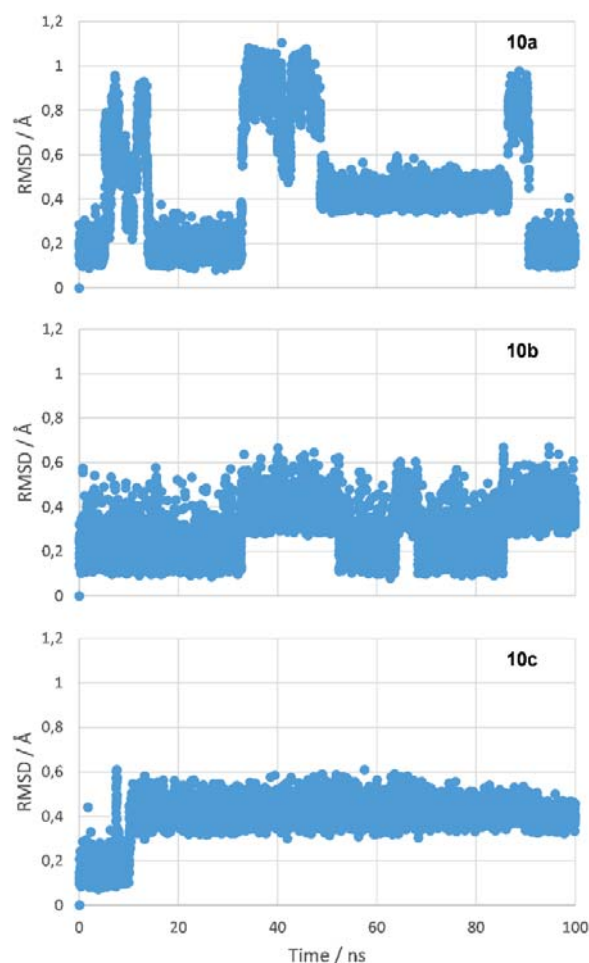


Figure 6. RMSD of 10,000 conformations from 100 ns molecular dynamic simulations for macrocyclic peptides **10a-c**.

Another RMSD calculation using an “all frames versus all frames” method (also selecting the 13 atoms constituting the macrocycle) was achieved on 100 sampled conformations. This small subset seemed sufficient to identify the most present conformations of each macrocyclic peptide. The resulting matrix was used for clustering.^[17] A cutoff of 0.3 Å was chosen, ensuring a very high similarity among cluster members. As suggested from the first RMSD analysis, a major cluster was obtained for **10c** (87%). The second cluster (11%) was discarded, being present only in the first 11 ns of the simulation. Two major clusters were identified for **10b** (60% and 33%) and two for **10a** (41% and 34%). In the latter, the third and fourth most populated clusters (9% and 8% respectively) were not further studied because of their low occurrence (<10%). The remaining 8% conformations were constituted of very small clusters. Representations of the center members of each selected cluster after energy minimization are given in figure 7.

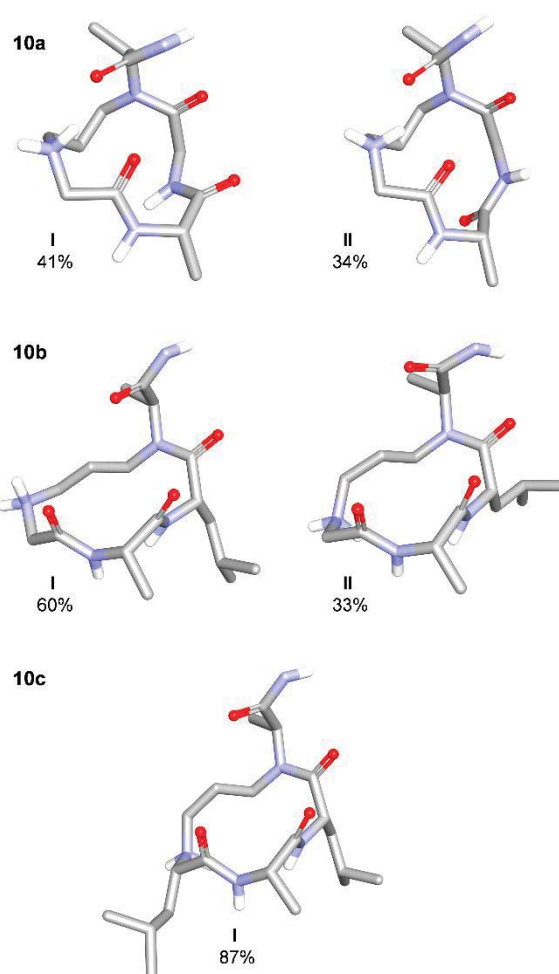


Figure 7. Conformations of the center members of the major clusters of **10a-c** identified by molecular dynamic simulations. Cluster sizes are given in %.

Dihedral angles were measured for the selected conformations after energy minimization (table 1). For an ideal α -helical turn (i. e. 3-length α -helix) dihedral angle values of Φ -58° and Ψ -47° and a $C\alpha_i$ to $C\alpha_{i+3}$ distance of 5.7 Å are expected. However, significant variations are observed experimentally in proteins and peptides, as demonstrated in 4-length α -helices.^[18] Most of the (Φ , Ψ) values for both major conformations of **10a** were distinctly different from those of an ideal α -helical turn. In particular, the Ψ_{i+2} and Φ_{i+3} values of cluster II were 140 to 180° larger than those of cluster I, resulting in a flip of the peptide bond orientation. Overall, both conformations displayed a contracted shape, as supported by a short $C\alpha_i$ to $C\alpha_{i+3}$ distance of 5.0 Å and 5.1 Å. Cluster II of **10b** and cluster I of **10c** had similar dihedral angles, mostly within α -helical space. Interestingly, a distance of exactly 5.7 Å was measured for **10c**. For this macrocyclic peptide, the largest deviations from an ideal α -helical turn were found for Ψ_{i+1} (33°) and Φ_{i+2} (24°). It resulted in an orientation of the C1 atom of the diaminopropane linker (mimicking the carbon of the carbonyl group of residue i ;

numbering in scheme 2) pointing towards the exterior of the helical barrel.

Table 1. Dihedral angles measured in center members of clusters of macrocyclic peptides **10a-c**.

	Cluster ^[a]	Φ_{i+1}	Ψ_{i+1}	Φ_{i+2}	Ψ_{i+2}	Φ_{i+3}	Ψ_{i+3}	$d(\text{\AA})^{[b]}$
10a	I (41)	92	-156	-56	-32	-68	-93	5.0
	II (34)	91	-153	-61	110	118	-121	5.1
10b	I (60)	76	-122	-93	-41	-75	-47	5.8
	II (33)	-60	-64	-90	-53	-59	-58	5.9
10c	I (87)	-66	-80	-82	-40	-62	-68	5.7

[a] The cluster size in % is given in parenthesis; [b] d: distance from Ca_{i+1} to Ca_{i+3} .

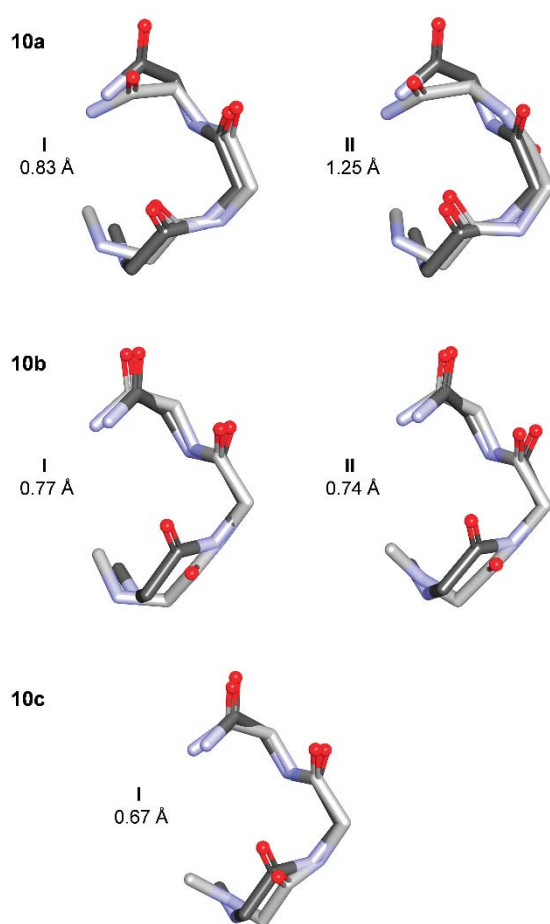


Figure 8. Overlap of the center members of the major clusters of **10a-c** with an α -helical turn ($\Phi = -58^\circ$ and $\Psi = -47^\circ$). RMSD values are given in Å.

For the center conformations of the main clusters, overlays and RMSD calculations were achieved versus an ideal α -helical turn. Fourteen heavy atoms constituting the turn were selected (figure 8). A rather poor overlay was observed for **10a**, with RMSD values of 0.83 Å and 1.25 Å for clusters I and II, respectively. A better fit was obtained for **10b**, with RMSD values of 0.77 Å and 0.74 Å for clusters I and II, respectively. As expected, **10c** gave the best match (0.67 Å), and the main mismatch was localized at the N-terminal extremity of the peptide. Gratifyingly, these results correlate well with conclusions drawn from CD spectra. Therefore, we believe that the macrocycles described herein (with at least 2 non-glycine residues within the turn) constitute satisfying, although not yet perfect, mimics of α -helical turns.

Conclusions

Macrocyclic peptides **10a-c** were designed by a hydrogen bond replacement strategy with the objective to stabilize a short amino acids sequence in an α -turn conformation. An optimized solid-phase synthesis was employed, and the removal of a key α -Ns protecting group was achieved on resin and in solution. Characterization in water by CD and NMR spectroscopies, completed by molecular modeling studies, provided some indications of a α -helical conformation in the macrocyclic moiety. CD indicated an α -helical turn character for **10a** (weak) **10b** (medium) and **10c** (large). By NMR, evidence was obtained for the major rotamers of **10a** and **10b**, but severe overlap with minor rotamers for **10c** precluded analysis. Molecular modeling indicated an α -helical turn character and turn stability (on 100 ns scale) for the major rotamers of **10b** and **10c**.

Compound **10a** appears as a major rotamer (82%) by NMR spectroscopy, with a strong A2-NH/G3-NH correlation. We believe NMR restrained molecular modeling would lead to an overestimation of its α -helical character. Indeed, CD spectroscopy and unrestrained molecular dynamics indicated a rather unstructured and flexible macrocyclic peptide. On the other hand, compound **10c** appears as a mixture of rotamers by NMR spectroscopy, suggesting that it would be a poor α -helical turn mimic. However, CD spectroscopy indicate the predominance of α -helical turn structure. This observation was further supported by unrestrained molecular dynamics on the major rotamer, which confirmed the stability of the desired conformation over 100 ns.

The efficiency and flexibility of the synthetic pathway will allow the production of a variety of macrocyclic peptides. This will allow further work aimed at better understanding the conformational preferences of this interesting class of molecules. Specifically, the effect of amino acid sequence will be evaluated. In addition, the effect of the nature of the linker will be studied, for example by masking the charge on the nitrogen atom, or by changing its length.

Experimental Section

Synthesis

N^α-Fmoc amino acids, Rink Amide-MBHA resin (0.45 mmol/g), and coupling reagents (HBTU, PyBOP and HATU) were purchased from SDS Carlo-Erba and Novabiochem. All solvents were purchased from SDS Carlo-Erba. All other reagents were purchased from Aldrich.

HPLC analysis was performed on a Phenomenex Luna C18 column (5 μ m, 4.6 x 250 mm) at 1 mL/min flow rate, with the following solvents system: solvent A was water with 0.1% TFA and solvent B was a 70% acetonitrile in water solution with 0.09% TFA. Peptides were purified by semi-preparative HPLC on a Grace Alltima C18 column (5 μ m, 10 x 250 mm) with the indicated gradient programs, and at a flow rate of 2 mL/min. The products were detected by UV at 220 and 254 nm.

Peptide **7** was synthesized following a previously reported procedure,^[5] with some improvements. Briefly, 0.5 mmol of Rink Amide-MBHA resin (0.45 mmol/g) was loaded with phenylalanine and *o*-Ns protected alanine under standard conditions to give **1**. Alkylation with unprotected 1,3-propanediol under Fukuyama-Mitsunobu conditions and removal of the *o*-Ns group with DBU and 2-mercaptoethanol gave **3**. A second Fukuyama-Mitsunobu alkylation step was achieved with 3 equivalents of *o*-Ns-Gly-OAll to give **4**. Subsequent coupling with Fmoc-Gly-OH and HATU/DIEA in dichloromethane (single round of 14 hours), followed by Fmoc removal, gave **5**. Note that for **5** in which R³ = isobutyl, the coupling with Fmoc-Leu-OH was repeated twice. Resin-bound peptide **7** was obtained after chain extension and protecting group removal. At this stage, the resin was divided into fractions, and used as follows.

Cleavage of resin-bound **7a** (0.2 mmol nominal resin loading) from the resin with pure TFA gave crude **7a**, which was used without further purification. The cyclization was carried out with PyBOP (0.44 mmol, 2.2 eq.) and DIEA (2 mmol, 10 eq.) in DMF (1 mM final concentration of **7a**) for 30 minutes to give peptide **9a**, which was purified by semi-preparative HPLC with a linear gradient from 30 to 100% B in 40 minutes (53 mg, 41% yield). HRMS: calculated for C₂₈H₃₅N₇O₉Na [M+Na]⁺ m/z 668.2115; observed 668.2100.

Peptide **8a** was obtained from resin-bound **7a** (0.1 mmol nominal resin loading) by 3 repeated treatments with 5 mL of 1.5% DBU and 1.5% 2-mercaptoethanol in DMF, followed by cleavage from the resin with pure TFA. Purification by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 20 to 80% B in 40 minutes gave 19 mg of peptide **8a** (27% yield).

Peptide **10a** was obtained by cyclization of **8a** (0.013 mmol, 9 mg) with PyBOP (0.031 mmol, 2.4 eq.) and DIEA (0.28 mmol, 22 eq.) in DMF (10 mM final concentration of **8a**) for 30 minutes, followed by purification by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 10 to 50% B in 40 minutes (3 mg, 40% yield). HRMS: calculated for C₂₂H₃₂N₆O₅Na [M+Na]⁺ m/z 483.2332; observed 483.2319.

Alternatively, peptide **10a** was synthesized from **9a** (0.017 mmol, 11 mg) by reaction in a solution of 1.5% DBU and 1.5% 2-mercaptoethanol in DMF (275 μ L final volume) for 14 h. After purification under the same chromatographic conditions as above, peptide **10a** was obtained in 78% yield (8 mg).

Peptide **10b** was obtained from **8b** (0.022 mmol, 12 mg) with PyBOP (0.044 mmol, 2.0 eq.) and DIEA (0.44 mmol, 20 eq.) in DMF (1 mM final concentration of **8b**) for 30 minutes, followed by purification by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 10 to 60% B in 40 minutes (5.3 mg, 47% yield). HRMS: calculated for C₂₆H₄₀N₆O₅Na [M+Na]⁺ m/z 539.2958; observed 539.2960.

Peptide **10c** was obtained from **9c** (0.034 mmol, 25.7 mg) by reaction in a solution of 1.5% DBU and 1.5% 2-mercaptoethanol in DMF (275 μ L final volume) for 14 h. After purification under the same chromatographic conditions as above, peptide **10c** was obtained in 24% yield (4.6 mg). HRMS: calculated for C₃₀H₄₇N₆O₅ [M]⁺ m/z 571.3608; observed 571.3629.

The linear peptide Ac-GAGAF-NH₂ (**11**) was synthesized on solid phase and under microwave irradiation on a 0.05 mmol scale with Rink Amide-MBHA resin (0.45 mmol/g) using a CEM Liberty 1 synthesizer. Microwave irradiation was employed following the synthesizer provider recommendations for both coupling and deprotection steps. Coupling reactions were performed using N^α-Fmoc amino acids (5.0 eq. related to the resin) activated with HBTU (4.9 eq.) and DIEA (10 eq.). After each coupling step, Fmoc removal was achieved by treating the resin with 20% piperidine in DMF. The peptide was acetylated by addition of acetic anhydride (10 eq.) and DIEA (20 eq.) in DMF (10 mL). The reaction was stirred at room temperature during 15 min and washed with DMF and dichloromethane. The cleavage of the peptide from the resin was done by treatment with 10 mL of TFA for 1 h at room temperature. After removal of the resin, the filtrate was concentrated under a stream of argon and precipitated with cold diethyl ether. The precipitate was isolated by centrifugation and washed with diethyl ether, affording the crude peptide, which was purified by semi-preparative HPLC using a linear gradient from 20 to 60% B in 40 minutes. The product was collected and analyzed by HPLC and its identity was confirmed by MALDI mass spectrometry. Pure fractions were pooled and lyophilized to yield **11** as a white solid (11 mg, 48% yield).

Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) experiments were performed on a Jobin-Yvon model C8 spectropolarimeter calibrated with (1S)-(+)-10-camphorsulfonic acid. Lyophilized peptide samples were weighed and dissolved in 18.2 M Ω distilled water to prepare stock solutions at 2 mM. Each stock solution was then diluted 10 times with phosphate buffer 10 mM pH 7.4 to obtain a final concentration of 200 μ M. Spectra were recorded at 293 K in a 0.1 cm cell between 190 and 260 nm with a bandwidth of 2.0 nm, an integration time of 8 seconds and a resolution step width of 1 nm. Each spectrum represents the average of 3 scans. Data are given in mean residue molar ellipticity $[\theta]$, calculated from the equation $[\theta] = 100 \cdot [\theta]_{\text{obs}} / C \cdot n \cdot l$, where $[\theta]_{\text{obs}}$ is the observed ellipticity in millidegrees, l is the optical path length in centimeters, C is the peptide molar concentration (M), and n is number of amide bonds ($n = 5$ for **10a**, **10b** and **10c** and $n = 6$ for **11**).

NMR spectroscopy

Samples for NMR analysis of peptides **10a-c** and **11** were prepared by dissolving the peptides (3 mg) in 450 μ L of H₂O and 50 μ L of D₂O (pH = 4 for the resulting solutions). 1D and 2D ¹H NMR spectra were recorded at 298 K on a Bruker Avance 400 spectrometer operating at a proton frequency of 400.13 MHz. 2D experiments included TOCSY (mixing time of 80 ms) and NOESY (mixing time of 200 ms), with spectral widths of 4795.4 Hz in both dimensions. 2D TOCSY and NOESY experiments were recorded with 1024 complex data points in the F2 dimension and 256 increments in the F1 dimension, with 16 and 128 scans per increment, respectively. Water suppression was achieved using excitation sculpting (esgpph). The carrier frequency was set to the water resonance. The NMR data were processed using the software Topspin (Bruker). All FIDs were zero-filled up to 2K data points to increase the digital resolution before using shifted cosine and sine-bell window functions in both dimensions.

Molecular modeling

Peptides **10a-c** in a *trans* conformation at the *N,N*-dialkyl amide position were built and typed with the CHARMM force field in the Discovery Studio package. A water cluster was added and the initial molecules were submitted to a standard dynamic cascade with default parameters, including energy minimization (Steepest Descent with maximum 1000 steps and RMS gradient of 1.0, followed by Adopted Basis NR with maximum 2000 steps and RMS gradient 0.1), equilibration and production at 300K (2 fs time steps). For each macrocyclic peptide, 10,000 conformations were saved over 100 ns production times. A first set of RMSD calculations (with the 13 atoms forming the macrocycle)

was achieved with all 10,000 conformations, versus the first conformation of the production step. For clustering, a second set of RMSD calculations (also with the 13 atoms forming the macrocycle) was achieved on a sample of 100 conformations, versus all these 100 conformations. The major clusters were identified from the resulting 100 x 100 matrices, with a cutoff of 0.3 Å. All conformations within the first cluster were removed and the second cluster was identified within the resulting matrices by the same procedure, and so on for the third and fourth clusters, if required. Dihedral angles and distances were measured on the center members of each cluster after an additional step of energy minimization (using the same procedure as above). For macrocyclic peptide **10c**, the same procedure was repeated starting from a different initial conformation, giving very similar results. RMSD calculations versus a model α -helical peptide ($\Phi = -58^\circ$ and $\Psi = -47^\circ$) were achieved selecting 14 heavy atoms constituting the helical segment.

Acknowledgements

Financial support from the University Paris Descartes and the French "Centre National de la Recherche Scientifique" ("Chaire de Partenariat CNRS" to S. B.) is acknowledged. L. W. acknowledges the China Scholarship Council for the donation of a scholarship.

Keywords: Peptide • α -turn • macrocycle • α -helix

- [1] a) V. Azzarito, K. Long, N. S. Murphy and A. J. Wilson, *Nature Chem.* **2013**, *5*, 161-173; b) T. A. Hill, N. E. Shepherd, F. Diness and D. P. Fairlie, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13020-13041.
- [2] a) N. E. Shepherd, H. N. Hoang, G. Abbenante and D. P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2974-2983; b) A. D. de Araujo, H. N. Hoang, W. M. Kok, F. Diness, P. Gupta, T. A. Hill, R. W. Driver, D. A. Price, S. Liras and D. P. Fairlie, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 6965-6969; c) G. H. Bird, E. Gavathiotis, J. L. LaBelle, S. G. Katz and L. D. Walensky, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 831-837; d) P. M. Cromm, J. Spiegel and T. N. Grossmann, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1362-1375.
- [3] a) E. Cabezas and A. C. Satterthwait, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3862-3875; b) R. N. Chapman, G. Dimartino and P. S. Arora, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12252-12253; c) A. Patgiri, A. L. Jochim and P. S. Arora, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1289-1300; d) G. Dimartino, D. Wang, R. N. Chapman and P. S. Arora, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2389-2392; e) A. Patgiri, M. Z. Menzenski, A. B. Mahon and P. S. Arora, *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1857-1865; f) A. B. Mahon and P. S. Arora, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1416-1418; g) S. E. Miller, N. R. Kallenbach and P. S. Arora, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4434-4437.
- [4] A. J. Vernall, P. Cassidy and P. F. Alewood, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5675-5678.
- [5] L. Wang, W.-Q. Liu, N. Saraux, M. Vidal and S. Broussy, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 2456-2459.
- [6] M. J. Kelso, R. L. Beyer, H. N. Hoang, A. S. Lakdawala, J. P. Snyder, W. V. Oliver, T. A. Robertson, T. G. Appleton and D. P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4828-4842.
- [7] H. N. Hoang, R. W. Driver, R. L. Beyer, A. K. Malde, G. T. Le, G. Abbenante, A. E. Mark and D. P. Fairlie, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11107-11111.
- [8] Y. Krishna, S. Sharma, R. S. Ampapathi and D. Koley, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 2084-2087.
- [9] a) S. C. Miller and T. S. Scanlan, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2301-2302; b) S. C. Miller and T. S. Scanlan, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2690-2691.
- [10] D.-H. Chin, R. W. Woody, C. A. Rohl and R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15416-15421.
- [11] P. C. Lyu, J. C. Sherman, A. Chen and N. R. Kallenbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 5317-5320.
- [12] M. T. Ma, H. N. Hoang, C. C. G. Scully, T. G. Appleton and D. P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4505-4512.
- [13] a) M. C. Manning and R. W. Woody, *Biopolymers* **1991**, *31*, 569-586; b) R. W. Woody and A. Koslowski, *Biophys. Chem.* **2002**, *101-102*, 535-551.
- [14] M. Buck, *Quart. Rev. Biophys.* **1998**, *31*, 297-355.
- [15] D. A. Niggli, M.-O. Ebert, Z. Lin, D. Seebach and W. F. van Gunsteren, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 586-593.
- [16] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan and M. Karplus, *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187-217.
- [17] X. Daura, W. F. van Gunsteren and A. E. Mark, *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* **1999**, *34*, 269-280.
- [18] L. Pal, P. Chakrabarti and G. Basu, *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 273-291.

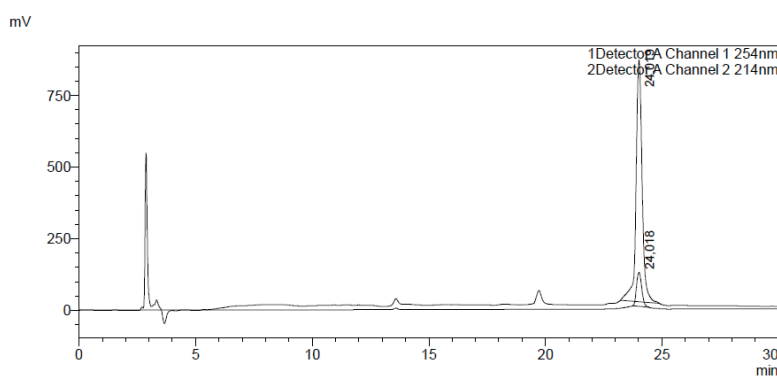
V. Résultats supplémentaires sur le développement de macrocycles peptidiques

5.1 Étude de stabilité des macrocycles dans le TFA

Nous avons utilisé du TFA pur pour le clivage de chaque produit intermédiaire pendant la synthèse parce que la séquence de ces peptides n'avait pas de groupement protecteur sur les chaînes latérales. La cyclisation a été réalisée en solution en conditions basiques. Le macrocycle final était stable en condition basique. Mais les peptides cycliques contiennent deux amines tertiaires et un groupement *o*-Ns électrophile. Nous avons donc voulu vérifier la stabilité de ce macrocycle dans les conditions de clivage, à savoir le TFA pur.

L'étude a été effectuée avec le macrocycle c[GALA*]F. Le peptide pur a été lyophilisé et ensuite analysé par HPLC. Puis, une petite quantité de ce peptide en poudre a été dissous dans 100 % de TFA. Après agitation pendant 30 min, le TFA a été évaporé, puis le peptide a été dissous dans un mélange H₂O/CH₃CN et analysé par HPLC. Le macrocycle a été largement dégradé dans ces conditions (**Figure 76**).

Spectre HPLC du macrocycle c[GALA*]F avec *o*-Ns.



Spectre HPLC du macrocycle c[GALA*]F avec *o*-Ns après traitement au TFA.

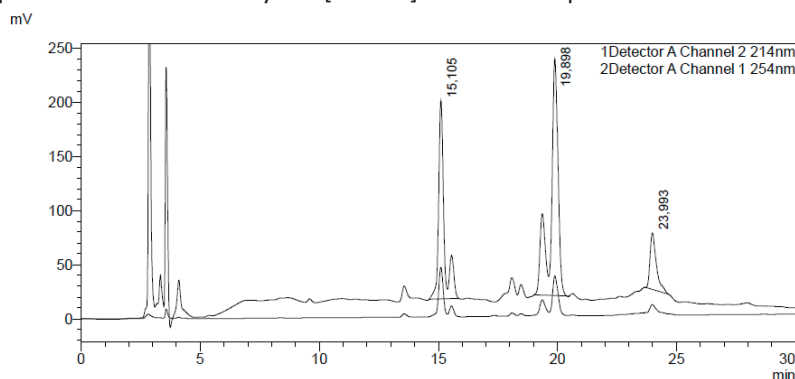


Figure 76. Dégradation du macrocycle c[GALA*]F avec groupement *o*-Ns en milieu acide (TFA).

Ensuite, nous avons étudié la stabilité de ce macrocycle après la déprotection du *o*-Ns. Il est stable sans le groupement *o*-Ns (**Figure 77**).

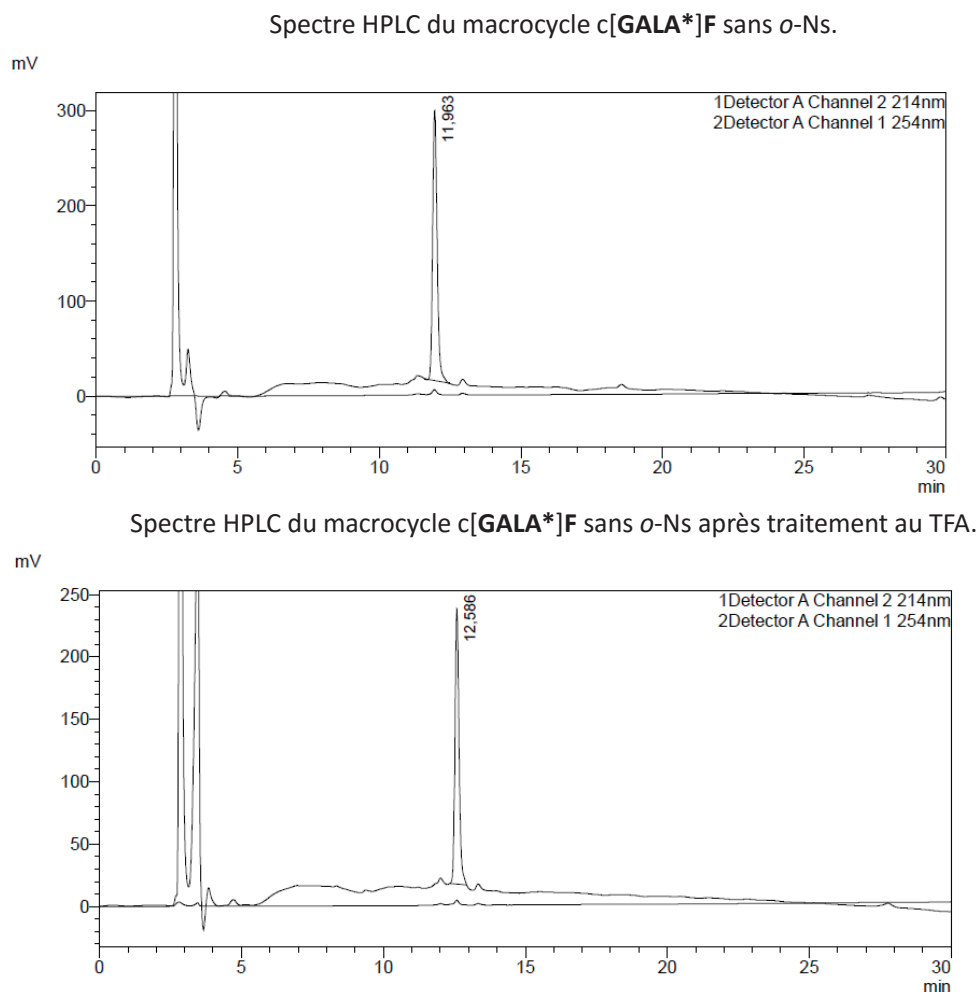


Figure 77. Le macrocycle c[GALA*]F est stable après déprotection du *o*-Ns.

Cette étude nous a permis de réinterpréter les résultats obtenus pour la cyclisation sur support solide par les deux voies de synthèse. Il est en effet possible que la cyclisation avait réussi, mais que le macrocycle a été dégradé pendant le clivage des peptides.

5.2 Étude de la cyclisation sur support solide

Après l'étude de la stabilisation du macrocycle c[GALA*]F, nous avons réfléchi aux deux voies de synthèse pour ce macrocycle. La première voie de synthèse n'avait pas réussi non seulement pour la cyclisation sur support solide mais également pour la cyclisation en solution. Le problème n'était donc pas uniquement la stabilité du groupement *o*-Ns. Pour la deuxième voie de synthèse (synthèse de macrocycle hydrosoluble), nous avons aussi essayé la cyclisation sur support solide après la déprotection du groupement *o*-Ns sur la résine. Elle a également échoué. L'empêchement de la cyclisation ne semble donc pas seulement être le problème de stabilité dû au groupement *o*-Ns.

Il y a plusieurs raisons pour que nous persévérions à effectuer la cyclisation sur support solide. D'une part, l'utilisation de support solide simplifie la synthèse des macrocycles. Une étape de purification en plus pendant la synthèse peut diminuer le rendement en macrocycle à la fin. D'autre part, si on ajoute des acides aminés avec des chaînes latérales protégées, le clivage des peptides linéaires enlève aussi les groupements de protection de la chaîne latérale (ce qui peut interférer avec la cyclisation en solution).

Dans la deuxième voie de synthèse, la cyclisation était effectuée par une formation de liaison amide entre le premier résidu et le deuxième. Nous pouvons aussi cycliser le peptide par la formation de liaison amide entre le deuxième et troisième résidu. La cyclisation dans cette position a besoin de la prolongation du peptide sur la chaîne alkyle. Cette prolongation permet d'avoir une chaîne plus longue et plus souple du côté de la chaîne alkyle qui pourrait peut-être permettre de cycliser le macrocycle sur phase solide. Cependant, la prolongation sur la chaîne alkyle serait un couplage peptidique avec un acide aminé libre en N-terminal et protégé en C-terminal.

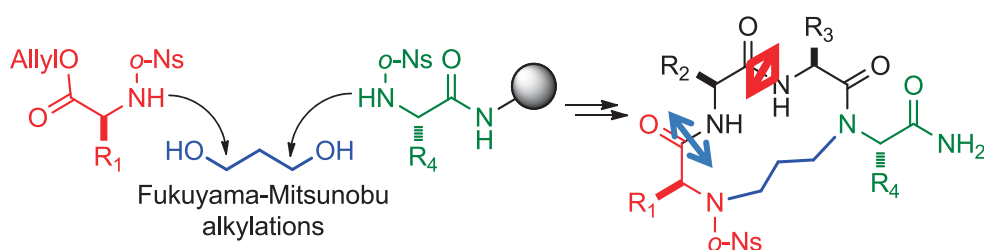


Schéma 31. Prolongation en C-terminal proposé.

The reaction scheme illustrates the synthesis of a cyclic peptide derivative. It begins with a diol (1,3-bis(hydroxymethyl)propan-2-ol) reacting with an N-allyl-L-alanine derivative (R₂-CH(NH-CO-O-Allyl)-CH₂-OH) and an N-protected-L-alanine derivative (R₁-CH(NH-CO-NH-o-Ns)-CH₂-OH) via Fukuyama-Mitsunobu alkylation. The resulting intermediate is a linear peptide derivative with a terminal N-allyl-L-alanine and an internal N-protected-L-alanine. This intermediate then undergoes cyclization to form the final cyclic peptide derivative, which is a cyclic peptide with a terminal N-allyl-L-alanine and an internal N-protected-L-alanine.

5.2.1 Synthèse de dipeptide *o*-Ns-AA₁-AA₂-OAllyl

$$\begin{array}{c}
 \text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{R}_2)-\text{COOH} + \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2 \xrightarrow[90\text{ }^\circ\text{C, r. t.}]{\text{HCl (gaz)}} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{R}_2)-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2 \\
 \text{42\%}
 \end{array}$$

$\text{R}_2 = \text{Ala}$

²³⁴ Jost M, Greie JC, Stemmer N, et al. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2002**, 41, 4267-4269

Ensuite, le dipeptide a été formé par un coulage peptidique avec l'agent de couplage CDI dans le THF.

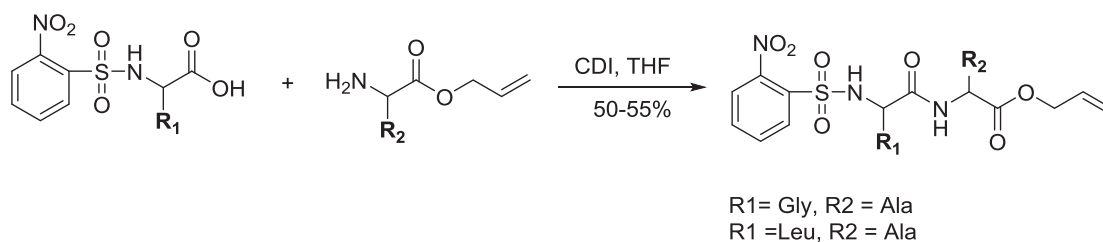


Schéma 34. Synthèse de dipeptide protégé par o-Ns et Oallyl (o-Ns-AA₁-AA₂-Oallyl).

Enfin, deux dipeptides ont été synthétisés : o-Ns-Gly-Ala-Oallyl et o-Ns-Leu-Ala-Oallyl.

5.2.2 Synthèse des macrocycles à l'aide de dipeptides

Le principe de la synthèse des macrocycles avec les dipeptides est similaire à la deuxième voie (paragraphe 3.2, **Schéma 29**). Cette « troisième voie » est représentée sur le **schéma 35**. La deuxième réaction de Fukuyama Mitsunobu introduit le dipeptide o-Ns-AA₁-AA₂-Oallyl. Puis, après la cyclisation sur support solide, on doit d'abord déprotéger le groupement o-Ns sur la résine avant de cliver le peptide.

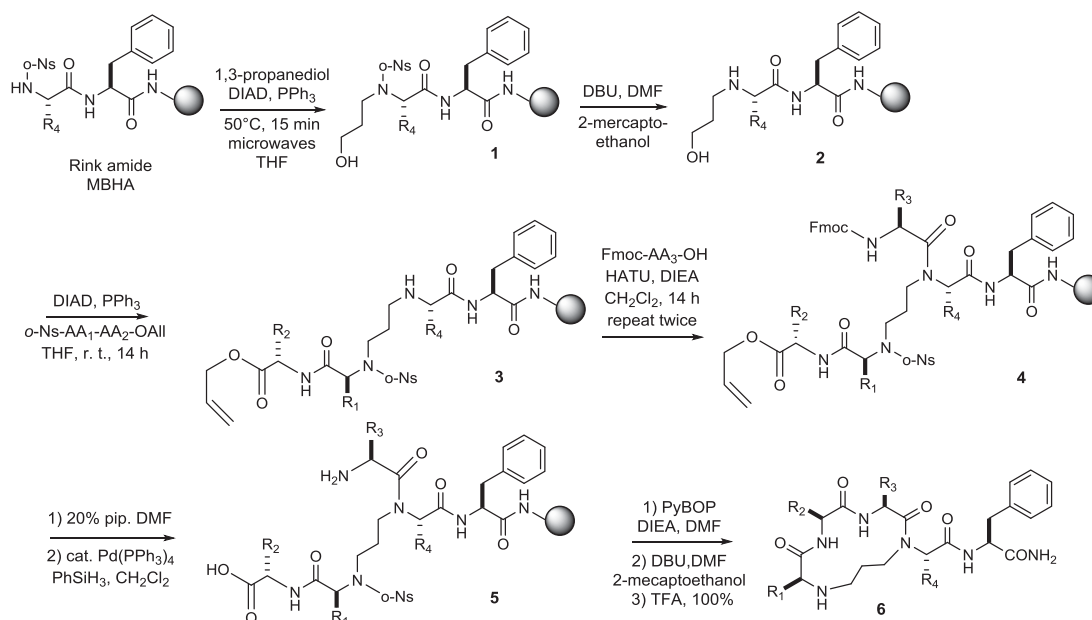


Schéma 35. Troisième voie de synthèse des peptides macrocycliques

Nous avons pris une séquence c[GALA*]F, un macrocycle qui a déjà été synthétisé par la deuxième voie de synthèse. Ce peptide macrocycle a été bien obtenu par cette nouvelle voie de synthèse avec la cyclisation sur support solide. Il a été confirmé par analyse d'HPLC et de spectroscopie de masse.

Puis, nous avons comparé l'étape de couplage difficile et le rendement de la synthèse avec les deux voies de synthèse pour ce macrocycle c[GALA*]F.

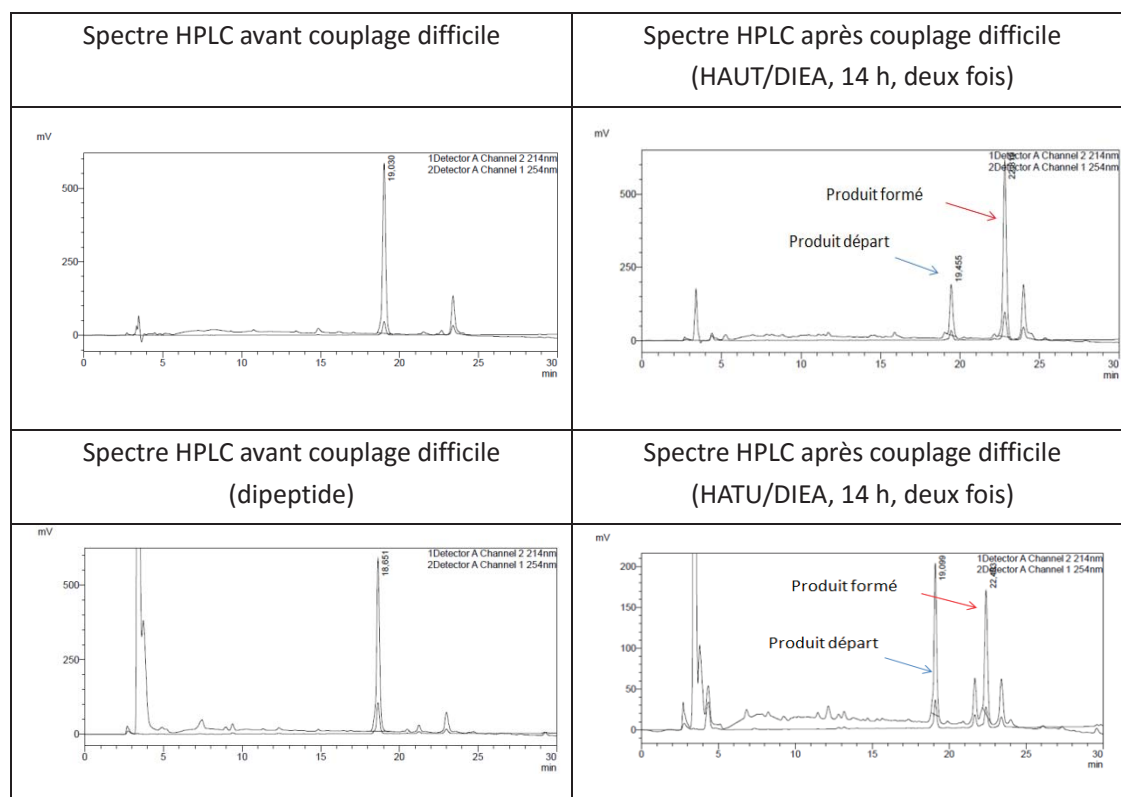


Figure 78. Comparaison de l'étape de couplage difficile pour la deuxième et troisième voie de synthèse.

Le rendement total pour ce macrocycle c[GALA*]F avec la deuxième voie de synthèse était de 11.2%. Il était 19.7% avec la troisième voie de synthèse.

En même temps, nous avons aussi essayé de synthétiser un peptide macrocyclique c[LAGA*]F à partir de *o*-Ns-Leu-Ala-OAllyl. Ce peptide linéaire n'a pas pu être cyclisé sur support solide. Le même problème s'est trouvé pour la synthèse de macrocycle c[LAKA*]F. Le succès de la cyclisation sur support solide semble donc dépendre de la séquence peptidique.

Selon la deuxième voie de synthèse, on peut aussi déprotéger le groupement *o*-Ns sur la résine avant d'essayer la cyclisation. Donc, nous avons aussi essayé de déprotéger le groupement *o*-Ns puis de cycliser le peptide linéaire LAGA*F sur la résine.

Selon l'analyse par HPLC et la spectroscopie de masse, la cyclisation semblait avoir réussi. Ensuite, nous l'avons analysé par RMN. Le spectre RMN était très différent de celui des autres peptides macrocycliques de la même série. L'étude de dichroïsme circulaire a aussi montré que la structure de ce peptide était totalement différente des autres. La déprotection de *o*-Ns a libéré la fonction amine du premier résidu. La cyclisation peut être réalisée entre le C-terminal et cette amine secondaire et former un cycle à 6 atomes de type dicétopipérazine (**Schéma 36**). Nous avons confirmé par RMN qu'après la déprotection du *o*-Ns sur la résine, la condition de cyclisation provoquait une formation de cycle à 6 atomes entre le dipeptide introduit. Par conséquent, le **Schéma 35** est la seule voie pour synthétiser les macrocycles avec la cyclisation sur support solide.

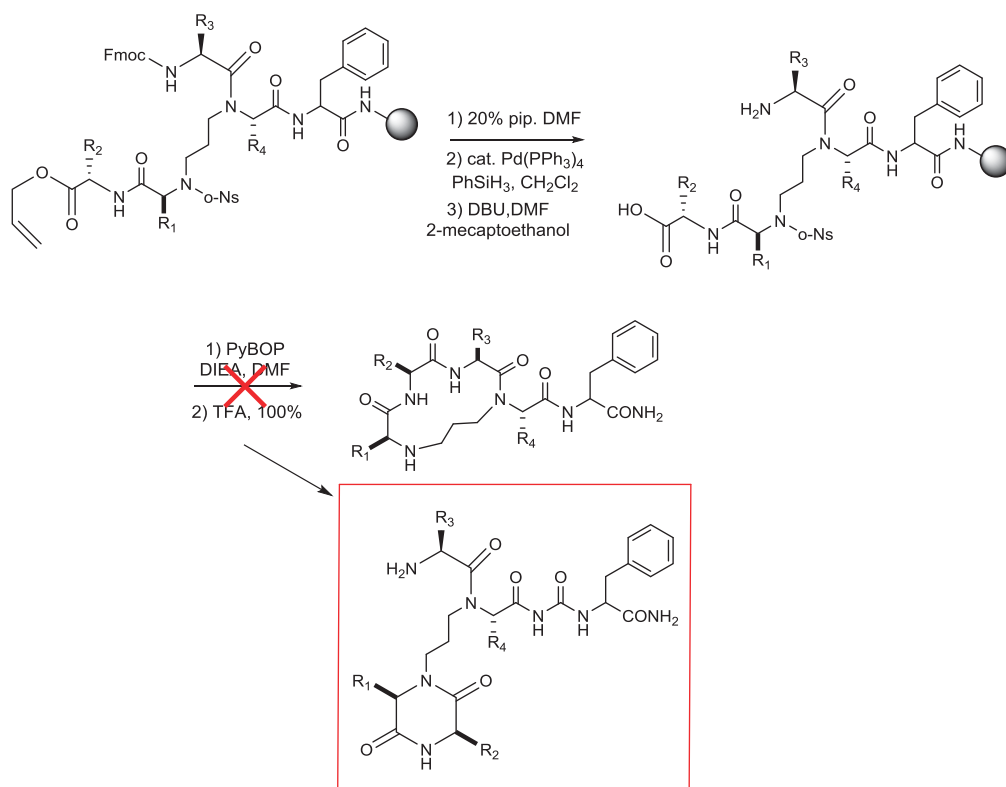


Schéma 36. Cyclisation intramoléculaire du dipeptide.

Nous avons synthétisé d'autres macrocycles comme c[**GAGA***]F et c[**GAKA***]F, par la cyclisation en phase solide. Ces résultats signifient que la séquence de dipeptide est importante pour la cyclisation sur support solide. Le premier résidu doit être flexible comme la **Gly**, le résidu Leu à cette position a empêché la cyclisation en phase solide. Les autres résidus n'ont pas encore été étudiés. Nous avons bien synthétisé le macrocycle c[**GAKA***]F avec une Lys qui était protégée sur la chaîne latérale par un groupement Boc. La réussite de la synthèse du macrocycle c[**GAKA***]F signifie qu'on peut envisager de synthétiser des peptides avec fonction biologique avec cette voie de synthèse.

5.3 Étude de la synthèse d'un peptide issu de l'hélice- α 1 du VEGF incorporant un macrocycle HBS

5.3.1 Conception

Les études structurales ont montré que les macrocycles avaient une structure favorisée en coude α , notamment pour les séquences c[GALA*]F et c[LALA*]F. La cyclisation sur support solide était finalement réalisée avec certaines séquences. Tous ces résultats nous permettent de continuer à synthétiser un peptide en hélice α en insérant le macrocycle en position N-terminale pour ensuite étudier sa conformation et son activité biologique.

Dans la partie précédente, nous avons travaillé sur le développement d'inhibiteurs peptidiques des VEGFR. Une partie importante était constituée par les inhibiteurs qui miment l'hélice α 1 du VEGF. Certains peptides modifiés étaient plus structurés en hélice α et ils ont montré une meilleure inhibition de l'interaction que la séquence naturelle de l'hélice α 1. Donc, nous avons proposé de synthétiser un peptide basé sur la séquence naturelle de l'hélice α 1 du VEGF en insérant un macrocycle à 13-atomes dans la séquence.

La conception de ce peptide était basée sur l'interaction de l'hélice α 1 du VEGF (₁₃EVVKFMDVYQRSY₂₅) avec le VEGFR1 D2 (**Figure 79**). Les trois résidus aromatiques sont responsables des principales interactions avec le VEGFR1 D2. L'introduction de macrocycle en N-terminal doit conserver ces trois résidus aromatiques. En plus, l'étape de cyclisation sur support solide de la synthèse de macrocycle était encore limitée à un seul dipeptide o-Ns-Gly-Ala-O-Allyl. Par conséquent, nous avons décidé d'ajouter un macrocycle que nous avons déjà synthétisé et étudié. Parmi les trois macrocycles c[GAGA*]F, c[GALA*]F et c[LALA*]F, seul c[GAGA*]F et c[GALA*]F ont pu être synthétisés par cyclisation sur support solide, et c[GALA*]F est plus structuré en coude α par rapport à c[GAGA*]F. Donc, le macrocycle c[GALA*]F a été choisi pour la synthèse de ce peptide. De plus, la Phe est présente aussi dans la l'hélice α 1 du VEGF. Nous avons donc remplacé les quatre résidus (₁₃EVVK₁₆) par le macrocycle c[GALA*] pour avoir le peptide c[GALA*]FMDVYQRSY. Pour éviter le problème d'oxydation, nous avons également remplacé la Met par une Nle (norleucine). La synthèse du peptide c[GALA*]FN^{le}DVYQRSY a donc été entreprise.

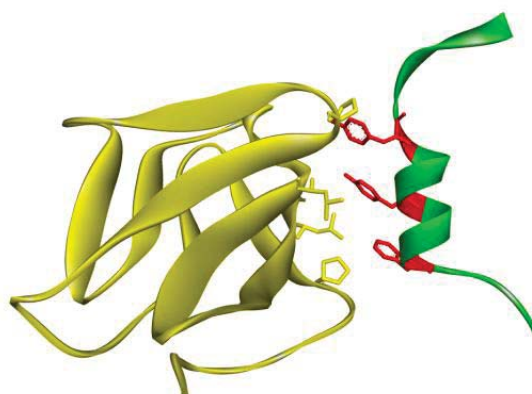


Figure 79. L'interaction de l'hélice $\alpha 1$ du VEGF avec VEGFR1 D2.

5.3.2 Synthèse

Dans un premier temps, nous avons voulu synthétiser ce peptide sur la phase solide avec une résine Rink amide MBHA par la méthode de dipeptide. Le peptide linéaire o-Ns-**AFN**^{le}**DVYQRSY**-résine a été synthétisé par la méthode SPPS dans le synthétiseur Liberty 1.

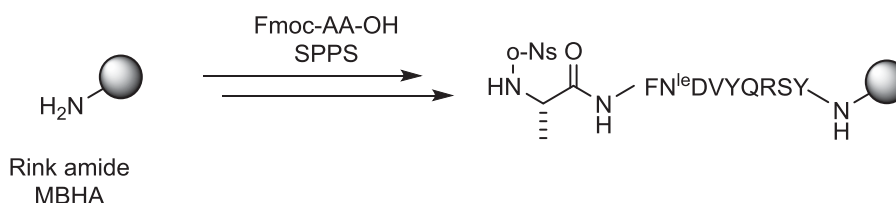


Schéma 37. SPPS de peptide linéaire.

Une petite quantité de ce peptide linéaire a été clivé de la résine et analysé par HPLC et spectrométrie de masse pour confirmer sa bonne séquence linéaire.

Ensuite, nous désirions introduire le macrocycle sur l'extrémité N-terminale de ce peptide linéaire par la voie de synthèse de macrocycle hydrosoluble (**Schéma 37**). A notre surprise, la première réaction de Fukuyama-Mitsunobu, utilisée normalement pour introduire la chaîne alkyle, n'a pas bien réussi sur ce peptide linéaire plus long avec plusieurs résidus fonctionnalisés. D'après analyse HPLC et spectrométrie de masse, la réaction de Fukuyama Mitsunobu n'était pas complète et même après une répétition de cette étape, il restait encore 50 % de produits départs.

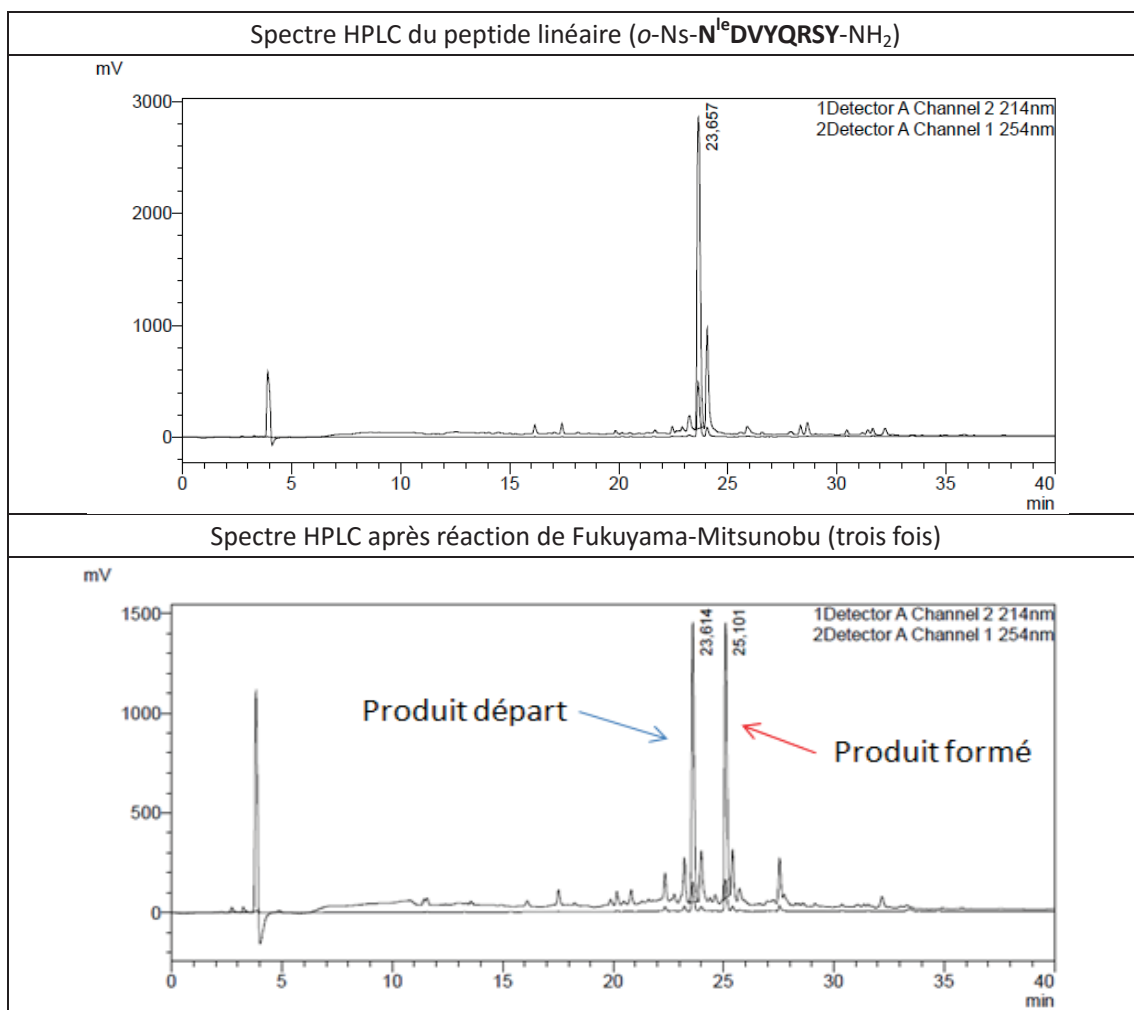


Figure 80. Réaction de Fukuyama-Mitsunobu incomplète après plusieurs répétitions.

De plus, le produit formé de la réaction avait une masse -18 par rapport à la masse théorique. Ce problème de masse -18 peut-être dû à une déshydratation de la fonction alcool libre. Dans ce cas, la suite de la synthèse ne peut plus être réalisée.

Afin d'obtenir ce peptide, nous avons décidé d'utiliser une méthode de condensation de deux fragments, le macrocycle et le peptide en hélice- α 1 du VEGF. La synthèse de peptide par la condensation de fragments peut-être réalisée entre deux fragments de peptide en solution²³⁵ ou un fragment en solution couplé avec un autre fragment sur support solide²³⁶. Pour nous, le rendement de la synthèse du macrocycle était limité à environ à 10 %. Cette condensation va consommer beaucoup de macrocycle. La condensation de deux fragments en solutions semble plus appropriée pour la synthèse de ce peptide.

En conséquent, ce peptide c[GALA*]FN^{le}DVYQRSY a été synthétisé à partir de deux fragments, un fragment de macrocycle c[GALA*]F-OH avec une fonction acide en

²³⁵ Nyfeler R. *Methods Mol Biol.* **1994**, 35, 303-316

²³⁶ Rinnová M, Lebl M, Souček M. *Letters in Peptide Science.* **1999**, 6, 15-22

C-terminal et un fragment de peptide de l'hélice- α 1 du VEGF H₂N-N^{le}DVYQRSY avec une fonction amine en N-terminal.

Le fragment H₂N-N^{le}DVYQRSY a été synthétisé par SPPS avec une résine Sieber amide qui est sensible à des conditions acides. Le clivage de la résine avec 1 % de TFA dans du CH₂Cl₂ sans déprotéger de groupements protecteurs des autres résidus. L'analyse de ce fragment par HPLC et spectrométrie de masse a été réalisée sur le peptide sans groupements protecteurs car le peptide avec groupements protecteurs est très hydrophobe. Le fragment obtenu à la fin était un peptide brut sans purification avec les chaînes latérales protégées.

Le fragment du macrocycle c[GALA*]F-OH a été synthétisé avec une résine Wang qui donne une fonction acide après le clivage final. La synthèse a suivi la troisième voie de synthèse des macrocycles (**Schéma 35**). Cependant, le macrocycle obtenu à la fin a une fonction amine libre sur le premier résidu **Gly**. Cette amine libre pouvait provoquer une réaction secondaire avec la fonction acide C-terminal d'un autre macrocycle. Donc, on doit protéger cette fonction amine ou l'acétyler pour éviter la polymérisation du macrocycle.

D'abord, nous avons acétylé ce macrocycle avec l'anhydride acétique en conditions basiques (DIEA). Le macrocycle acétylé a été bien obtenu par cette acétylation en solution. Mais, après la purification de Ac-c[GALA*]F-OH, nous avons essayé la condensation entre les deux fragments obtenus avec un agent de couplage HATU/DIEA. Aucun produit final n'a été détecté. Le problème a été ensuite découvert par la resynthèse du macrocycle. On voudrait réaliser l'acétylation de la fonction amine sur support solide avant de cliver le macrocycle final. Nous avons trouvé que le macrocycle n'était pas stable dans l'acide non plus après l'acétylation d'amine à cette position comme le groupement *o*-Ns. Ces résultats pourraient expliquer aussi le fait que la condensation de Ac-c[GALA*]F-OH et H₂N-N^{le}DVYQRSY ne pouvait pas donner le produit final. Car après la condensation, le peptide a été traité avec une solution de TFA/Tips/H₂O (95:2.5:2.5) pour enlever tous les groupements protecteurs de la chaîne latérale. Le macrocycle s'était dégradé pendant la déprotection.

Enfin, nous avons décidé de tester la stabilité du macrocycle après protection de l'amine par un groupement Boc. La protection de Boc a été réalisée avec Boc₂O en condition basique. Puis, une petite quantité de peptide a été mis dans la même solution de déprotection. Le groupement Boc a été bien enlevé par cette solution et le macrocycle n'était pas dégradé. Puis, le groupement Boc a été introduit sur le macrocycle afin de réaliser la condensation.

La condensation de Boc-c[**GAL*A**]F-OH et H₂N-N^{le}**DVYQRSY** a été réalisée dans le DMF avec HATU/DIEA comme agent de couplage. Selon les résultats obtenus (**Figure 81**), la masse correspond au produit final c[**GAL*A**]FN^{le}**DVYQRSY** a été détectée par spectrométrie de masse. Cependant, le produit de bonne masse est sous forme de plusieurs pics dans le chromatogramme HPLC. Nous n'avons pas encore réussi à synthétiser une grande quantité de macrocycle afin de pouvoir séparer les différents isomères.

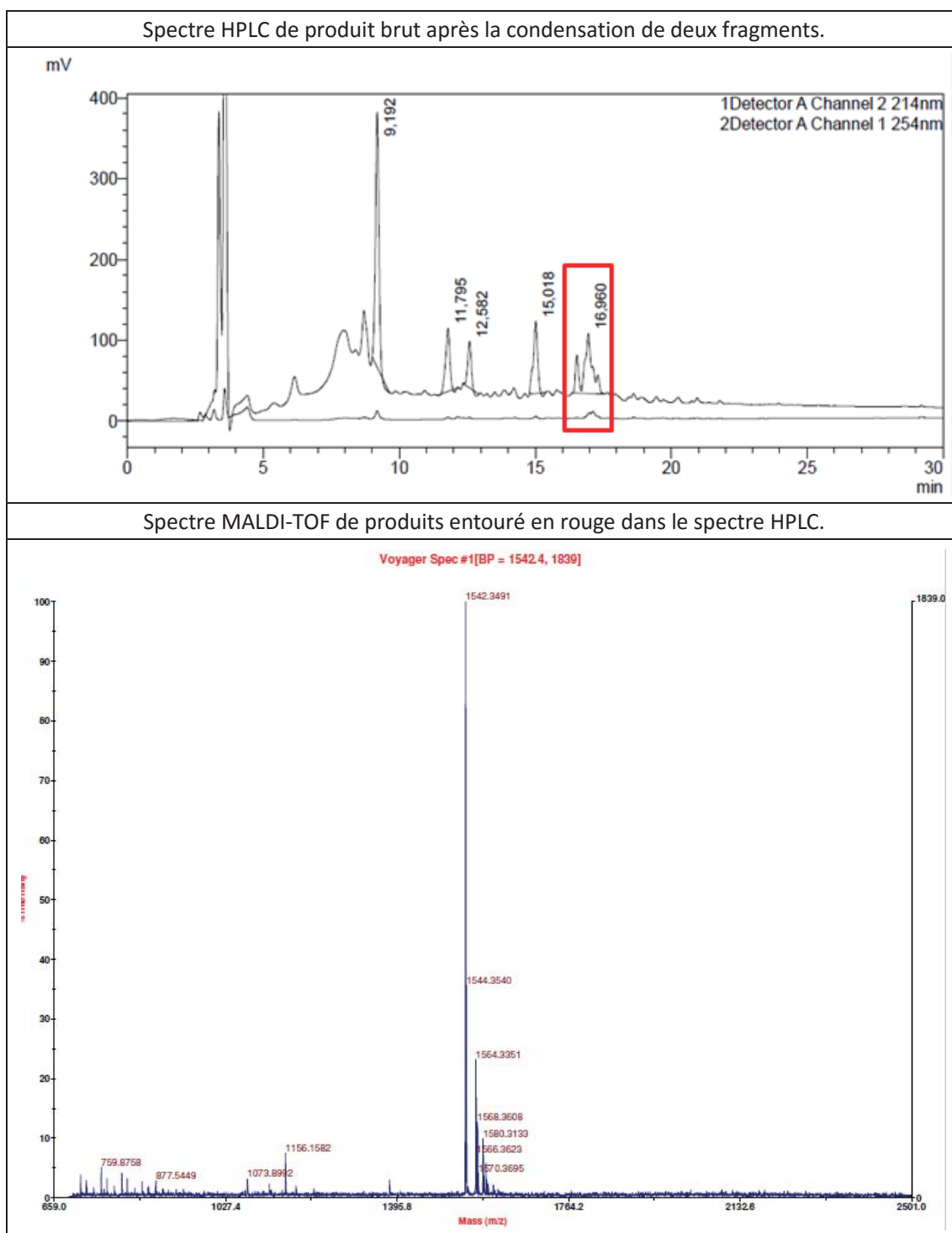


Figure 81. Analyse par HPLC et MALDI-TOF pour la réaction de condensation.

VI. Conclusions

La stratégie « hydrogen-bond surrogate » est importante dans le développement d'agents peptidiques en conformation hélice α .

Basé sur cette stratégie « hydrogen-bond surrogate », nous avons conçu et synthétisé de nouveaux peptides macrocycliques à 13 atomes. Après plusieurs études de synthèse, une voie de synthèse sur phase solide a été développée pour produire une série de macrocycles modèles.

La première série de macrocycles était très hydrophobe à cause du groupement protecteur *o*-Ns. Nous avons réussi à déprotéger ce groupement et donc à obtenir des macrocycles hydrosolubles. Ceci nous a permis d'étudier leur conformation en solution aqueuse par CD, RMN et modélisation. Ces études structurales ont montré que ces macrocycles à 13 atomes favorisaient une conformation coude α . Cet effet dépend des acides aminés dans la séquence, et la Gly défavorisait la conformation en coude α .

Les études de stabilité d'un macrocycle nous ont donné des informations sur les problèmes pouvant survenir pendant la synthèse. Puis, l'introduction d'un dipeptide dans la synthèse a résolu le problème de la cyclisation sur support solide. Même si cette cyclisation sur support solide est encore limitée par la séquence, elle nous a facilité l'application de ce macrocycle dans la synthèse de peptide avec fonction biologique.

Un peptide mimant l'hélice α_1 du VEGF avec un macrocycle a été synthétisé par une combinaison de deux fragments. Ce peptide a été identifié par HPLC analytique et spectrométrie de masse. Malheureusement, nous n'avons pas pu en avoir une quantité suffisante pour les études structurales et les tests biologiques à cause des faibles rendements de synthèse de macrocycle et de la réaction de combinaison.

Conclusions et perspectives

Les interactions protéine-protéine (PPIs) sont des interactions spécifiques qui jouent un rôle important dans divers processus biologiques dont des processus pathologiques comme l'angiogenèse tumorale. Le développement d'inhibiteurs de PPI est une approche thérapeutique qui a été validée dans le traitement de nombreuses maladies. La conception rationnelle d'inhibiteurs peptidiques est une des branches importantes dans le développement d'inhibiteurs de PPIs.

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons focalisé notre attention sur le développement d'inhibiteurs du VEGFR par conception rationnelle. Quatre axes de recherche ont été réalisés : 1) peptides modifiés en position C-terminale pour améliorer l'affinité d'un inhibiteur développé antérieurement ; 2) peptides conçus à partir de différents sites d'interaction de trois ligands du VEGFR1 ; 3) peptides mimant l'hélice $\alpha 1$ du VEGF, avec des modifications de séquences et la stabilisation de la conformation hélice α ; 4) peptides associés de différents sites d'interaction du VEGF.

Les études sur le développement de peptides modifiés en position C-terminale se sont affranchies du problème possible de traces de Pd⁽⁰⁾ qui ont pu survenir dans les travaux antérieurs. Une baisse d'affinité a été observée pour l'inhibiteur de référence. Cependant, ces travaux de modifications ont finalement identifié trois peptides avec des affinités améliorées. Les études RMN d'un des trois meilleurs inhibiteurs ont confirmé son interaction avec le récepteur ($K_d = 196 \mu M$). Puis, l'effet anti-angiogénique des deux peptides a été confirmé par un test d'inhibition de formation de microtubes à partir de cellules HUVE. Dans le développement d'inhibiteurs du VEGFR1 par différents sites d'interaction de ses trois ligands, nous avons tout d'abord découvert que les peptides mimant la boucle L1, le site d'interaction des trois ligands avec le VEGFR D3, avaient la meilleure affinité pour bloquer l'interaction VEGF/VEGFR, notamment le peptide conçu à partir de la boucle L1 du VEGF-B. Trois peptides mimant la boucle L1 inhibent la formation de microtubules à partir de cellules HUVE. La modification de la séquence de l'hélice- $\alpha 1$ du VEGF n'a pas permis de beaucoup améliorer l'affinité des peptides. Cependant, l'utilisation d'un nouvel acide aminé modifié sur sa chaîne latérale avec des fonctions thiols pour stabiliser la conformation en hélice α du peptide a permis d'identifier un peptide monocyclique avec une affinité améliorée. L'affinité du peptide monocyclique n'a pas été améliorée, mais cette stratégie pourrait être importante dans le développement de peptides contraints. Les peptides associés à partir de différents sites d'interaction du VEGF étaient moins actifs pour bloquer d'interaction VEGF/VEGFR. Mais, cette stratégie de conception est aussi importante dans le développement d'inhibiteurs de PPIs.

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, un nouveau peptide macrocyclique de type HBS a été conçu et développé. Le développement de ce macrocycle a été effectué afin de stabiliser la conformation en hélice α de peptides. Cette étude a permis non seulement de synthétiser ce macrocycle, mais aussi de l'appliquer dans les peptides mimant l'hélice $\alpha 1$ du VEGF.

Pendant ces premiers temps, plus d'études ont été faites pour la synthèse et la caractérisation de ce macrocycle. Beaucoup de difficultés ont été découvertes, et certaines surmontées, pendant la synthèse (solubilité, stabilité, polymérisation, rendement, cyclisation en phase solide, etc.). Finalement, nous avons réussi à développer une voie de synthèse pour synthétiser des peptides macrocycliques hydrosolubles. Ces peptides ont montré une structure favorisée en coude α (un tour d'hélice α) par trois études différentes, RMN, dichroïsme circulaire et modélisation moléculaire. Puis, la cyclisation en phase solide a finalement été réussie par l'utilisation d'un dipeptide dans la synthèse. La synthèse d'un peptide utilisant ce macrocycle avec l'hélice $\alpha 1$ du VEGF a été réalisée. Malheureusement, nous n'avons pas pu obtenir une quantité suffisante de la molécule finale pour les études structurales ou les tests biologiques. Cependant, ce travail a montré qu'il est possible d'appliquer ce peptide macrocyclique de type HBS dans les peptides avec fonctions biologiques.

En conclusion, ce travail de thèse a enrichi la banque d'inhibiteurs d'interaction VEGF/VEGFR. De nouvelles approches sont également proposées telles que la boucle L1 de différents ligands du VEGFR1, l'importance du domaine D3 du VEGFR dans l'interaction avec ligands ainsi que la fonction biologique de nouveaux peptides macrocycliques de type HBS et leur application dans de longs peptides structurés en hélice α .

Experimental section

General

1. Reagents

The reagents for chemical synthesis were purchased from Aldrich, Alfa Aesar, Acros, TCI or SDS Carlo-Erba. All Fmoc protected amino acids, peptide synthesis reagents and resins (Rink amide MBHA, NovaSyn TGA, Sieber amide, Wang LL) were purchased from Novabiochem. The solvents were obtained from SDS Carlo-Erba and NMR solvents were from Eurisotop.

2. General peptide synthesis

The synthesis of peptides was performed in solid phase using Fmoc chemistry and different resins on microwave assisted CEM-Liberty 1 synthesizer, with HBTU/DIEA or DIC/Oxyma Pure as coupling reagents and 20% piperidine in DMF or 20% piperidine in DMF containing 0.1 M Oxyma Pure to deprotect Fmoc group. For peptides acetylated at the N-terminal, the peptide was finally coupled with acetic acid in the presence of coupling reagents. Except particular peptides, peptides were then cleaved from resin with simultaneous removal of side chain protecting groups by treatment with a 10 mL solution containing 95% TFA, 2.5% H₂O and 2.5% TIPS for the peptides without cysteine residues or 94% TFA, 2.5% H₂O, 1% TIPS and 2.5% EDT for the peptides with cysteine during 3 h at room temperature. The resin was then filtered off and the filtrate was evaporated, precipitated in cold diethyl ester, and collected by centrifugation.

3. Purification and HPLC analysis

Crude peptides were first analyzed on a Shimadzu Prominence LC-20AD HPLC using a GRACE Vydac Protein and Peptide 218TP column (4.6×250 mm), with dual UV detection at 214 nm and 254 nm and a linear A-B gradient (A: 0.1% TFA aqueous; B: 0.09% TFA in 70% aqueous acetonitrile) at a flow rate of 1 mL/min. Then the peptides were purified on Shimadzu semi-preparative HPLC system using a GRACE Vydac Protein and Peptide 218TP column (10×250 mm) at flow rate of 2 mL/min. Fractions were rechecked by analytical HPLC as described, the pure fractions were collected and lyophilized to give white solid peptides.

4. Cysteine-containing peptides cyclization

Purified and lyophilized linear peptides containing free thiol groups were dissolved in 0.1 M NH_4HCO_3 solution at a concentration of 1 mM. Cyclisation was realized by air oxidation at room temperature for 48h and controlled by HPLC for the complete oxidation.

5. MALDI-TOF mass spectrometry analysis

The final purified peptides were analyzed by MALDI-TOF. A mixture of 2 μL matrix solution (in 50% acetonitrile aqueous solution) and 2 μL peptide (approximately 50 μM in acetonitrile aqueous solution) was loaded on the 96-well plate. After evaporation of solvent, the sample was analyzed by MALDI mass spectrometry (Voyager-DE™ PRO Biospectrometry™ Workstation, PerSeptive Biosystems).

6. VEGFR1 binding assay

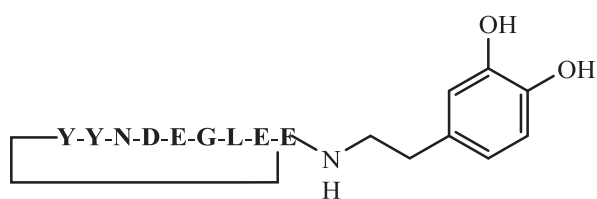
High-binding 96-well (Corning Life Sciences, Netherlands) plates were coated with humanized extracellular domains (ECD) of VEGFR-1 (R&D Systems, Abingdon, UK) (20 ng/well) in phosphate-buffered saline solution (PBS 1X, pH 7.4) at 4 °C overnight. Then the plates were washed three times with 200 μL per well washing buffer (PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20, buffer A) and treated with PBS containing 3% (w/v) BSA at 37 °C for 2 h. After three washing steps with buffer A, 50 μL of peptide solutions at twice the desired final concentration (in PBS 1X containing 2% DMSO) were added in triplicate wells and the plates were incubated at 37 °C for 1 h, followed by a 50 μL solution of (0.1 ng/well) btVEGF-A₁₆₅ (R&D Systems, Abingdon, UK) in PBS containing 2% DMSO. The final mixture was kept for 2 h at 37 °C and washed four times with buffer A. A solution of diluted 1:8000 (v/v) in PBS (containing 0.1% (v/v) Tween 20 and 0.3% (w/v) BSA) Streptavidin-Horseradish Peroxidase (which recognize specifically the btVEGF-A₁₆₅ bound, from Amersham, Pittsburgh, PA, USA,) 100 μL was then added to each well. After 45 minutes incubation at 37 °C and in the dark, the plates were washed five times with buffer A. 100 μL SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA) was added and the chemiluminescence was quantified with a Perkin Elmer Victor 2 spectrophotometer (Victor Wallac Multilabel reader). The percentages of displacement were calculated by the following formula: $100 \times [1 - (S - \text{NS}) / (\text{MS} - \text{NS})]$ where S is the signal measured, NS is the nonspecific binding signal defined as the signal measured in the absence of coated receptor on the microplate, and MS is the maximum binding signal obtained with btVEGF-A₁₆₅ without competitor.

Chapitre 3

Part 1: Development of C-terminal substituted cyclic peptides

Peptide **1-19** (number according to **Article 1**) and their related modified amino acids were prepared and characterized according to the **Experimental Section** of **Article 1**.

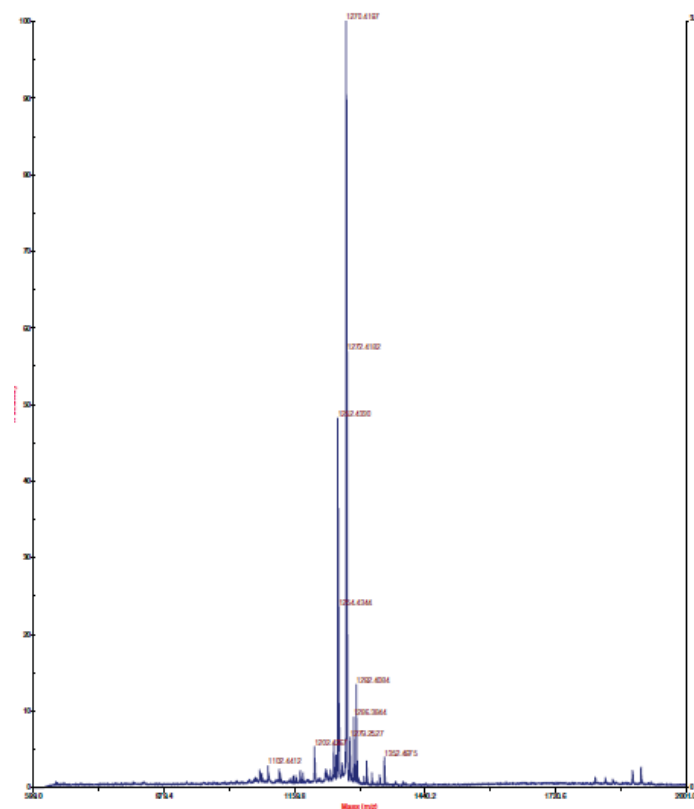
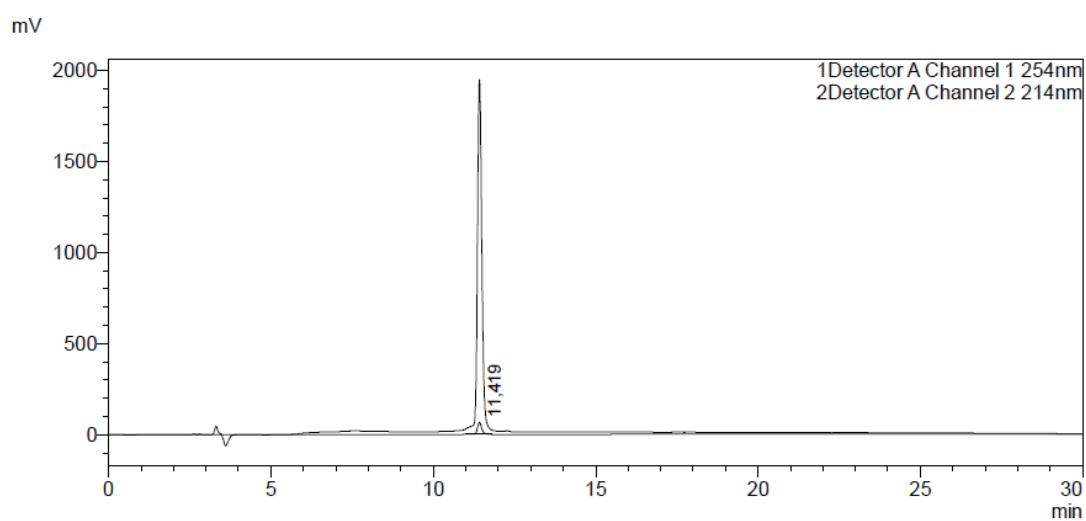
Peptide 58


$$\text{C}_{57}\text{H}_{72}\text{N}_{11}\text{O}_{21}$$

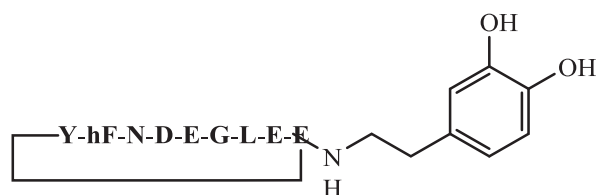
Exact Mass: 1246.49
Molecular Weight: 1247.26

MS (MALDI) found: $[M+Na]^+$ 1270.42.

HPLC: Rt = 11.4 min (30 – 100 % of solution B in 30 min)



Peptide 59



$C_{54}H_{68}N_9O_{18}$

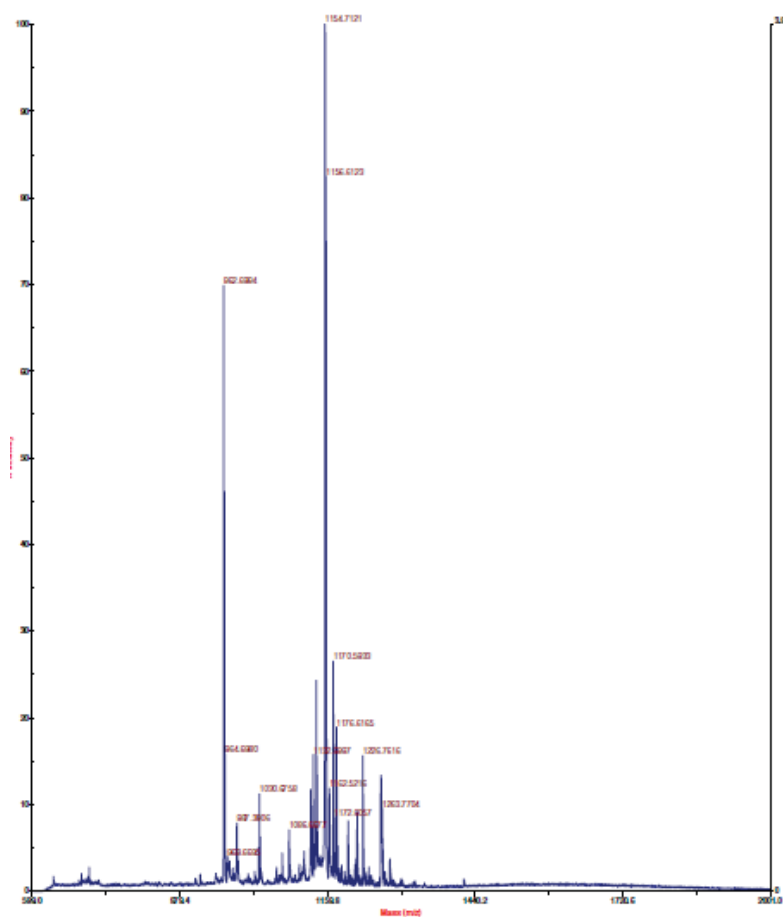
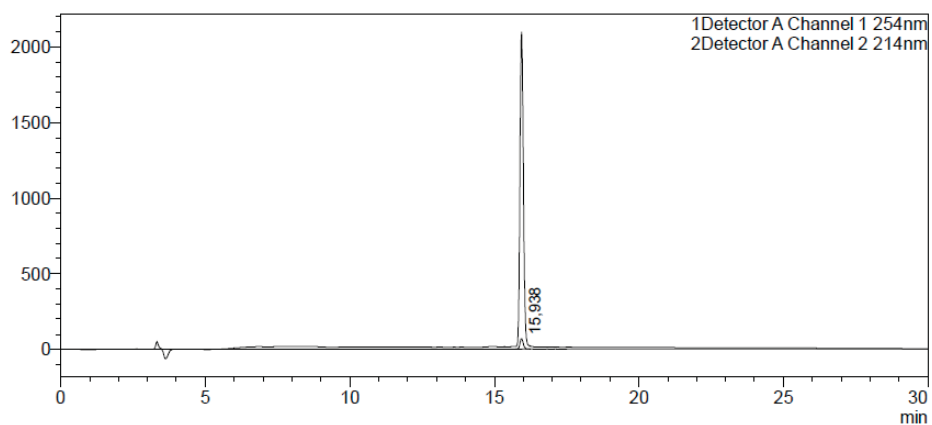
Exact Mass: 1130.47

Molecular Weight: 1131.18

MS (MALDI) found: $[M+H]^+$ 1132.70 and $[M+Na]^+$ 1154.71.

HPLC: Rt = 15.9 min (30 – 100 % of solution B in 30 min)

mV



Part 2: Identification of VEGFR1 antagonists by scanning binding epitope of 3 ligands

Peptide **1-19** (number according to **Article 3**) were prepared and characterized according to the **Experimental Section** of **Article 3**.

Part 3: Development of helical peptide antagonists of VEGFR1

Peptides **20-31** were synthesized on solid phase by CEM-Liberty 1 system at a 0.1 mmol scale with Rink amide MBHA resin, following **General Peptide Synthesis** procedure.

Peptide 20

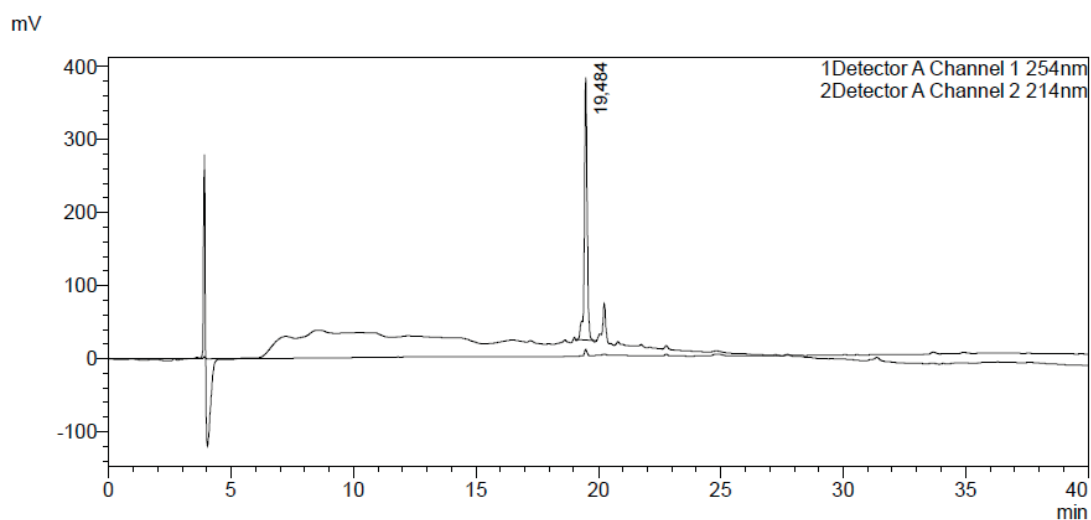


Exact Mass: 1248.56

Molecular Weight: 1249.41

MS (ESI) found: 1250.23 [M+H⁺]

HPLC: Rt = 19.4 min (10 – 100 % of solution B in 30 min)



Peptide 21

Ac-K-F-M-D-V-Y-Q-R-S-Y-NH₂

C₆₃H₉₂N₁₆O₁₇S

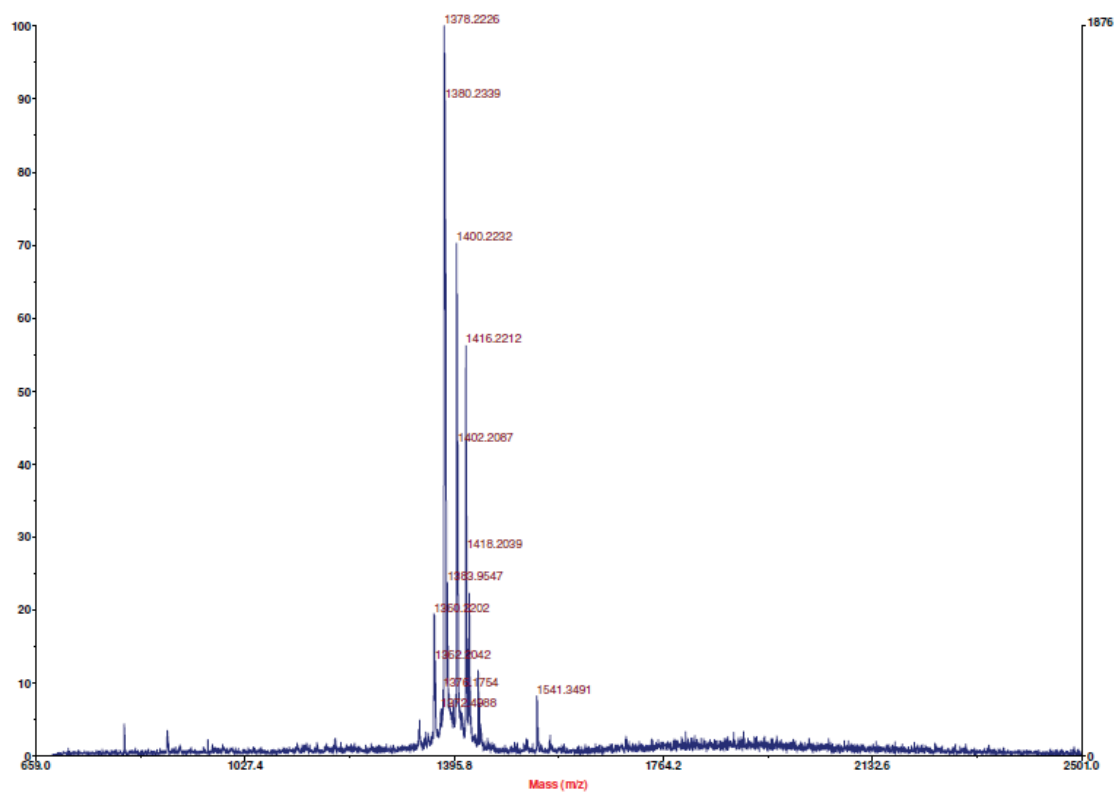
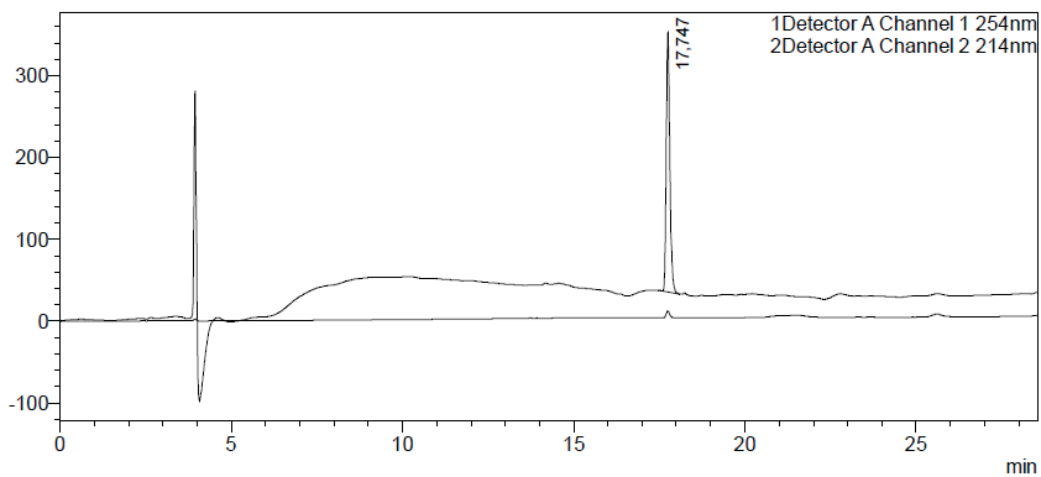
Exact Mass: 1376.65

Molecular Weight: 1377.58

MS (MALDI) found: [M+H]⁺ 1378.22 and [M+Na]⁺ 1400.22.

HPLC: Rt = 17.7 min (10 – 100 % of solution B in 30 min)

mV



Peptide 22

K-F-M-D-V-Y-Q-R-S-Y-NH₂

C₆₁H₉₀N₁₆O₁₆S

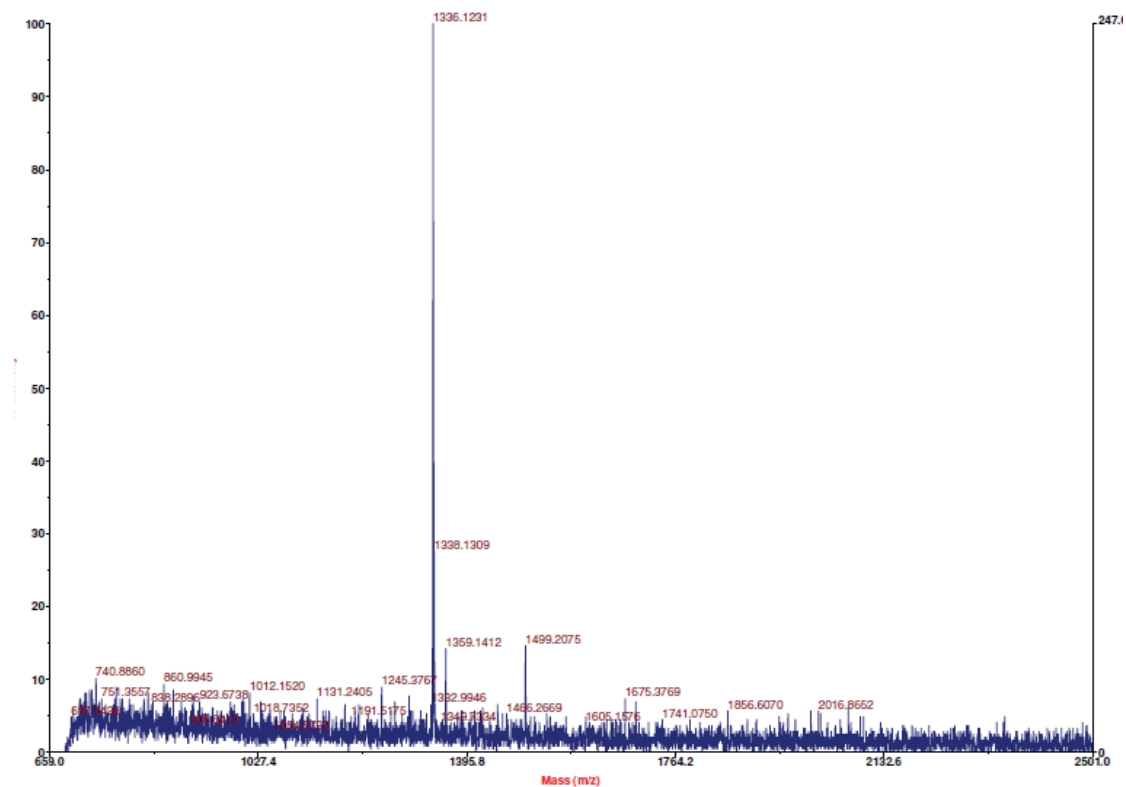
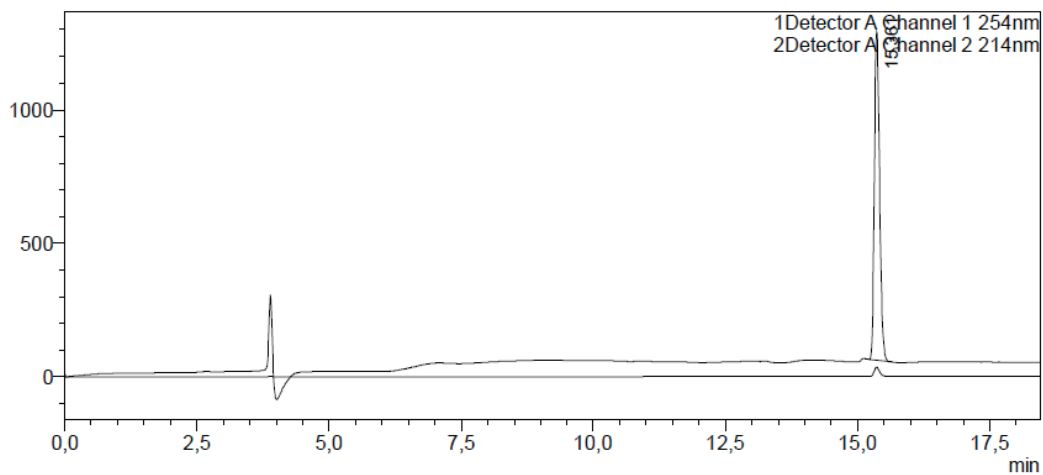
Exact Mass: 1334.64

Molecular Weight: 1335.55

MS (MALDI) found: [M+H]⁺ 1336.12.

HPLC: Rt = 15.3 min (10 – 100 % of solution B in 30 min)

mV



Peptide 23

E-V-V-K-F-M-D-V-Y-Q-R-S-Y-S-E-P-NH₂

$C_{89}H_{134}N_{22}O_{27}S$

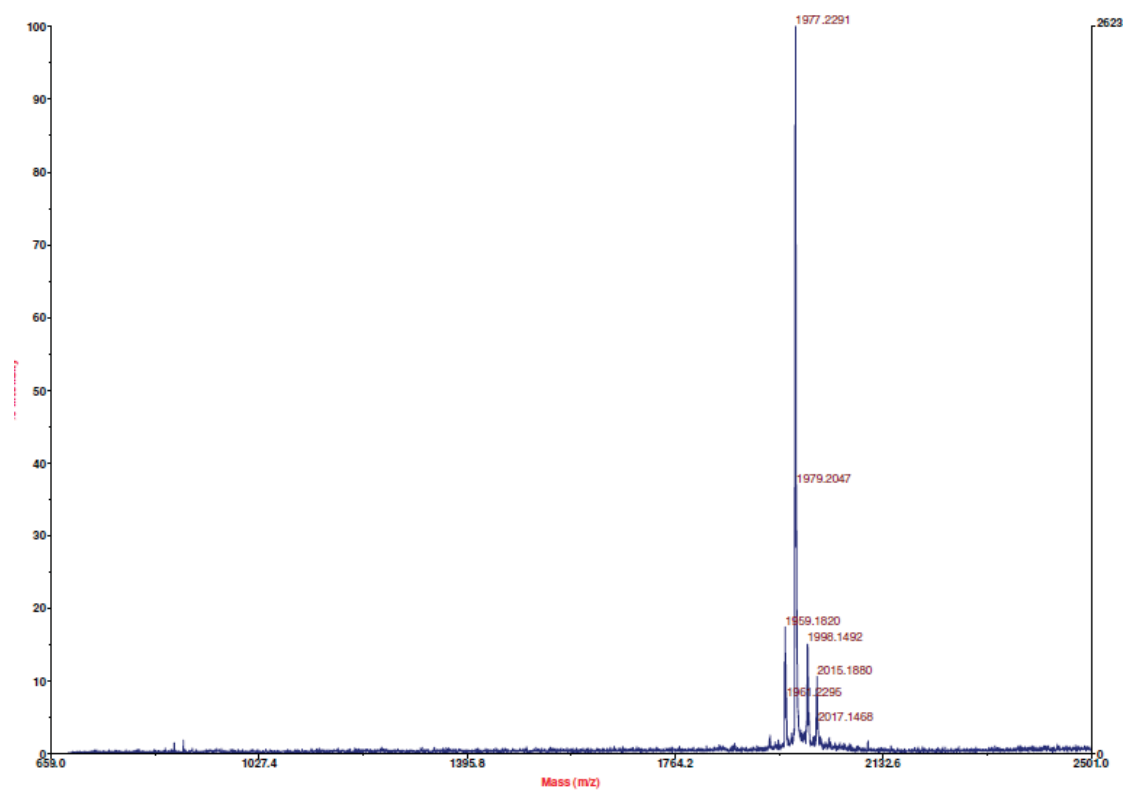
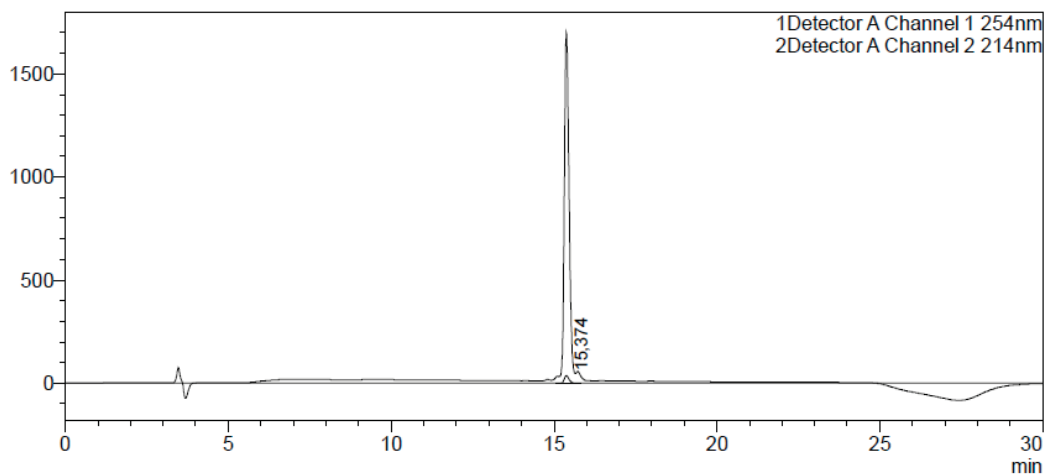
Exact Mass: 1974.95

Molecular Weight: 1976.24

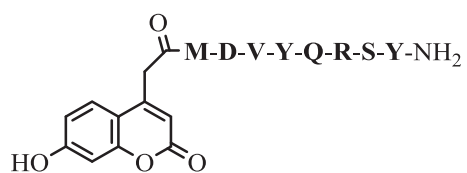
MS (MALDI) found: $[M+H]^+$ 1977.23.

HPLC: Rt = 15.3 min (20 – 60 % of solution B in 20 min)

mV



Peptide 24



C₅₇H₇₅N₁₃O₁₈S

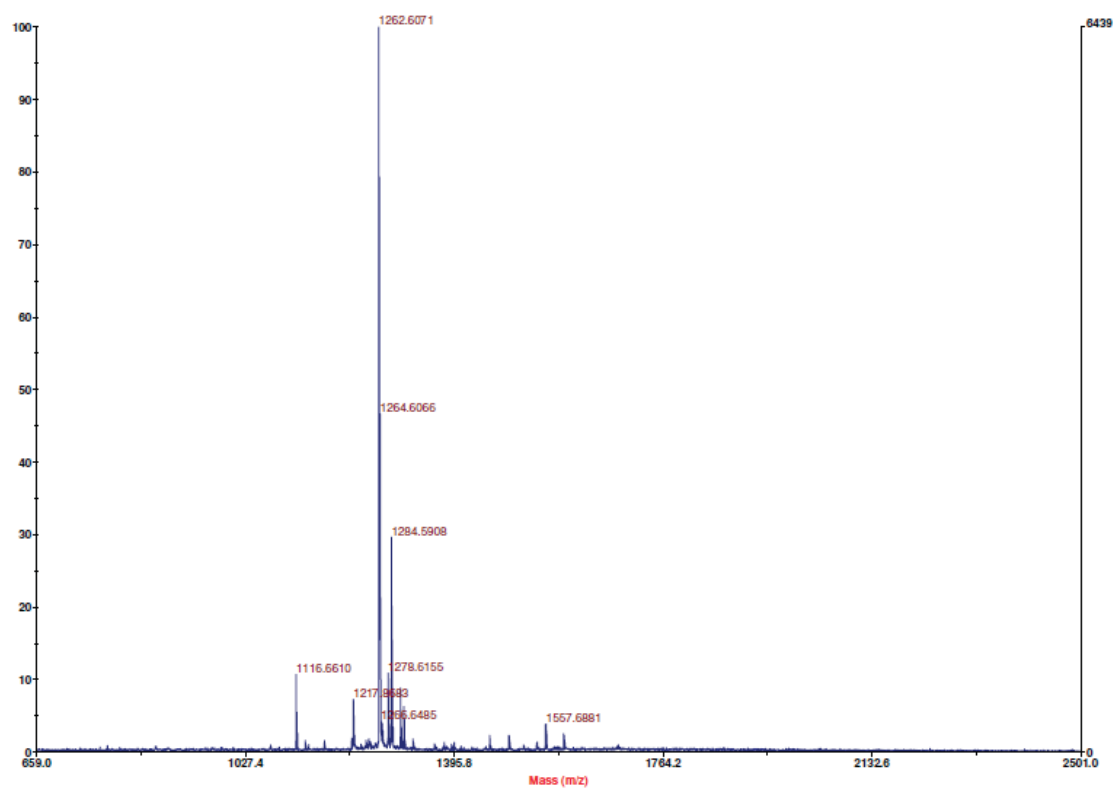
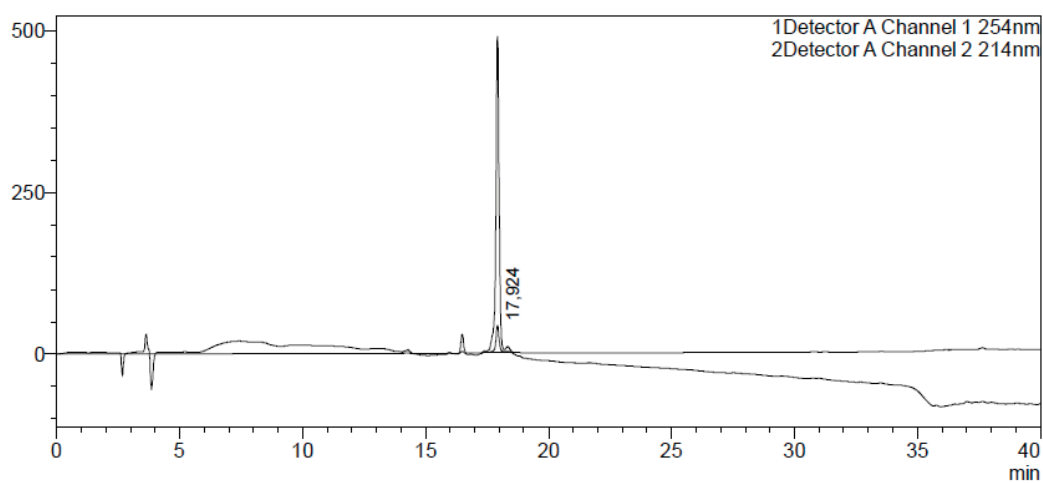
Exact Mass: 1261.51

Molecular Weight: 1262.36

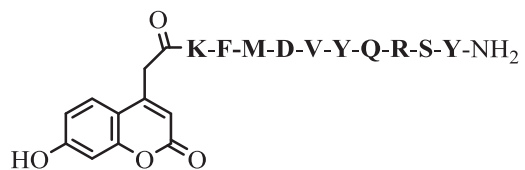
MS (MALDI) found: [M+H⁺] 1262.61

HPLC: Rt = 17.9 min (20 – 80 % of solution B in 30 min)

mV



Peptide 25



$C_{72}H_{96}N_{16}O_{20}S$

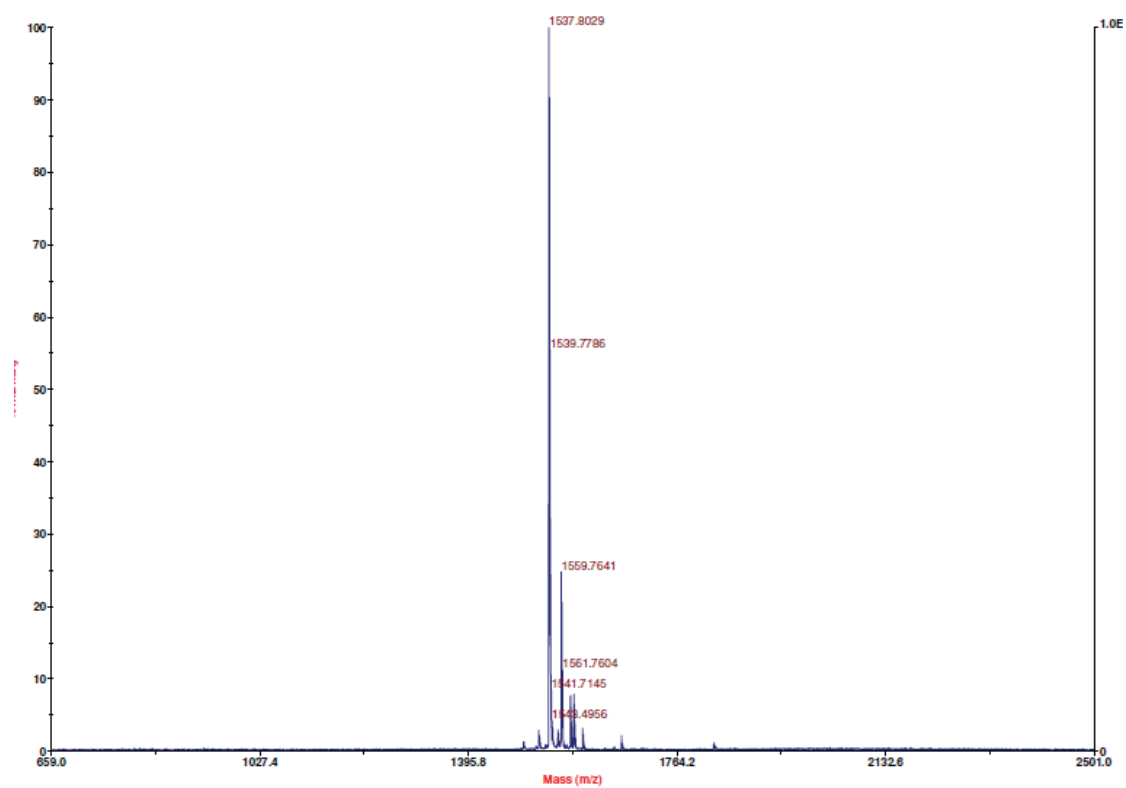
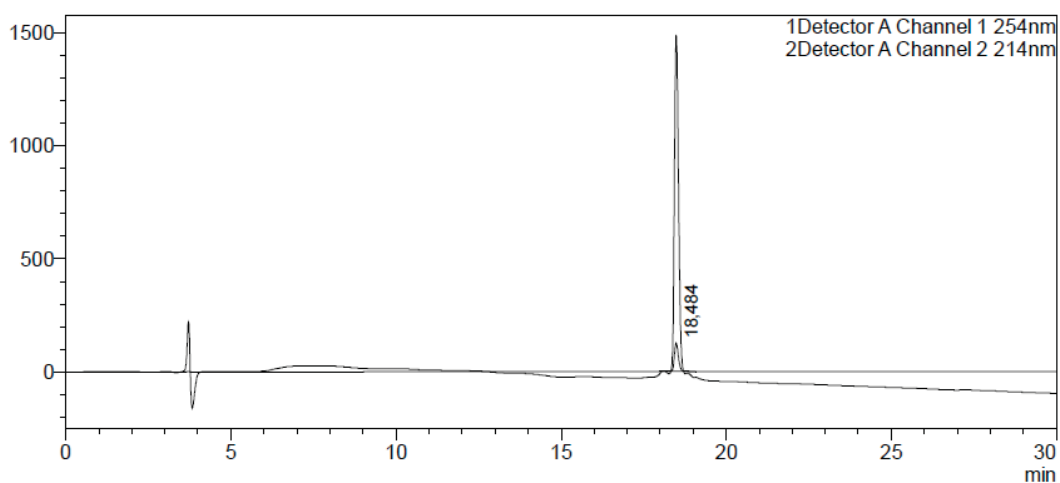
Exact Mass: 1536.67

Molecular Weight: 1537.71

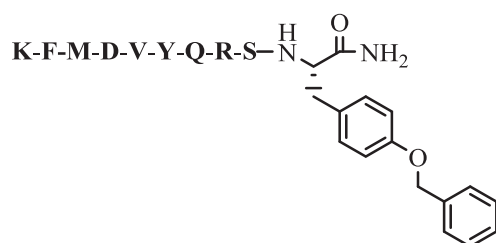
MS (MALDI) found: $[M+H]^+$ 1537.80

HPLC: Rt = 18.4 min (20 – 80 % of solution B in 30 min)

mV



Peptide 26



C₆₈H₉₆N₁₆O₁₆S

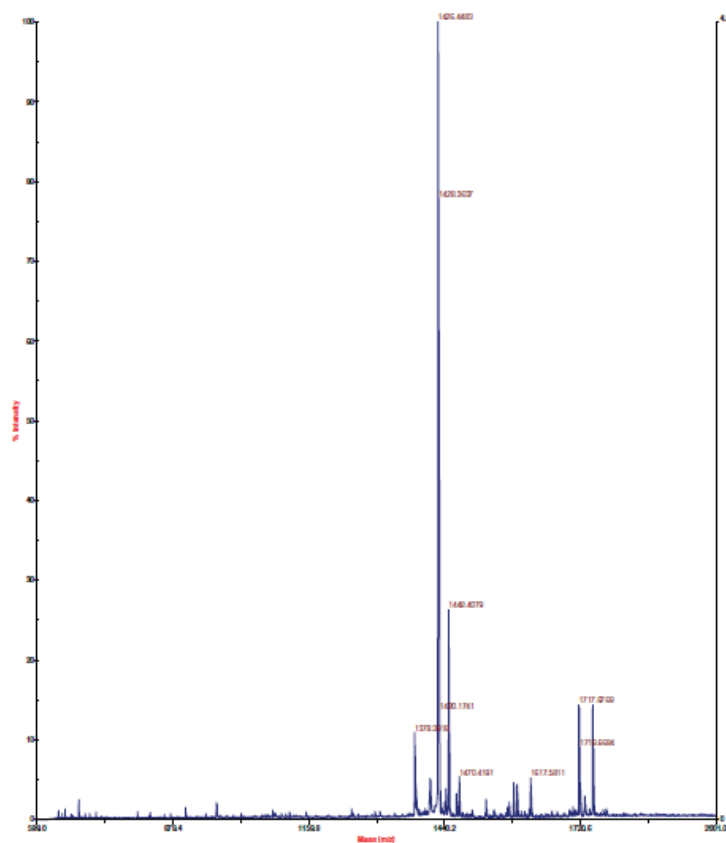
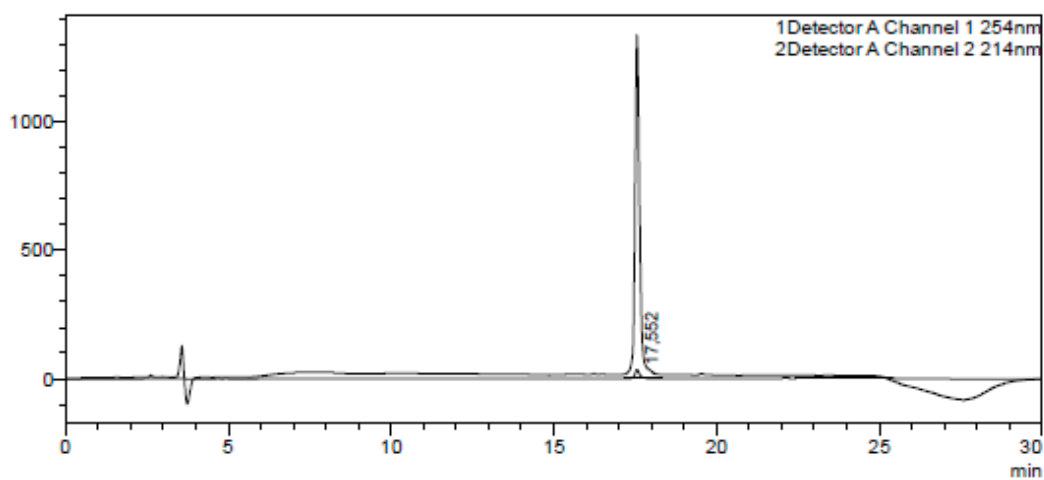
Exact Mass: 1424.69

Molecular Weight: 1425.67

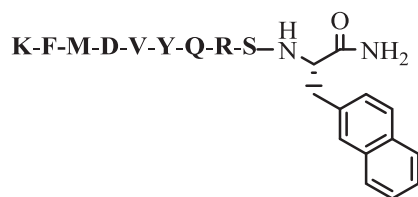
MS (MALDI) found: [M+H]⁺ 1426.44

HPLC: Rt = 17.5 min (20 – 60 % of solution B in 20 min)

mV



Peptide 27



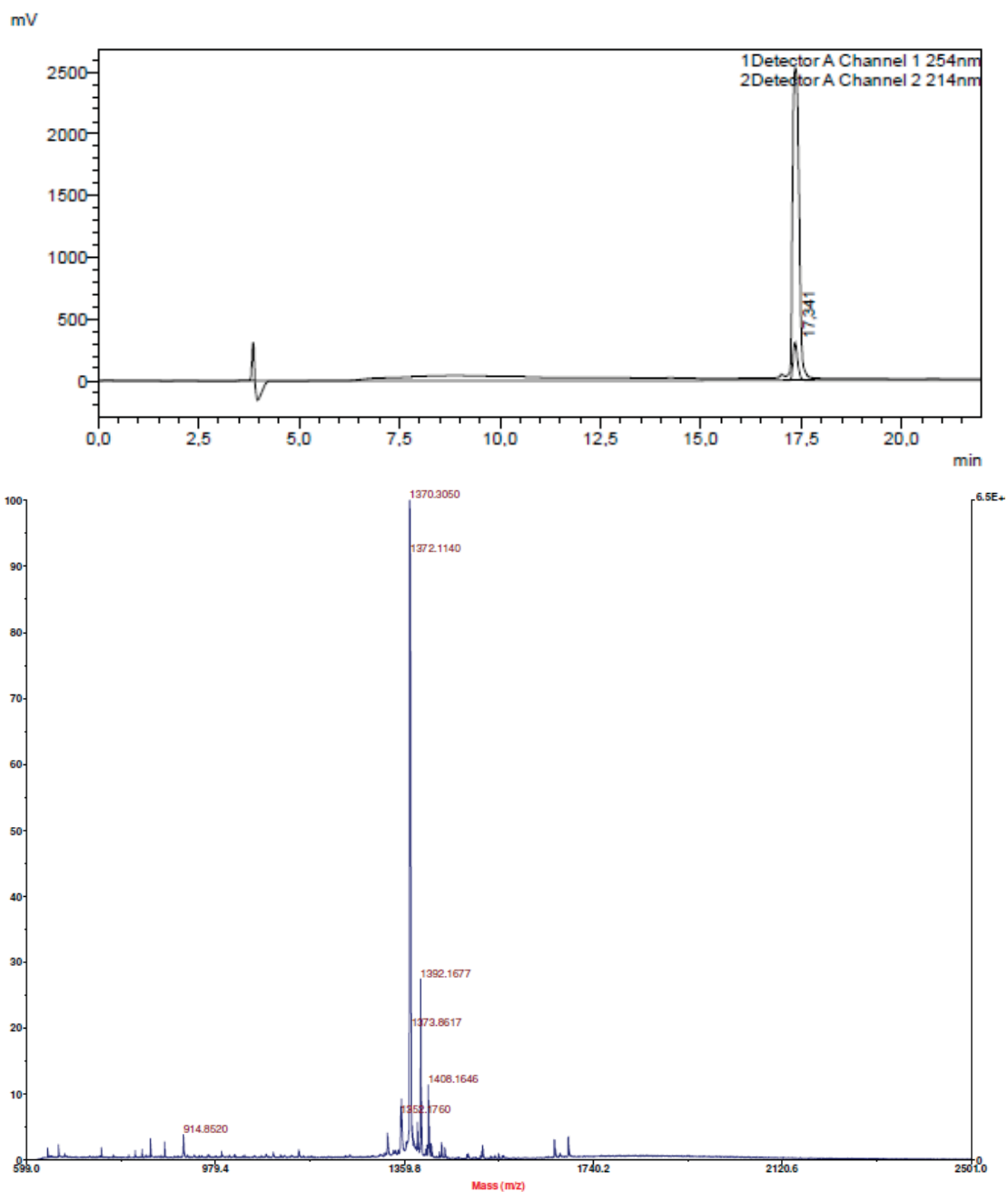
C₆₅H₉₂N₁₆O₁₅S

Exact Mass: 1368.66

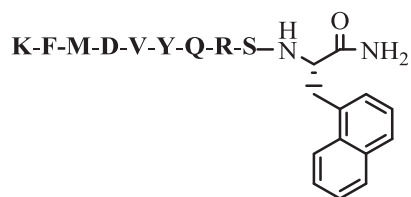
Molecular Weight: 1369.61

MS (MALDI) found: [M+H]⁺ 1370.30, [M+Na]⁺ 1392.16

HPLC: Rt = 17.3 min (10 – 100 % of solution B in 30 min)



Peptide 28



C₆₅H₉₂N₁₆O₁₅S

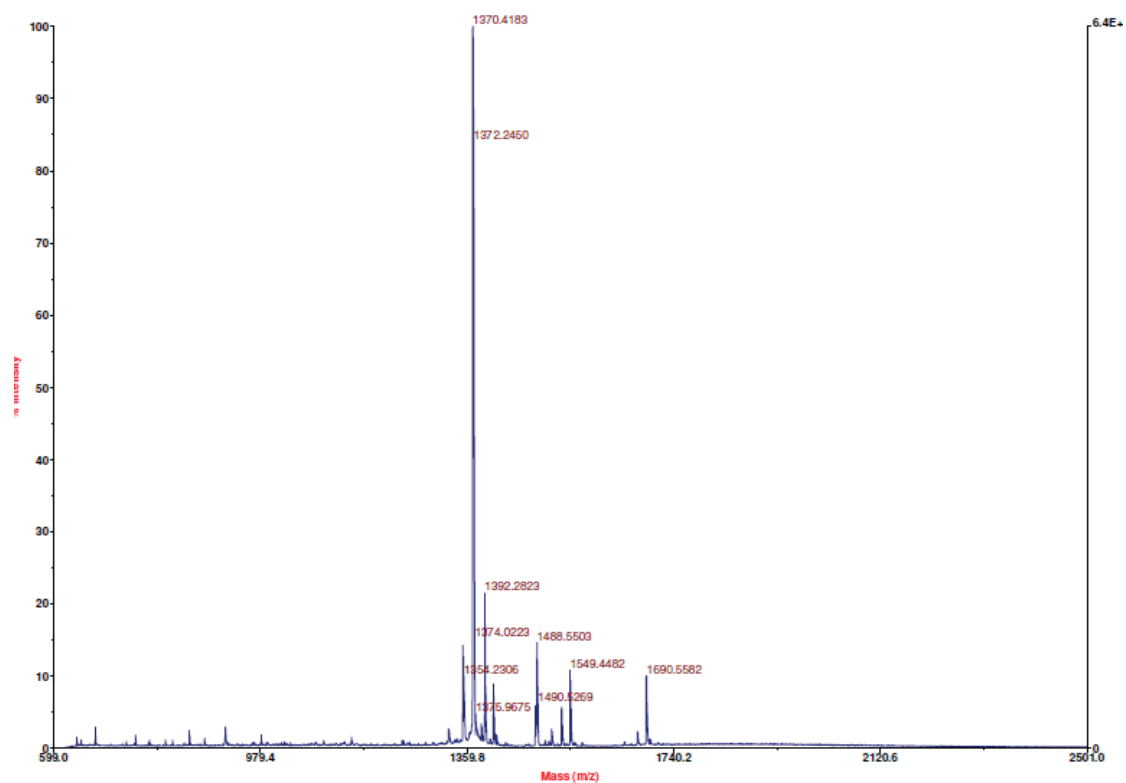
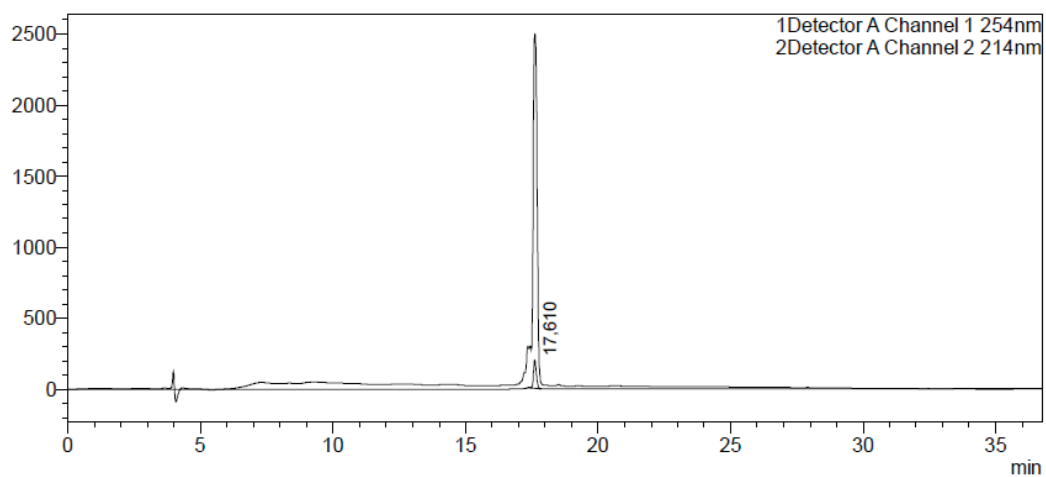
Exact Mass: 1368.66

Molecular Weight: 1369.61

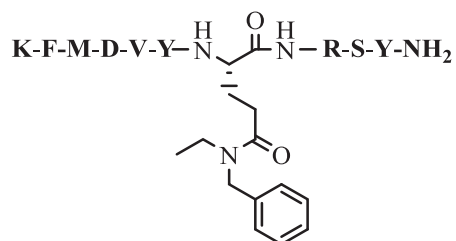
MS (MALDI) found: [M+H]⁺ 1370.41, [M+Na]⁺ 1392.28

HPLC: Rt = 17.6 min (10 – 100 % of solution B in 30 min)

mV



Peptide 29



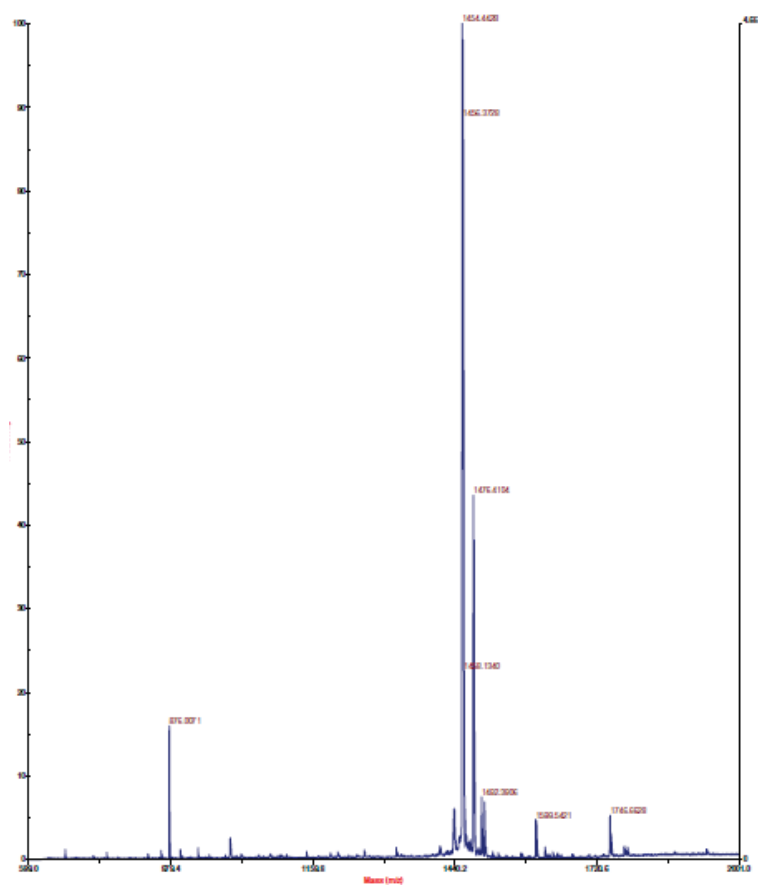
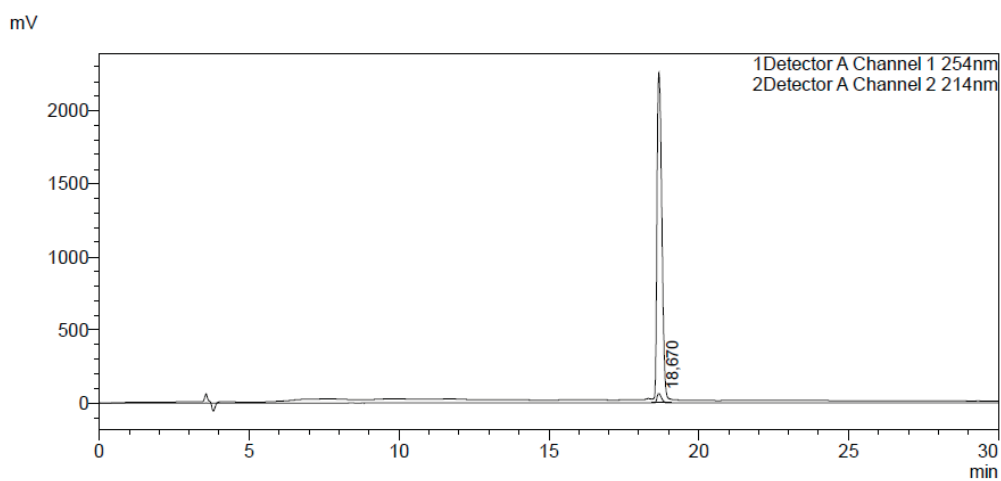
$\text{C}_{70}\text{H}_{100}\text{N}_{16}\text{O}_{16}\text{S}$

Exact Mass: 1452.72

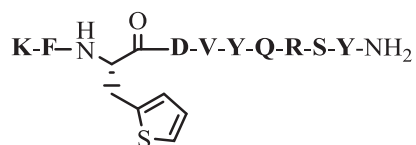
Molecular Weight: 1453.73

MS (MALDI) found: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1370.41, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1392.28

HPLC: Rt = 18.6 min (20 – 80 % of solution B in 30 min)



Peptide 30



$C_{63}H_{88}N_{16}O_{16}S$

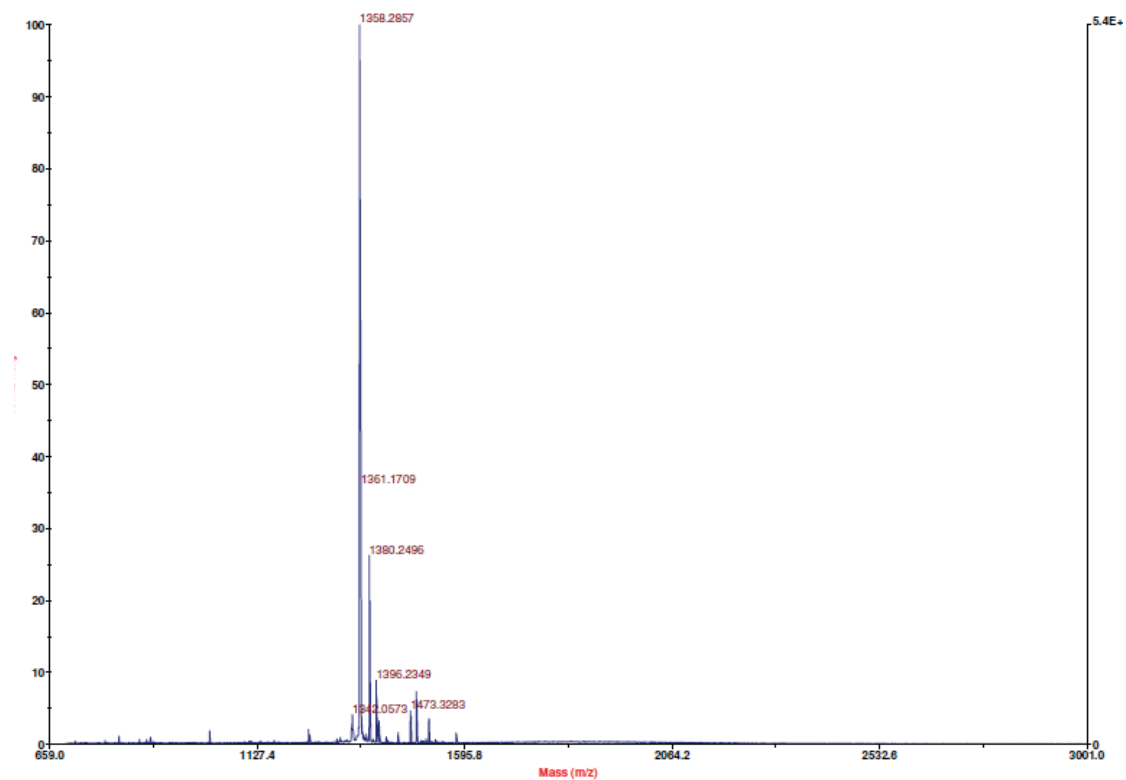
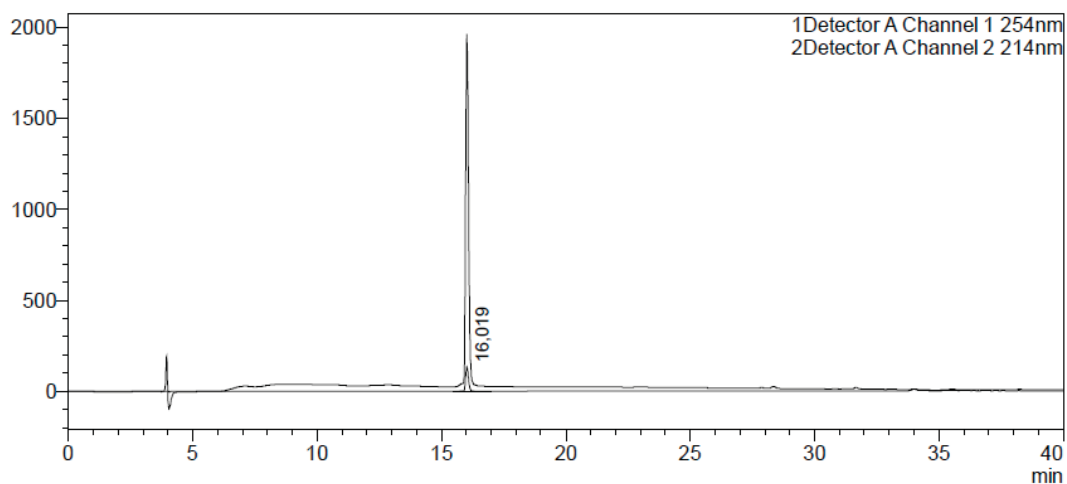
Exact Mass: 1356.63

Molecular Weight: 1357.55

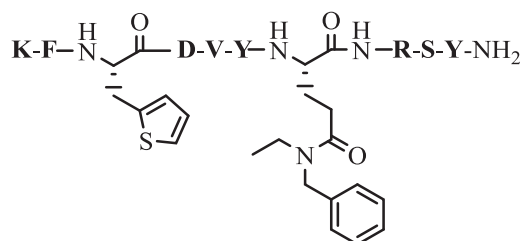
MS (MALDI) found: $[M+H]^+$ 1358.28, $[M+Na]^+$ 1380.24

HPLC: R_t = 16.0 min (10 – 100 % of solution B in 30 min)

mV



Peptide 31



C₇₂H₉₈N₁₆O₁₆S

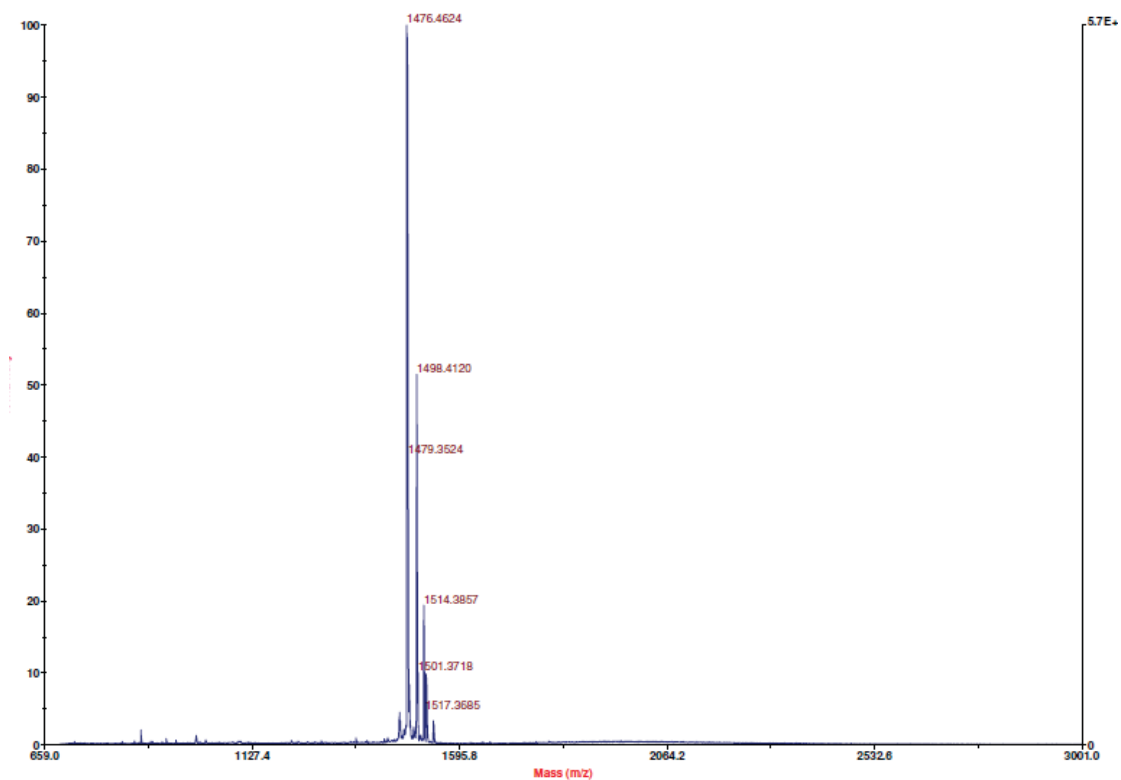
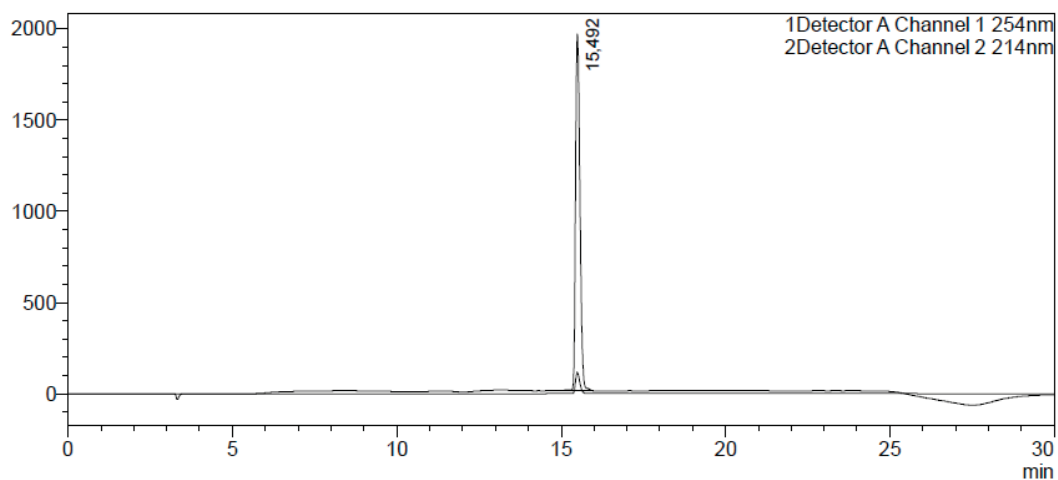
Exact Mass: 1474.71

Molecular Weight: 1475.73

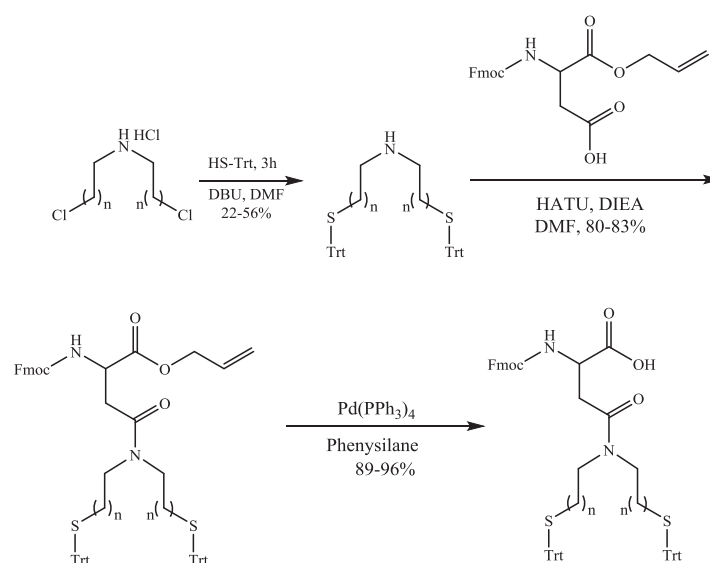
MS (MALDI) found: [M+H]⁺ 1376.46, [M+Na]⁺ 1398.41

HPLC: Rt = 15.4 min (30 – 70 % of solution B in 20 min)

mV



- Synthesis of two functions sulfur modified Fmoc-Asp-OH, **114** and **124**



Synthesis of bis((2-(triphenylmethyl)sulfany)ethyl)amine (**112**)

1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ene (1.0 mL, 8.85 mmol) was added drop-wise, under inert atmosphere to an ice-cooled solution of bis(2-chloroethyl)amine (300 mg, 2.1 mmol) and triphenylmethanethiol (1.1 g, 4 mmol) in DMF (10 mL). The mixture was stirred for 3 h at room temperature and monitored by TLC (c-hexane: EtOAc: TEA, 8:2:0.1). After completion of the reaction, the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was then dissolved in 20 mL of DCM and washed with brine. The residue was purified by column chromatography (c-hexane: EtOAc: TEA, 8:2:0.1) to yield the product **112** (627 mg, 1.0 mmol, 54%).

TLC (c-hexane: EtOAc: TEA = 8:2:0.1) R_f = 0.52.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.30-2.35 (m, 8H,); 7.21 (t, J = 6Hz, 6H); 7.29 (t, J = 6Hz, 12H); 7.44 (d, J = 6Hz, 12H).

Synthesis of (S)-allyl 2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-4-(bis(2-(triphenylmethyl)sulfany)ethyl)amino)-4-oxobutanoate (**113**)

A solution of **112** (1 mmol, 627 mg) in DMF (10 mL) was added to a solution of N,N-diisopropylethylamine (DIEA) (2.88 mmol, 372 mg), HATU (1.44 mmol, 546 mg), and (S)-3-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-4-(allyloxy)-4-oxobutanoic acid (Fmoc-Asp(OH)-OAllyl) (1.16 mmol, 458 mg). The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature and monitored by TLC (c-hexane: EtOAc, 7:3). After completion of the reaction, the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was then dissolved in 100 mL of EtOAc and washed with saturated NH_4Cl solution and saturated NaHCO_3 solution. The organic phase was separated and

dried over MgSO_4 , and the residual solid after evaporation was purified by column chromatography to yield **113** (0.80 mmol, 798.7 mg, 83%).

TLC (c-hexane: EtOAc = 7:3) R_f = 0.63.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.19-2.23 (m, 3H); 2.33 (t, J = 8 Hz, 2H); 2.56-2.80 (m, 5H); 4.23-4.28 (m, 2H); 4.44-4.58 (m, 4H); 5.15 (d, J = 12 Hz, 1H); 5.23 (d, J = 16 Hz, 1H); 5.78-5.85 (m, 1H); 6.03 (d, J = 12 Hz, 1H); 7.21-7.30 (m, 20H); 7.34-7.42 (m, 14H); 7.62 (d, J = 4 Hz, 1H); 7.78 (d, J = 8 Hz, 1H).

*Synthesis of (S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-4-(bis(2-(triphenylmethyl)sulfanyl)ethyl)amino)-4-oxobutanoic acid (**114**)*

113 (0.80 mmol, 798 mg) was dissolved in 20 mL DCM under argon. Phenylsilane (2 mmol, 250 μL) and $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.016 mmol, 18 mg) were added, and the mixture was stirred at room temperature for 30 min, then the solvent removed in vacuo. The crude product was purified by column chromatography (c-hexane: EtOAc: CH_3COOH = 6:4:0.1). The purified solid product was at last dissolved in 50 ml 1,4-dioxane and lyophilized to yield the final product **114** as a white solid (686.6 mg, 0.72 mmol, 89.5 %)

(c-hexane: EtOAc: CH_3COOH = 6:4:0.1) R_f = 0.55.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.17-2.42 (m, 5H); 2.63-2.81 (m, 5H); 4.24-4.27 (m, 2H); 4.42-4.46 (m, 2H); 6.02 (d, J = 8 Hz, 1H); 7.19-7.48 (m, 30H); 7.62 (d, J = 8 Hz, 2H); 7.82 (d, J = 8 Hz, 2H).

*Synthesis of bis((2-(triphenylmethyl)sulfanyl)propyl))amine (**122**)*

1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ene (1.0 mL, 8.85 mmol) was added drop-wise, under inert atmosphere to an ice-cooled solution of bis(2-chloropropyl)amine (500 mg, 2.9 mmol) and triphenylmethanethiol (1.6 g, 4 mmol) in DMF (15 mL). The mixture was stirred for 3 h at room temperature and monitored by TLC (c-hexane: EtOAc: TEA, 8:2:0.1). After completion of the reaction, the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was then dissolved in 20 mL of DCM and washed with brine. The residue was purified by column chromatography (c-hexane: EtOAc: TEA, 8:2:0.1) to yield the product **122** (410 mg, 0.65 mmol, 22.4%).

TLC (c-hexane: EtOAc: TEA = 8:2:0.1) R_f = 0.36.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.76-1.82 (m, 4H); 2.15 (t, J = 6 Hz, 4H); 2.62 (t, J = 4 Hz, 4H); 7.21 (t, J = 6 Hz, 6H); 7.30 (t, J = 6 Hz, 12H); 7.44 (d, J = 6 Hz, 12H).

*Synthesis of (S)-allyl 2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-4-(bis(2-(triphenylmethyl)sulfanyl)propyl)amino)-4-oxobutanoate (**123**)*

Solution of the **122** (0.65 mmol, 410 mg) in DCM (10 mL) was added to a solution of N,N-diisopropylethylamine (DIEA) (2.27 mmol, 293 mg), HATU (0.78 mmol, 295 mg), and (S)-3-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-4-(allyloxy)-4-oxobutanoic acid (Fmoc-Asp(OH)-OAllyl) (0.78 mmol, 308 mg). The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature and monitored by TLC (c-hexane: EtOAc, 7:3). After completion of the reaction, the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was then dissolved in 100 mL of EtOAc and washed with saturated NH₄Cl solution and saturated NaHCO₃ solution. The organic phase was separated and dried over MgSO₄, and the residual solid was purified by column chromatography to yield **123** (515 mg, 0.52 mmol, 80%).

TLC (c-hexane: EtOAc = 7:3) R_f = 0.43.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.45-1.50 (m, 4H); 2.09-2.16 (m, 4H); 2.58 (dd, J=16 Hz, 1H); 2.90 (t, J=6 Hz, 2H); 3.01-3.09 (m, 3H); 4.24-4.29 (m, 2H); 4.43-4.48 (m, 1H); 4.61 (d, J= 4Hz, 3H); 5.19 (d, J= 8 Hz, 1H); 5.27 (d, J= 12 Hz, 1H); 5.84-5.88 (m, 1H); 6.11 (d, J= 8 Hz, 1H); 7.19-7.33 (m, 21H); 7.39-7.43 (m, 13H); 7.60 (d, J= 8Hz, 2H); 7.76 (d, J= 8Hz, 2H).

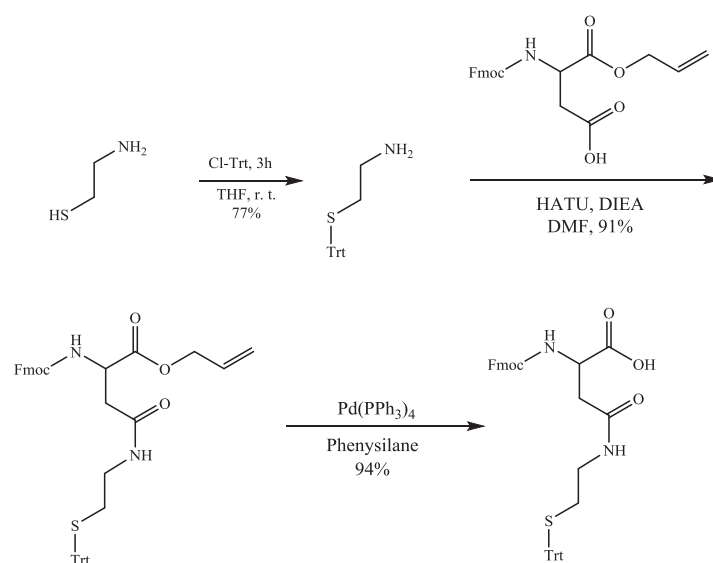
*Synthesis of (S)-2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-4-(bis(2-(triphenylmethyl)sulfanyl)propyl)amino)-4-oxobutanoic acid (**124**)*

123 (0.52 mmol, 515 mg) was dissolved in 20 mL DCM under argon. Phenylsilane (0.67 mmol, 75 µL) and Pd(PPh₃)₄ (0.010 mmol, 10 mg) were added, and the mixture was stirred at room temperature for 30 min, then the solvent removed in vacuo. The crude product was purified by column chromatography (c-hexane: EtOAc: CH₃COOH = 6:4:0.1). The purified solid product was at last dissolved in 50 ml 1,4-dioxane and lyophilized to yield the final product **114** as a white solid (480 mg, 0.50 mmol, 96.1 %).

(c-hexane: EtOAc: CH₃COOH = 6:4:0.1) R_f = 0.58.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.45-1.52 (m, 4H); 2.14-2.17 (m, 4H); 2.64 (dd, J=16 Hz, 1H); 2.90 (t, J=6 Hz, 2H); 3.01-3.09 (m, 2H); 3.10-3.16 (m, 1H); 4.23 (t, J= 8Hz, 1H); 4.32 (t, J= 8Hz, 1H); 4.43-4.48 (m, 1H); 6.35 (d, J=6 Hz, 1H); 7.22-7.34 (m, 23H); 7.39-7.44 (m, 11H); 7.62 (d, J= 8Hz, 2H); 7.80 (d, J= 8Hz, 2H).

- Synthesis of one function sulfur modified Fmoc-Asp-OH, **134**.



Synthesis of 2-(tritylthio)ethan-1-amine (**132**)

Trityl chloride (16.5 mmol, 4.6g) and 2-aminoethanethiol (15 mmol, 1.2g) were dissolved in 15 mL THF. The mixture was heated under reflux for 3 h, and then the solvent was removed in vacuo. The crude product was dissolved in 50 mL CH₂Cl₂ and washed with a saturated NaHCO₃ solution, and the organic phase was separated, dried over MgSO₄ and evaporated to yield **132** as a white solid without further purification (3.7 g, 11 mmol, 76.8%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.36 (t, *J* = 12 Hz, 2H); 2.58 (t, *J* = 12 Hz, 2H); 7.22 (t, *J* = 12 Hz, 3H); 7.28 (t, *J* = 12 Hz, 6H); 7.45 (d, *J* = 8 Hz, 6H).

Synthesis of (S)-allyl-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-4-(2-(tritylthio)ethan-1-amino)-4-oxobutanoate (**133**)

A solution of **132** (3.5 mmol, 1.1 g) in DMF (20 mL) was added to a solution of N,N-diisopropylethylamine (DIEA) (7 mmol, 904 mg), HATU (3.5 mmol, 1.3 g), and (S)-3-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-4-(allyloxy)-4-oxobutanoic acid (Fmoc-Asp(OH)-OAllyl) (3.2 mmol, 1.3 g). The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature and monitored by TLC (c-hexane: EtOAc, 7:3). After completion of the reaction, the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was then dissolved in 100 mL of EtOAc and washed with saturated NH₄Cl solution and saturated NaHCO₃ solution. The organic phase was separated and dried over MgSO₄, and the residual solid was purified by column chromatography to yield **133** (2.8 mmol, 2.0 g, 91.2%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.43 (t, *J* = 12 Hz, 2H); 2.64 (dd, *J* = 16 Hz, 1H); 2.87 (dd, *J* = 16 Hz, 1H); 3.05 (t, *J* = 12 Hz, 2H); 4.26-4.30 (m, 2H); 4.44-4.46 (m, 1H); 4.67 (d, *J* = 4 Hz, 3H); 5.22 (d, *J* = 12 Hz, 1H); 5.31 (d, *J* = 16 Hz, 1H); 5.86-5.94 (m, 1H); 6.07 (d, *J* = 8

Hz, 1H); 7.22 (t, J = 12 Hz, 3H); 7.27 (t, J = 12 Hz, 6H); 7.40 (d, J = 12 Hz, 6H); 7.61 (d, J = 8 Hz, 1H); 7.78 (d, J = 8 Hz, 1H)

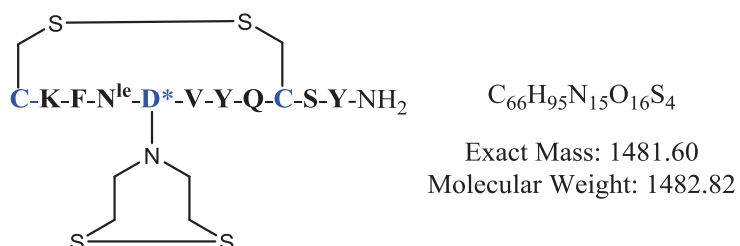
*Synthesis of (S)-2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-4-(2-(tritylthio)ethan-1-amino)-4-oxobutanoic acid (**134**)*

123 (2.8 mmol, 2 g) was dissolved in 20 mL DCM under argon. Phenylsilane (5 mmol, 625 μ L) and Pd(PPh₃)₄ (0.05 mmol, 60 mg) were added, and the mixture was stirred at room temperature for 30 min, then the solvent removed in vacuo. The crude product was purified by column chromatography (c-hexane: EtOAc: CH₃COOH = 6:4:0.1). The purified solid product was at last dissolved in 50 ml 1,4-dioxane and lyophilized to yield the final product **134** as a white solid (1.8 g, 2.7 mmol, 94.6 %)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.44 (t, t, J = 8 Hz, 2H); 2.64 (dd, J = 16 Hz, 1H); 3.01-3.13 (m, 2H); 4.19 (t, J = 8 Hz, 1H); 4.37-4.42 (m, 3H); 6.10-6.11 (m, 2H); 7.20 (t, J = 12 Hz, 3H); 7.28 (t, J = 12 Hz, 6H); 7.40 (d, J = 12 Hz, 6H); 7.60 (d, J = 8 Hz, 1H); 7.76 (d, J = 8 Hz, 1H)

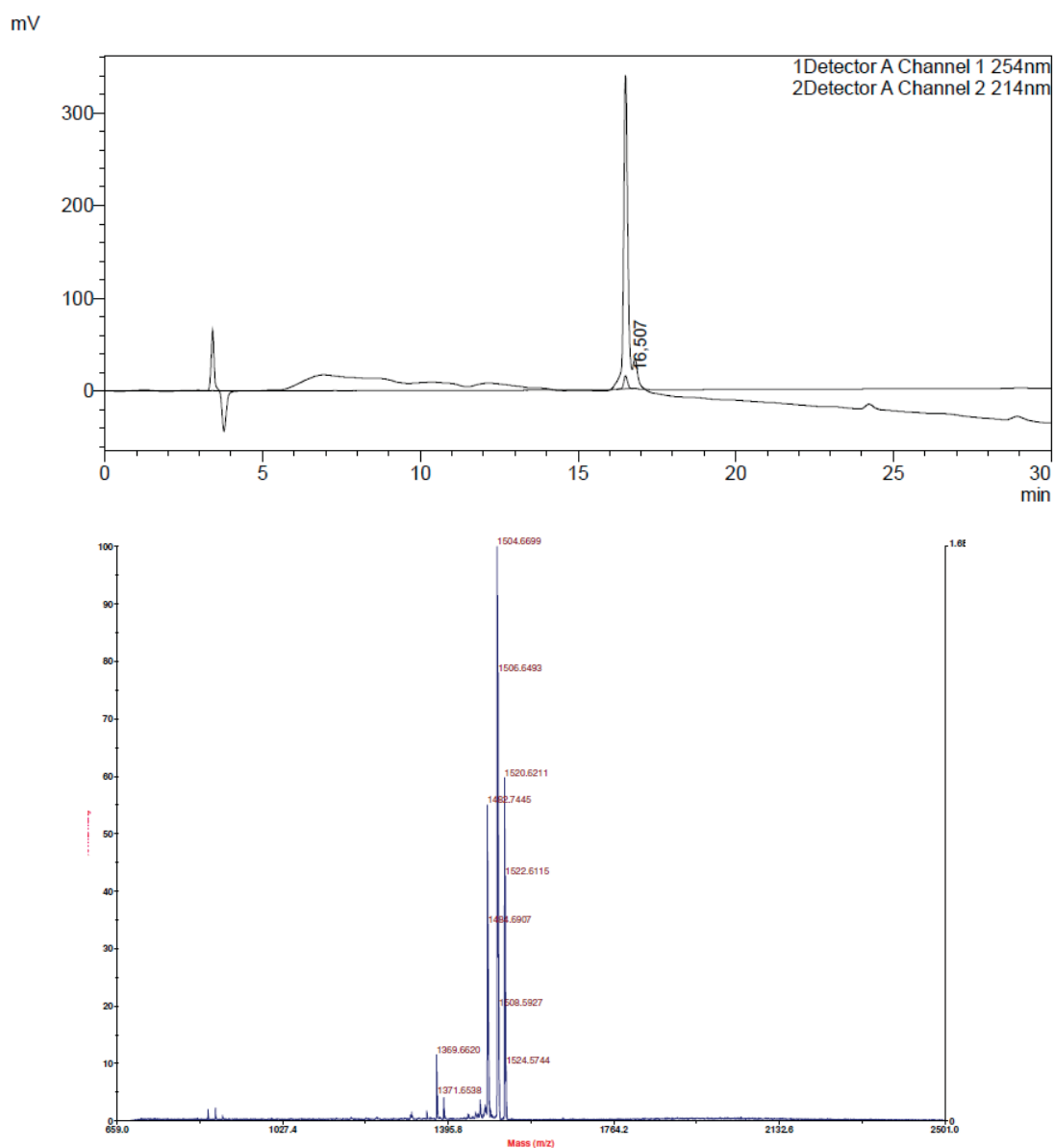
Peptides **66**, **72**, **77**, **144** and **145** were synthesized on solid phase by CEM-Liberty 1 system at a 0.1 mmol scale with Rink amide MBHA resin, following **General Peptide Synthesis** procedure.

Peptide 66

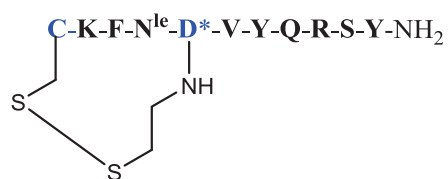


MS (MALDI) found: [M] 1482.74, [M+Na] 1504.66

HPLC: Rt = 16.5 min (30 – 100 % of solution B in 30 min)



Peptide 72


$$\text{C}_{67}\text{H}_{100}\text{N}_{18}\text{O}_{16}\text{S}_2$$

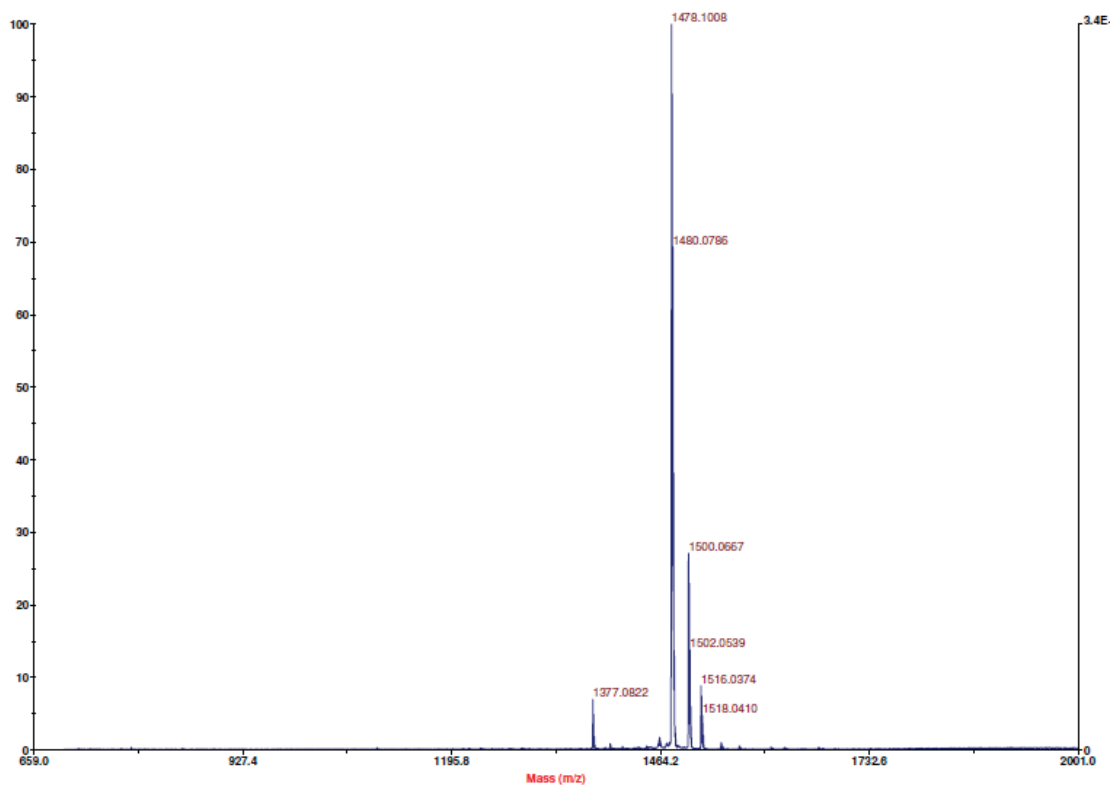
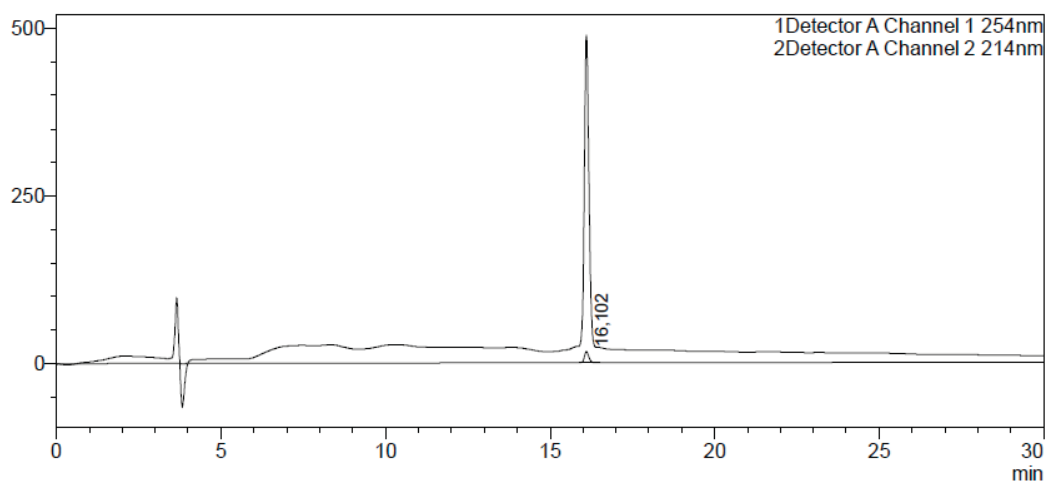
Exact Mass: 1476.70

Molecular Weight: 1477.77

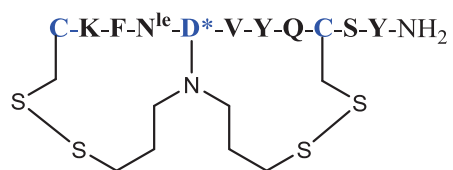
MS (MALDI) found: $[M+H]^+$ 1478.10, $[M+Na]^+$ 1500.06

HPLC: $R_t = 16.1$ min (20 – 80 % of solution B in 30 min)

mV



Peptide 77



C₆₈H₉₉N₁₅O₁₆S₄

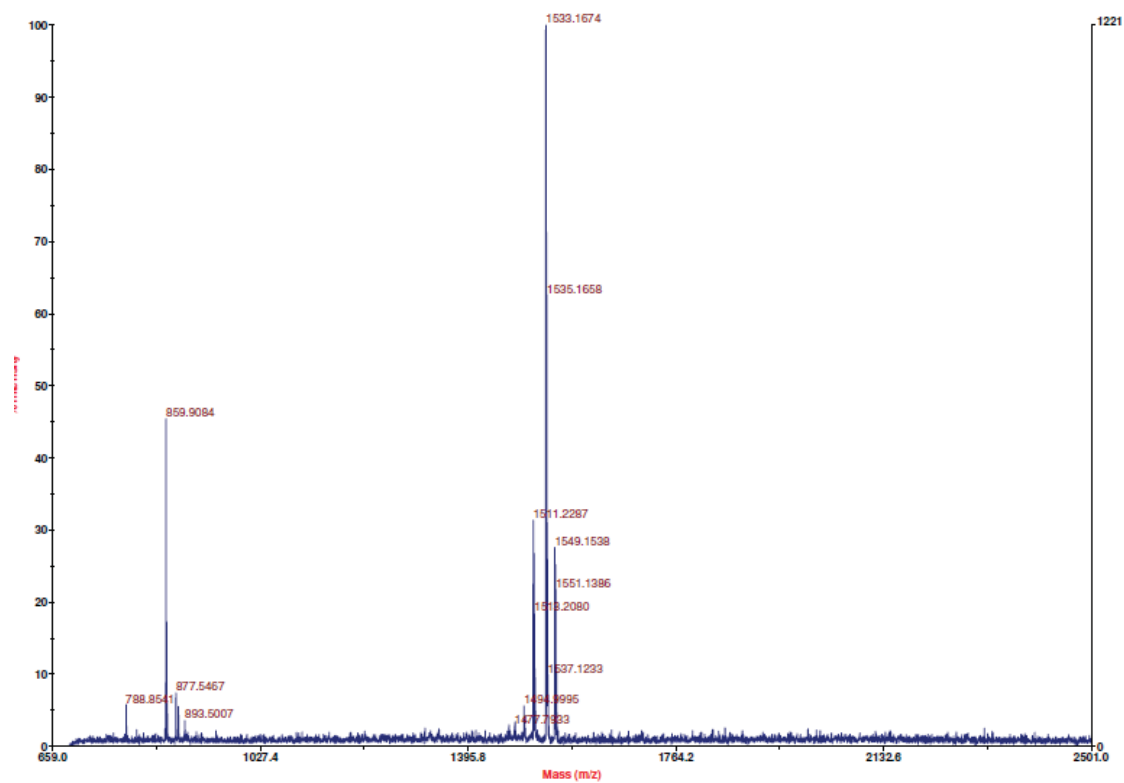
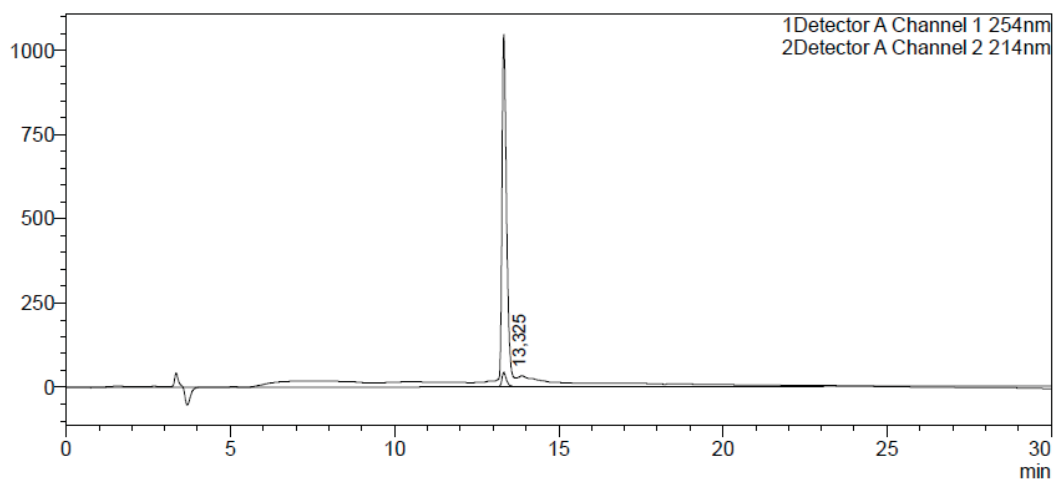
Exact Mass: 1509.63

Molecular Weight: 1510.87

MS (MALDI) found: [M+H]⁺ 1511.22, [M+Na]⁺ 1533.16

HPLC: Rt = 13.3 min (30 – 100 % of solution B in 30 min)

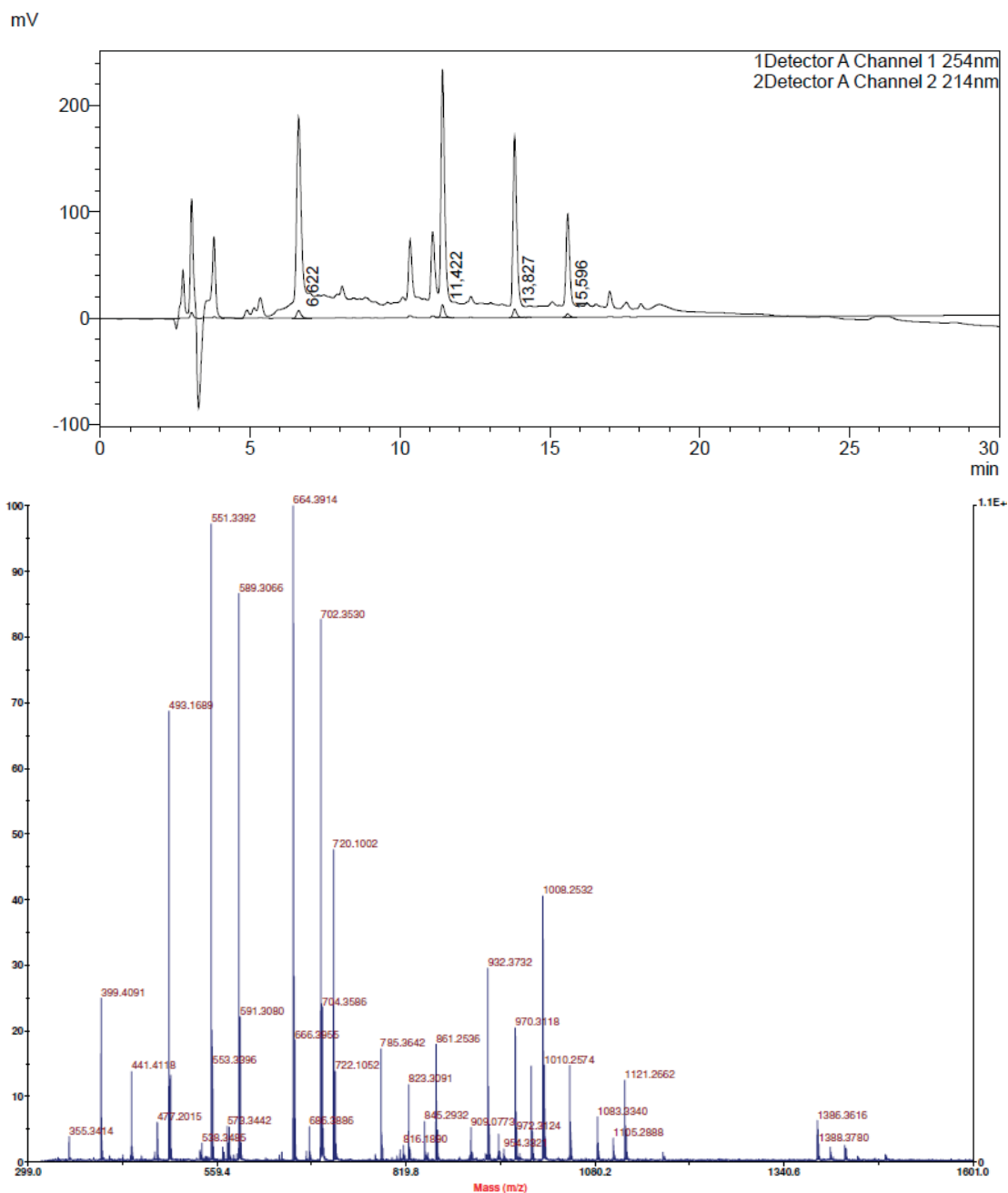
mV



- α -Chymotrypsin peptide digestion assay

The peptide was dissolved in 200 μ L NH_4HCO_3 solution (10 mM, pH = 7.9). α -Chymotrypsin (peptide : α -Chymotrypsin, 60 : 1, W : W) was then added to this solution. The mixture was kept in water bath at 30 $^\circ\text{C}$ for 3 h, and the completion of the digestion of peptide was controlled by HPLC analysis. Finally, this mixture was analyzed by MALDI-TOF spectroscopy.

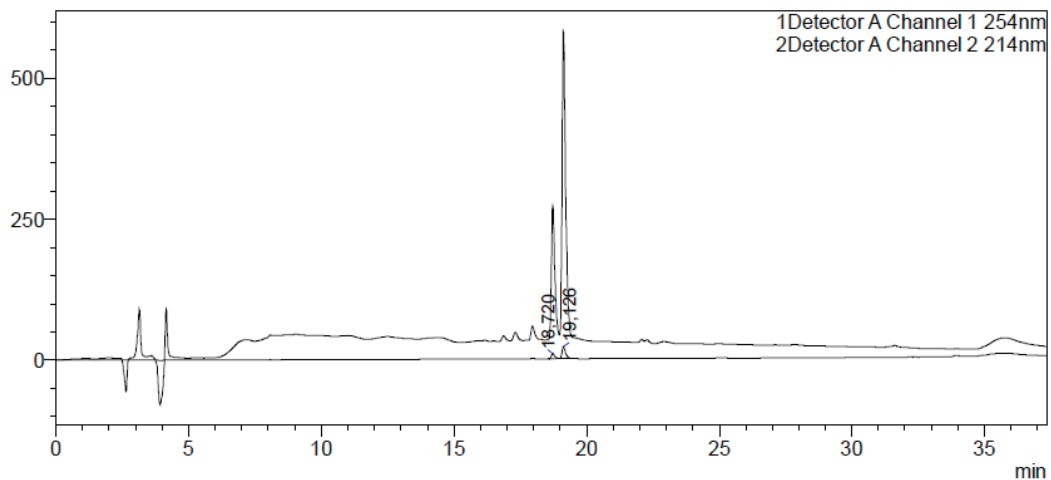
Peptide 66 after digestion by α -Chymotrypsin



Peptide 77 after digestion by α -Chymotrypsin

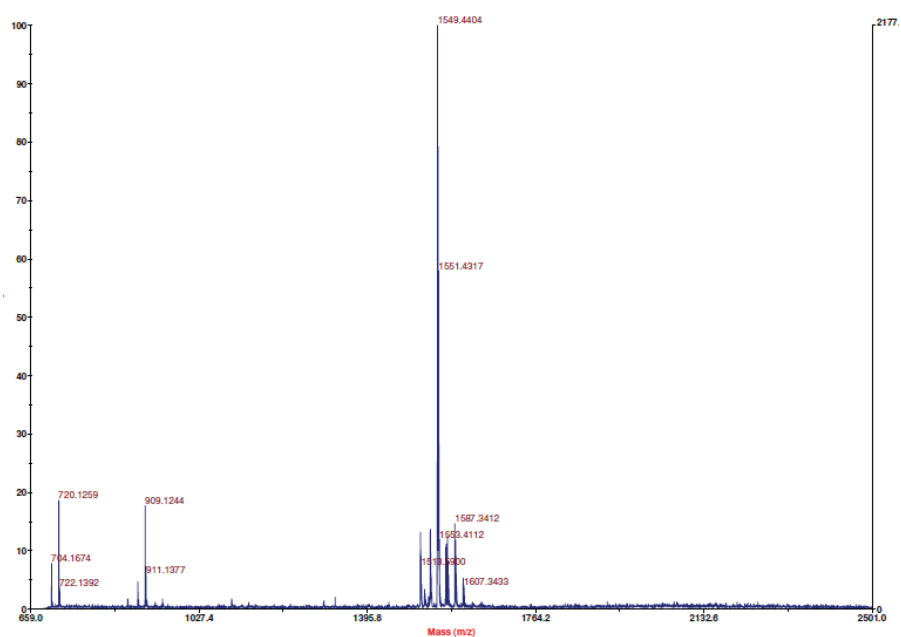
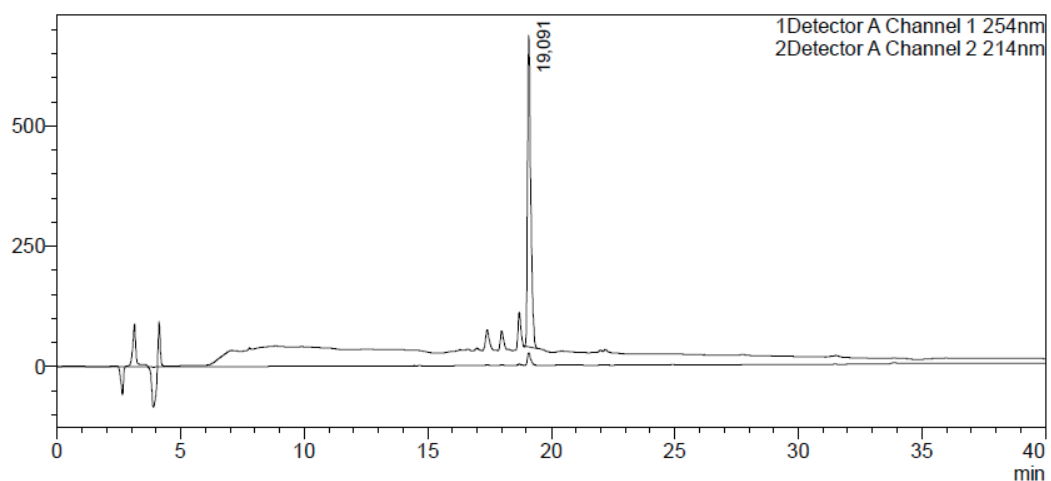
1 h after digestion:

mV

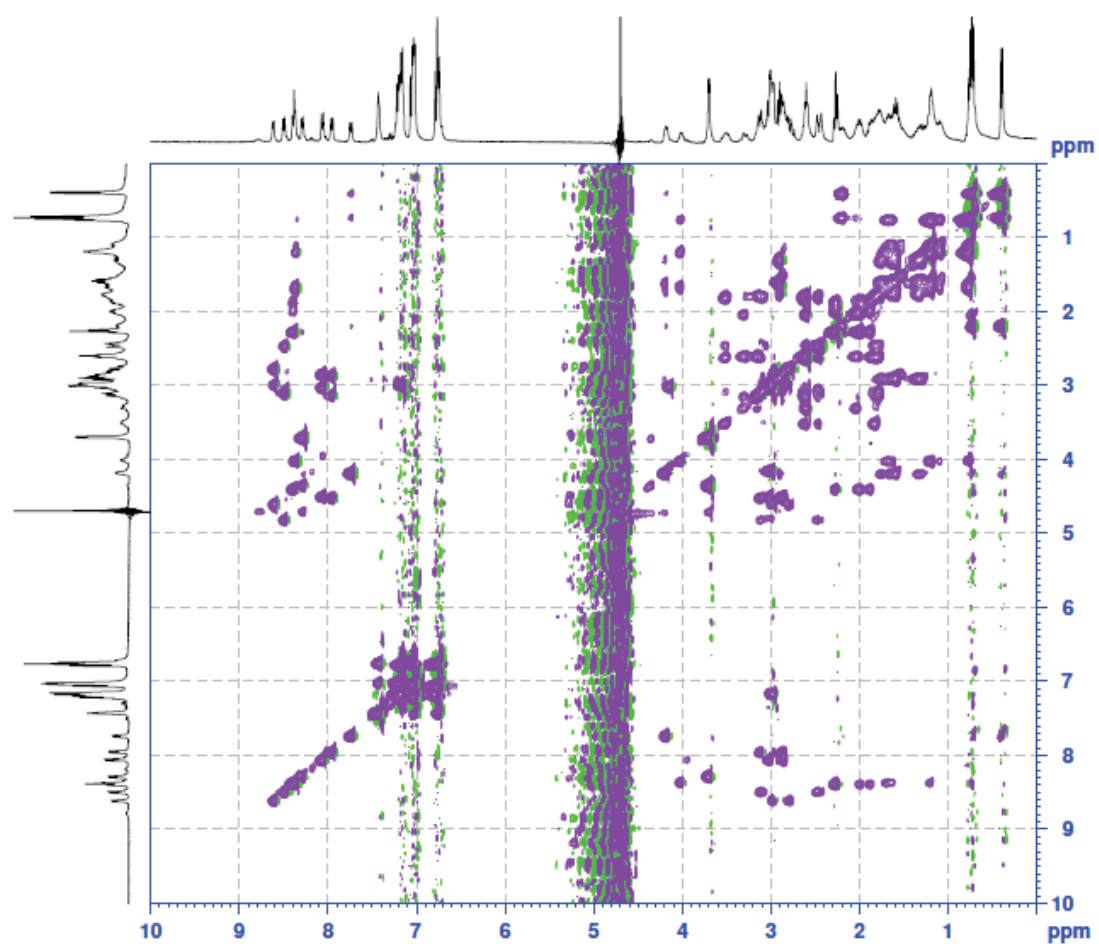


2 h after digestion:

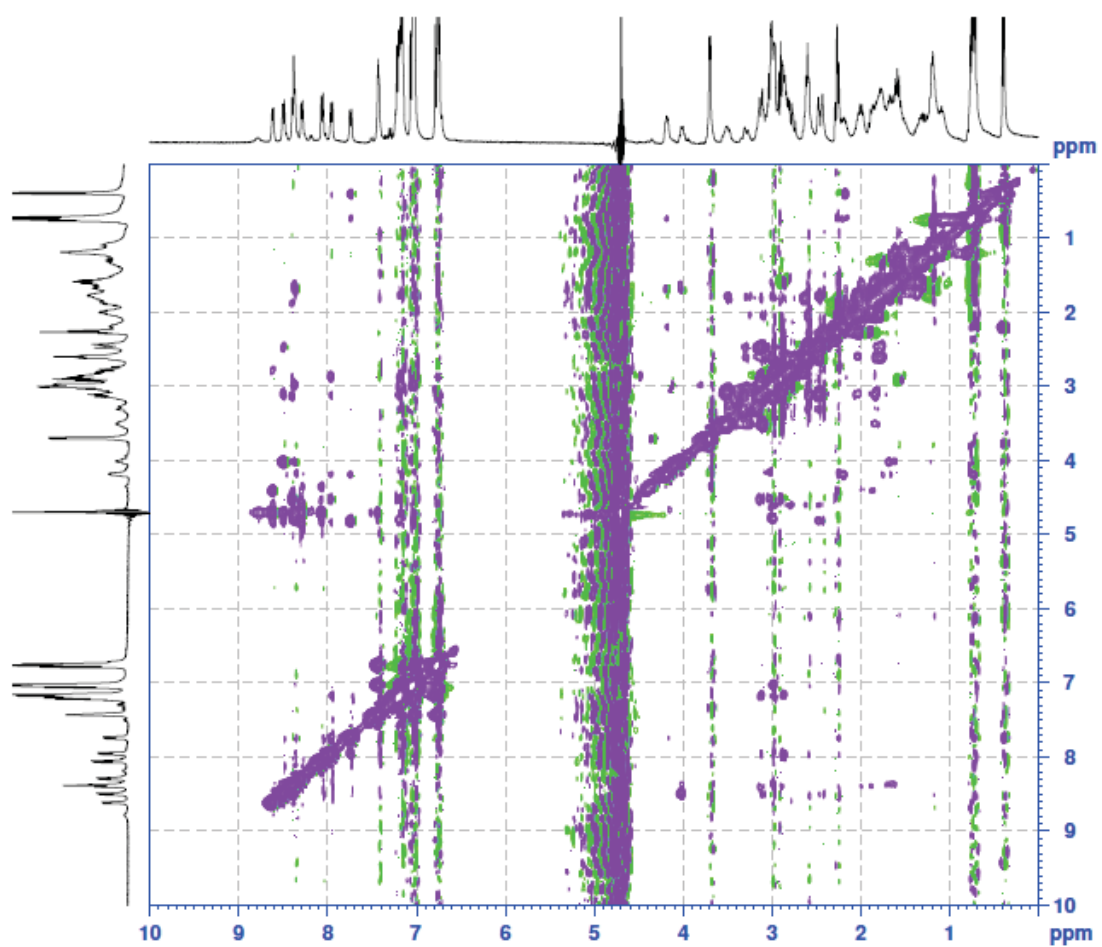
mV



Peptide 77 NMR spectra

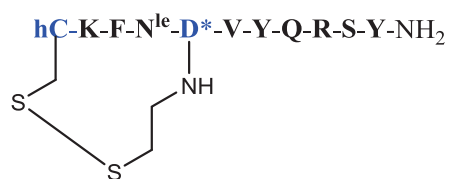


TOCSY spectrum of **peptide 77** (1H, 400 MHz, H₂O/D₂O 9:1)



NOESY spectrum of **peptide 77** (1H, 400 MHz, H₂O/D₂O 9:1)

Peptide 144


$$\text{C}_{68}\text{H}_{102}\text{N}_{18}\text{O}_{16}\text{S}_2$$

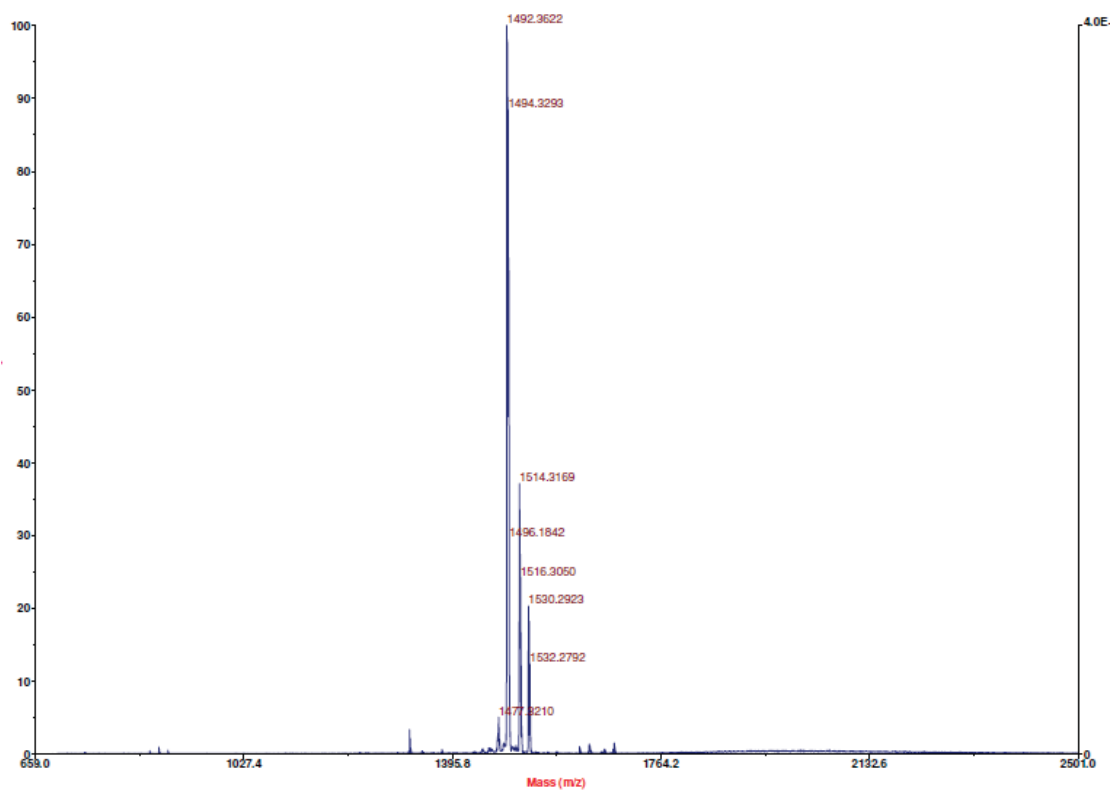
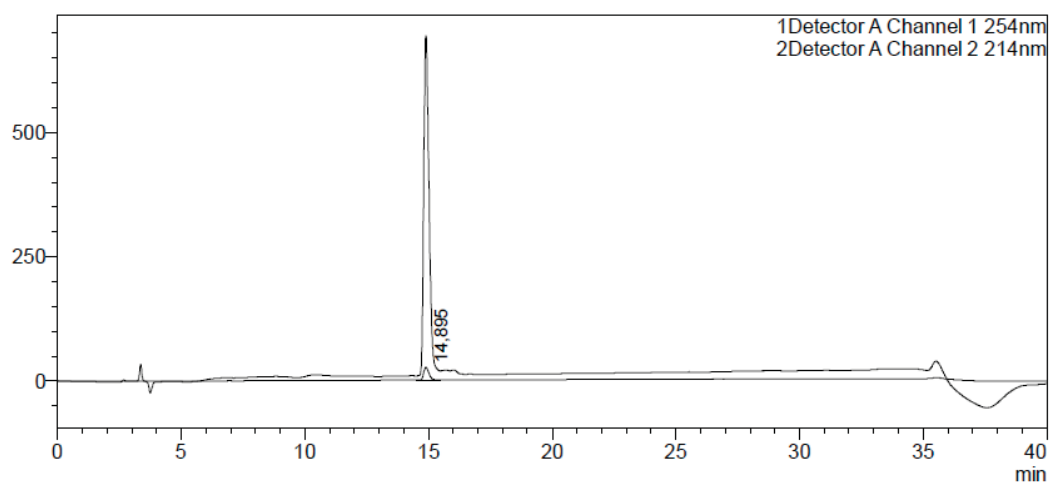
Exact Mass: 1490.72

Molecular Weight: 1491.79

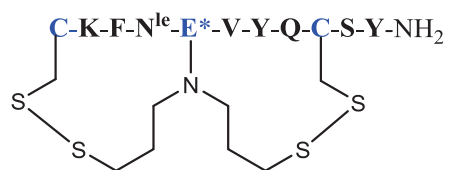
MS (MALDI) found: $[M+H]^+$ 1492.36, $[M+Na]^+$ 1514.31, $[M+K]^+$ 1530.29

HPLC: $R_t = 14.8$ min (30 – 60 % of solution B in 30 min)

mV



Peptide 145



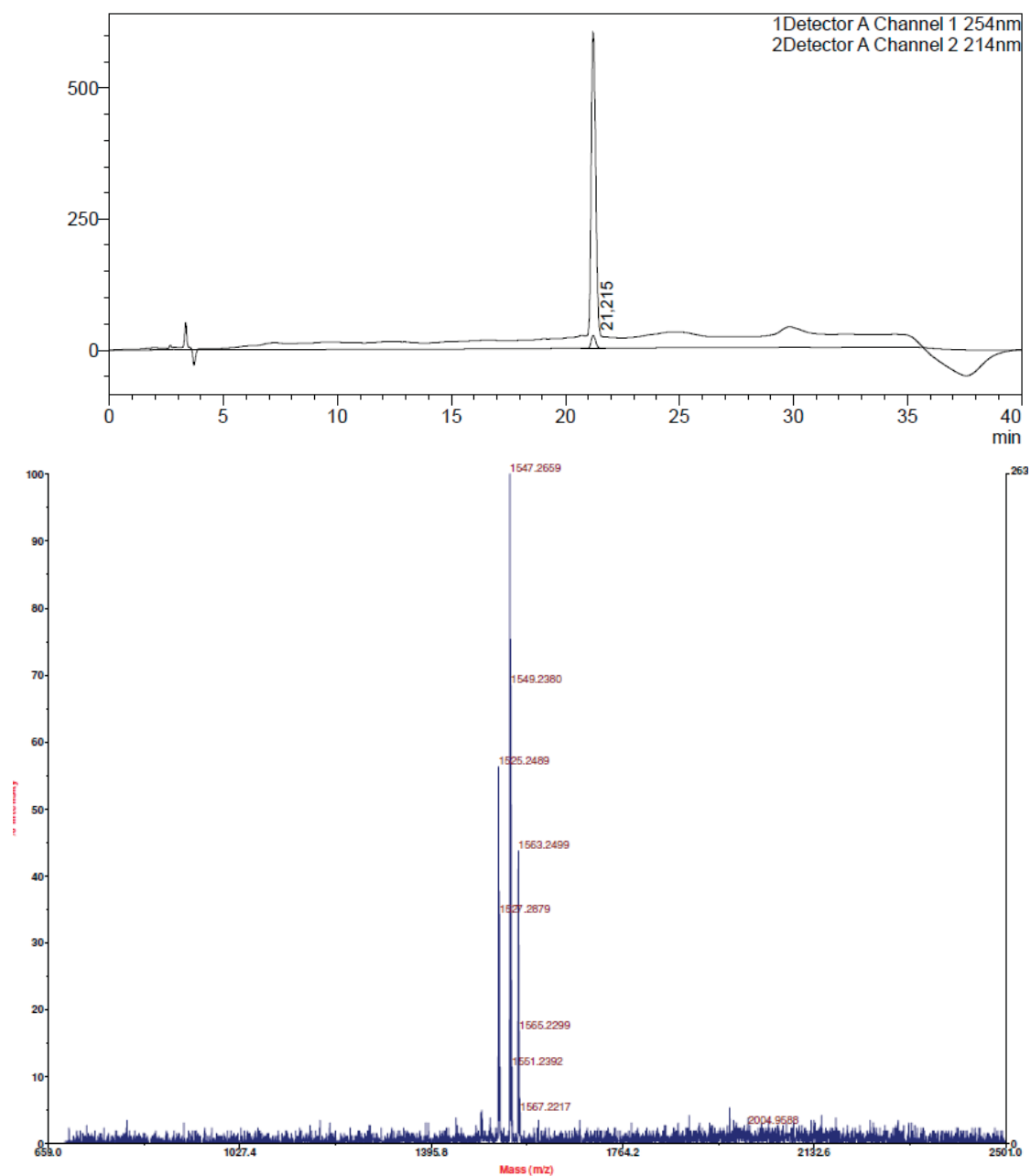
Exact Mass: 1523.64

Molecular Weight: 1524.90

MS (MALDI) found: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1525.24, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1547.26, $[\text{M}+\text{K}]^+$ 1563.24

HPLC: Rt = 21.2 min (30 – 60 % of solution B in 30 min)

mV



Part 4: Peptide antagonists from combination of different binding sites of VEGFR1

Peptides **33-37** were synthesized on solid phase by CEM-Liberty 1 system at a 0.1 mmol scale with Rink amide MBHA resin, following **General Peptide Synthesis** procedure.

Peptide 33

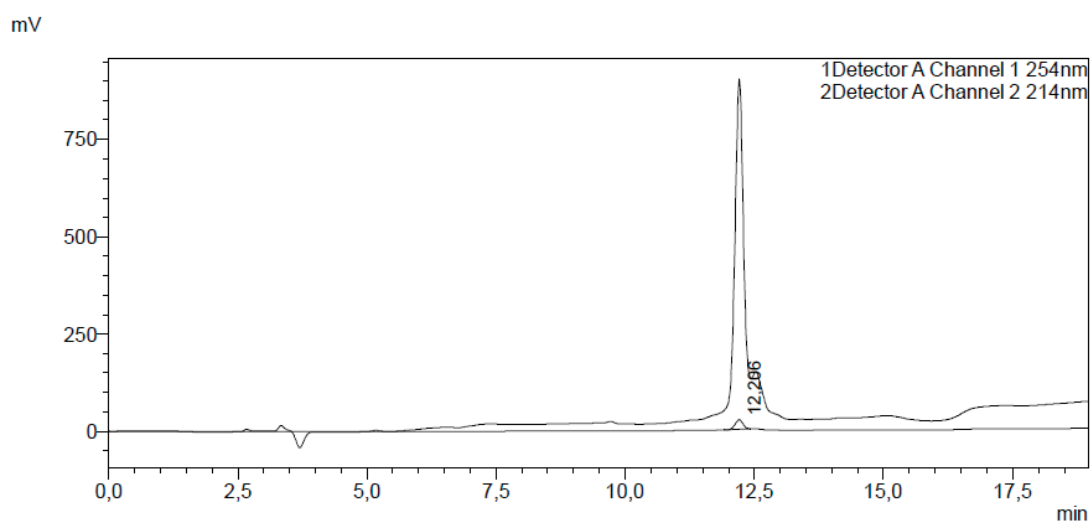


Exact Mass: 2351.00

Molecular Weight: 2352.64

MS (ESI) found: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 2353.72

HPLC: Rt = 12.2 min (30 – 90 % of solution B in 30 min)



Peptide 34

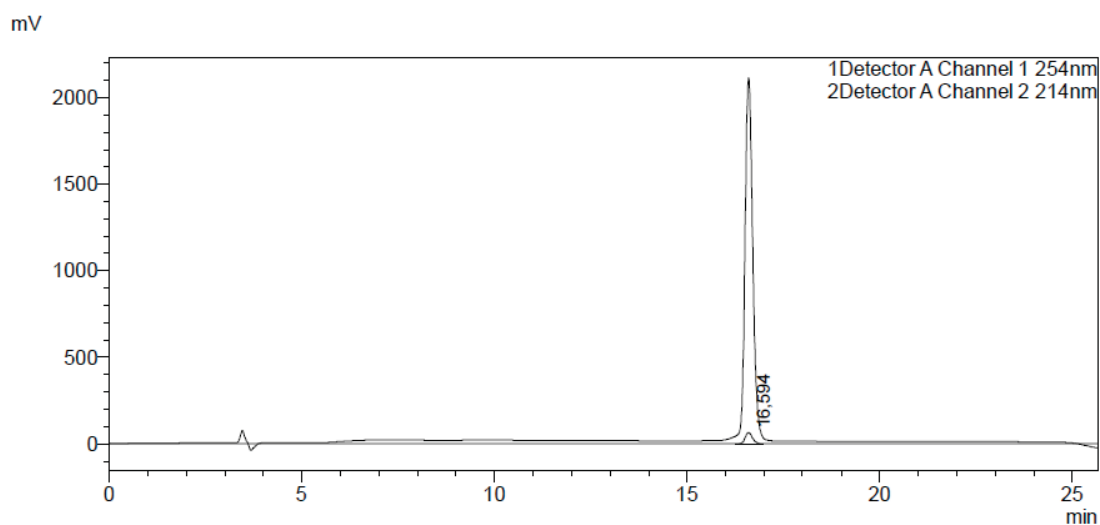


Exact Mass: 2334.97

Molecular Weight: 2336.60

MS (ESI) found: [M+H]⁺ 2336.8

HPLC: Rt = 16.5 min (20 – 60 % of solution B in 20 min)



Peptide 35

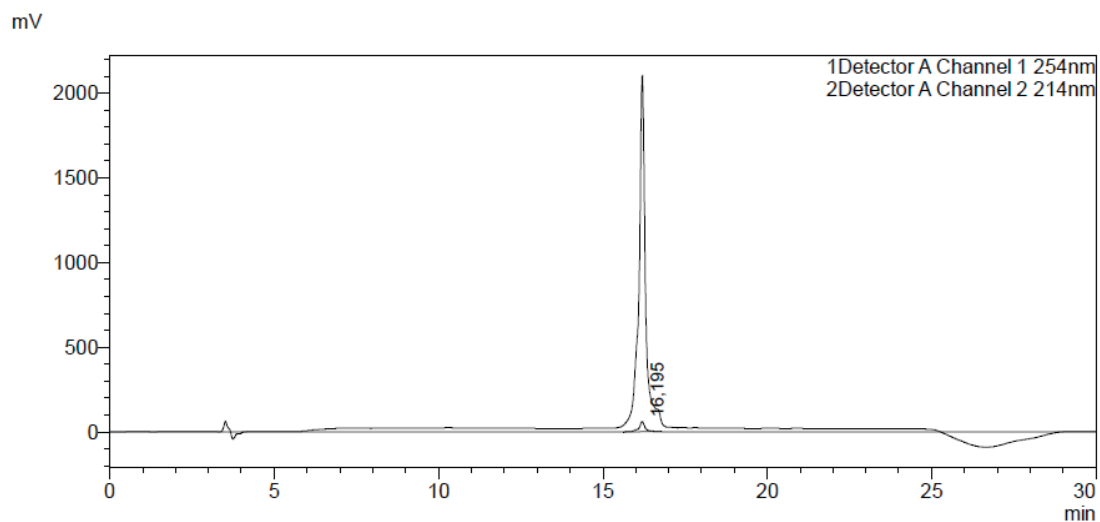


Exact Mass: 2862.30

Molecular Weight: 2864.35

MS (ESI) found: [M+H]⁺ 2865.1

HPLC: Rt = 16.1 min (20 – 70 % of solution B in 20 min)



Peptide 36

Ac-K-F-M-D-V-Y-Q-R-S-Y-PEG-K-NH₂

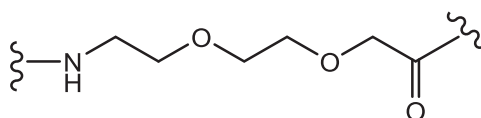
Ac-K-F-M-D-V-Y-Q-R-S-Y-PEG

C₁₄₄H₂₁₅N₃₅O₄₀S₂

Exact Mass: 3155.47

Molecular Weight: 3157.67

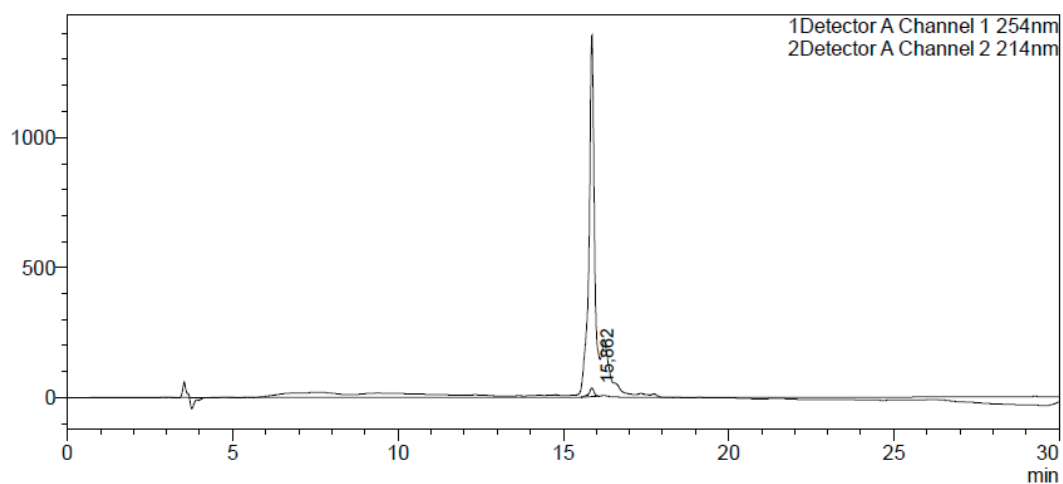
PEG:



MS (ESI) found: [M+H]⁺ 3158.2

HPLC: Rt = 12.2 min (30 – 90 % of solution B in 30 min)

mV



Peptide 37

Ac-K-F-M-D-V-Y-Q-R-S-Y-K-COOH

$C_{132}H_{194}N_{33}O_{35}S_2$

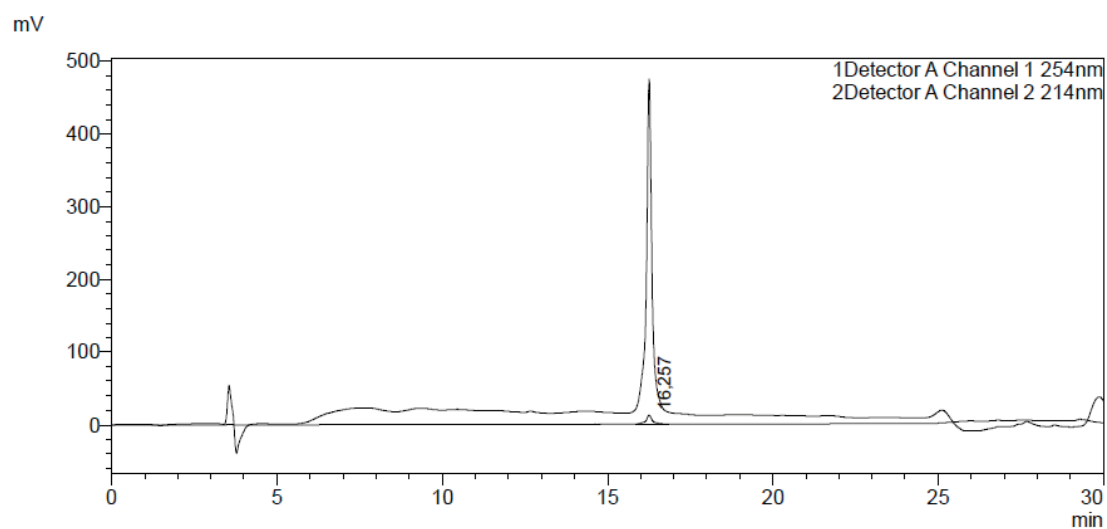
Ac-K-F-M-D-V-Y-Q-R-S-Y

Exact Mass: 2863.31

Molecular Weight: 2865.29

MS (ESI) found: $[M+H]^+$ 2866.9

HPLC: Rt = 16.2 min (20 – 70 % of solution B in 20 min)



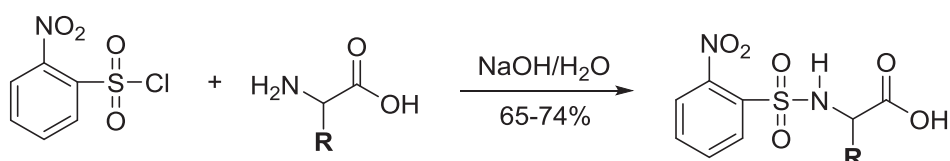
Chapitre 4

Part 1: Synthesis of new constrained 13-membered Peptide

Macrocycles

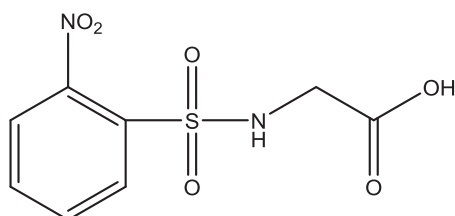
- Preparation of 2-Nitrobenzenesulfonyl protected amino acids

General procedure of synthesis of *o*-Ns-AA-OH:



Natural α -amino acid (AA) was dissolved in a stirred NaOH (2 equiv.) solution in H₂O (5 mL for 10 mmol). 2-Nitrobenzenesulfonyl chloride (1.2 equiv.) was added to the mixture and stirred at room temperature for 2 h. Then the solution was acidified to pH = 1 by HCl (37%). The precipitate (*o*-Ns-AA-OH) was filtered and washed with H₂O, and dried under vacuum.

o-Ns-Gly-OH



((2-nitrophenyl)sulfonyl)glycine

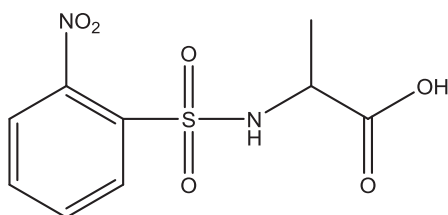
Chemical Formula: C₈H₈N₂O₆S

Exact Mass: 260.01

From 30 mmol glycine. 4.52 g was obtained (58% yield).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.11 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.89 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.83 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.79 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, *o*-Ns), 4.32 (s, 2H, CH₂)

***o*-Ns-Ala-OH**

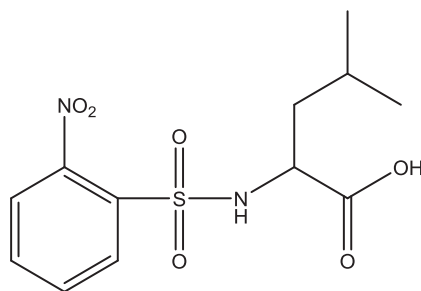


((2-nitrophenyl)sulfonyl)alanine
Chemical Formula: C₉H₁₀N₂O₆S
Exact Mass: 274.03

From 20 mmol α -alanine. 3.56 g was obtained (65% yield).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.11 (d, J = 7.6 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.89 (d, J = 7.6 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.83 (t, J = 7.4 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.79 (t, J = 7.4 Hz, 1H, *o*-Ns), 4.14 (q, J = 7.2 Hz, 1H, H α), 1.43 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃)

***o*-Ns-Leu-OH**

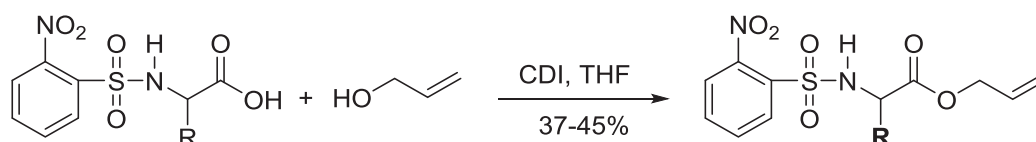


((2-nitrophenyl)sulfonyl)leucine
Chemical Formula: C₁₂H₁₆N₂O₆S
Exact Mass: 316.07

From 15 mmol α -leucine. 3.51 g was obtained (74% yield).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.11 (d, J = 7.6 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.99 (d, J = 7.6 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.96 (t, J = 7.4 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.94 (t, J = 7.4 Hz, 1H, *o*-Ns), 4.24 (q, J = 7.2 Hz, 1H, H α), 1.83 (m, H, CH), 1.63 (t, J = 8.2 Hz, 2H, CH₂), 0.95 (dd, J = 7.2 Hz, 6H, 2CH₃)

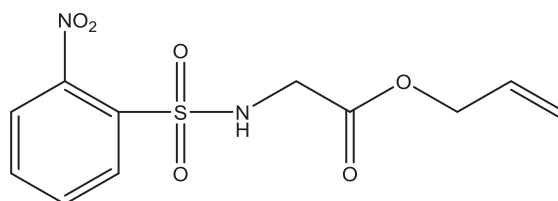
General procedure of synthesis of *o*-Ns-AA-OAllyl:



1,1'-Carbonyldiimidazole (CDI) (1.2 equiv.) was added to a solution of 2-nitrobenzenesulfonyl protected amino acid (*o*-Ns-AA-OH) in THF (10 mL for 2 mmol) and stirred for 20 min before addition of allyl alcohol (3 equiv.). The final mixture with allyl alcohol was stirred overnight at room temperature. The crude product was

concentrated under vacuum. Then it was dissolved in EtOAc washed by saturated NH_4Cl solution, saturated NaHCO_3 solution and brine, dried over magnesium sulfate (MgSO_4). The product was finally obtained by removing the EtOAc under vacuum without further purification.

***o*-Ns-Gly-OAllyl**



allyl ((2-nitrophenyl)sulfonyl)glycinate

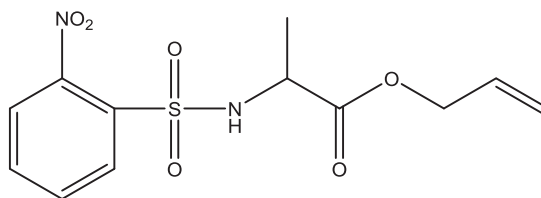
Chemical Formula: $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$

Exact Mass: 300.04

From 5 mmol *o*-Ns-Gly-OH. 720 mg was obtained (48% yield).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.1 (d, J = 7.2 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.89 (d, J = 7.4 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.84 (t, J = 7.4 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.80 (t, J = 7.4 Hz, 1H, *o*-Ns), 5.68 (m, 1H, HC=), 5.17 (d, J = 9.2 Hz 1 H, =CH₂), 5.10 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, =CH₂), 4.48 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 4.12 (s, 2H, CH₂)

***o*-Ns-Ala-OAllyl**



allyl ((2-nitrophenyl)sulfonyl)alaninate

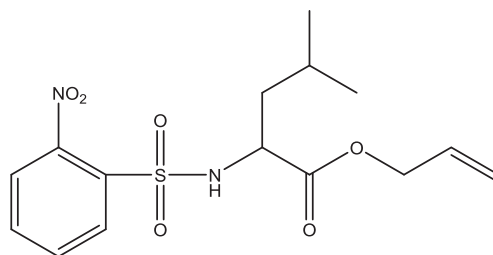
Chemical Formula: $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$

Exact Mass: 314.06

From 5 mmol *o*-Ns-Ala-OH. 706 mg was obtained (45% yield).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.12 (d, J = 7.6 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.95 (d, J = 7.6 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.77 (t, J = 7.4 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.74 (t, J = 7.4 Hz, 1H, *o*-Ns), 5.76 (m, 1H, HC=), 5.29 (d, J = 6.8 Hz 1 H, =CH₂), 5.24 (d, J = 6.8 Hz, 1 H, =CH₂), 4.52 (d, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 4.07 (q, J = 7.8 Hz, 1H, H α), 1.43 (d, J = 10.4 Hz, 3H, CH₃)

***o*-Ns-Leu-OAllyl**



allyl ((2-nitrophenyl)sulfonyl)leucinate

Chemical Formula: C₁₅H₂₀N₂O₆S

Exact Mass: 356.10

From 5 mmol *o*-Ns-Leu-OH. 658 mg was obtained (37% yield).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.12 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.96 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.89 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, *o*-Ns), 5.74 (m, 1H, HC=), 5.24 (d, *J* = 12.4 Hz 1 H, =CH₂), 5.18 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, =CH₂), 4.65 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, O-CH₂), 3.62 (q *J* = 7.8 Hz, 1H, H_α), 1.89 (m, H, CH), 1.65 (t, *J* = 10.2 Hz, 2H, CH_{2β}), 0.88 (dd, *J* = 7.2 Hz, 6H, 2CH₃)

- **Synthesis of macrocyclic peptides a-f (GAGA*, GALA*, GFLA*, LALA*, LFAL*, LAAF*, number according to [Article 4](#)**

Peptides **a-f** were prepared and characterized according to « Supporting information » of [Article 4](#)

Supporting information of [Article 4](#)

Solid Phase Synthesis of constrained 13-membered Peptide Macrocycles employing Fukuyama-Mitsunobu Alkylations

Lei Wang, Wang-Qing Liu, Noémie Saraux, Michel Vidal and Sylvain Broussy*

*UMR 8638 CNRS, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie de Paris, Sorbonne
Paris Cité, 4 avenue de l'Observatoire, Paris 75006 France*

sylvain.broussy@parisdescartes.fr

Table of Contents

Materials and Methods	2
General Procedures for the Synthesis of Linear Precursors 5a-f on Solid-Phase	3
Spectroscopic Data, HPLC chromatograms and NMR spectra for Linear Precursors 5a-f	4
General Procedure for the synthesis of Macrocyclic Peptides 6a-f	22
Spectroscopic Data, HPLC chromatograms and NMR spectra for Macrocyclic Peptides 6a-f	23

Materials and Methods

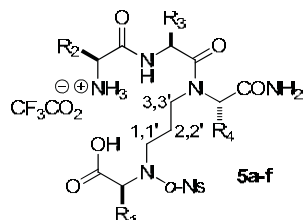
Unless otherwise stated, reactions were performed at room temperature in oven-dried glassware. For solid-phase reactions, the resin was placed in plastic syringes equipped with a frit and a stopper. Shaking was effected by rotating the syringes on a wheel. The washing steps were performed by manual shaking and the solvents were removed by aspiration with a water pump. THF was dried by passage through an activated alumina column under argon.

N^α-Fmoc amino acids and solvents (HPLC grade CH₃CN, peptide synthesis grade DMF and DIEA) were purchased from SDS Carlo-Erba. All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich, Merck-Novabiochem, or Alfa Aesar and used as received unless otherwise specified. After each coupling step, Fmoc removal was effected by treating the resin with 20% piperidine in DMF. The cleavage of the peptide from the resin was done by treatment with 10 mL of pure TFA for 1 h at room temperature. After removal of the resin the filtrate was concentrated under a stream of argon. The crude peptides were dissolved in water/CH₃CN and purified by semi-preparative HPLC (Shimadzu Prominence) on a Grace Alltima C18 column (5 μm, 10 x 250 mm) using a gradient program beginning at 20% B and rising to 100% B in 60 min at a flow rate of 2 mL/min (for linear precursors **5a-f**: solvent A was water with 0.1% TFA and solvent B was 70% acetonitrile aqueous solution with 0.09% TFA; for macrocycles **6a-f**: solvent A was water and solvent B was 70% acetonitrile aqueous solution). The products were detected at 214 or 220 and 254 nm, collected, and analyzed by HPLC (Shimadzu Prominence) using a Phenomenex Luna C18 column (5 μm, 4.6 x 250 mm) with the indicated gradient programs. Pure fractions were pooled and lyophilized to yield the peptides as white solids.

All NMR spectra were recorded on a Bruker 400 MHz spectrometer (¹H frequency) and are reported relative to residual solvent signals. Multiplicities are reported as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, p = pentet, sept = septuplet, m = multiplet, br s = broad singlet, app = apparent. Unless indicated otherwise, NMR spectra were recorded at 298 K. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained by electrospray ionization (ESI⁺) on an orbitrap (Thermo Fisher Scientific).

List of Abbreviations:

HPLC: high performance liquid chromatography, THF: tetrahydrofuran, DMSO: dimethylsulfoxide, DMF: dimethylformamide. Fmoc: fluorenylmethyloxycarbonyl, DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene, HATU: 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate, PyBOP: benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate, DIEA: *N,N*-diisopropylethylamine, TFA: trifluoroacetic acid, DIAD: diisopropyl azodicarboxylate.

General Procedures for Linear Precursors **5a-f** Synthesis on Solid-Phase

The first *o*-nosyl protected amino acid (R_4) (0.50 mmol, 5 equivalents) was loaded on Rink amide MBHA resin LL 100-200 mesh (278 mg, 0.1 mmol, 0.36 mmol/g) using HATU (186 mg, 0.49 mmol, 4.9 equivalents) and DIEA (174 μ L, 1.0 mmol, 10 equivalents) in 4 mL DMF. After 2 hours at room temperature, the resin was washed with DMF, MeOH, CH_2Cl_2 and anhydrous THF.

1st Fukuyama-Mitsunobu alkylation: 1,3 propanediol (72 μ L, 1.0 mmol, 10 equivalents), DIAD (197 μ L, 1.0 mmol, 10 equivalents), PPh_3 (262 mg, 1.0 mmol, 10 equivalents) and 5 mL of anhydrous THF were added to the resin and the reaction mixture was either kept at room temperature for 14 hours or heated under controlled microwaves irradiation at 50°C (CEM instrument) for 15 minutes under argon. The resin was washed with DMF, MeOH and CH_2Cl_2 .

The *o*-Ns protecting group was removed by 3 repeated treatments of 10 minutes each with a solution of 1.5% DBU and 1.5% β -mercaptoethanol in DMF (v:v), and washed as above.

2nd Fukuyama-Mitsunobu alkylation: the desired *o*-Ns/Allyl protected amino acid (R_1) (0.6 mmol, 6 equivalents), DIAD (98 μ L, 0.5 mmol, 5 equivalents), PPh_3 (131 mg, 0.5 mmol, 5 equivalents) and 4 mL of anhydrous THF were added to the resin and the mixture was shaken for 14 hours. The resin was washed as above.

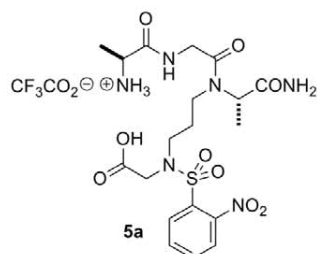
The desired Fmoc protected amino acid (R_3) (0.5 mmol, 5 equivalents), HATU (186 mg, 4.9 mmol, 4.9 equivalents), DIEA (174 μ L, 1.0 mmol, 10 equivalents) and 5 mL CH_2Cl_2 were added to the resin and the mixture was shaken at room temperature for 14 hours. The resin was washed as above and the procedure repeated once. The Fmoc protecting group was removed following the standard procedure.

The desired Fmoc protected amino acid (R_2) (0.5 mmol, 5 equivalents), HATU (186 mg, 4.9 mmol, 4.9 equivalents), DIEA (174 μ L, 1.0 mmol, 10 equivalents) and 5 mL DMF were added to the resin and the mixture was shaken at room temperature for 2 hours. The resin was washed as above and the Fmoc protecting group was removed following the standard procedure.

CH_2Cl_2 was added to the resin and a stream of argon was bubbled through the resulting suspension. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (11.6 mg, 0.01 mmol, 0.1 equivalent) and PhSiH_3 (296 μ L, 2.4 mmol, 24 equivalents) were added and the mixture was kept under a stream of argon for 10 minutes. The resin was washed as above. The products **5a-f** were cleaved from the resin and purified following the standard procedures.

Spectroscopic Data, HPLC chromatograms and NMR spectra for Linear Precursors 5a-f

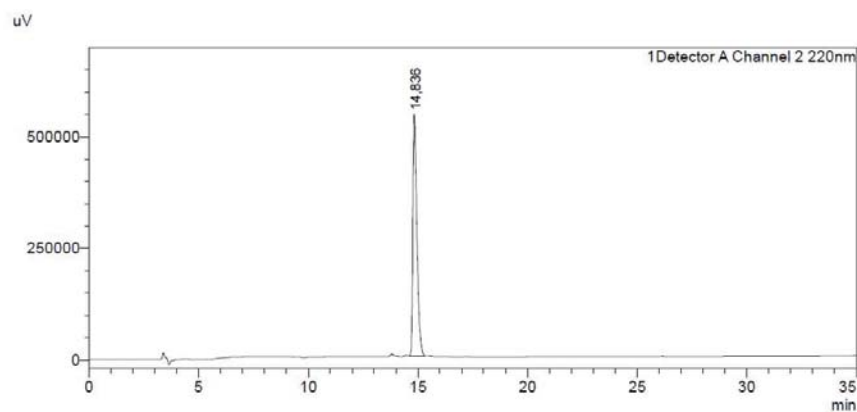
Compound 5a



From 0.033 mmol resin, 8.5 mg were obtained (41% yield).

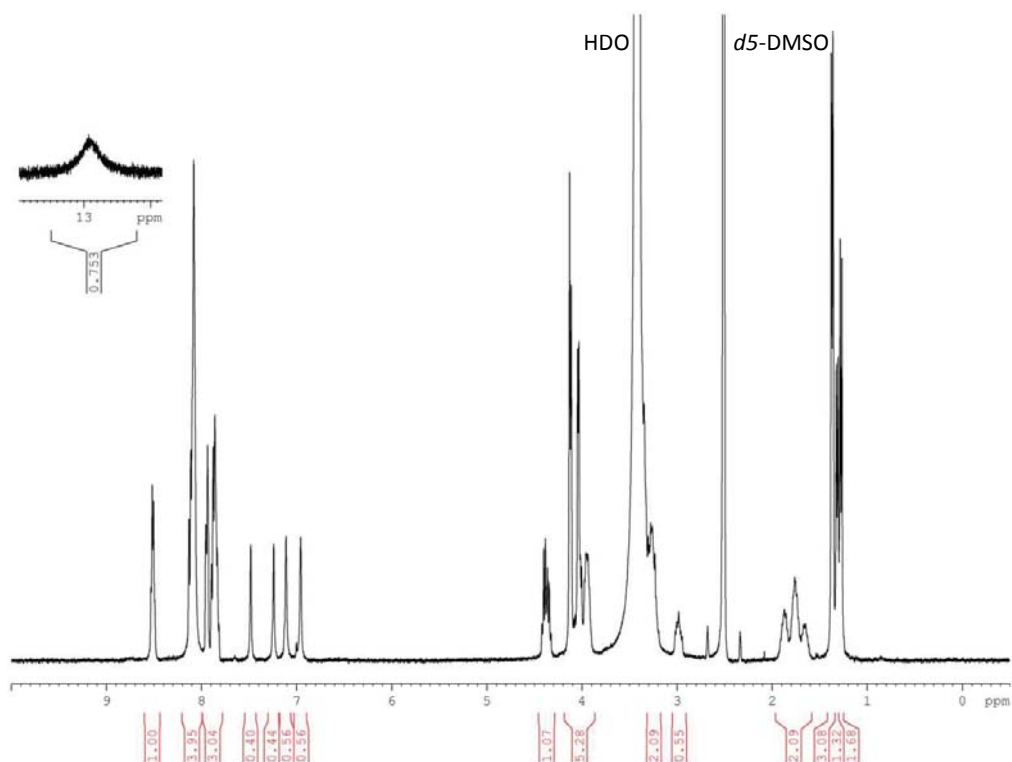
^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO), for the mixture of two rotamers (ratio 0.6:0.4): δ 12.90 (br s, 1H), 8.52 (app t, $J = 5.2$ Hz, 0.6H), 8.50 (app t, $J = 5.3$ Hz, 0.4H), 8.13-8.08 (m, 4H), 7.95-7.82 (m, 3H), 7.48 (br s, 0.4H), 7.24 (br s, 0.4H), 7.11 (br s, 0.6H), 6.96 (br s, 0.6H), 4.41 (q, $J = 7.3$ Hz, 0.6H), 4.35 (q, $J = 7.4$ Hz, 0.4H), 4.13 (s, 1.2H), 4.11 (s, 0.8H), 4.08-4.00 (m, 2H), 3.97-3.94 (m, 1H), 3.34-3.23 (m, 3.4H), 3.02-2.95 (m, 0.6H), 1.91-1.62 (m, 2H), 1.37 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.31 (d, $J = 6.8$ Hz, 1.2H), 1.27 (d, $J = 7.2$ Hz, 1.8H).

HRMS: calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 517.17112; observed 517.17105.

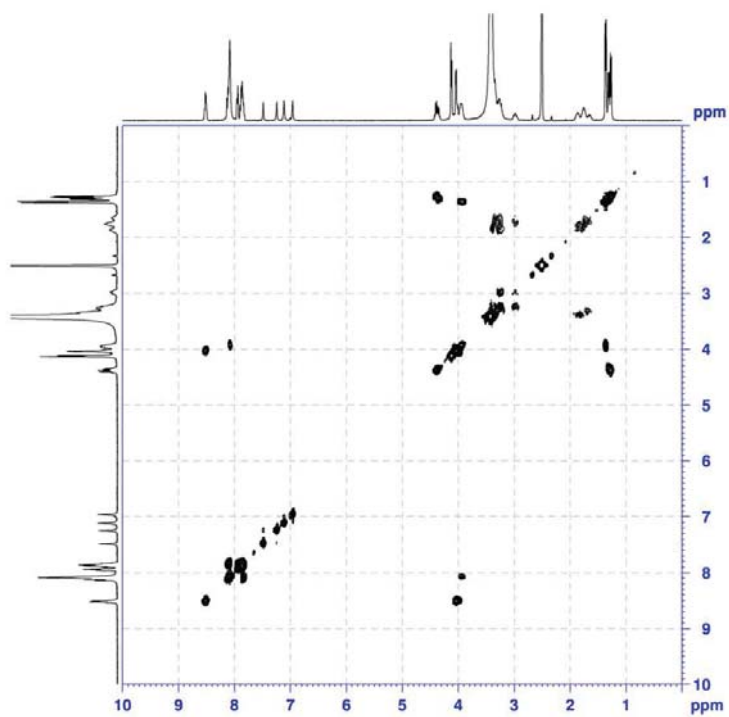


HPLC chromatogram of 5a (20 to 60% B in 30 minutes).

Supporting Information

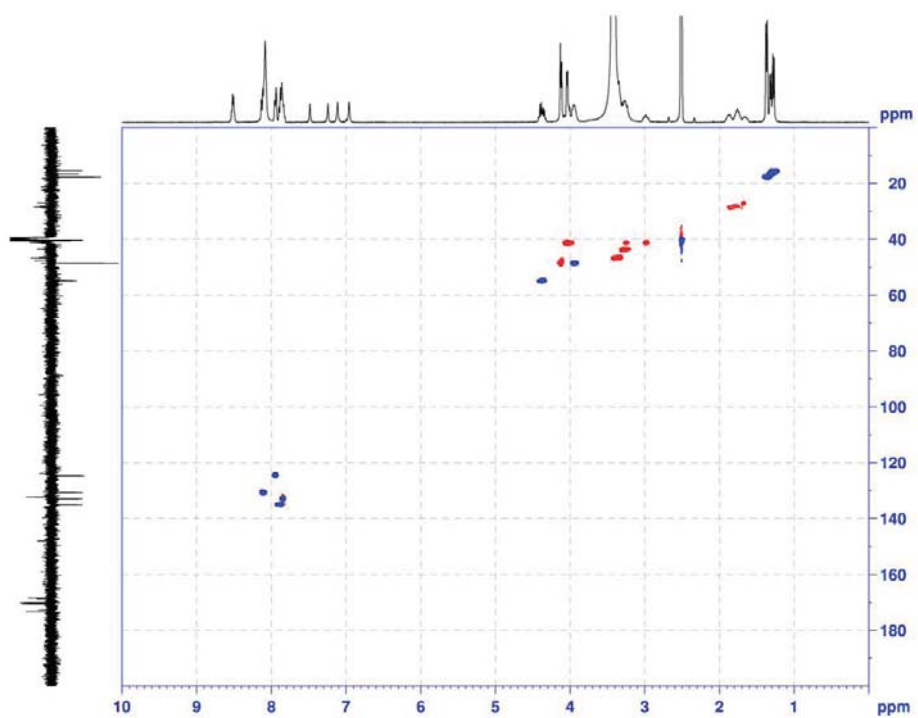


^1H NMR spectrum of **5a** (400 MHz, d_6 -DMSO).



COSY spectrum of compound **5a** (^1H , 400 MHz, d_6 -DMSO).

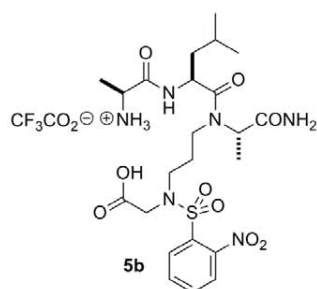
Supporting Information



HSQC spectrum of **5a** ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$, 400 MHz 1H, d_6 -DMSO).

Supporting Information

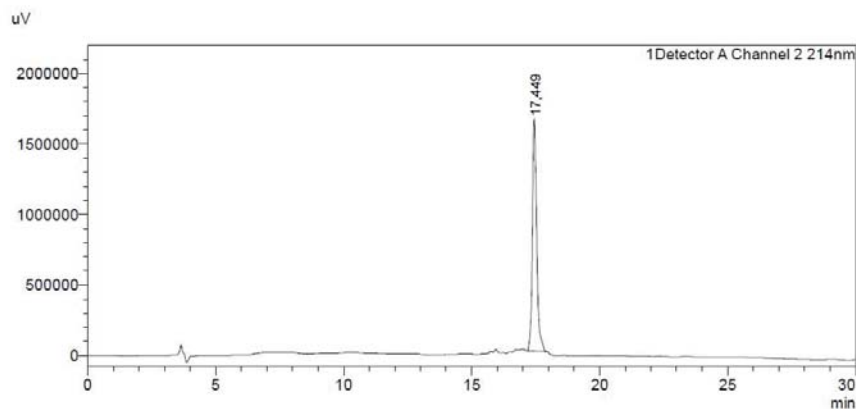
Compound **5b**



From 0.080 mmol resin, 17 mg were obtained (31% yield).

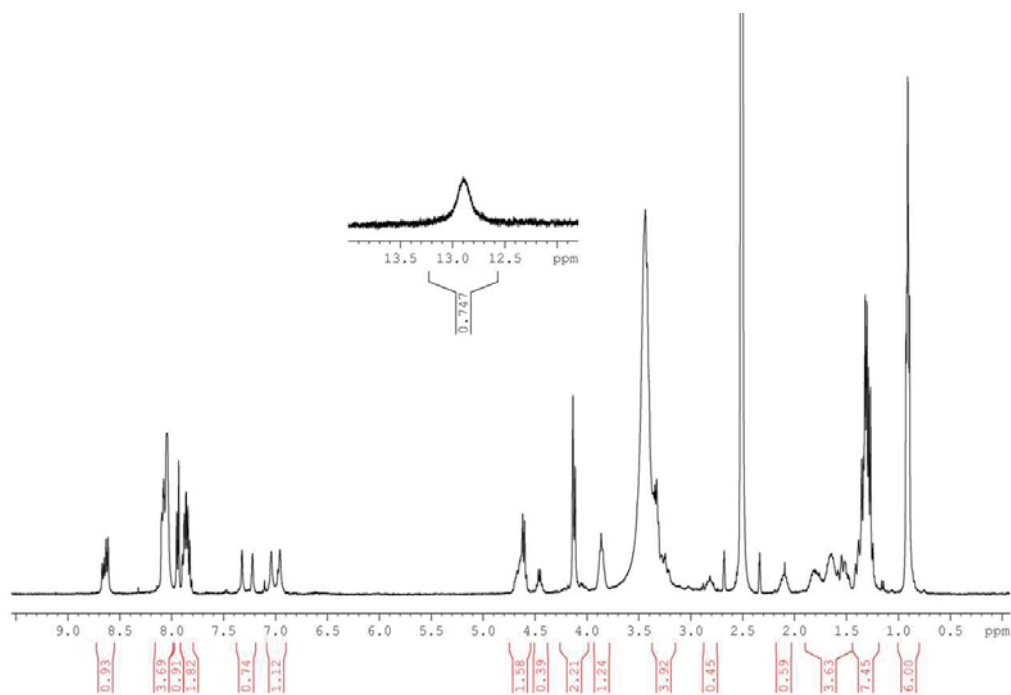
^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) for the mixture of two rotamers (ratio 0.6:0.4): δ 12.89 (br s, 1H), 8.66 (d, $J = 7.5$ Hz, 0.4H), 8.62 (d, $J = 7.8$ Hz, 0.6H), 8.10-8.04 (m, 4H), 7.95-7.81 (m, 3H), 7.32 (br s, 0.4H), 7.22 (br s, 0.4H), 7.04 (br s, 0.6H), 6.96 (br s, 0.6H), 4.69-4.58 (m, 1.6H), 4.46 (q, $J = 6.9$ Hz, 0.4H), 4.13 (s, 1.2H), 4.11 (s, 0.8H), 3.89-3.82 (m, 1H), 3.42-3.21 (m, 3.6H), 2.85-2.78 (m, 0.4H), 2.14-2.06 (m, 0.4H), 1.85-1.48 (m, 3.6H), 1.41-1.24 (m, 7H), 0.92-0.89 (m, 6H).

HRMS: calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 573.23372; observed 573.23356.

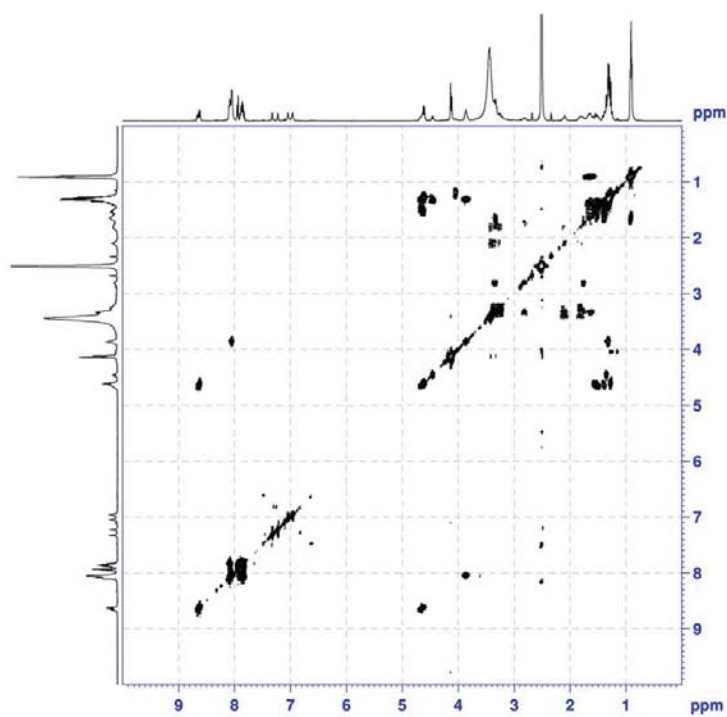


HPLC chromatogram of **5b** (20 to 70% B in 20 minutes).

Supporting Information

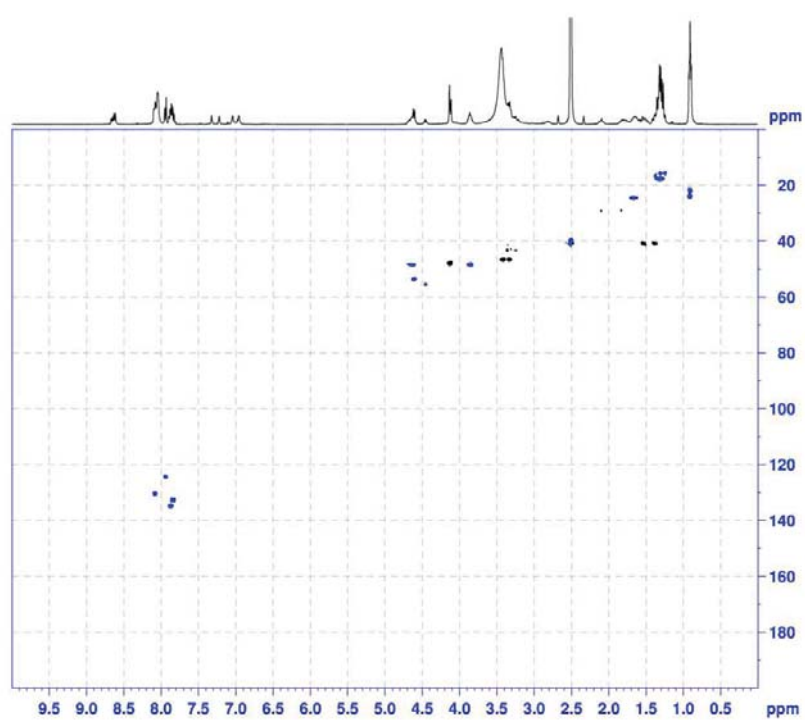


^1H NMR spectrum of **5b** (400 MHz, d_6 -DMSO).

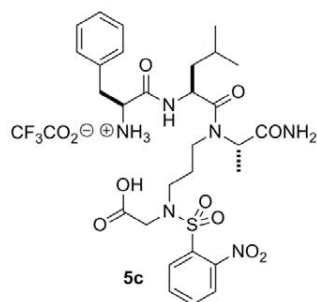


COSY spectrum of compound **5b** (^1H , 400 MHz, d_6 -DMSO).

Supporting Information



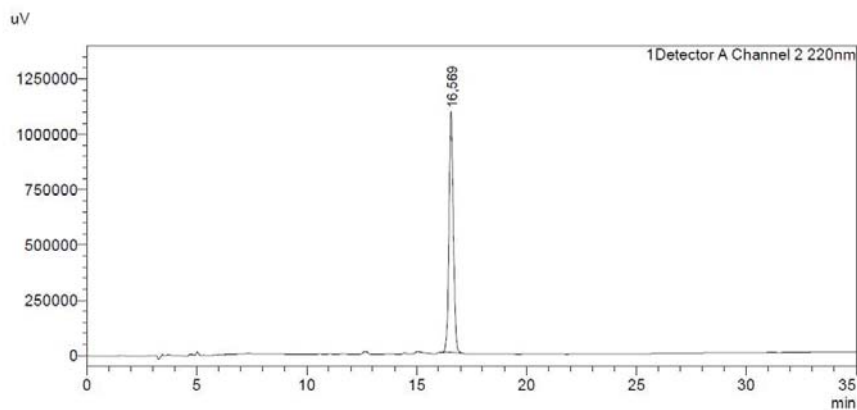
HSQC spectrum of **5b** ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$, 400 MHz 1H, *d*₆-DMSO).

Compound **5c**

From 0.080 mmol resin, 28 mg were obtained (46% yield).

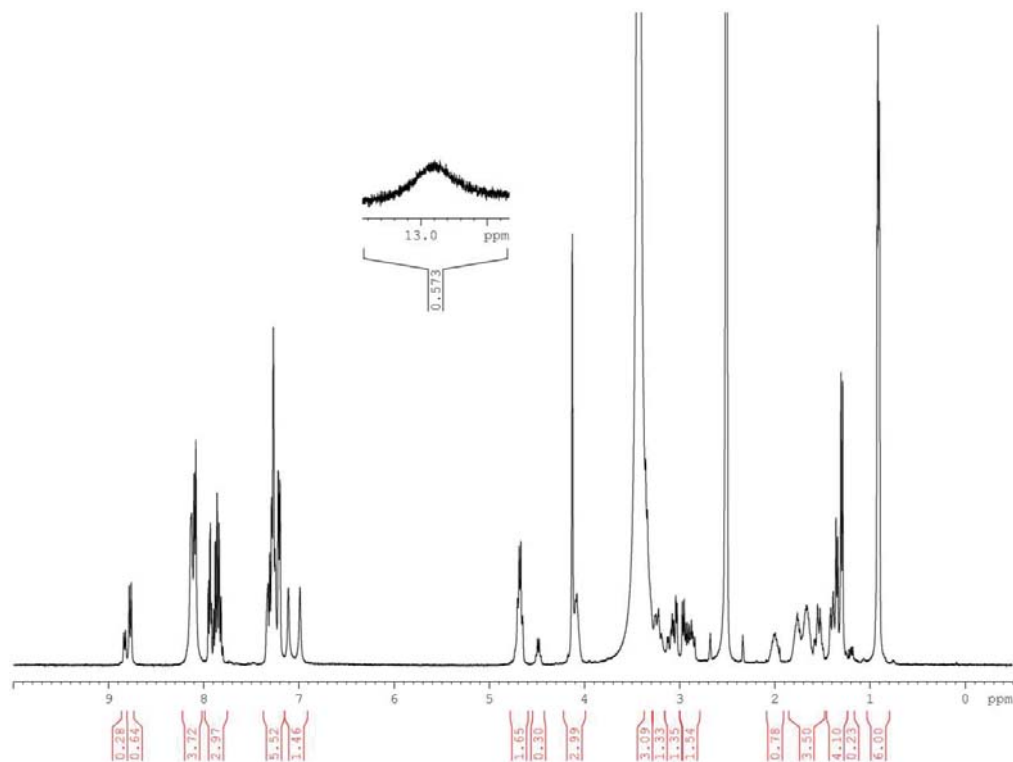
^1H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) for the mixture of two rotamers (ratio 0.7:0.3): δ 12.91 (br s, 1H), 8.83 (d, *J* = 7.4 Hz, 0.3H), 8.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 0.7H), 8.13-8.08 (m, 4H), 7.95-7.82 (m, 3H), 7.32-7.20 (m, 5.6H), 7.11 (br s, 0.7H), 6.99 (br s, 0.7H), 4.70-4.65 (m, 1.7H), 4.48 (q, *J* = 7.0 Hz, 0.3H), 4.13 (s, 2H), 4.10-4.07 (m, 1H), 3.36-3.19 (m, 3H), 3.10-3.02 (m, 1.3H), 2.97-2.84 (m, 1.7H), 2.03-1.96 (m, 0.7H), 1.79-1.51 (m, 3.3H), 1.41-1.29 (m, 4H), 0.92-0.90 (m, 6H).

HRMS: calculated for $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ *m/z* 649.26502; observed 649.26500.

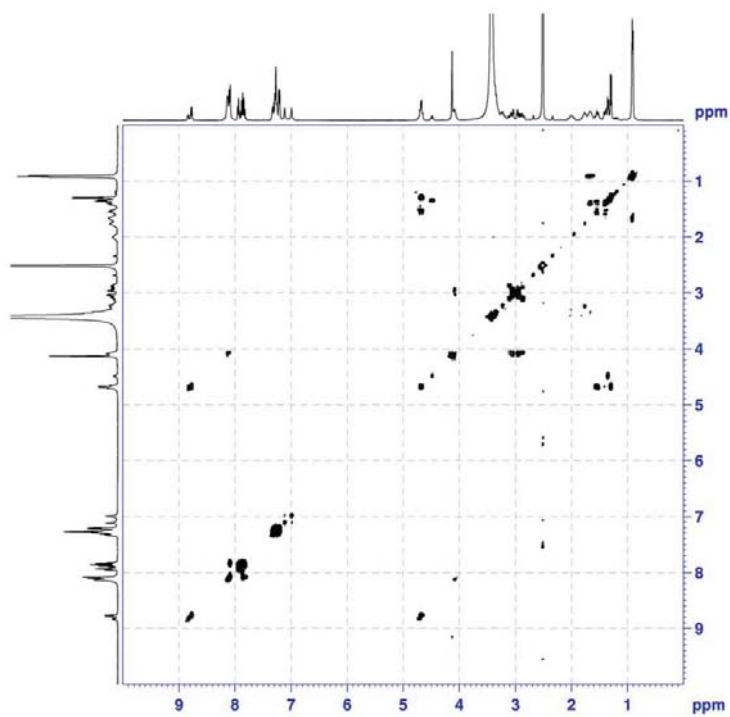


HPLC chromatogram of **5c** (30 to 100% B in 30 minutes).

Supporting Information

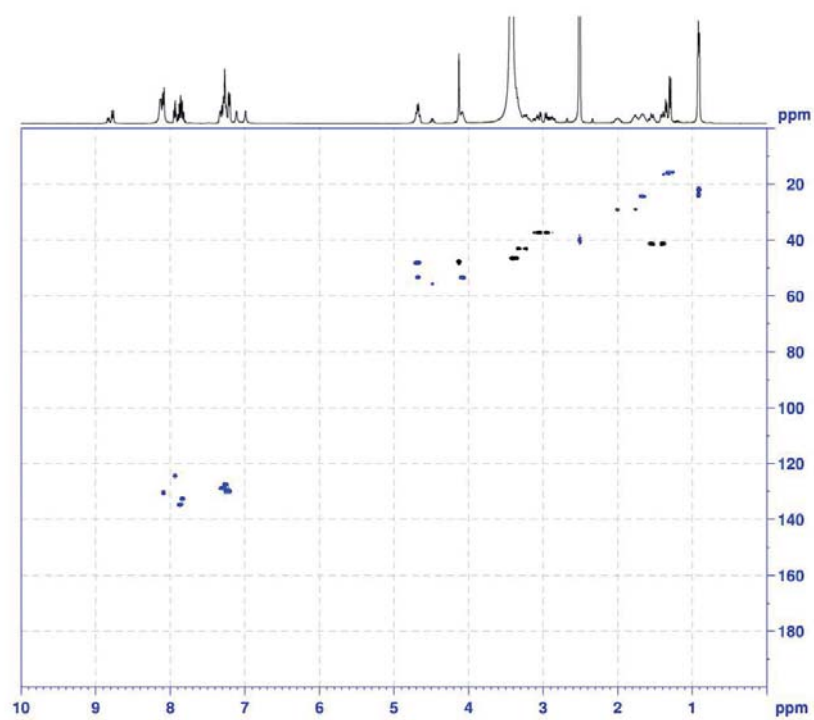


^1H NMR spectrum of **5c** (400 MHz, d_6 -DMSO).

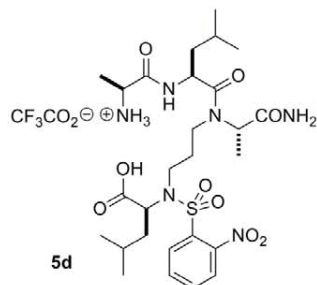


COSY spectrum of compound **5c** (^1H , 400 MHz, d_6 -DMSO).

Supporting Information



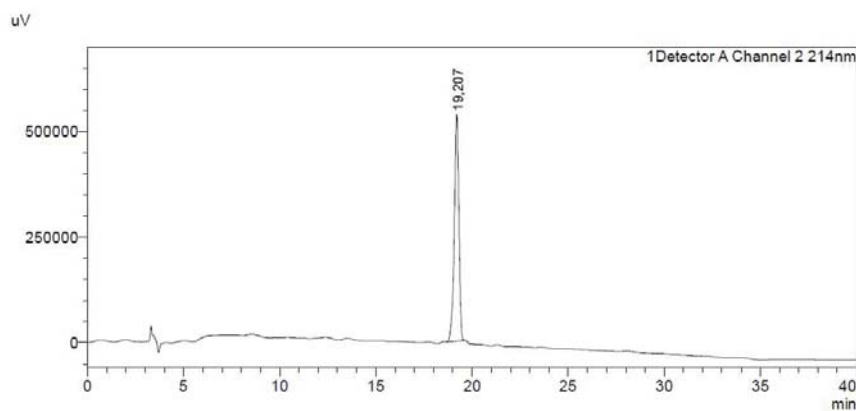
HSQC spectrum of **5c** ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$, 400 MHz 1H, d_6 -DMSO).

Compound **5d**

From 0.080 mmol resin, 14 mg were obtained (24% yield).

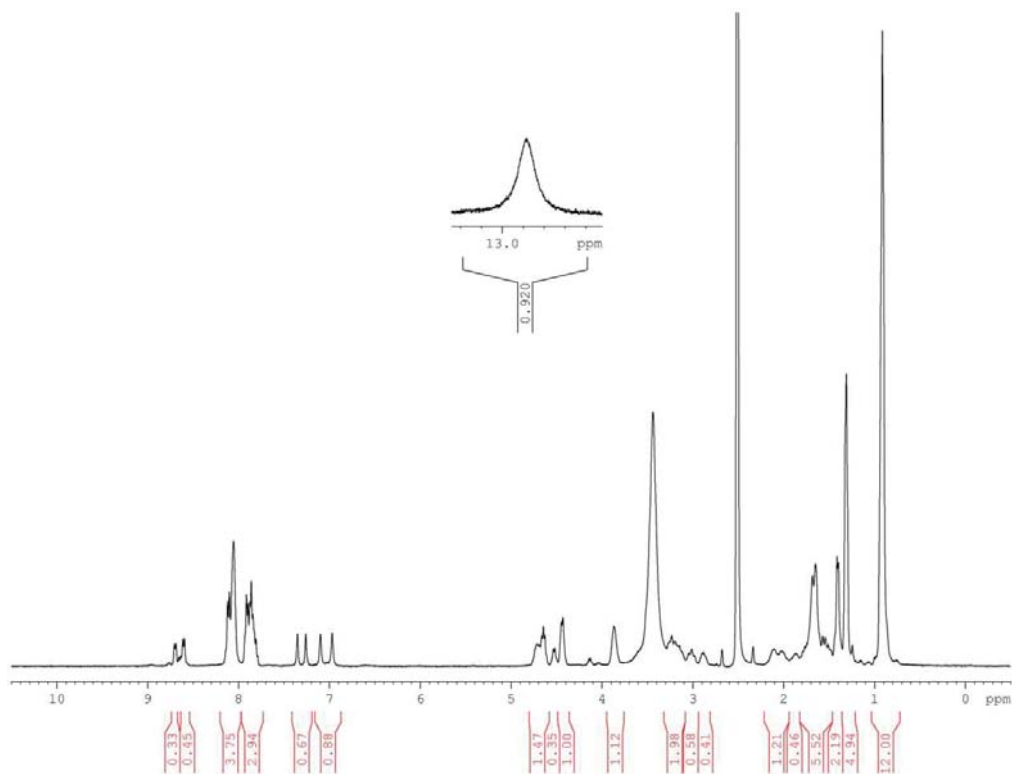
^1H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) for the mixture of two rotamers (ratio 0.6:0.4): δ 12.89 (br s, 1H), 8.69 (d, *J* = 7.0 Hz, 0.4H), 8.61 (d, *J* = 7.4 Hz, 0.6H), 8.12-8.05 (m, 4H), 7.91-7.79 (m, 3H), 7.35 (br s, 0.4H), 7.26 (br s, 0.4H), 7.10 (br s, 0.6H), 6.97 (br s, 0.6H), 4.74-4.63 (m, 1.6H), 4.52 (q, *J* = 6.6 Hz, 0.4H), 4.45-4.42 (m, 1H), 3.89-3.84 (m, 1H), 3.55-3.14 (m, hidden under the water peak, 3H), 3.04-2.98 (m, 0.6H), 2.90-2.85 (m, 0.4H), 2.14-1.99 (m, 1H), 1.89-1.82 (m, 0.4H), 1.76-1.51 (m, 5.6H), 1.41-1.39 (m, 2.2H), 1.31 (br s, 4.8H), 0.91 (br s, 12H).

HRMS: calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ *m/z* 629.29632; observed 629.29621.

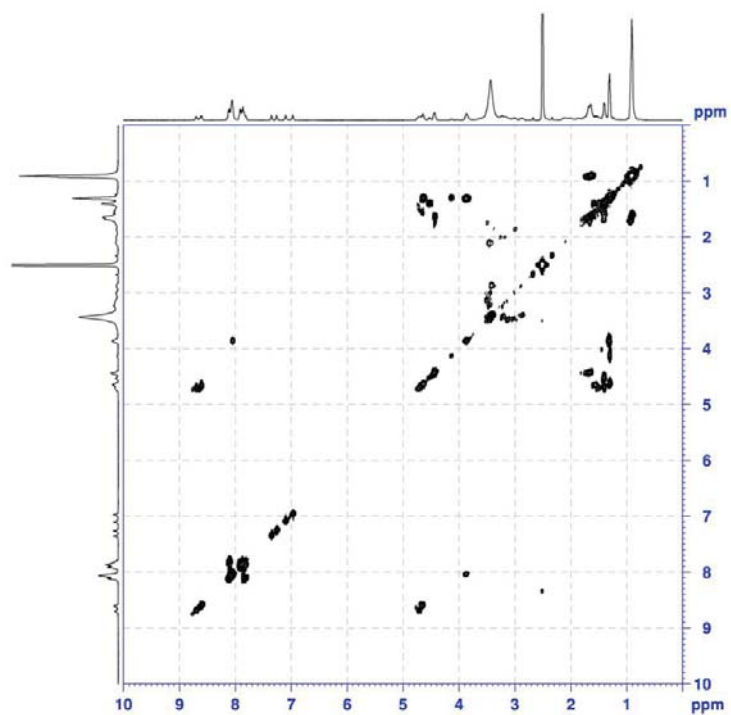


HPLC chromatogram of **5d** (30 to 100% B in 30 minutes).

Supporting Information

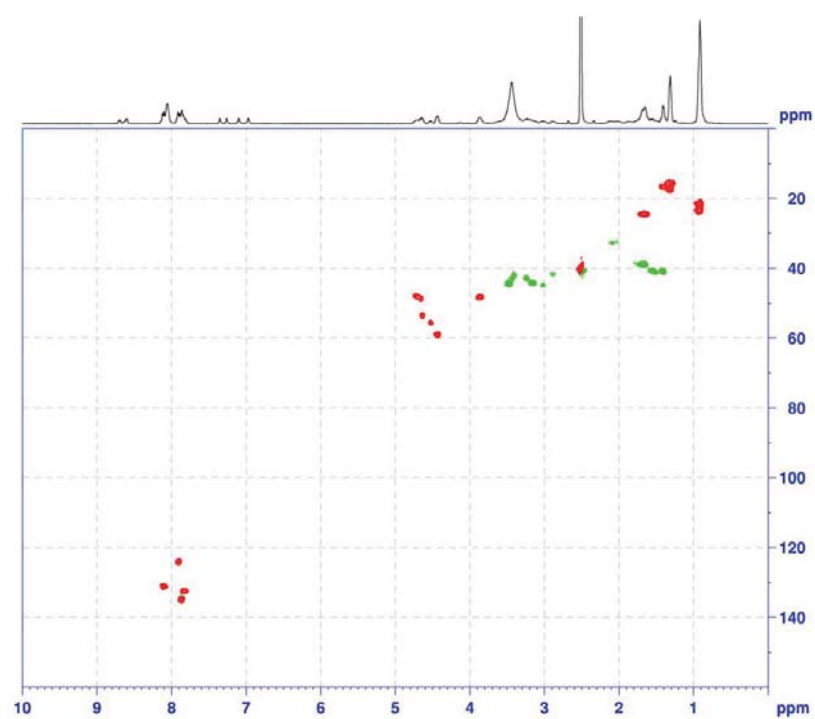


^1H NMR spectrum of **5d** (400 MHz, d_6 -DMSO).

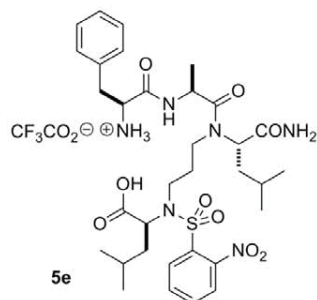


COSY spectrum of compound **5d** (^1H , 400 MHz, d_6 -DMSO).

Supporting Information



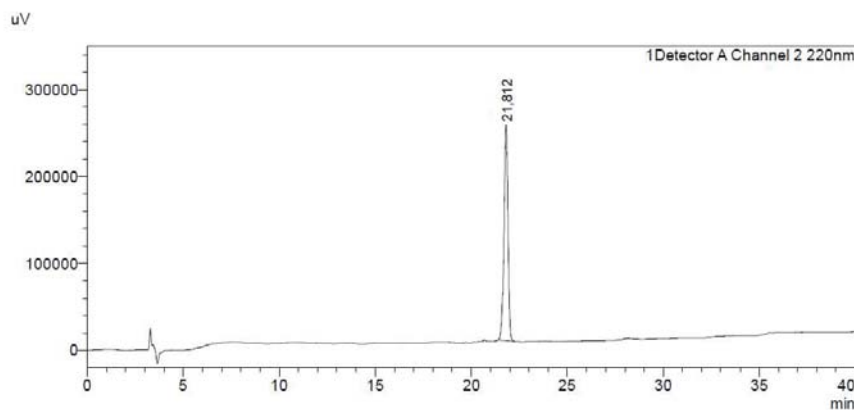
HSQC spectrum of **5d** ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$, 400 MHz 1H, *d*6-DMSO).

Compound **5e**

From 0.080 mmol resin, 16 mg were obtained (24% yield).

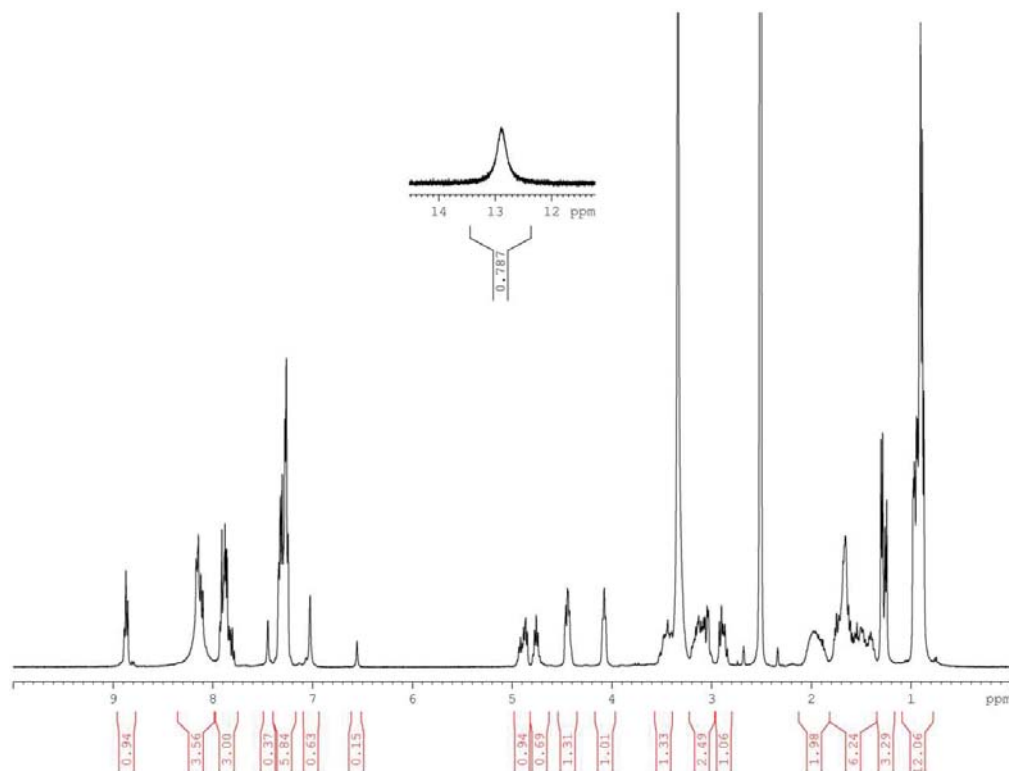
^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) for the mixture of two rotamers (ratio 0.6:0.4): δ 12.90 (br s, 1H), 8.88 (d, J = 6.4 Hz, 0.4H), 8.86 (d, J = 7.5 Hz, 0.6H), 8.17-8.10 (m, 4H), 7.93-7.79 (m, 3H), 7.45 (br s, 0.4H), 7.34-7.25 (m, 6H), 7.02 (br s, 0.6H), 4.93-4.85 (m, 1H), 4.76 (app p, J = 7.0 Hz, 0.6H), 4.46-4.42 (m, 1.4H), 4.08 (app t, J = 6.0 Hz, 1H), 3.51-3.30 (m, hidden under the water peak, 2.4H), 3.20-3.03 (m, 2.6H), 2.92-2.84 (m, 1H), 2.05-1.85 (m, 2H), 1.77-1.39 (m, 6H), 1.29 (d, J = 6.6 Hz, 1.8H), 1.25 (d, J = 6.6 Hz, 1.2H), 0.98-0.87 (m, 12H).

HRMS: calculated for $\text{C}_{33}\text{H}_{49}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 705.32762; observed 705.32830.

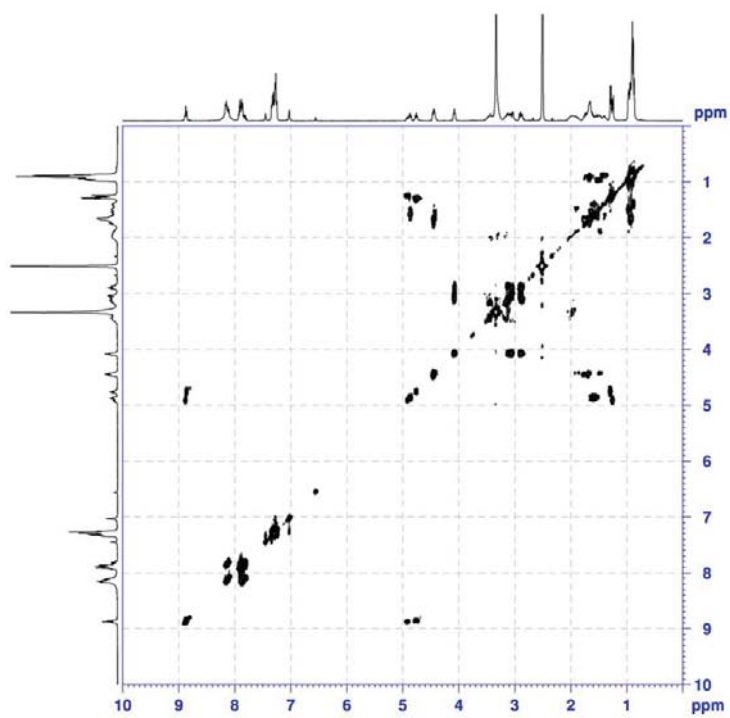


HPLC chromatogram of **5e** (30 to 100% B in 30 minutes).

Supporting Information

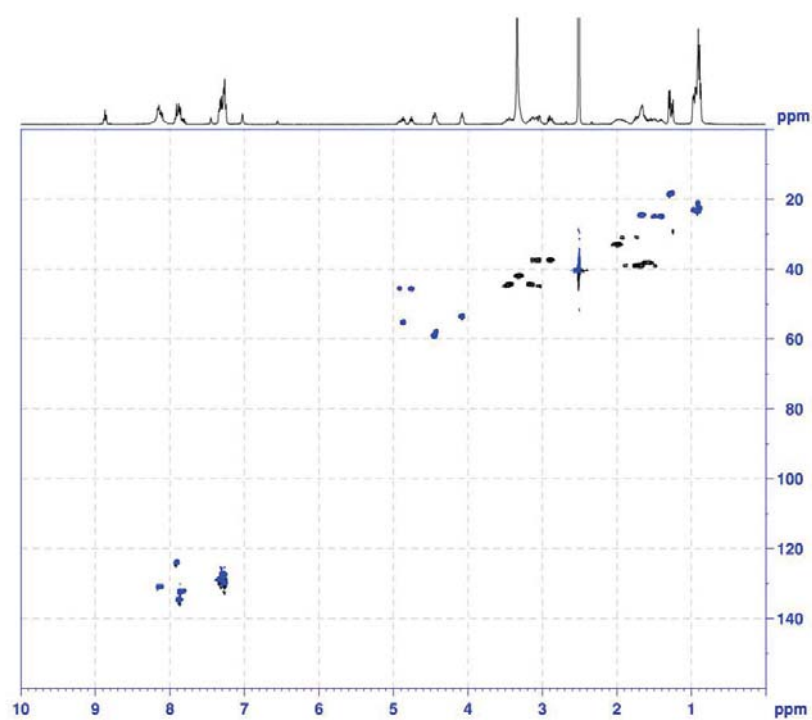


^1H NMR spectrum of **5e** (400 MHz, d_6 -DMSO).

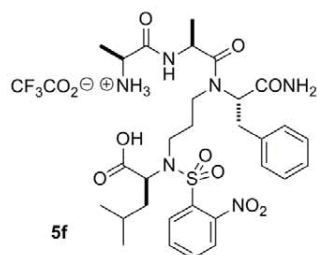


COSY spectrum of compound **5e** (^1H , 400 MHz, d_6 -DMSO).

Supporting Information



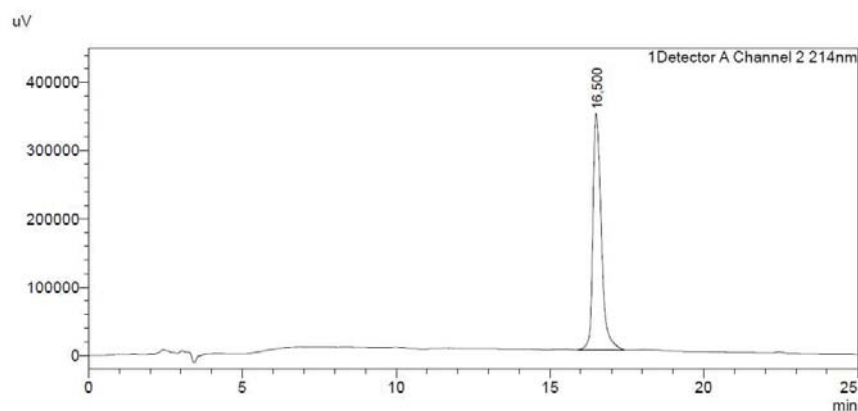
HSQC spectrum of **5e** ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$, 400 MHz 1H, *d*₆-DMSO).

Compound **5f**

From 0.080 mmol resin, 9 mg were obtained (15% yield).

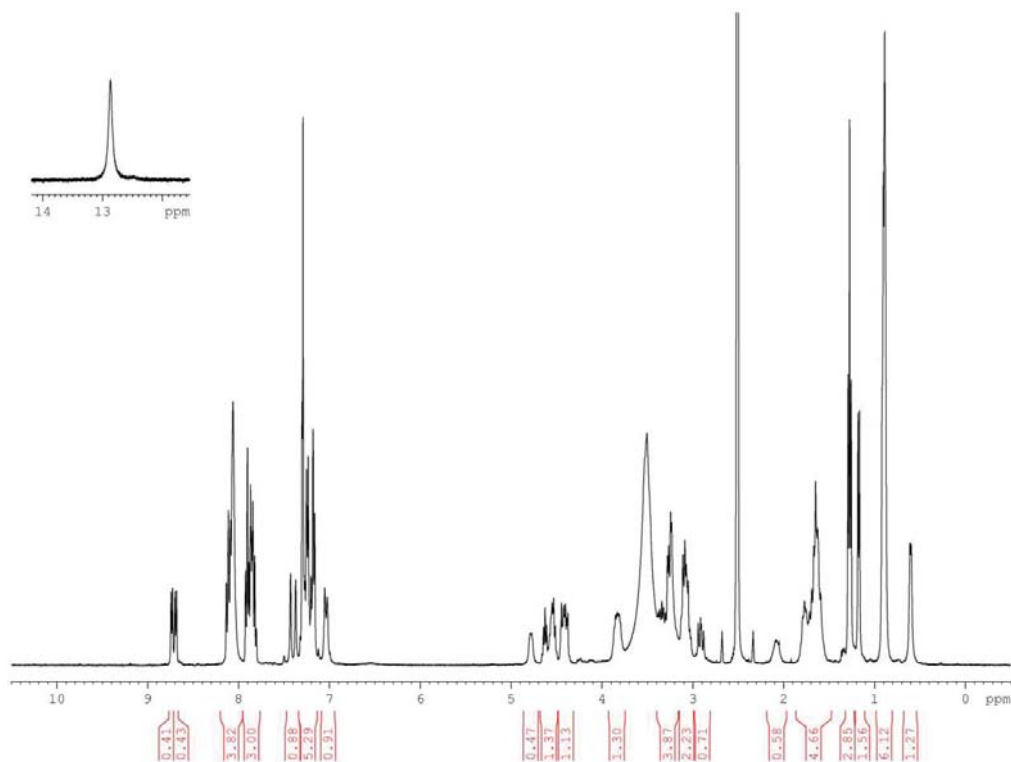
^1H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) for the mixture of two rotamers (ratio 0.5:0.5): δ 12.87 (br s, 1H), 8.73 (d, $J = 6.6$ Hz, 0.5H), 8.69 (d, $J = 7.0$ Hz, 0.5H), 8.13-8.06 (m, 4H), 7.92-7.81 (m, 3H), 7.43 (br s, 0.5H), 7.37 (br s, 0.5H), 7.30-7.16 (m, 5H), 7.05 (br s, 0.5H), 7.02 (br s, 0.5H), 4.80-4.75 (m, 0.5H), 4.62 (app p, $J = 6.9$ Hz, 0.5H), 4.58-4.51 (m, 1H), 4.44-4.37 (m, 1H), 3.86-3.81 (m, 1H), 3.38-3.23 (m, 3.5H), 3.10-3.03 (m, 2H), 2.91 (dd, $J = 13.8, 10.1$ Hz, 0.5H), 2.12-2.03 (m, 0.5H), 1.79-1.59 (m, 4.5H), 1.28 (d, $J = 6.9$ Hz, 1.5H), 1.26 (d, $J = 6.7$ Hz, 1.5H), 1.17 (d, $J = 6.7$ Hz, 1.5H), 0.91-0.88 (m, 6H), 0.60 (d, $J = 5.3$ Hz, 1.5H).

HRMS: calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 663.28067; observed 663.28081.

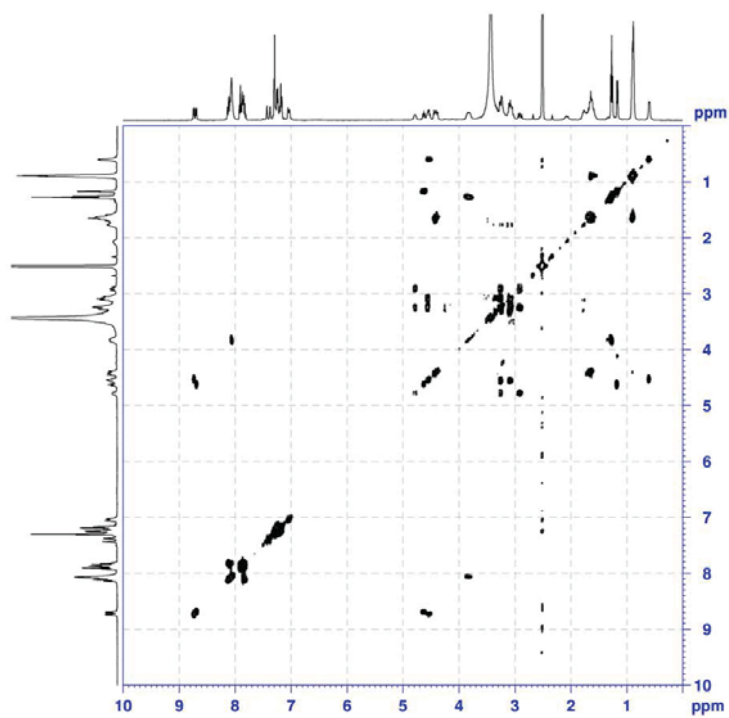


HPLC chromatogram of **5f** (40 to 80% B in 20 minutes).

Supporting Information

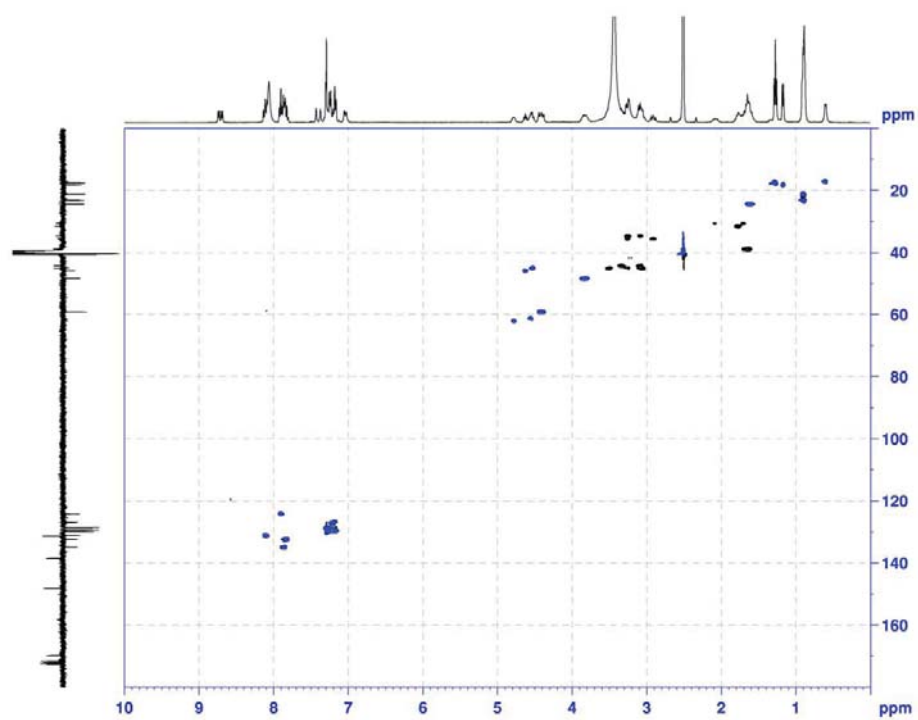


^1H NMR spectrum of **5f** (400 MHz, d_6 -DMSO).

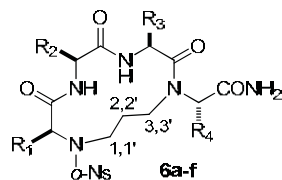


COSY spectrum of compound **5f** (^1H , 400 MHz, d_6 -DMSO).

Supporting Information



HSQC spectrum of **5f** ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$, 400 MHz 1H, *d*6-DMSO).

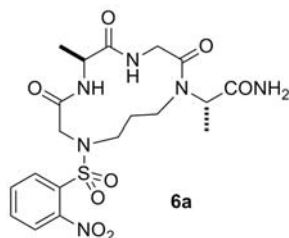
General Procedure for Macrocyclic Peptides **6a-f** Synthesis

The desired linear precursor **5a-f** (0.015 mmol) was dissolved in DMF at the desired concentration, typically 1 mM or 10 mM. PyBOP (16 mg, 0.03 mmol, 2.0 equivalents) and DIEA (22 μ L, 0.12 mmol, 8.0 equivalents) were added and the mixture was shaken 1 hour at room temperature. The reaction was monitored by analytical HPLC. The reaction mixture was concentrated and the product was purified by semi-preparative HPLC using solvents A and B as described above but without TFA.

The proposition of attribution of ^1H NMR data for compounds **6a-f** below is given as deduced from a combination of ^1H NMR at variable temperatures (VT), COSY, ROESY and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC experiments. For all VT experiments, the absence of degradation of the products during the analysis was confirmed by new recordings of the final spectra at 298 K. These spectra were identical to the initial ones.

Spectroscopic Data, HPLC chromatograms and NMR spectra for Macrocyclic Peptides 6a-f

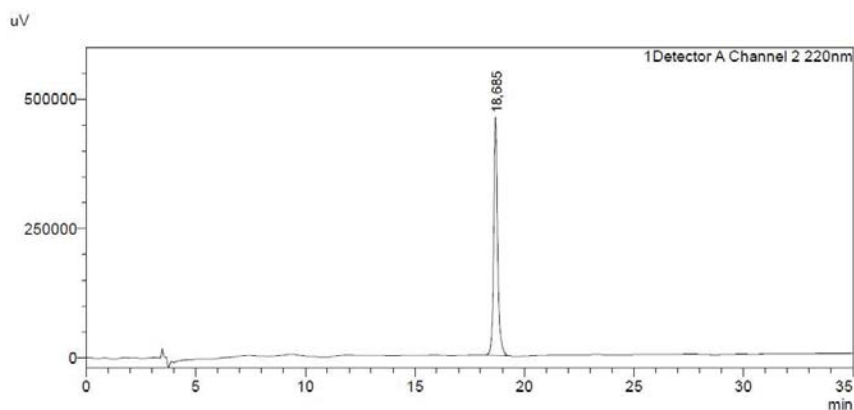
Compound 6a



From 6 mg (0.010 mmol) of **5a**, 2.6 mg were obtained (52% yield).

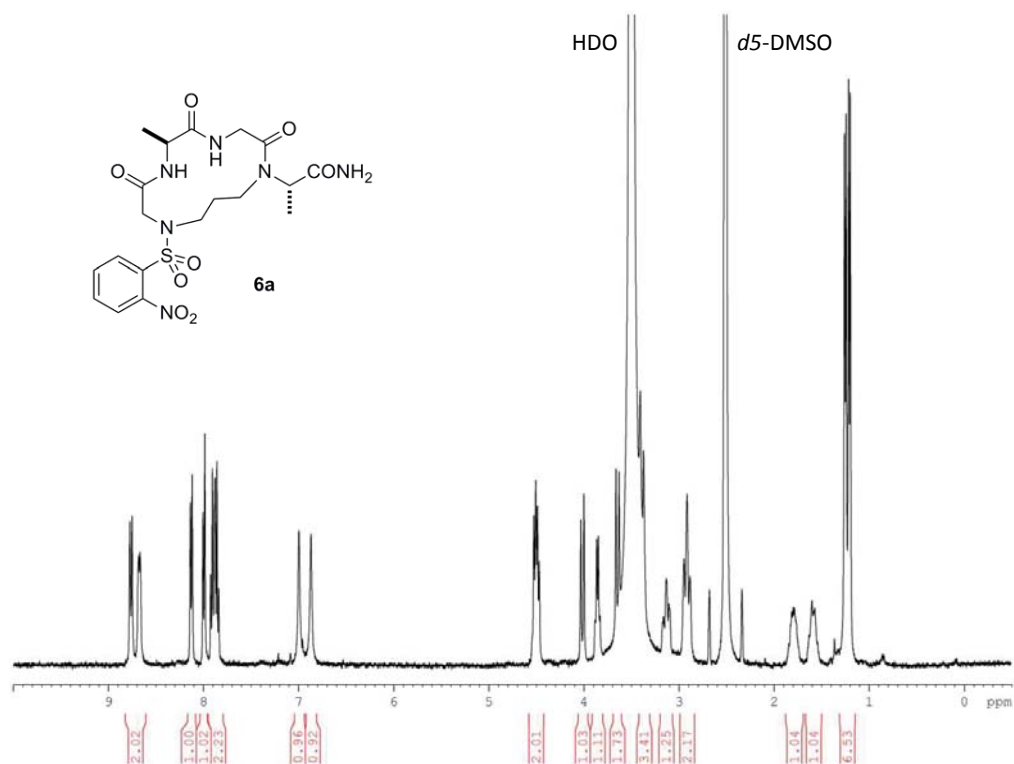
^1H NMR (400 MHz, *d6*-DMSO): δ 8.76 (d, J = 9.2 Hz, 1H, A2-NH), 8.67 (br d, J = 5.7 Hz, 1H, G3-NH), 8.13 (d, J = 7.6 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.99 (d, J = 7.6 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.90 (t, J = 7.4 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.86 (t, J = 7.3 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.00 (s, 1H, CONH₂), 6.89 (s, 1H, CONH₂), 4.52-4.47 (m, 2H, A2-H α and G3-H α), 4.01 (d, J = 13.2 Hz, 1H, G1-H α), 3.85 (q, J = 7.2 Hz, 1H, A4-H α), 3.64 (d, J = 12.8 Hz, 1H, G1-H α'), 3.39 (m, 2H, G3-H α' and H1), 3.13 (app t, J = 12.8 Hz, 1H, H1'), 2.91 (app t, J = 12.7 Hz, H3 and H3'), 1.86-1.74 (m, 1H, H2), 1.65-1.53 (m, 1H, H2'), 1.25 (d, J = 6.9 Hz, 3H, A4-H β), 1.20 (d, J = 6.9 Hz, 3H, A2-H β).

HRMS (ESI): calculated for C₁₉H₂₆N₆O₈SNa [M+Na]⁺ m/z 521.14250; observed 521.14226.

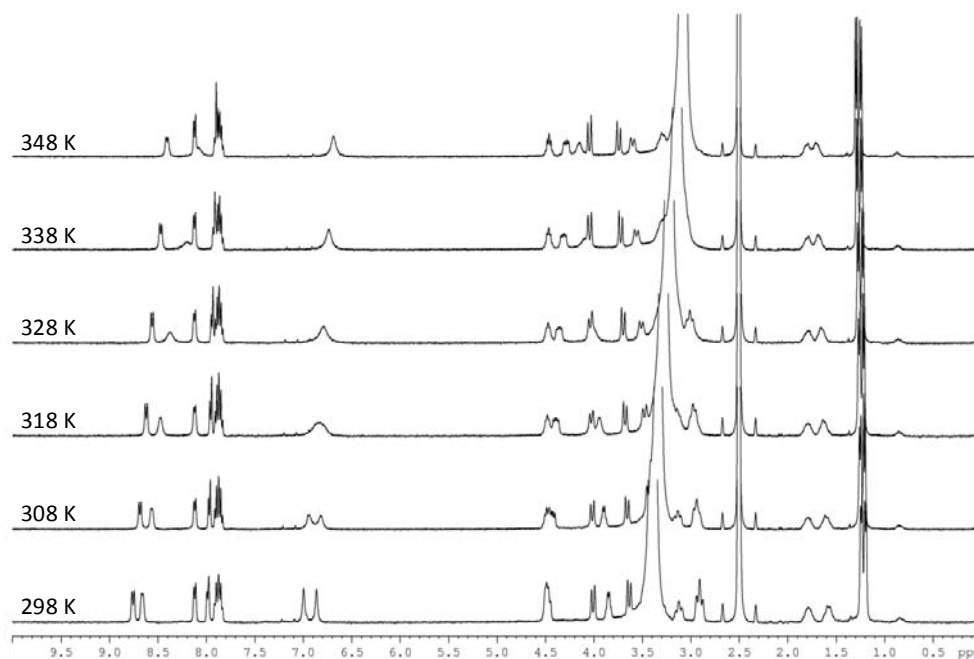


HPLC chromatogram of compound **6a** (20 to 60% B in 30 minutes).

Supporting Information

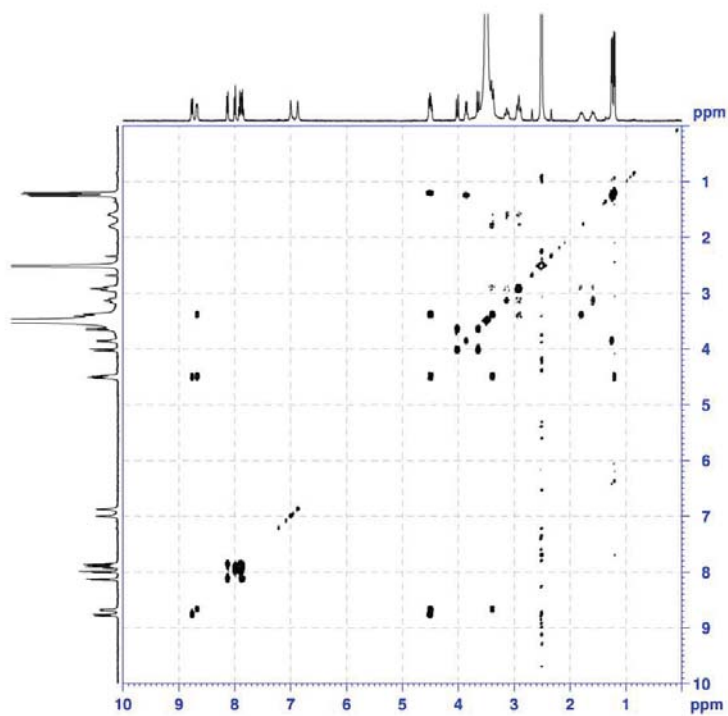


^1H NMR spectrum of compound **6a** (400 MHz, d_6 -DMSO).

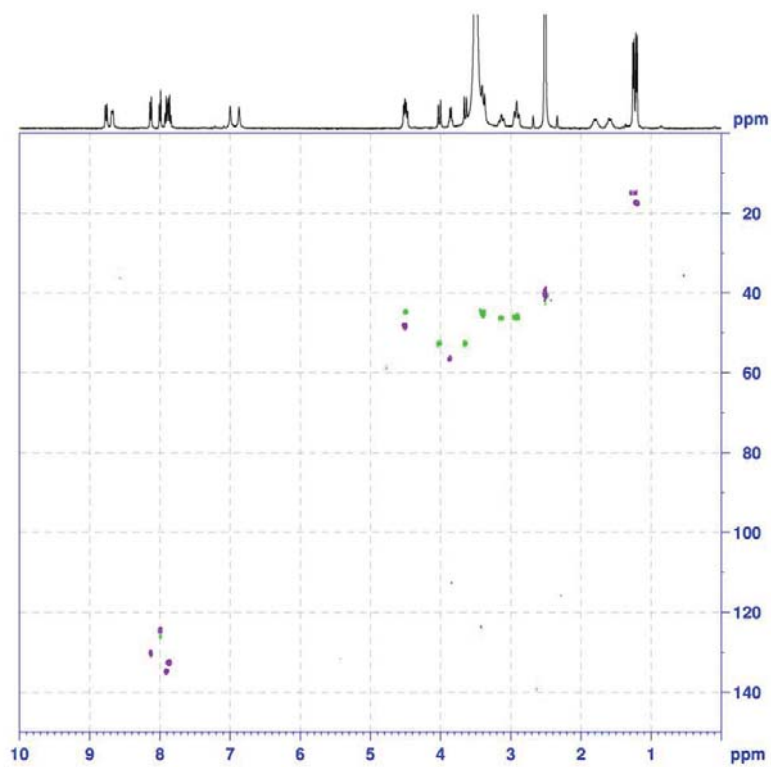


Temperature dependence ^1H NMR spectra of compound **6a** (400 MHz, d_6 -DMSO).

Supporting Information

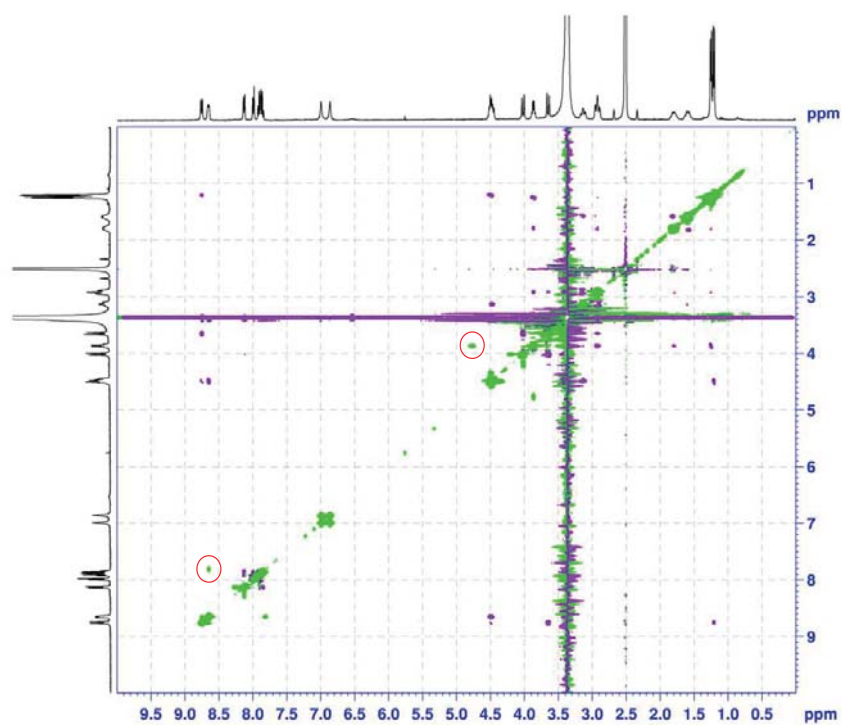


COSY spectrum of compound **6a** (^1H , 400 MHz, d_6 -DMSO).



HSQC spectrum of compound **6a** ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$, 400 MHz, d_6 -DMSO).

Supporting Information

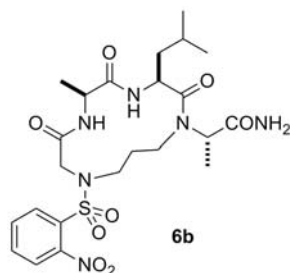


ROESY spectrum of compound **6a** (¹H, 400 MHz, *d*₆-DMSO).

Red circles highlight selected correlation peaks the same phase as the diagonal, indicating the presence of a minor rotamer.

Supporting Information

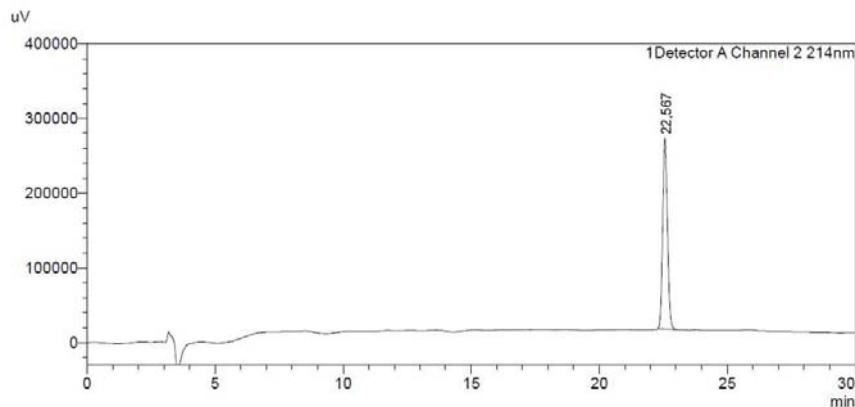
Compound **6b**



From 10 mg (0.015 mmol) of **5b**, 3.5 mg were obtained (42% yield).

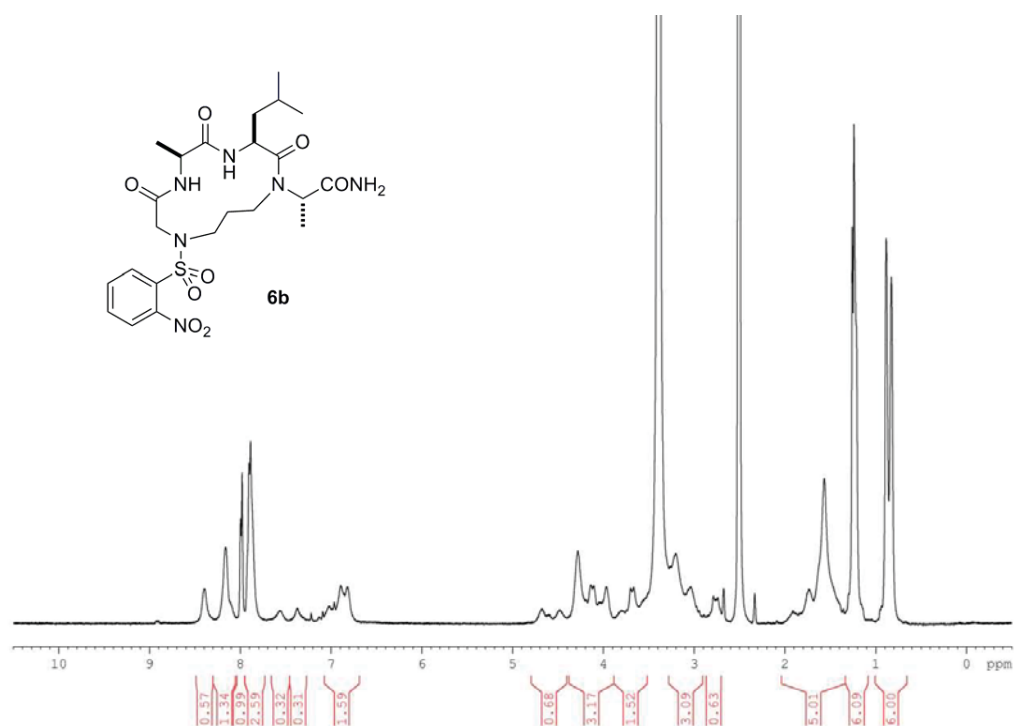
¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO, 348 K): δ 8.15 (br d, J = 6.7 Hz, 2H, *o*-Ns and NH), 7.92-7.86 (m, 3H, *o*-Ns), 7.48 (br s, 1H, NH), 6.72 (br s, 2H, CONH₂), 4.54 (br s, 1H, L3-H α), 4.28 (br s, 2H, A2-H α and A4-H α), 4.14 (d, J = 14.9 Hz, 1H, G1-H α), 3.68 (d, J = 14.9 Hz, 1H, G1-H α'), 3.47 (br s, 1H, H1), 3.20-2.95 (m, 3H, hidden under the water peak at 348K, observed at lower temperatures, H1', H3, H3'), 1.85 (br s, 1H, H2), 1.72-1.54 (m, 4H, H2', L3-H β , L3-H β' and L3-H γ), 1.27 (app t, J = 8.3 Hz, 6H, A2-H β and A4-H β), 0.91 (d, J = 5.8 Hz, 3H, L3-H δ), 0.88 (d, J = 5.8 Hz, 3H, L3-H δ').

HRMS: calculated for C₂₃H₃₄N₆O₈SNa [M+Na]⁺ m/z 577.20510; observed 577.20485.

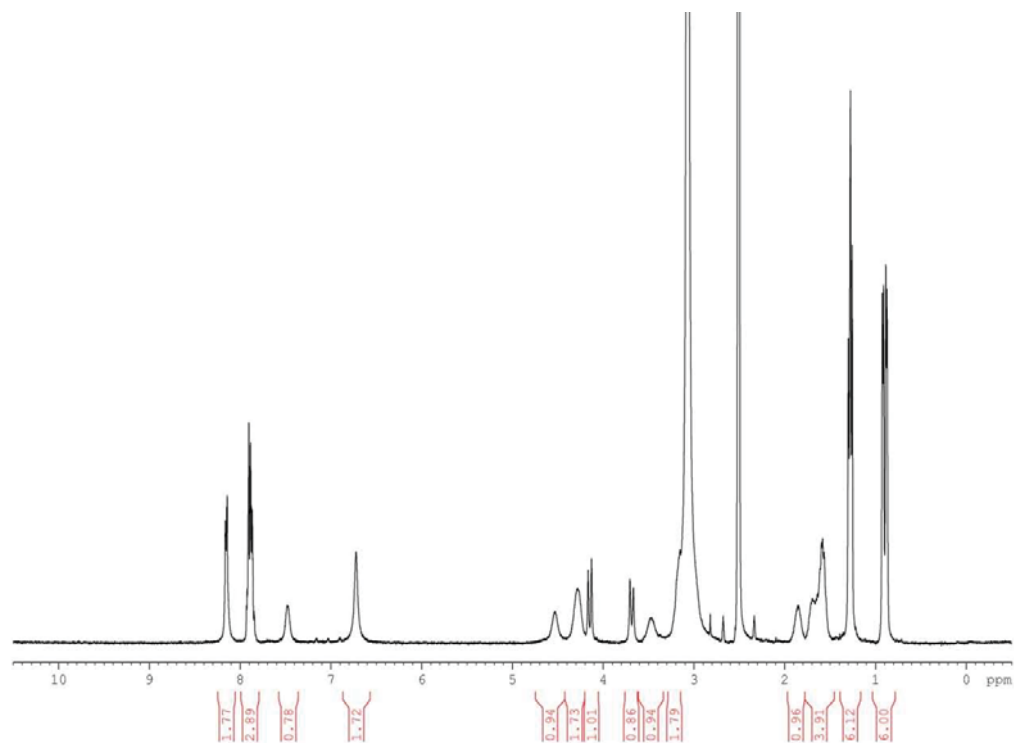


HPLC chromatogram of compound **6b** (30 to 100% B in 30 minutes).

Supporting Information

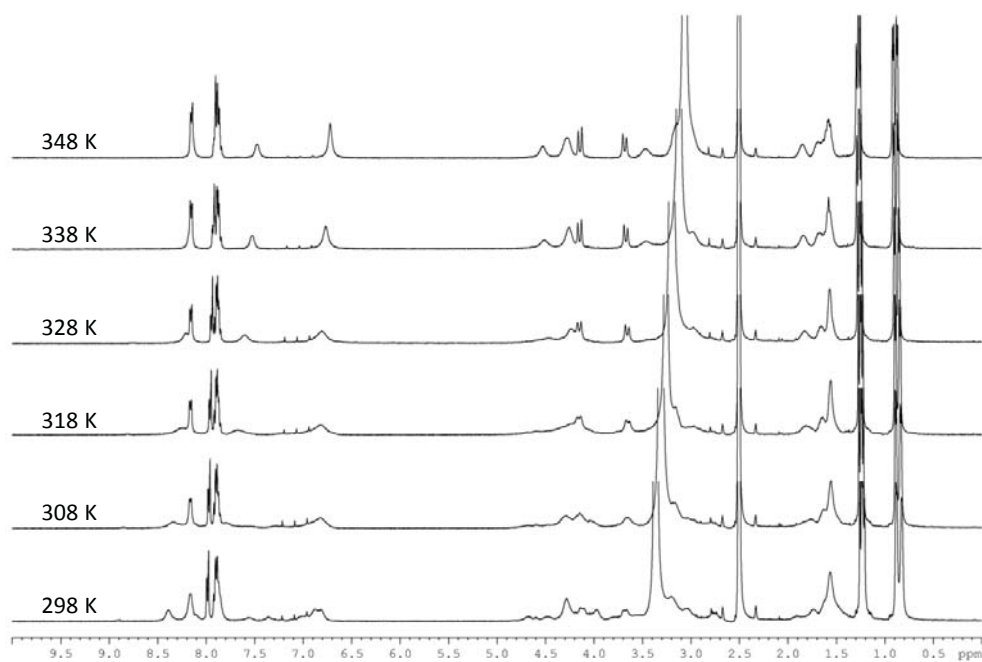


¹H NMR spectrum of compound **6b** (400 MHz, *d*₆-DMSO).

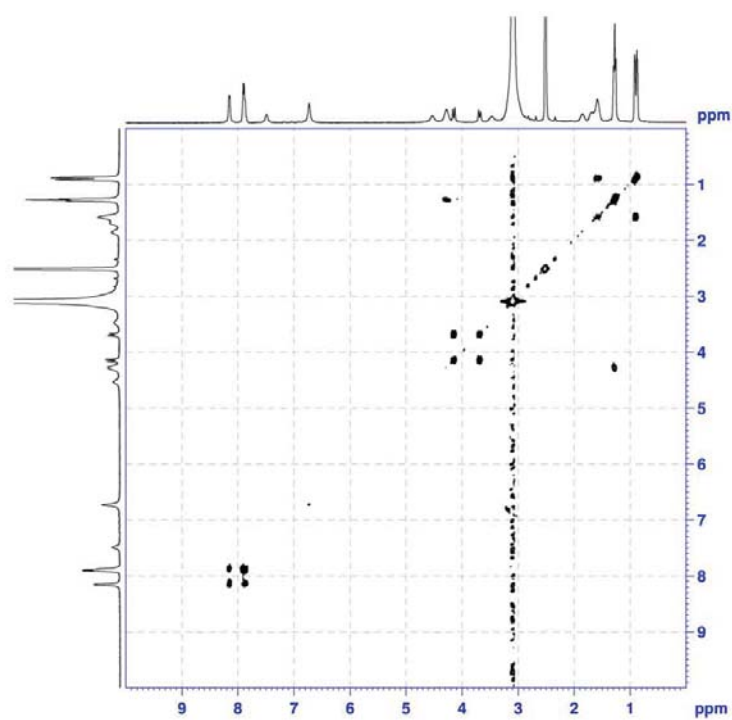


¹H NMR spectrum of compound **6b** (400 MHz, *d*₆-DMSO, 348 K).

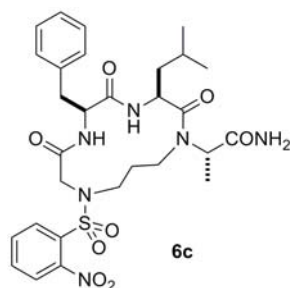
Supporting Information



Temperature dependence ^1H NMR spectra of compound **6b** (400 MHz, d_6 -DMSO).



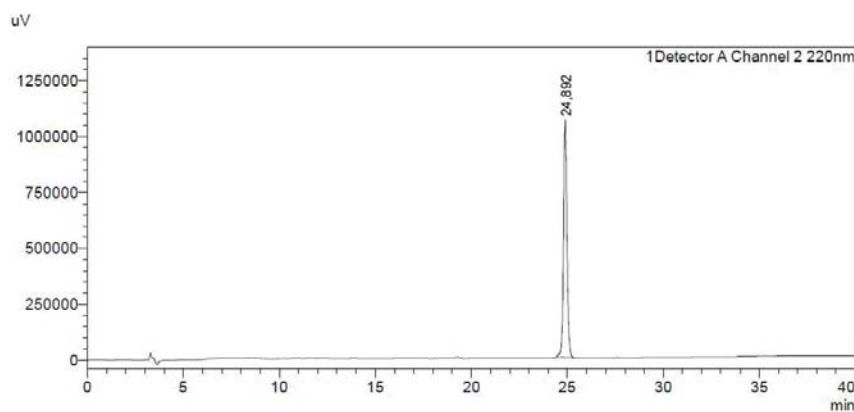
COSY spectrum of compound **6b** at 348K (^1H , 400 MHz, d_6 -DMSO).

Compound **6c**

From 10 mg (0.013 mmol) of **5c**, 3.4 mg were obtained (41% yield).

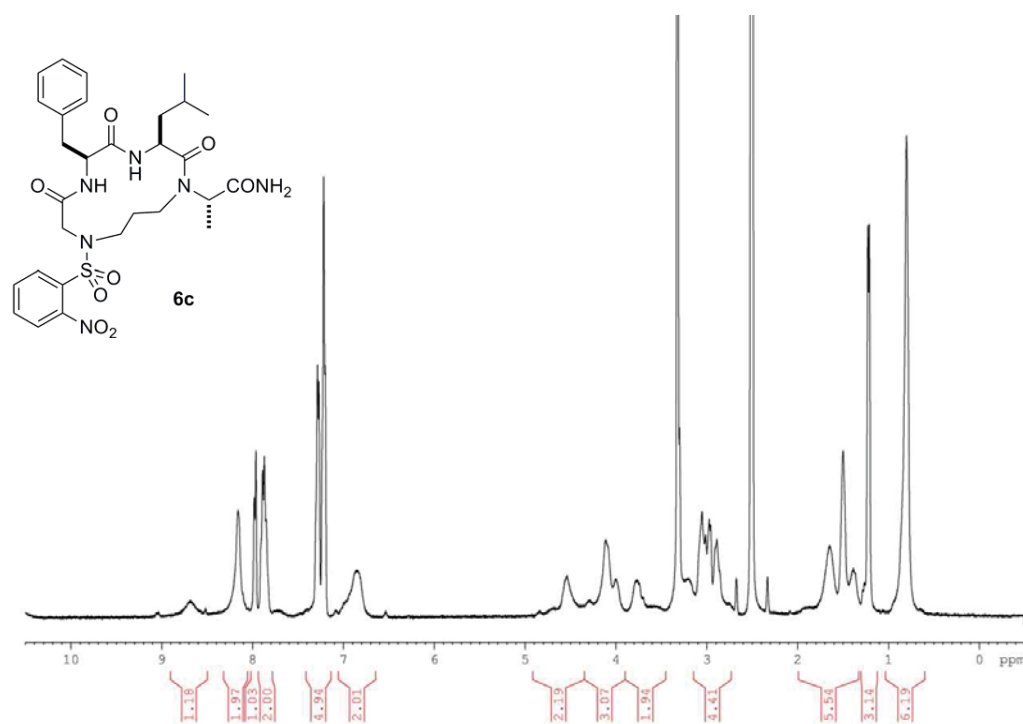
^1H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO, 348 K): δ 8.32 (br s, 1H, NH), 8.14 (d, J = 6.2 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.90-7.85 (m, 3H, *o*-Ns), 7.74 (br s, 1H, NH), 7.29-7.22 (m, 5H, F2-Ph), 6.70 (s, 2H, CONH₂), 4.51 (br d, J = 6.7 Hz, 1H, F2-H α), 4.45 (br s, 1H, L3-H α), 4.29 (br s, 1H, A4-H α), 4.09 (d, J = 15.5 Hz, 1H, G1-H α), 3.72 (d, J = 14.5 Hz, 1H, G1-H α'), 3.43 (br s, 1H, H1), 3.23-2.92 (m, 5H, hidden under the water peak at 348K, observed at lower temperatures, H1', H3, H3', F2-H β and F2-H β'), 1.83 (br s, 1H, H2), 1.68-1.49 (m, 4H, H2', L3-H β , L3-H β' and L3-H γ), 1.26 (d, J = 6.6 Hz, 3H, A4-H β), 0.88 (d, J = 3.6 Hz, 3H, L3-H δ), 0.85 (d, J = 3.5 Hz, 3H, L3-H δ').

HRMS: calculated for C₂₉H₃₈N₆O₈SNa [M+Na]⁺ *m/z* 653.23640; observed 653.23618.

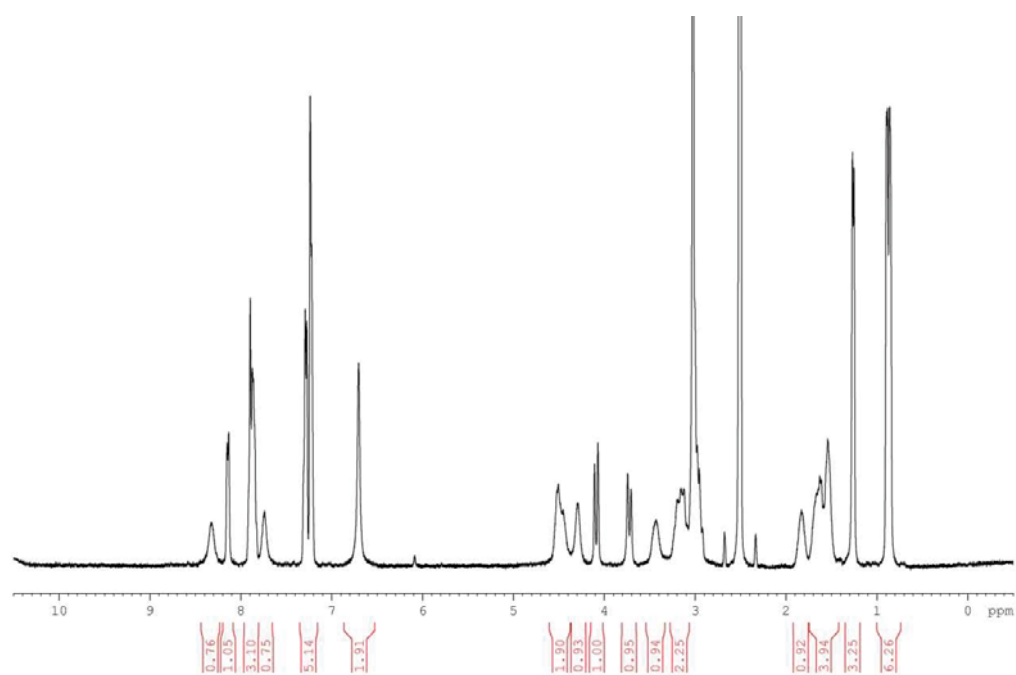


HPLC chromatogram of compound **6c** (30 to 100% B in 30 minutes).

Supporting Information

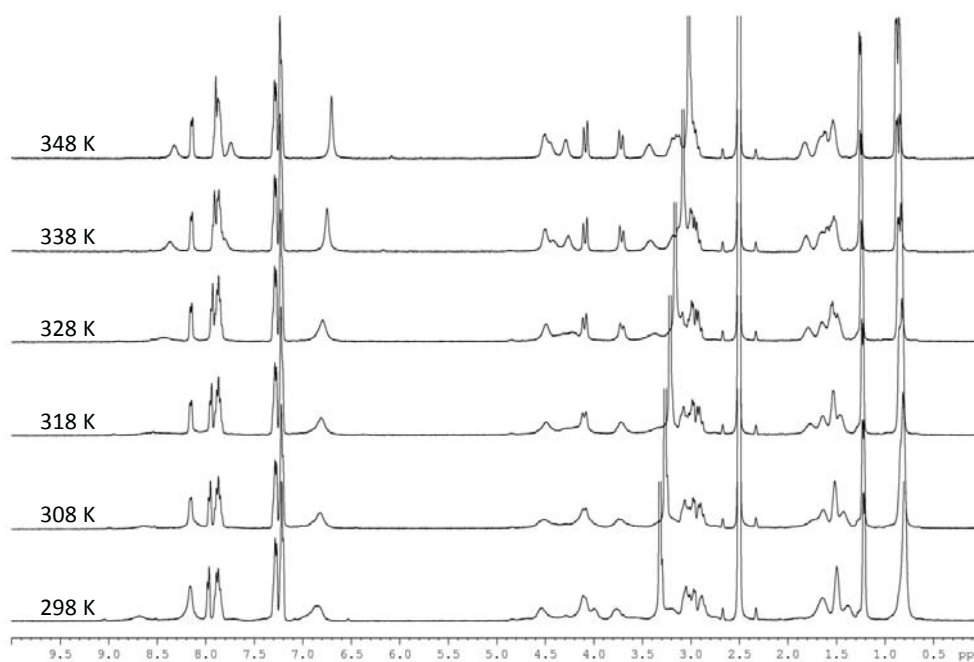


¹H NMR spectrum of compound **6c** (400 MHz, *d*₆-DMSO).

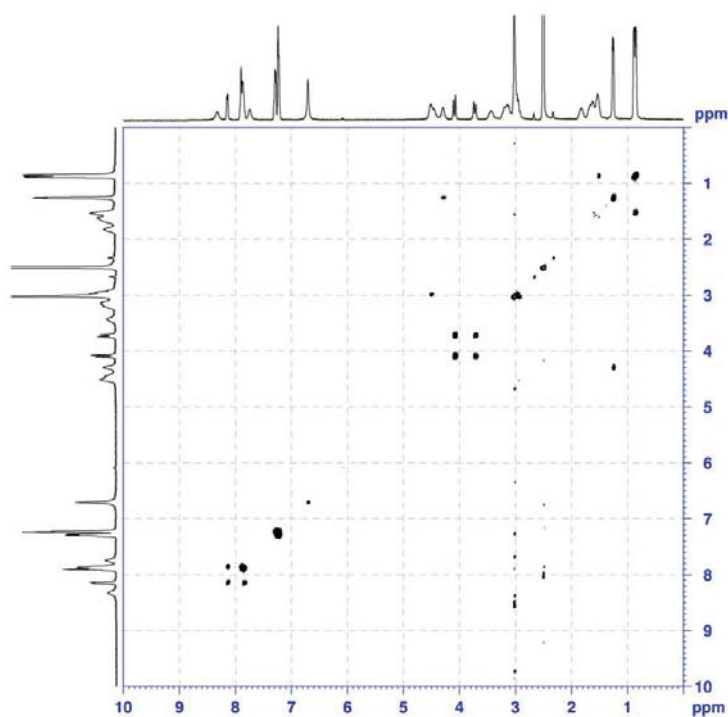


¹H NMR spectrum of compound **6c** (400 MHz, *d*₆-DMSO, 348 K).

Supporting Information

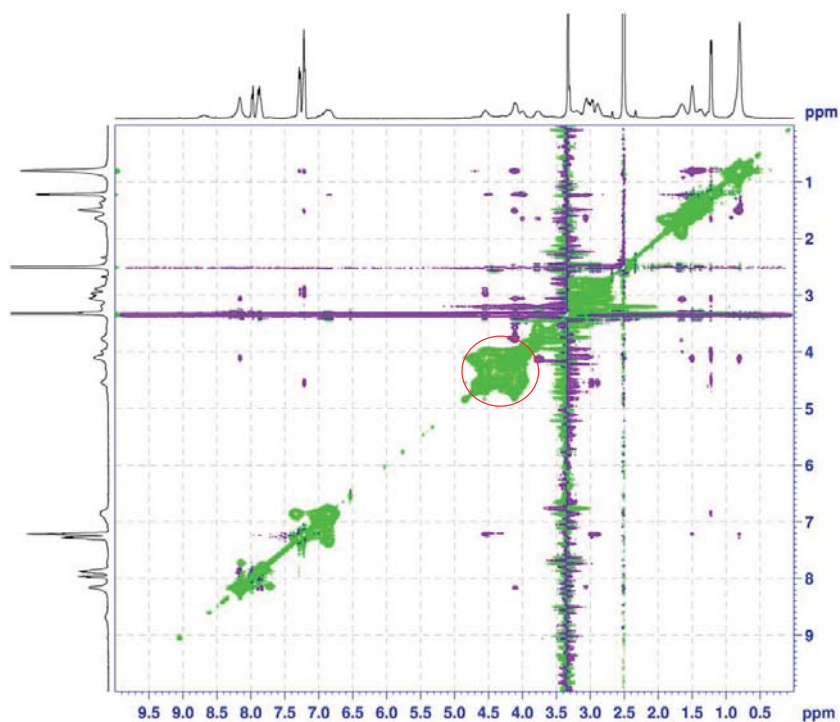


Temperature dependence ^1H NMR spectra of compound **6c** (400 MHz, d_6 -DMSO).



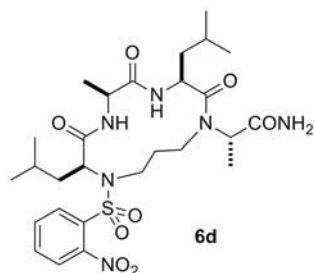
COSY spectrum of compound **6c** at 348K (^1H , 400 MHz, d_6 -DMSO).

Supporting Information



ROESY spectrum of compound **6c** (¹H, 400 MHz, *d*₆-DMSO).

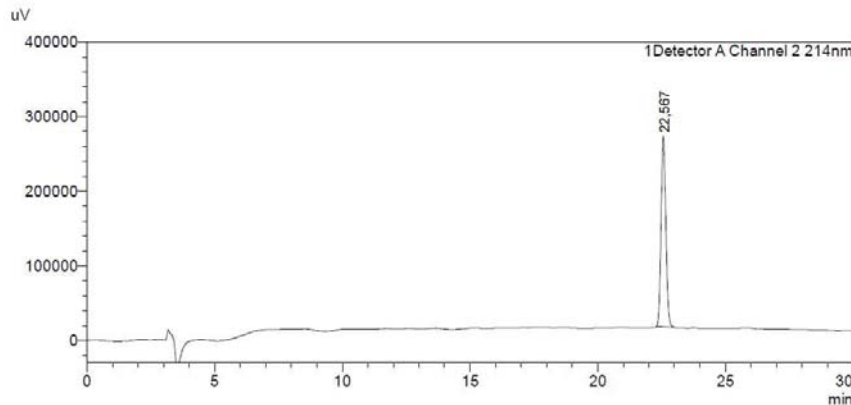
The red circle highlights strong correlation peaks the same phase as the diagonal in the H_α region of the spectrum, indicating the presence of rotamers.

Compound **6d**

From 14 mg (0.019 mmol) of **5d**, 4.0 mg were obtained (35% yield).

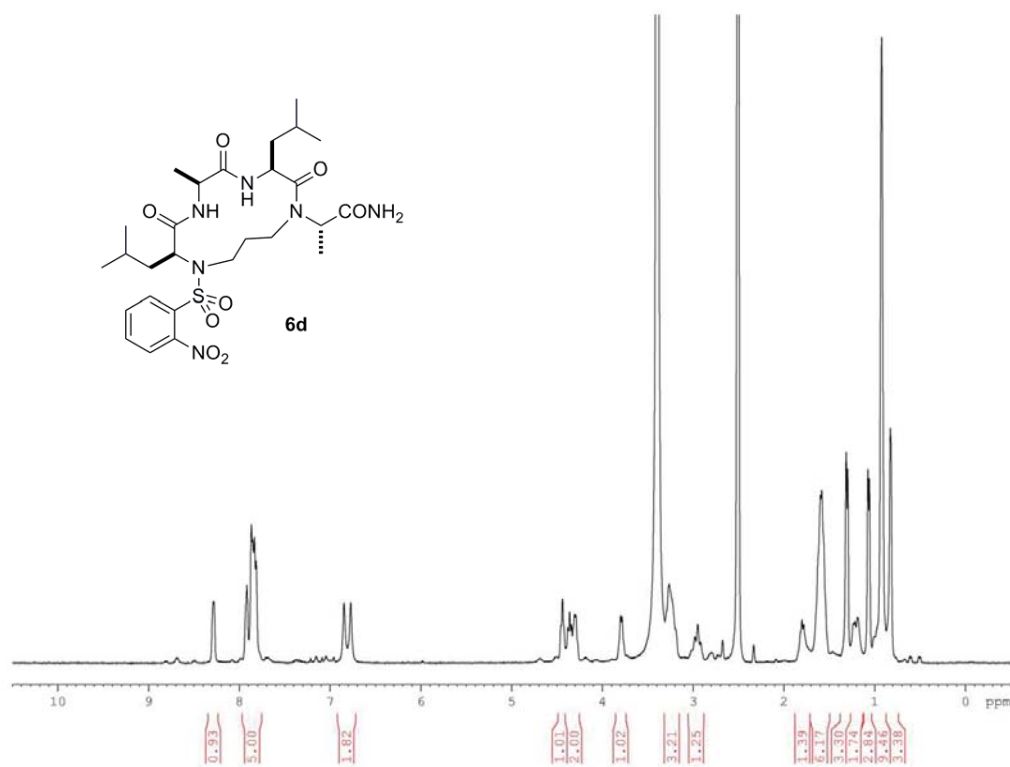
^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO), major rotamer: δ 8.28 (d, J = 2.2 Hz, 1H, o -Ns), 7.93-7.81 (m, 5H, A2-NH, L3-NH and o -Ns), 6.85 (s, 1H, CONH₂), 6.77 (s, 1H, CONH₂), 4.43 (t, J = 6.4 Hz, 1H, L1-H α), 4.36 (app p, J = 7.6 Hz, 1H, A2-H α), 4.30 (app q, J = 6.4 Hz, 1H, L3-H α), 3.79 (q, J = 6.8 Hz, 1H, A4-H α), 3.28-3.19 (m, 3H, H1, H1' and H3), 3.02-2.90 (m, 1H, H3'), 1.82-1.78 (m, 1H, L1-H β), 1.62-1.56 (m, 6H, H2, L1-H β ', L3-H β , L3-H β ', L1-H γ and L3-H γ), 1.30 (d, J = 6.2 Hz, 3H, A2-H β), 1.23-1.19 (m, 1H, H2'), 1.06 (d, J = 5.9 Hz, 3H, A4-H β), 0.92 (br s, 9H, L1-H δ , L3-H δ and L3-H δ '), 0.82 (s, 3H, L1-H δ ').

HRMS: calculated for C₂₇H₄₂N₆O₈SNa [M+Na]⁺ m/z 633.26770; observed 633.26819.

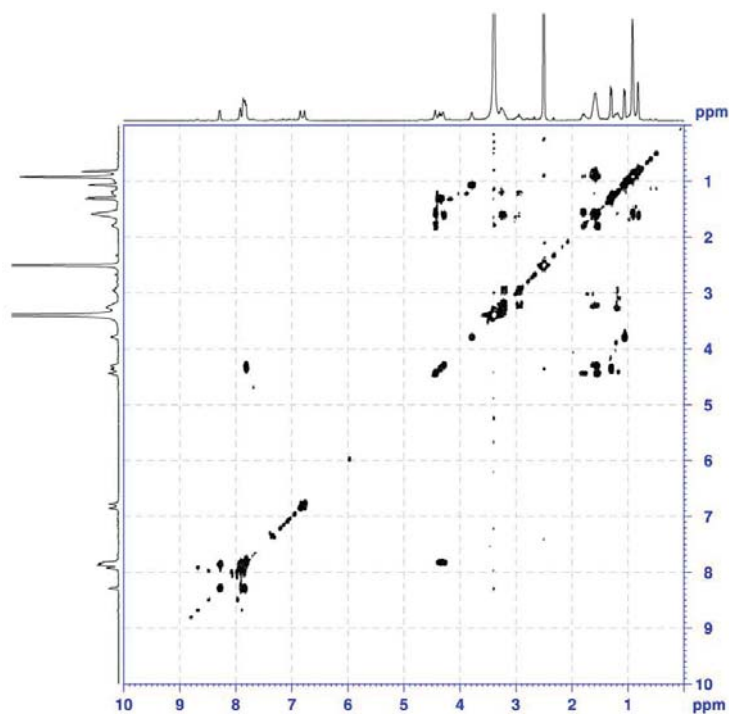


HPLC chromatogram of compound **6d** (30 to 100% B in 30 minutes).

Supporting Information

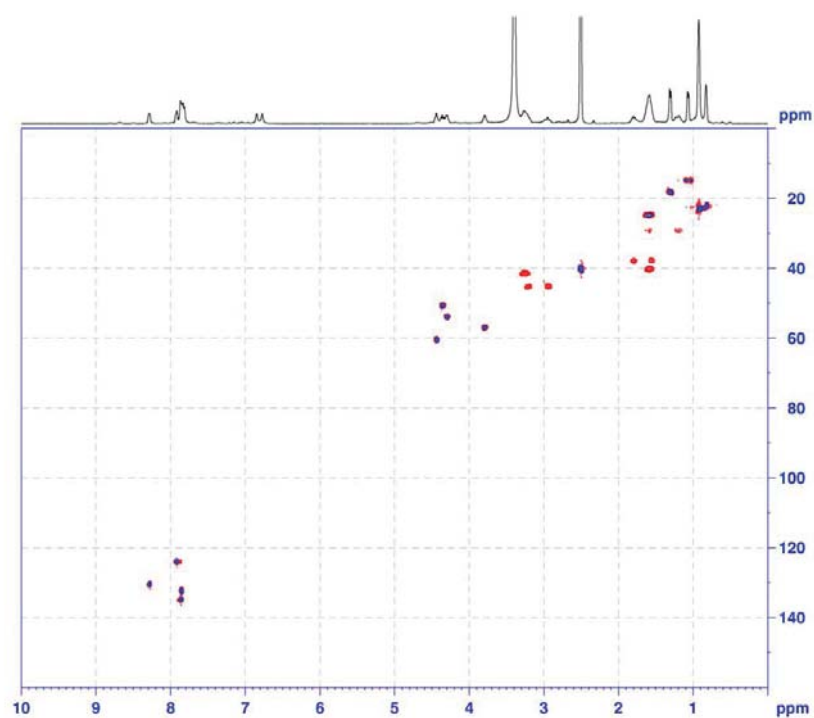


^1H NMR spectrum of compound **6d** (400 MHz, d_6 -DMSO).

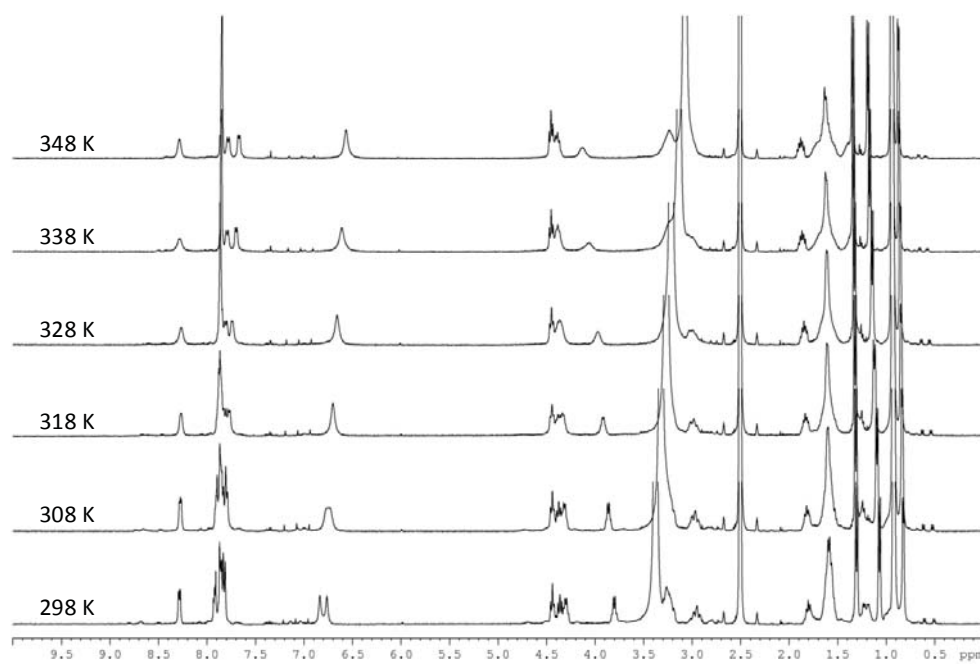


COSY spectrum of compound **6d** (^1H , 400 MHz, d_6 -DMSO).

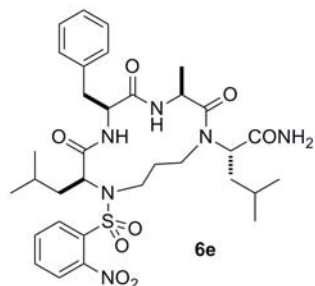
Supporting Information



HSQC spectrum of compound **6d** ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$, 400 MHz 1H, d_6 -DMSO).



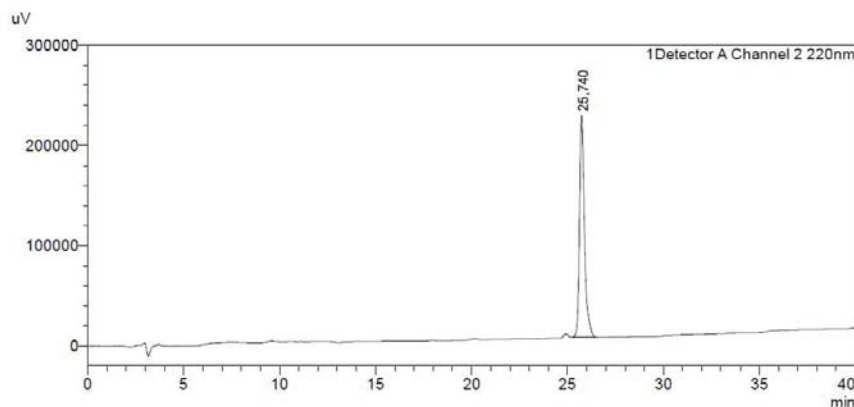
Temperature dependence ^1H NMR spectra of compound **6d** (400 MHz, d_6 -DMSO).

Compound **6e**

From 5 mg (0.006 mmol) of **5e**, 2.2 mg were obtained (53% yield).

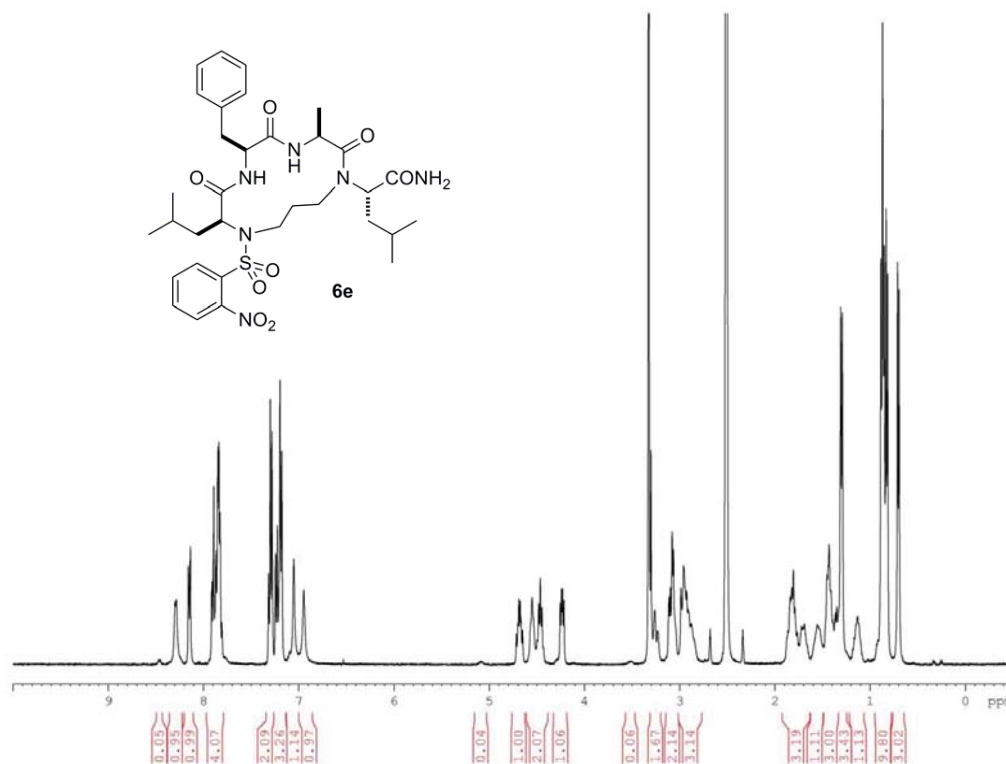
^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO), major rotamer: δ 8.29 (br d, $J = 6.0$ Hz, 1H, A3-NH), 8.15 (dd, $J = 6.9, 1.7$ Hz, 1H, o -Ns), 7.91-7.81 (m, 4H, F2-NH and o -Ns), 7.32-7.18 (m, 5H, F2-Ph), 7.05 (br s, 1H, CONH₂), 6.95 (br s, 1H, CONH₂), 4.68 (td, $J = 10.2, 6.2$ Hz, 1H, F2-H α), 4.55 (br t, $J = 6.2$ Hz, 1H, L4-H α), 4.46 (app p, $J = 6.8$ Hz, 1H, A3-H α), 4.23 (dd, $J = 9.9, 5.5$ Hz, 1H, L1-H α), 3.30-3.23 (m, 1H, H1), 3.09 (br dd, $J = 13.9, 5.8$ Hz, 2H, H1' and F2-H β), 2.99-2.88 (m, 3H, H3, H3' and F2-H β '), 1.87-1.76 (m, 2H, L1-H β and L4-H β), 1.72-1.66 (m, 1H, H2), 1.58-1.51 (m, 1H, H2'), 1.45-1.35 (m, 3H, L1-H β ', L4-H β ' and L4-H γ), 1.30 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, A3-H β), 1.17-1.09 (m, 1H, L1-H γ), 0.87 (app t, $J = 6.9$ Hz, 6H, L4-H δ and L4-H δ '), 0.82 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, L1-H δ), 0.70 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, L1-H δ ').

HRMS: calculated for C₃₃H₄₆N₆O₈SNa [M+Na]⁺ m/z 709.29900; observed 709.29891.

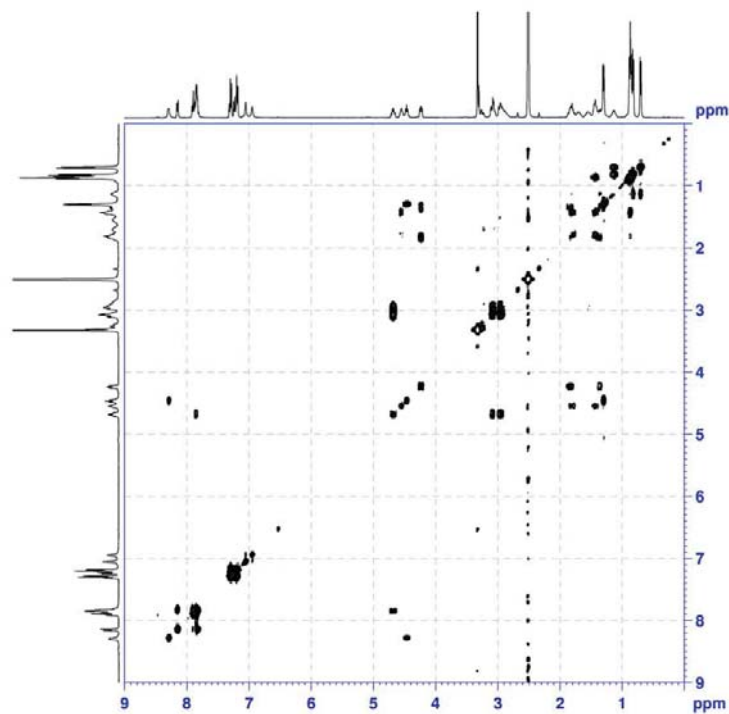


HPLC chromatogram of compound **6e** (50 to 100% B in 30 minutes).

Supporting Information

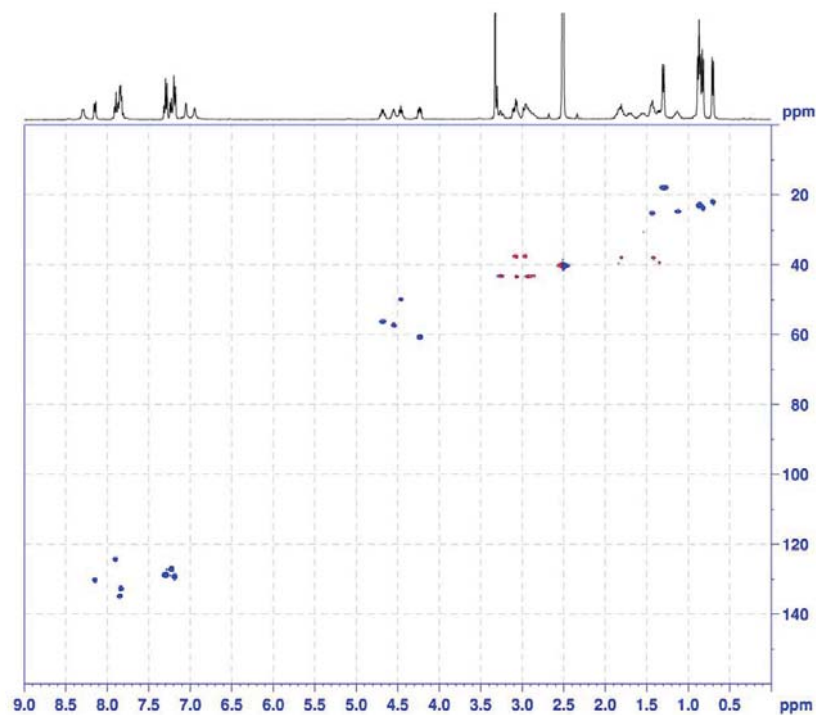


^1H NMR spectrum of compound **6e** (400 MHz, d_6 -DMSO).

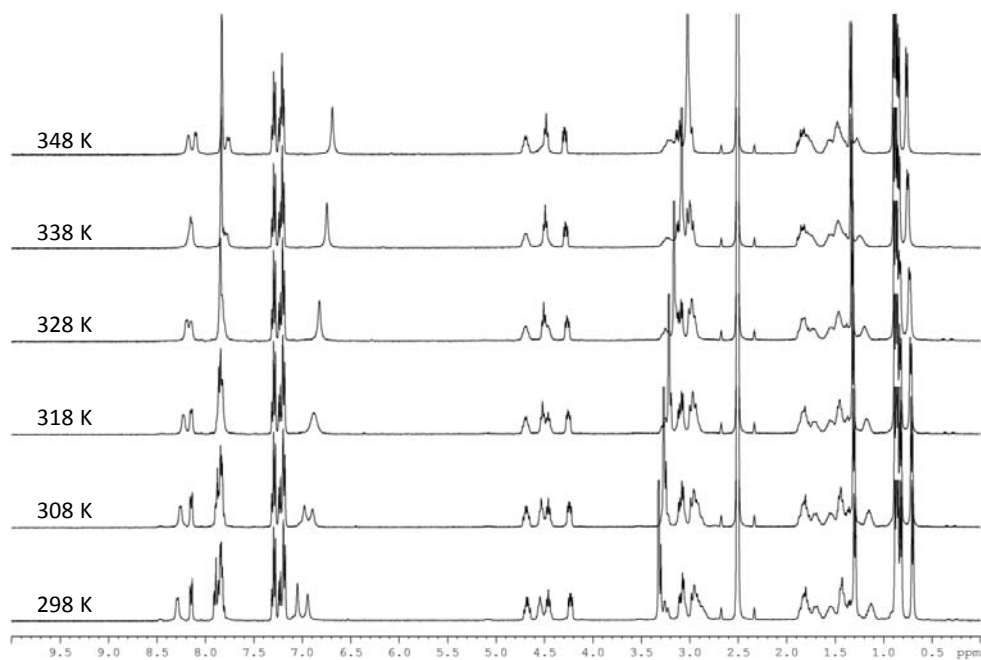


COSY spectrum of compound **6e** (^1H , 400 MHz, d_6 -DMSO).

Supporting Information

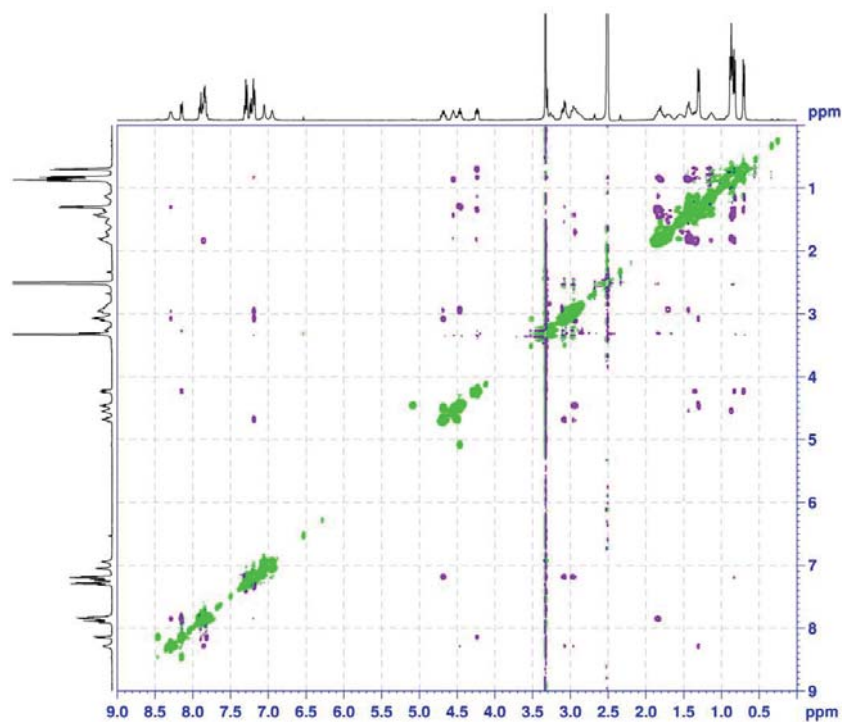


HSQC spectrum of compound **6e** ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$, 400 MHz, d_6 -DMSO).

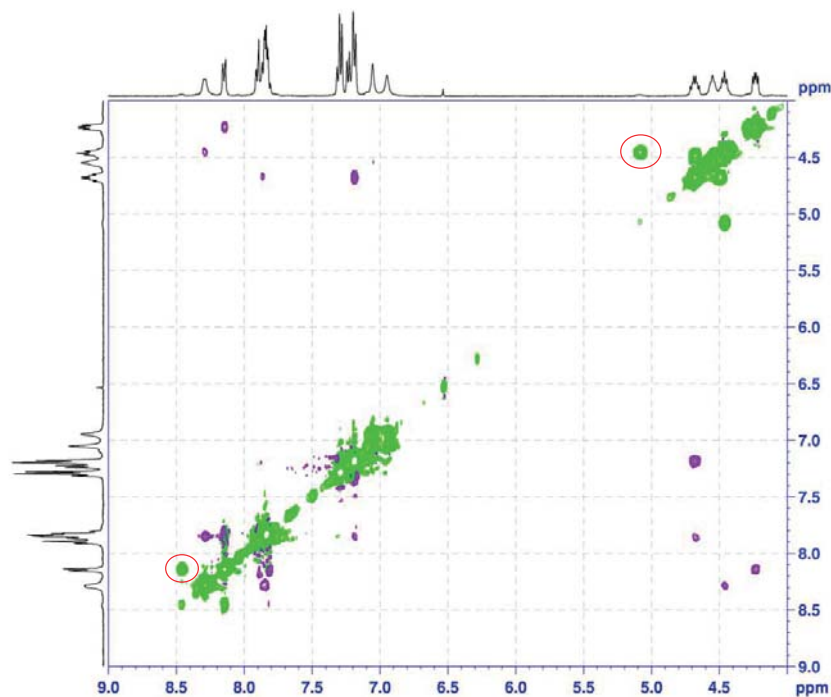


Temperature dependence ^1H NMR spectra of compound **6e** (400 MHz, d_6 -DMSO).

Supporting Information

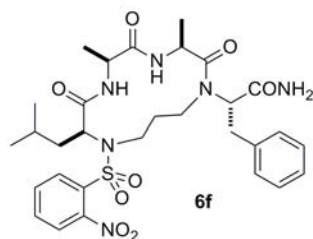


ROESY spectrum of compound **6e** (^1H , 400 MHz, d_6 -DMSO).



Selected region of the ROESY spectrum of compound **6e** (^1H , 400 MHz, d_6 -DMSO).

The red circles highlight correlation peaks the same phase as the diagonal, indicating the presence of two rotamers.

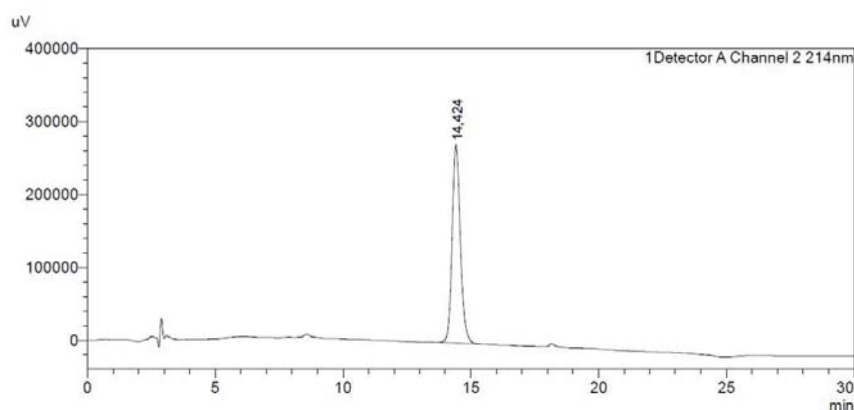
Compound **6f**

From 9 mg (0.012 mmol) of **5f**, 2.5 mg were obtained (31% yield).

^1H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO), major rotamer (the integration was set to 1.0 for 1H): δ 8.24 (br d, J = 6.6 Hz, 1H, A3-NH), 8.17 (dd, J = 7.2, 1.7 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.91-7.81 (m, 4H, A2-NH and *o*-Ns), 7.28-7.13 (m, 6H, 5xF4-Ph and 1xCONH₂), 6.87 (br s, 1H, CONH₂), 4.46-4.37 (m, 3H, L1-H α , A2-H α and F4-H α), 4.25-4.19 (m, 1H, A3-H α), 3.27-3.22 (m, 2H, H1 and F4-H β), 2.95 (dd, J = 13.6 and 8.5 Hz, 1H, F4-H β'), 2.81-2.74 (m, 2H, H1' and H3), 2.58-2.53 (m, 1H, H3'), 1.90-1.83 (m, 1H, L1-H β), 1.69-1.53 (m, 4H, H2, H2', L1-H β' and L1-H γ), 1.30-1.27 (m, 3H, A2-H β), 1.17 (d, J = 6.7 Hz, 3H, A3-H β), 0.93-0.90 (m, 6H, L1-H δ).

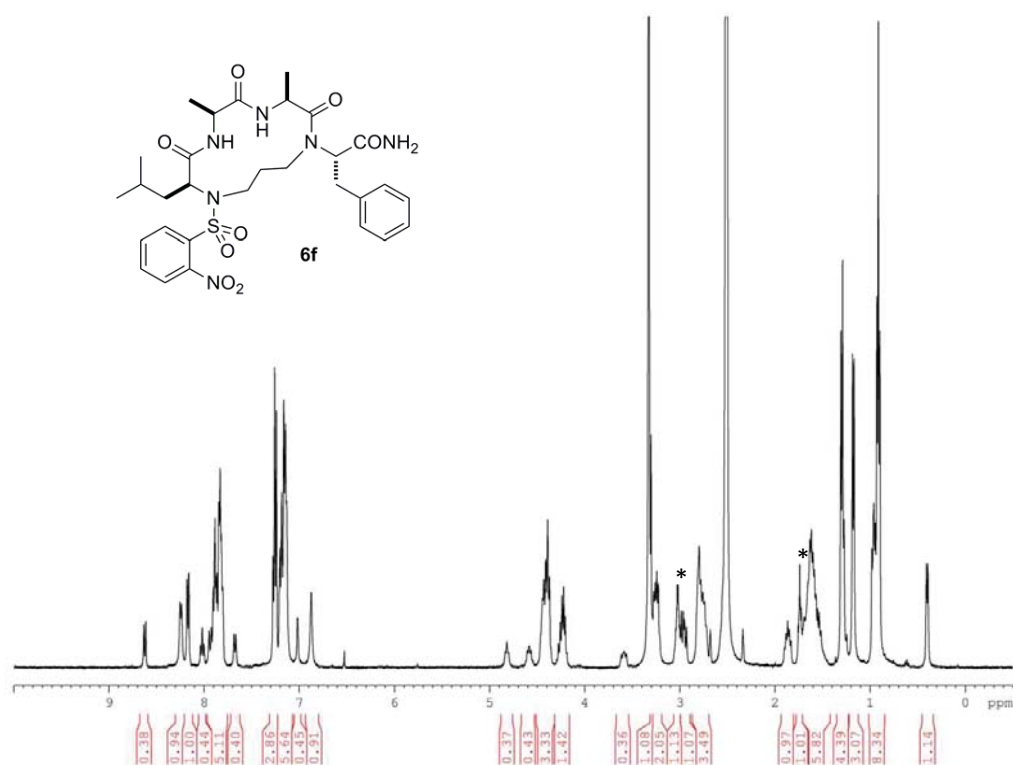
Minor rotamer (the corresponding integration on the spectrum was 0.4 for 1H): δ 8.62 (d, J = 8.0 Hz, 1H, *o*-Ns), 8.02 (t, J = 7.6 Hz, 1H, *o*-Ns), 7.94 (d, J = 10.0 Hz, 1H, A3-NH), 7.91-7.81 (m, 2H, *o*-Ns), 7.68 (d, J = 8.0 Hz, 1H, A2-NH), 7.28-7.13 (m, 6H, 5xF4-Ph and 1xCONH₂), 7.02 (br s, 1H, CONH₂), 4.82 (t, J = 6.3 Hz, 1H, F4-H α), 4.60-4.56 (m, 1H, A3-H α), 4.46-4.37 (m, 1H, L1-H α), 4.29-4.22 (m, 1H, A2-H α), 3.62-3.56 (m, 1H, H1), 3.01-2.98 (m, 1H, H1'), 2.81-2.74 (m, 3H, H3, F4-H β and F4-H β'), 2.58-2.53 (m, 1H, H3'), 1.69-1.53 (m, 5H, H2, H2', L1-H β , L1-H β' and L1-H γ), 1.30-1.27 (m, 3H, A2-H β), 0.98-0.94 (m, 6H, L1-H δ), 0.40 (d, J = 6.3 Hz, A3-H β).

HRMS: calculated for C₃₀H₄₀N₆O₈SNa [M+Na]⁺ m/z 667.2521; observed 667.2494.

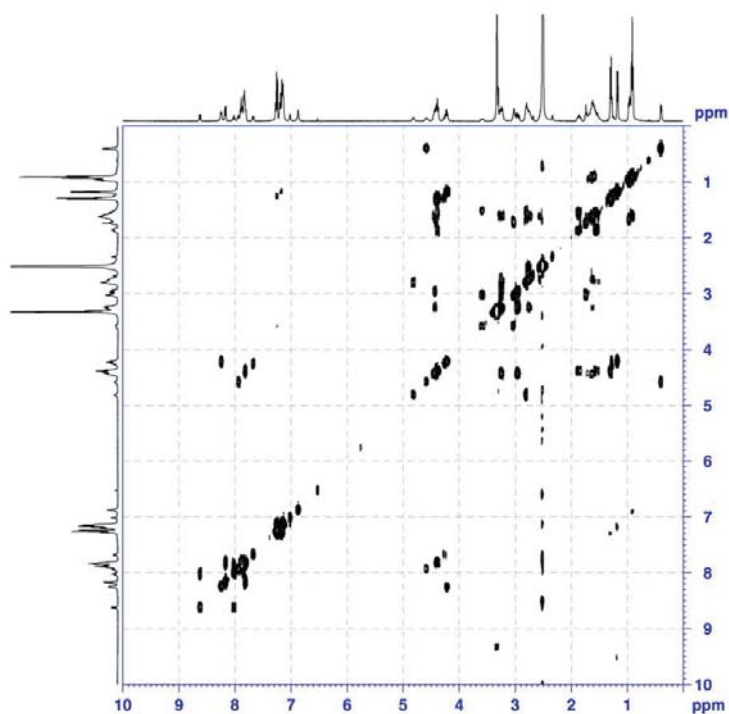


HPLC chromatogram of compound **6f** (60 to 100% B in 20 minutes).

Supporting Information

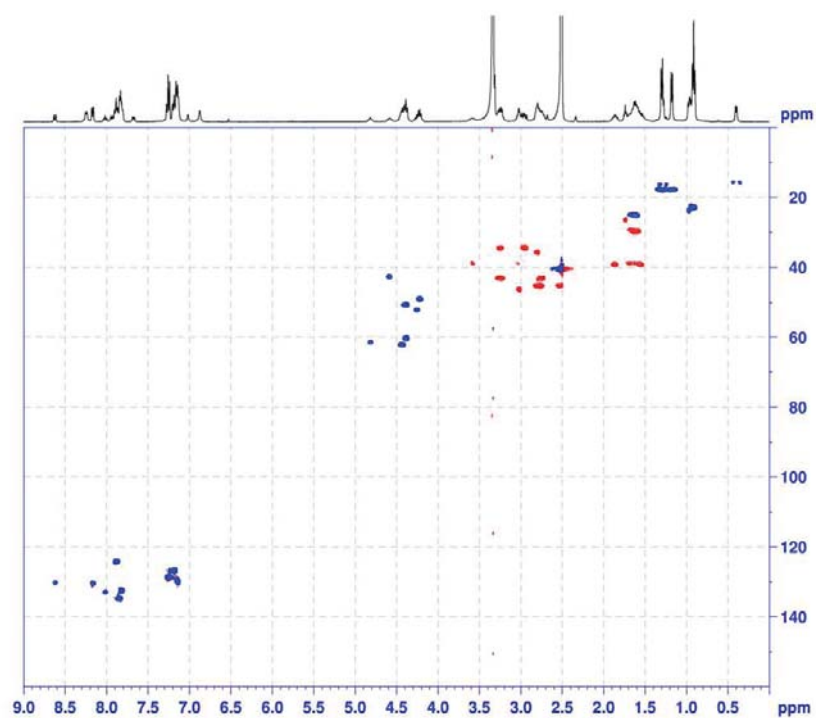


^1H NMR spectrum of compound **6f** (400 MHz, d_6 -DMSO). *Denotes residual pyrrolidine from the PyBOP coupling agent.

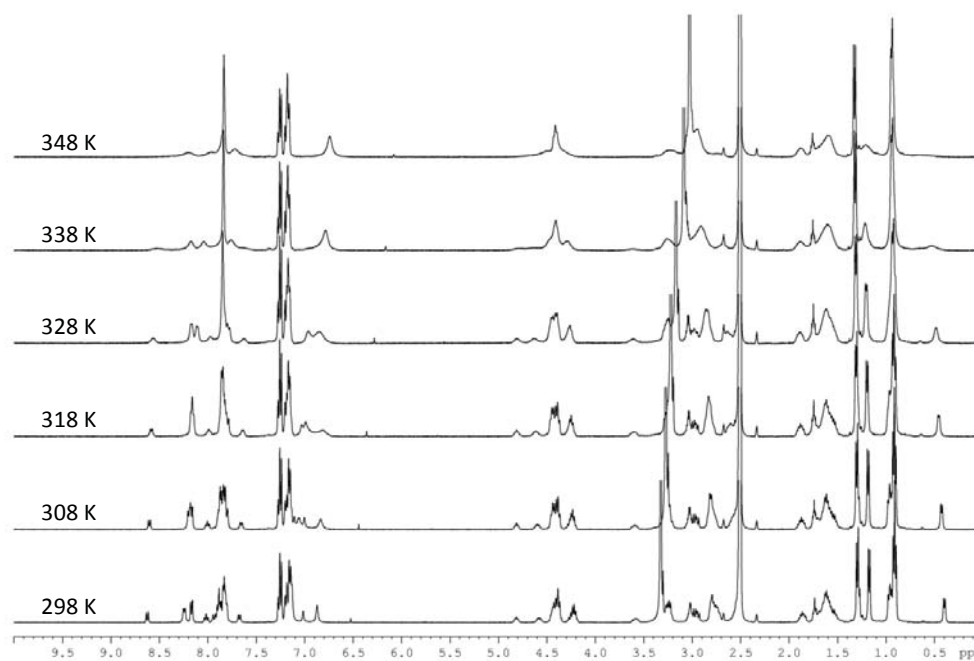


COSY spectrum of compound **6f** (^1H , 400 MHz, d_6 -DMSO).

Supporting Information

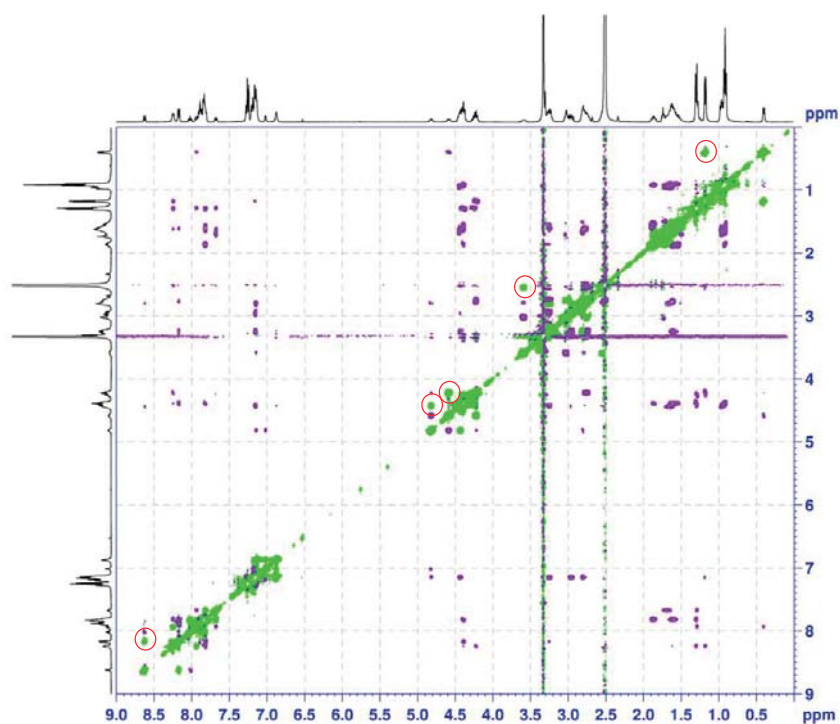


HSQC spectrum of compound **6e** ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$, 400 MHz, d_6 -DMSO).



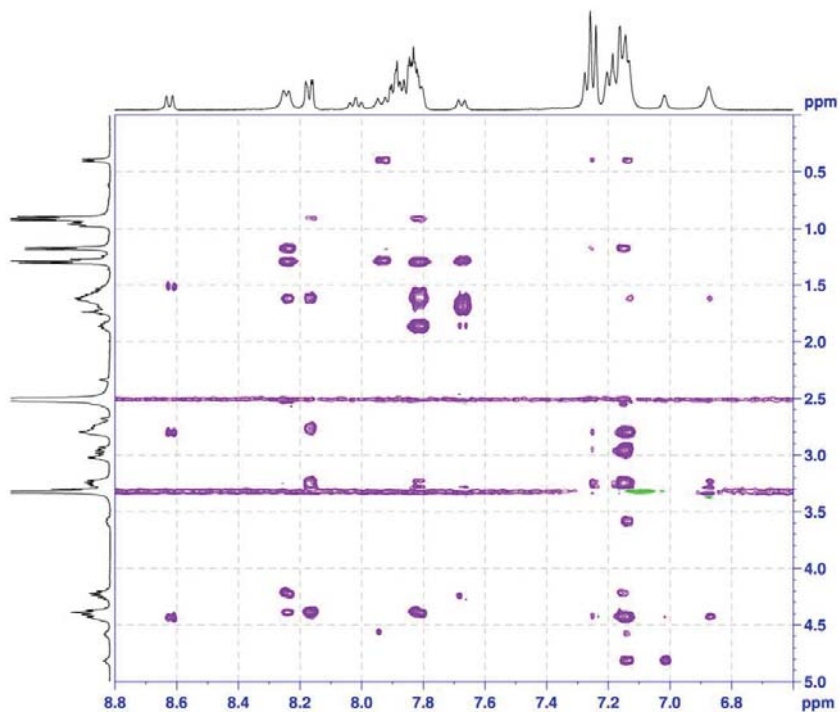
Temperature dependence ^1H NMR spectra of **6f** (400 MHz, d_6 -DMSO).

Supporting Information



ROESY spectrum of **6f** (¹H, 400 MHz, *d*₆-DMSO).

Red circles highlight selected correlation peaks the same phase as the diagonal, indicating the presence of two rotamers.



Selected region of the ROESY spectrum of compound **6f** (¹H, 400 MHz, *d*₆-DMSO).

Part 2: Synthesis, spectroscopic study in water and molecular modeling of 13-membered macrocyclic peptides

Three water soluble macrocyclic peptides **10a**, **10b**, **10c** (**GAGA*F**, **GALA*F**, **LALA*F**, number according to **Article 5**) were prepared and studied according to « Supporting information » of **Article 5**.

Supporting information of Article 5

Synthesis and spectroscopic study in water of macrocyclic peptides designed for α -turn stabilization

Lei Wang, Kexin Zhu, Wang-Qing Liu, Pascale Coric, Serge Bouaziz, Michel Vidal and
Sylvain Broussy*

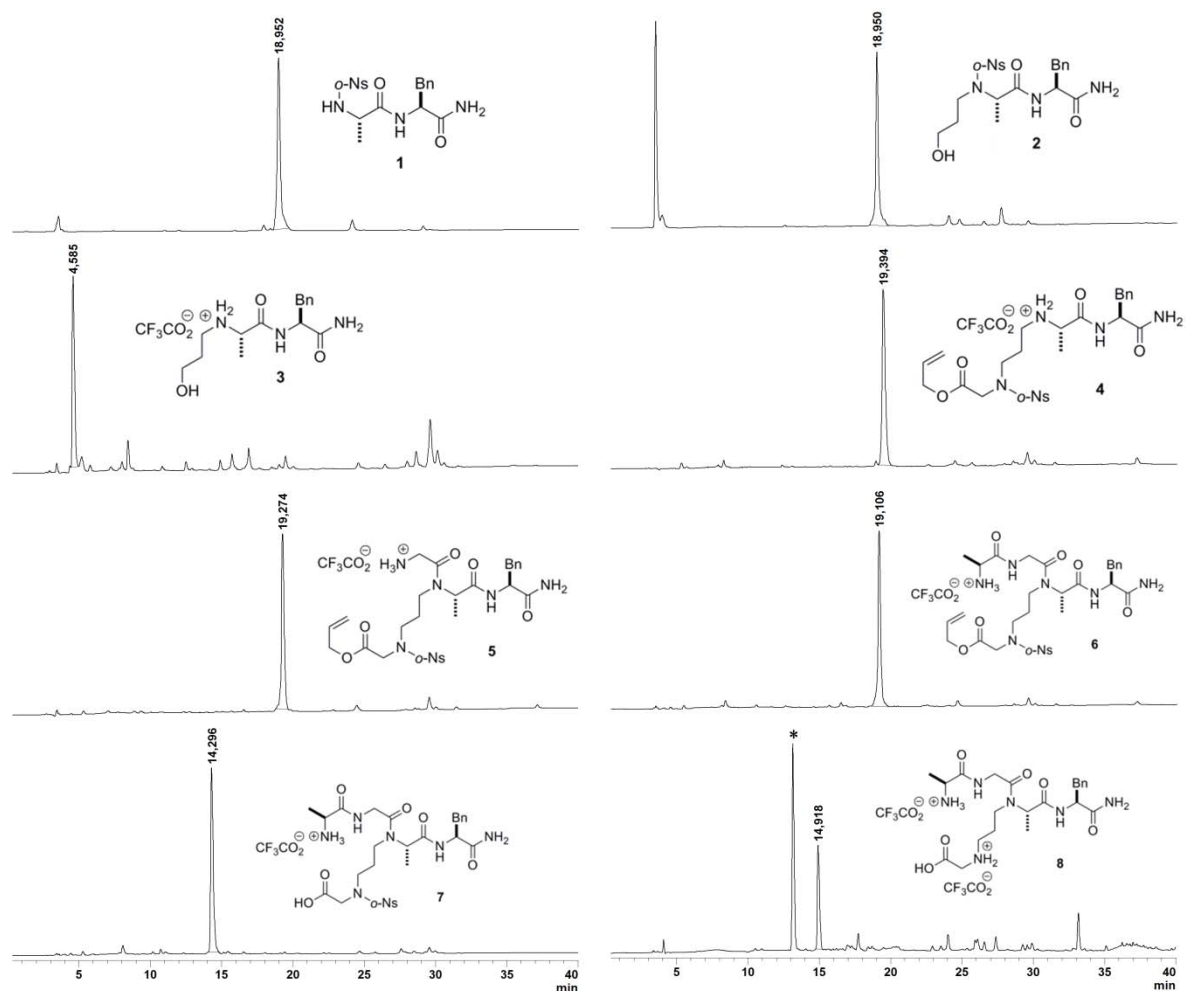
*UMR 8638/8015 CNRS, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie de Paris,
Sorbonne Paris Cité, 4 avenue de l'Observatoire, Paris 75006 France*
sylvain.broussy@parisdescartes.fr

Table of Contents

HPLC chromatograms of peptides 1-8 , 9a and 10a-c	2
CD spectra of 10a and 11 with and without added TFE	4
NMR spectra and attribution tables of peptides 9a , 10a-c and 11	5
Variable temperature ^1H NMR data for peptides 10a and 11	9

HPLC chromatograms of peptides **1-8** (AA₁ = AA₃ = Gly).

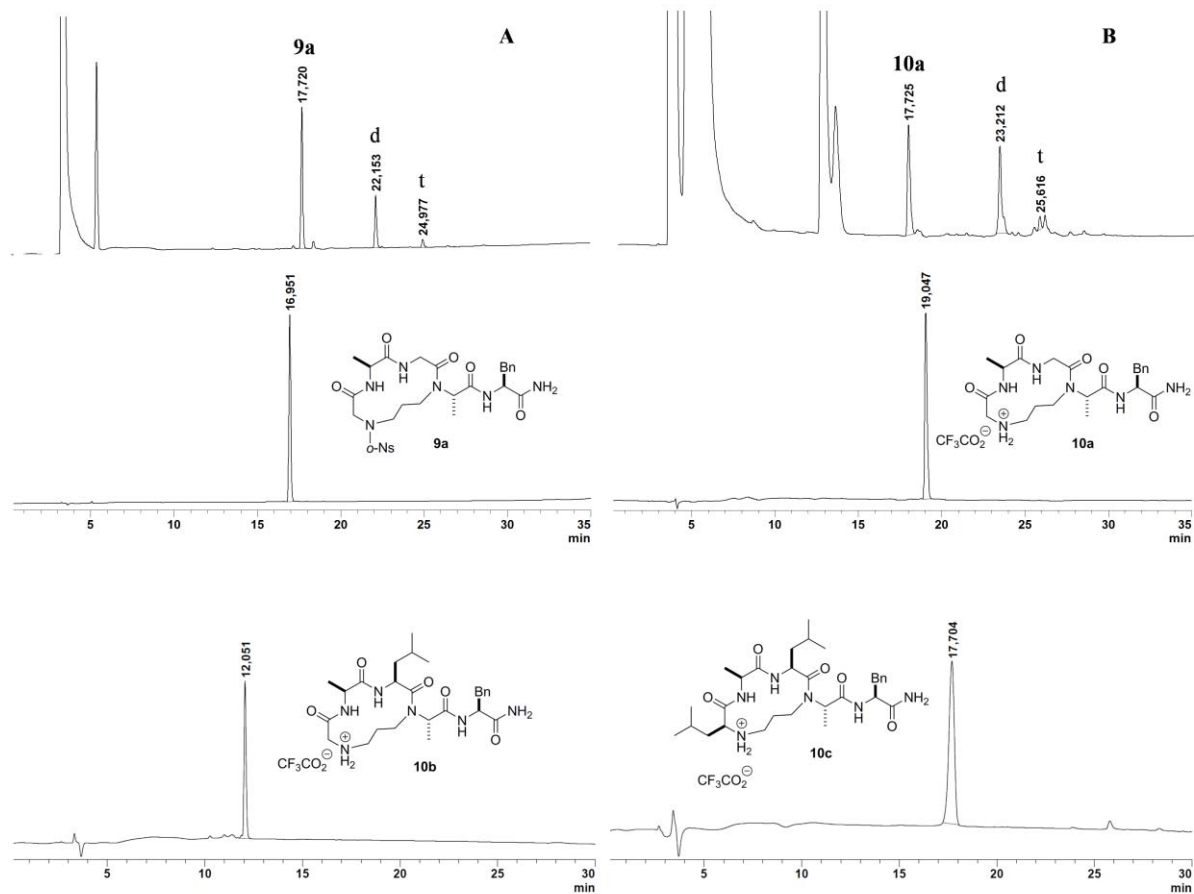
See the experimental section for details. Gradient conditions: 30-100% B in 30 min for **1-7** and 15-50% B in 30 min for **8**.



*Denotes a non-peptide side product.

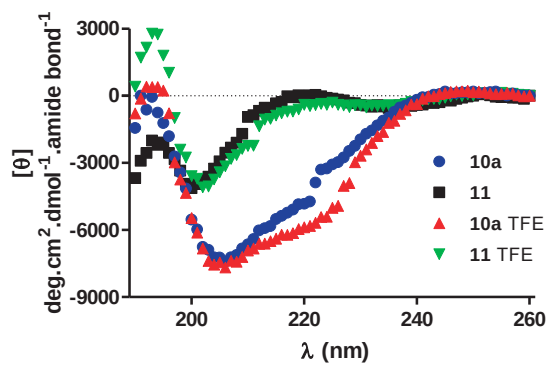
HPLC chromatograms of peptides **9a**, **10a**, **10b** and **10c**.

See the experimental section for details. Gradient conditions: 30-100% in 30 min for **9a**, **10b** and **10c**; 15-50% B in 30 min for **10a**.

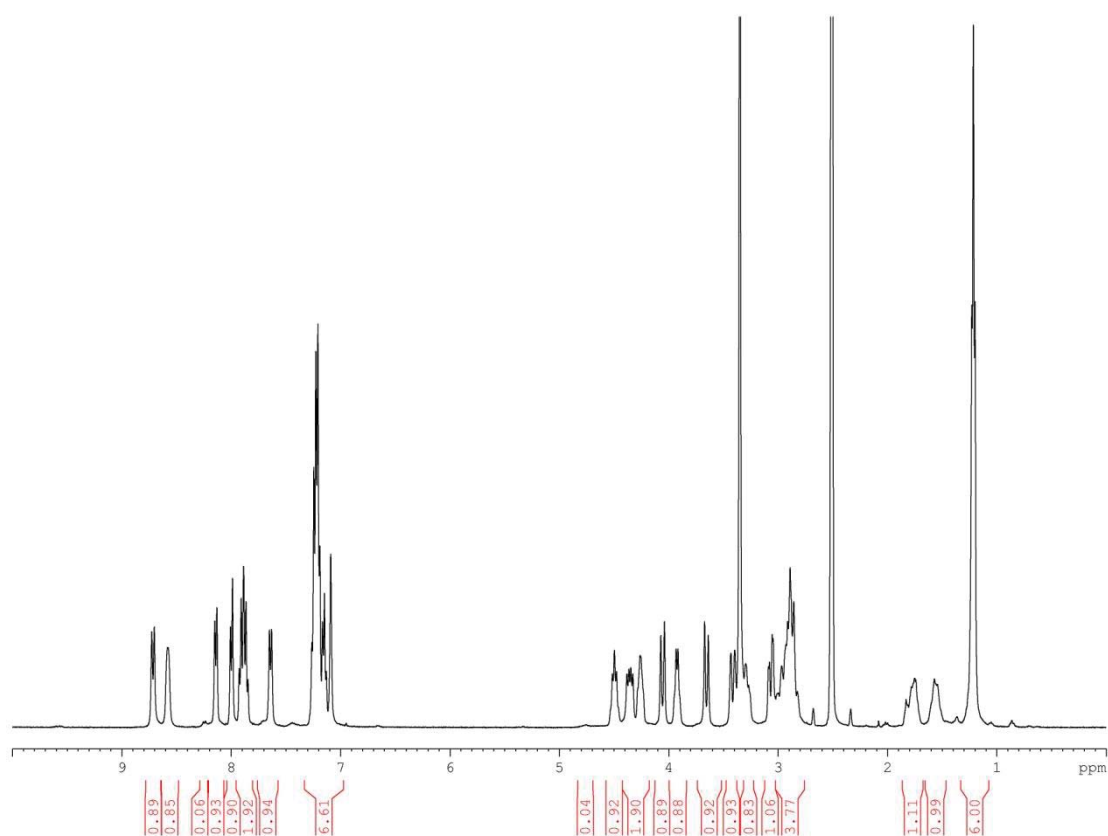


A and **B** are crude chromatograms of cyclization reactions of 10 mM solutions of **7** and **8** respectively.
d: dimer; t: trimer.

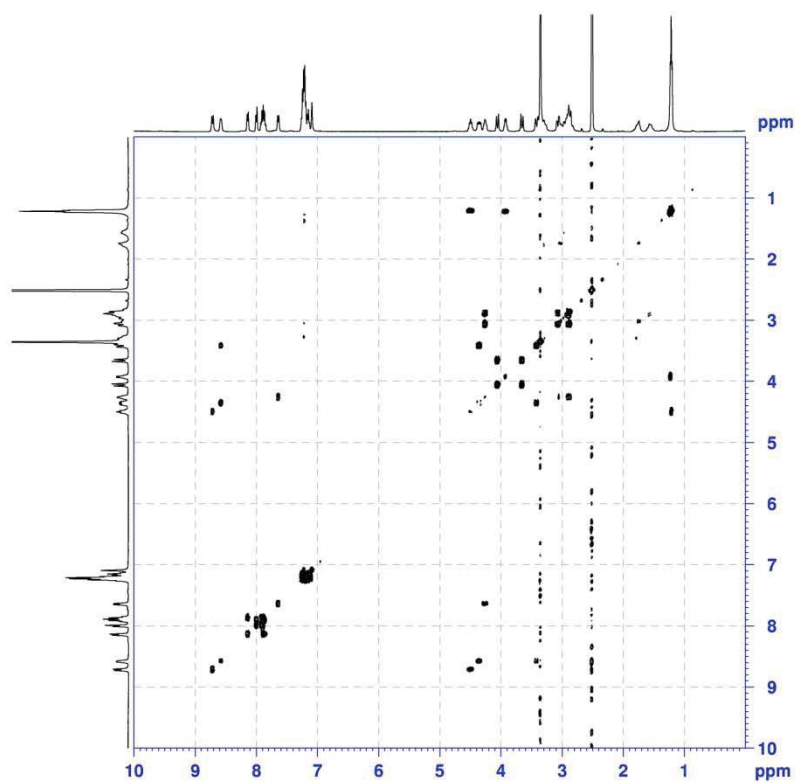
CD spectra of peptides **10a** and **11** in 10 mM phosphate buffer pH 7.4 without (blue and black) and with (red and green) 30% TFE, at 293 K.



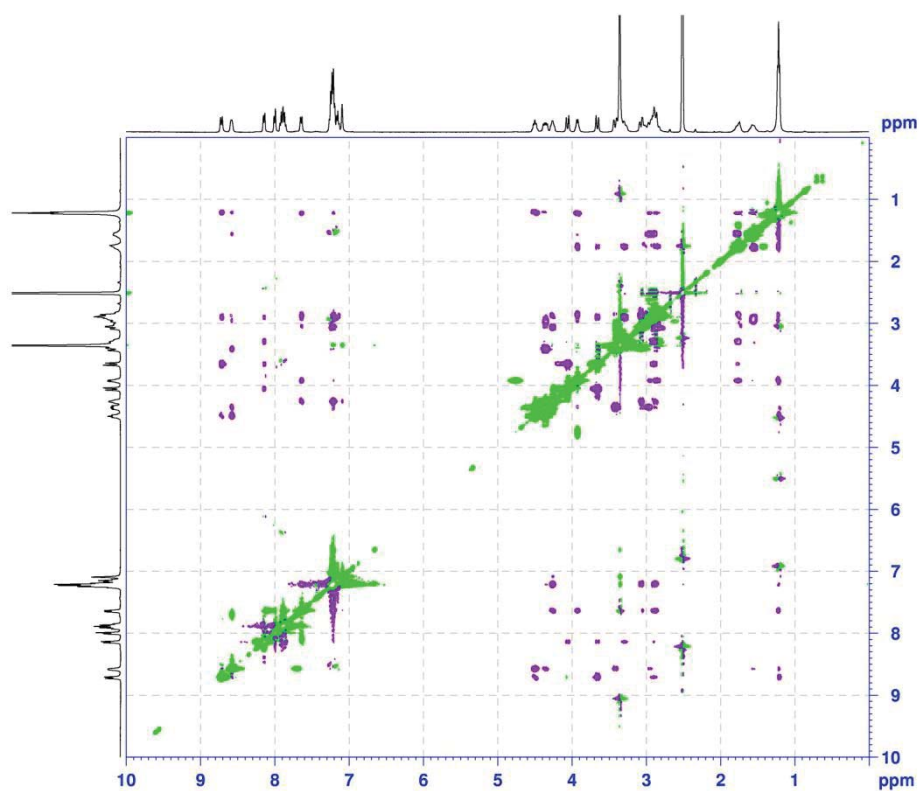
NMR spectra of peptide **9a**



¹H NMR spectrum of peptide **9a** (400 MHz, d₆-DMSO).



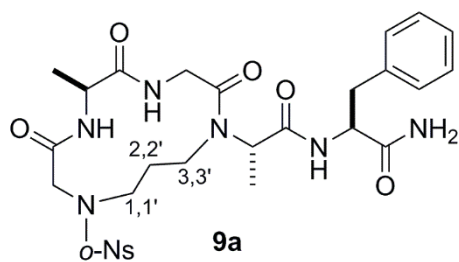
COSY spectrum of peptide **9a** (¹H, 400 MHz, d₆-DMSO).



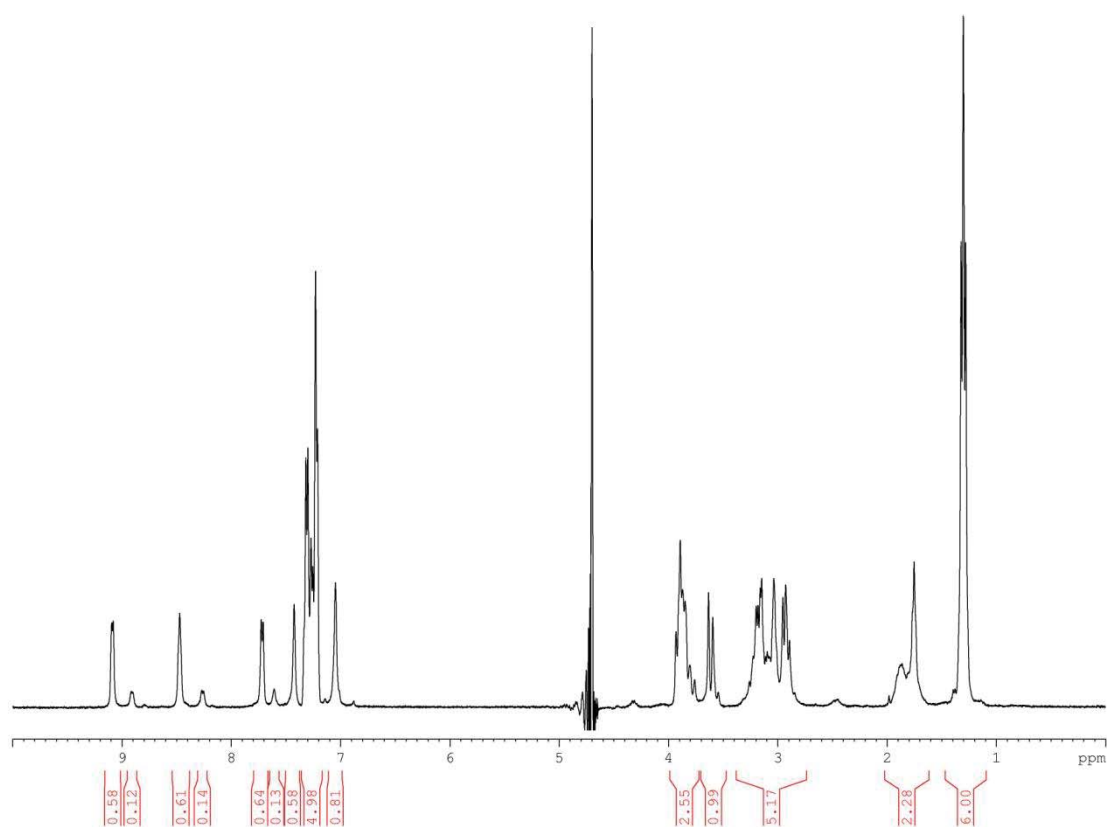
ROESY spectrum of peptide **9a** (^1H , 400 MHz, d_6 -DMSO).

Attribution table for peptide **9a** (chemical shifts extracted from the ROESY spectrum).

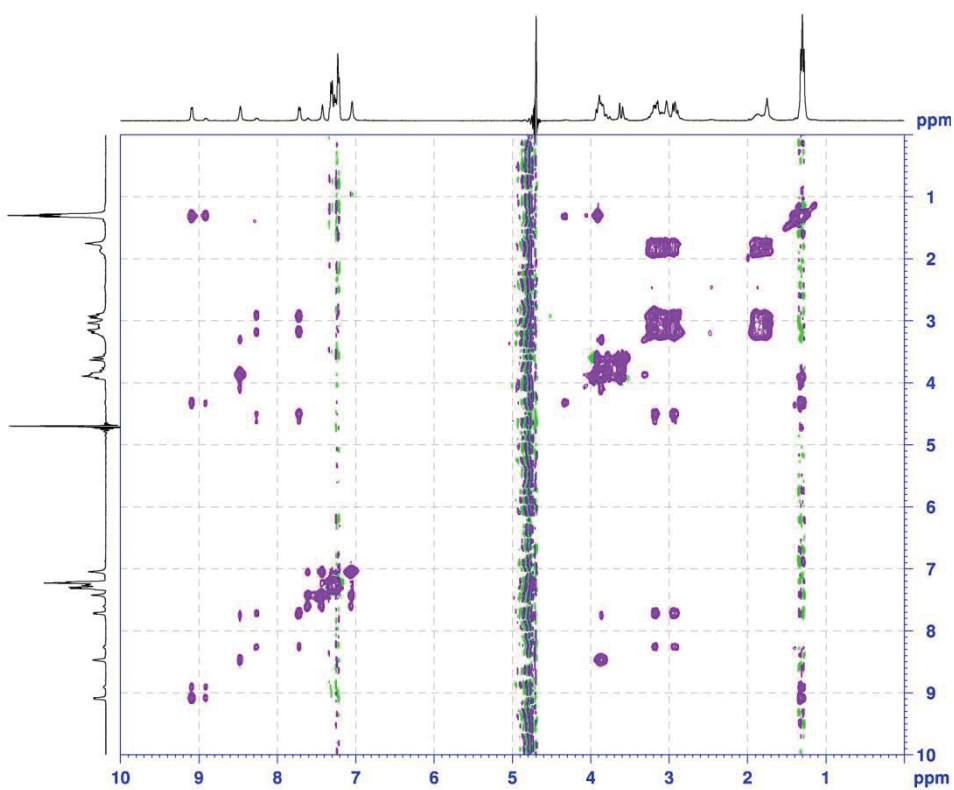
	NH	H _{α}	H _{β}	H _{arom}	C _{ter} -NH ₂	1,1'	2,2'	3,3'
G1 (<i>o</i> -Ns)	-	3.66 4.05	-	7.86 7.91 8.00 8.14	-	-	-	-
A2	8.72	4.50	1.20	-	-	-	-	-
G3	8.58	3.41 4.35	-	-	-	-	-	-
A4	-	3.92	1.22	-	-	2.89 3.28	1.55 1.74	2.95 3.02
F5	7.64	4.26	2.88 3.06	7.13-7.26	7.09	-	-	-



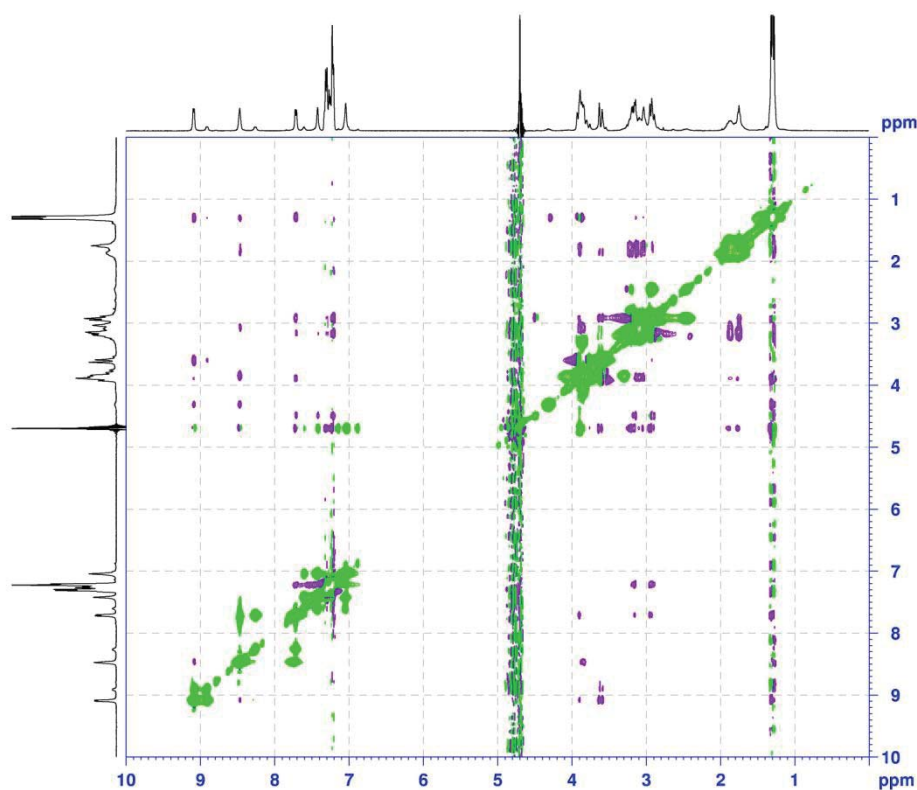
NMR spectra of peptide **10a**



¹H NMR spectrum of peptide **10a** (400 MHz, H₂O/D₂O 9:1).



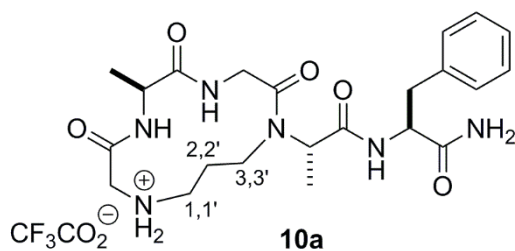
TOCSY spectrum of peptide **10a** (¹H, 400 MHz, H₂O/D₂O 9:1).



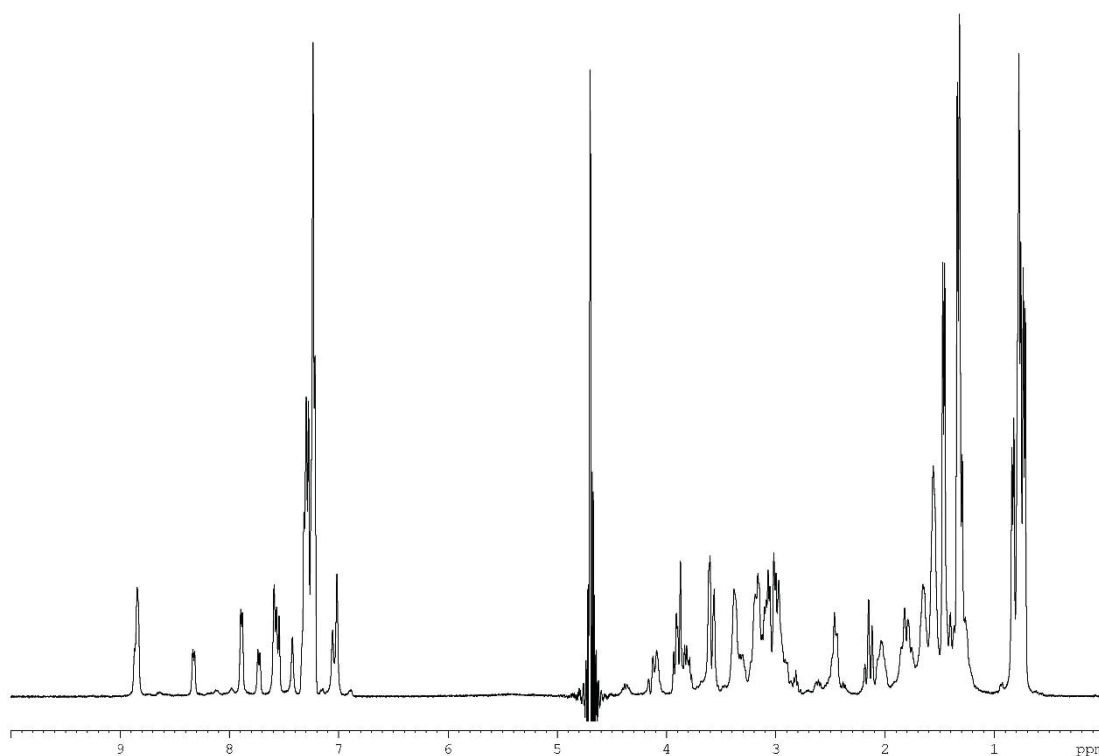
NOESY spectrum of peptide **10a** (^1H , 400 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1).

Attribution table for peptide **10a** (major rotamer, chemical shifts extracted from the NOESY spectrum).

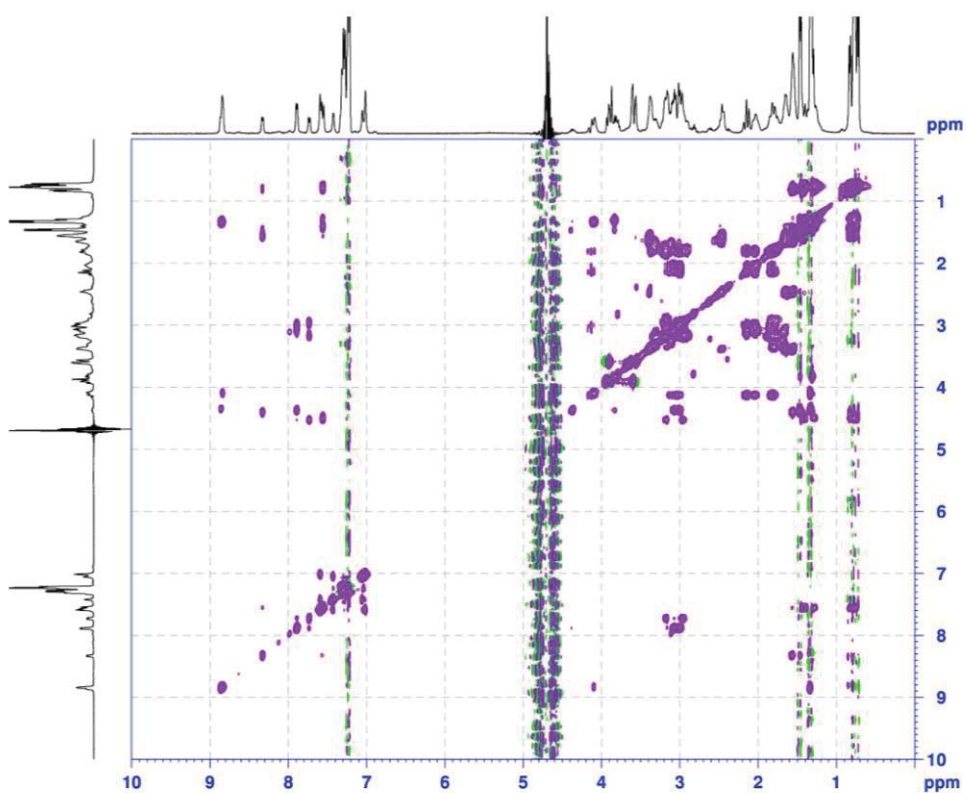
	NH	H _{α}	H _{β}	H _{arom}	C _{ter} -NH ₂	1,1'	2,2'	3,3'
G1	-	3.60 3.89	-	-	-	-	-	-
A2	9.09	4.31	1.30	-	-	-	-	-
G3	8.47	3.84	-	-	-	-	-	-
A4	-	3.89	1.29	-	-	2.85-3.05	1.75 1.86	2.95-3.15
F5	7.71	4.48	2.91 3.16	7.21-7.33	7.04 7.42	-	-	-



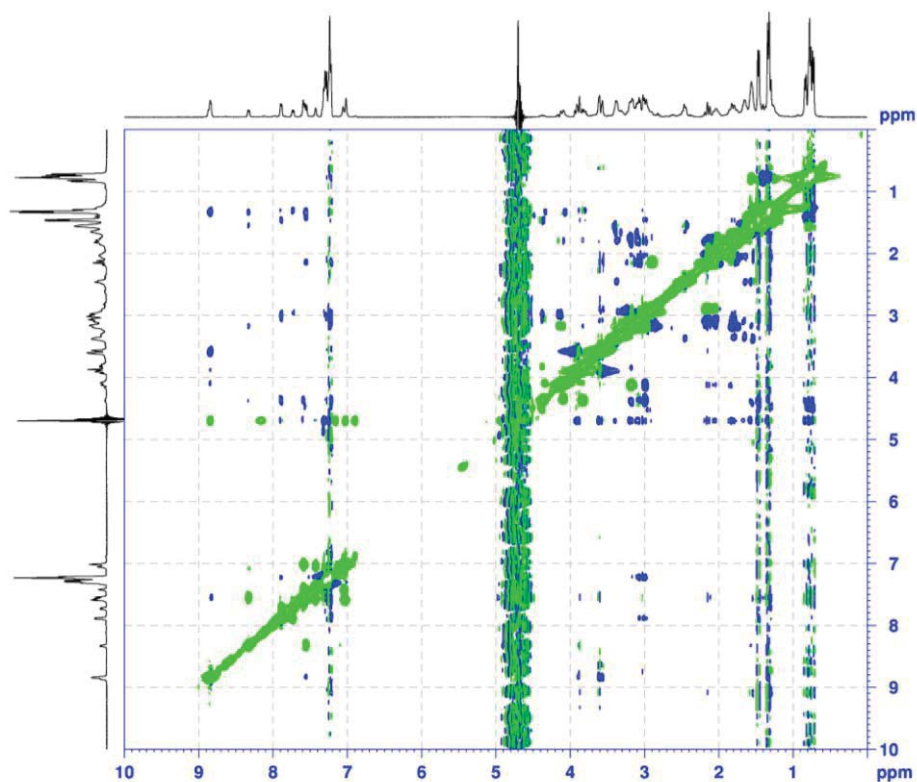
NMR spectra of peptide **10b**



^1H NMR spectrum of peptide **10b** (400 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1).



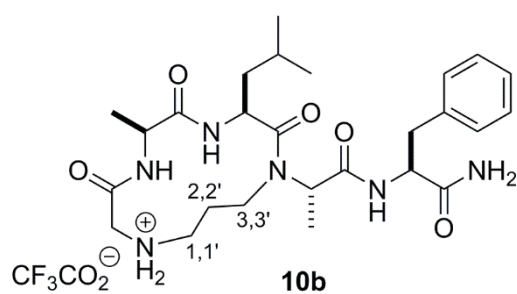
TOCSY spectrum of peptide **10b** (^1H , 400 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1).



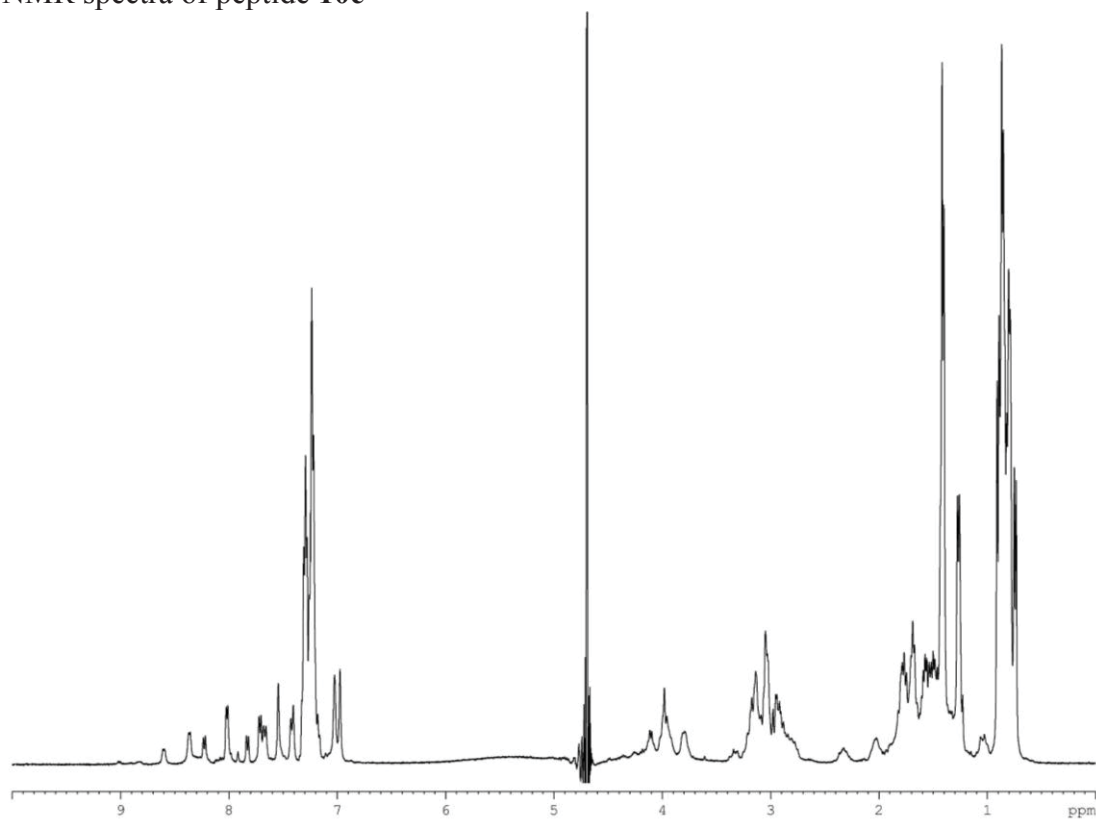
NOESY spectrum of peptide **10b** (^1H , 400 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1).

Attribution table for peptide **10b** (major rotamer, chemical shifts extracted from the NOESY spectrum).

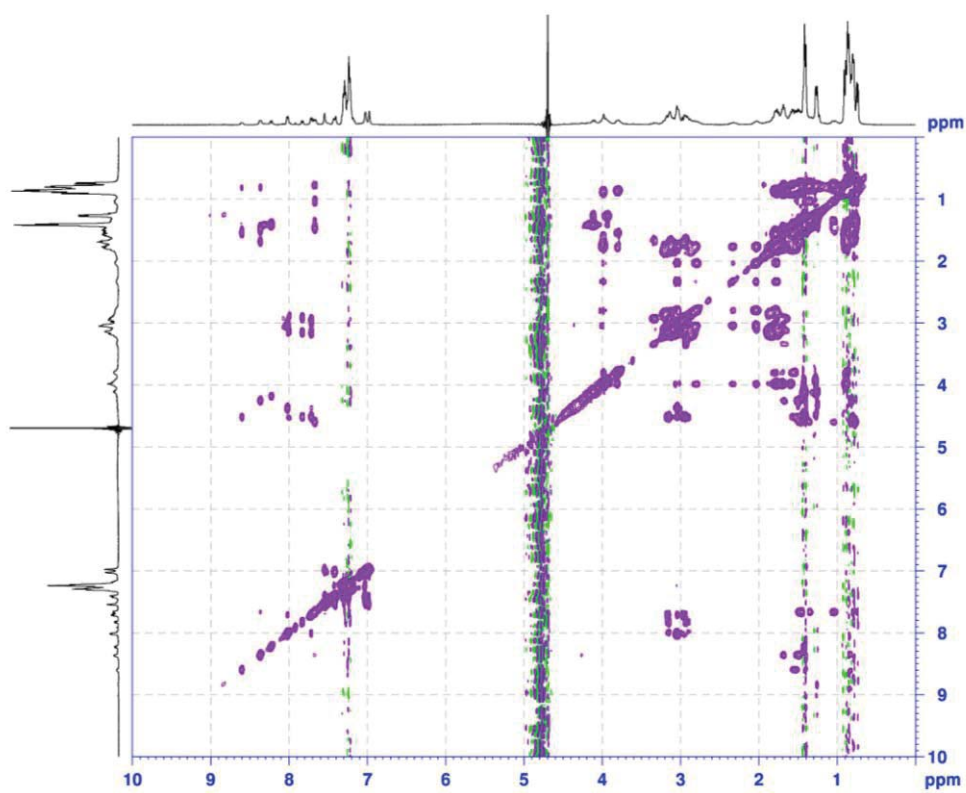
	NH	H _a	H _β	H _γ	H _δ	H _{arom}	C _{ter} -NH ₂	1,1'	2,2'	3,3'
G1	-	3.58 3.88	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	8.84	4.09	1.33			-	-	-	-	-
L3	7.56	4.47	1.39	1.27	0.78	-	-	-	-	-
A4	-	3.83	1.30			-	-	?	?	?
F5	7.89	4.36	3.01 3.09	-	-	7.21- 7.34	7.02 7.59	-	-	-



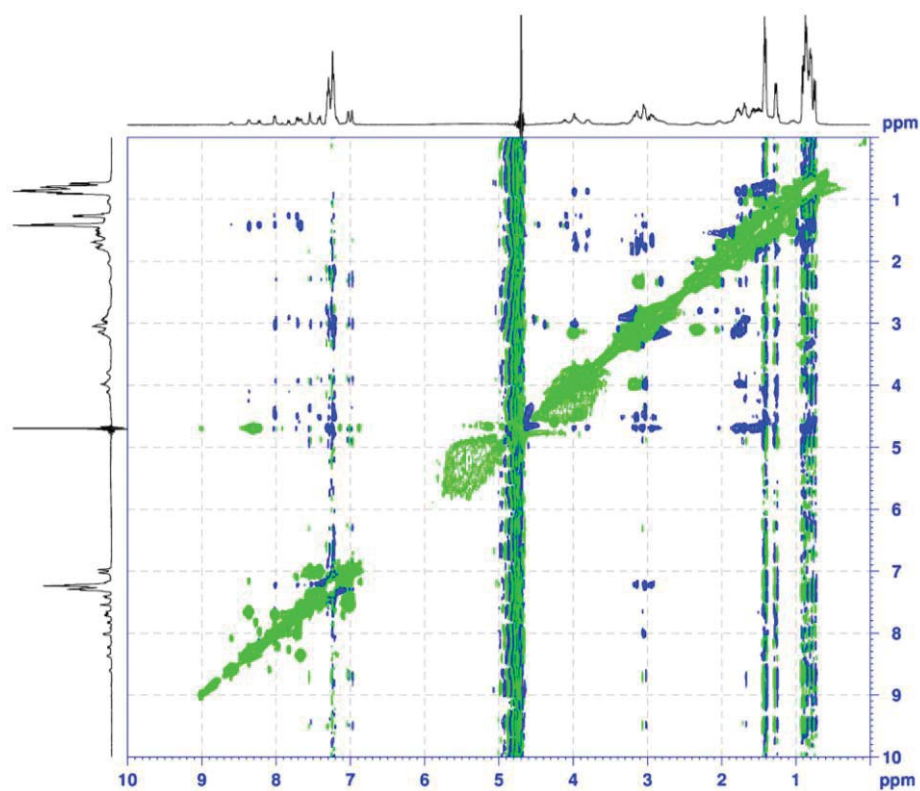
NMR spectra of peptide **10c**



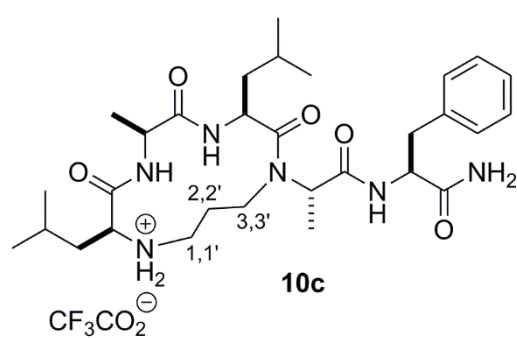
^1H NMR spectrum of peptide **10c** (400 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1).



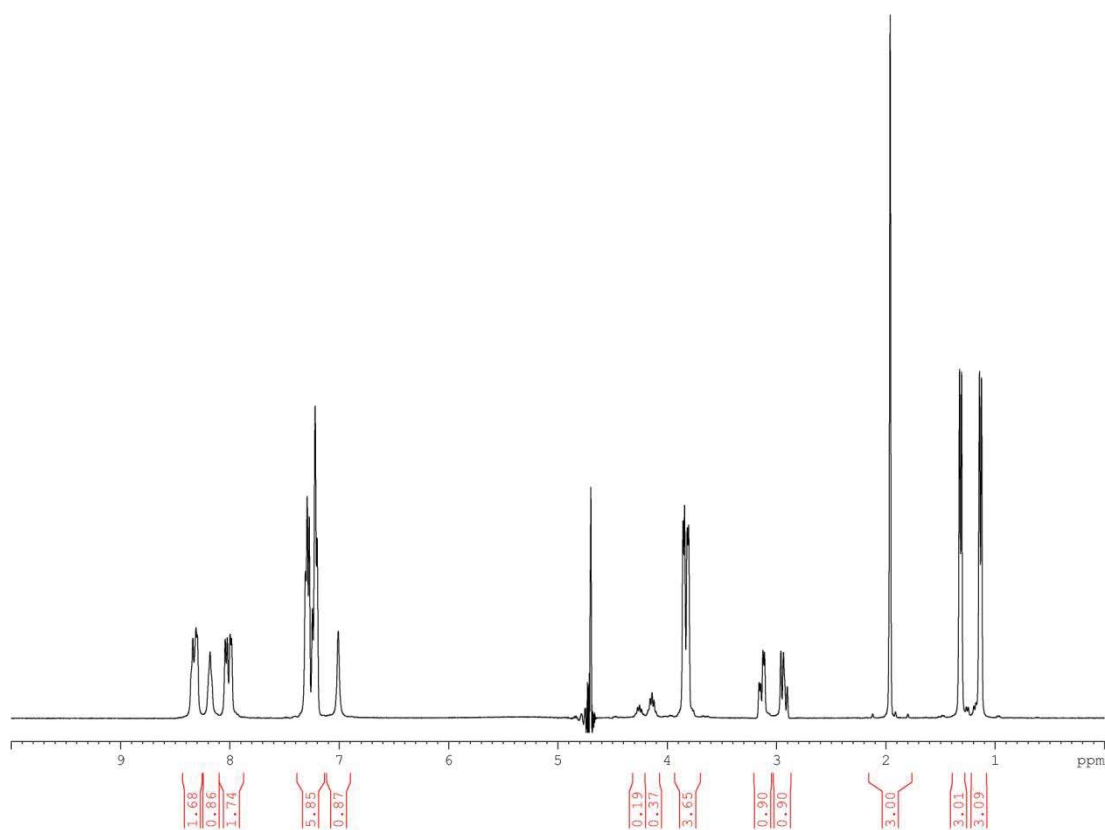
TOCSY spectrum of peptide **10c** (^1H , 400 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1).



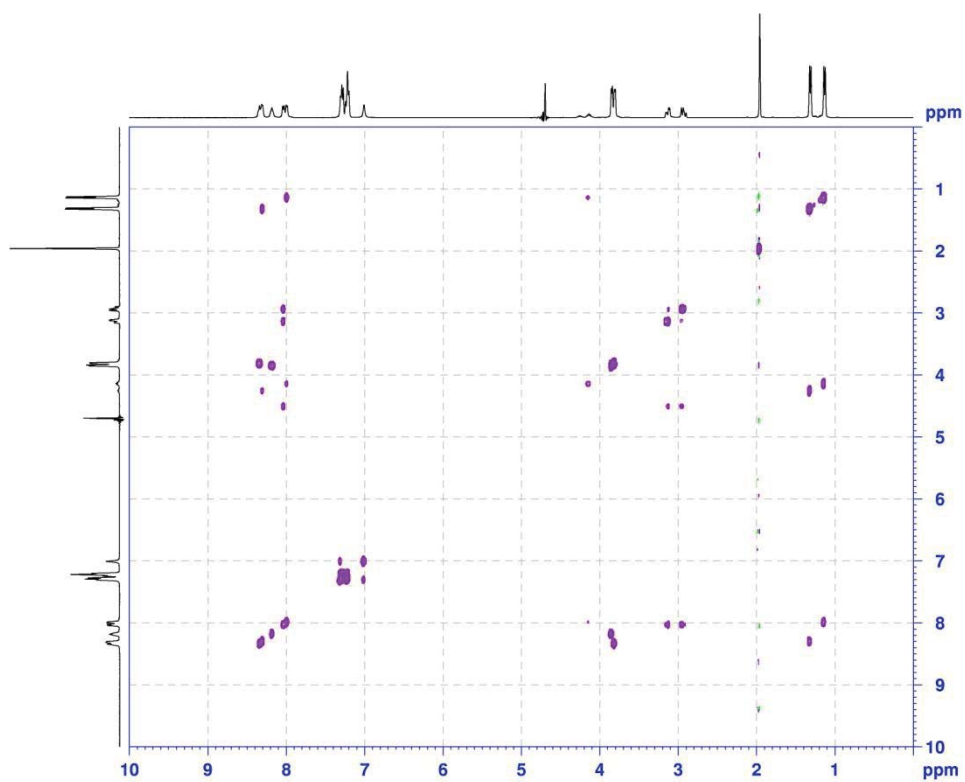
NOESY spectrum of peptide **10c** (^1H , 400 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1).



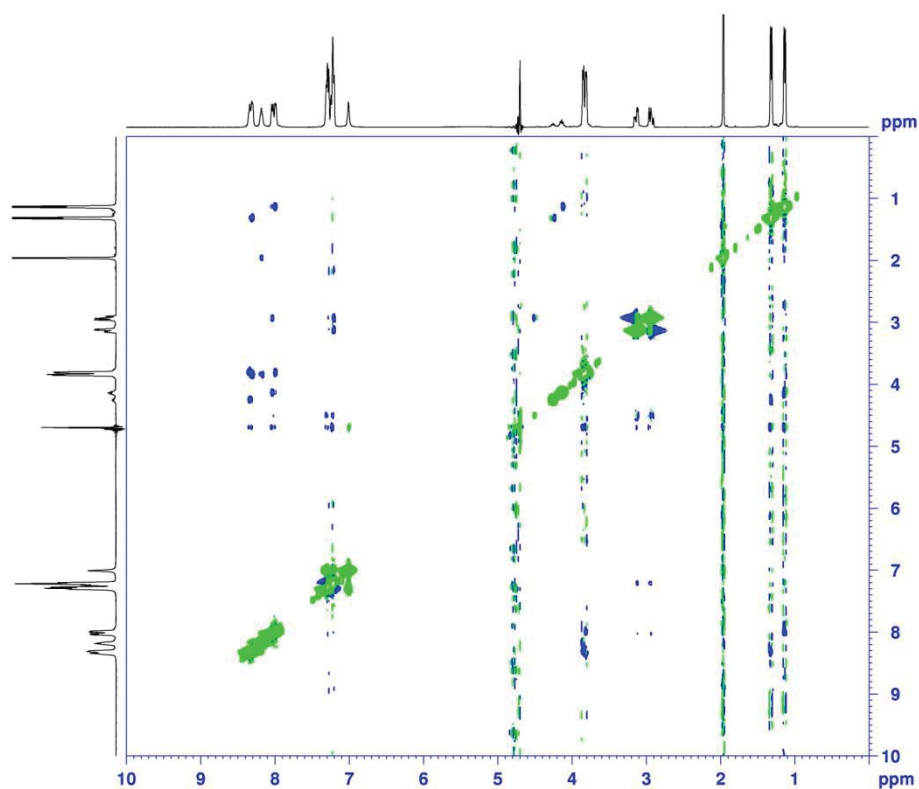
NMR spectra of peptide **11**



¹H NMR spectrum of peptide **11** (400 MHz, H₂O/D₂O 9:1).



TOCSY spectrum of peptide **11** (¹H, 400 MHz, H₂O/D₂O 9:1).

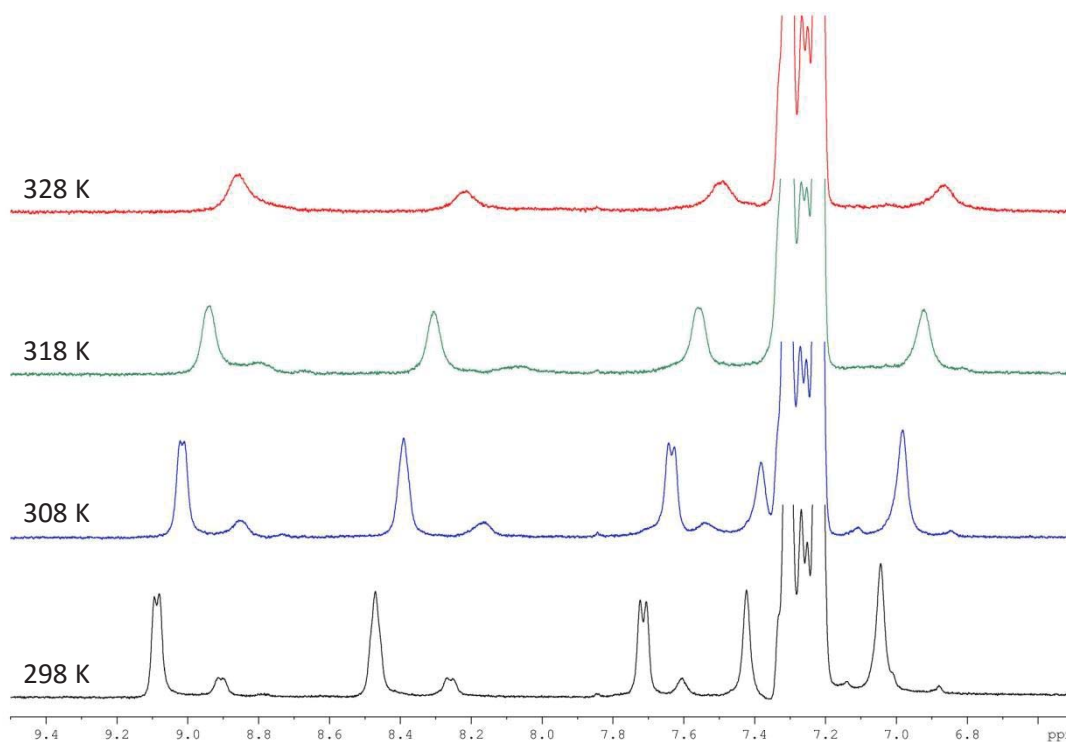


NOESY spectrum of peptide **11** (^1H , 400 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1).

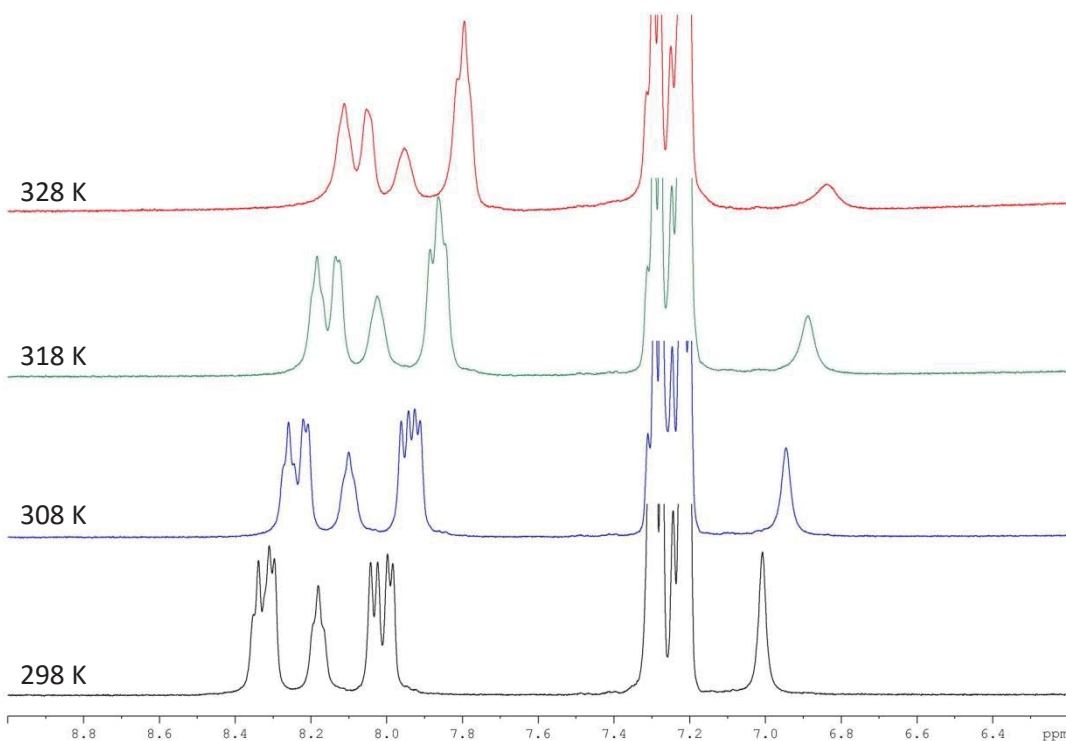
Attribution table for peptide **11**, Ac-GAGAF-NH₂ (chemical shifts extracted from the NOESY spectrum).

	NH	H _{α}	H _{β}	H _{arom}	C _{ter} -NH ₂	N _{ter} -Ac
G1	8.18	3.85	-	-	-	1.96
A2	8.30	4.24	1.32	-	-	-
G3	8.34	3.80	-	-	-	-
A4	7.99	4.13	1.13	-	-	-
F5	8.03	4.50	2.93 3.12	7.20-7.31	7.01	-

Variable temperature ^1H NMR data for peptides **10a** and **11**



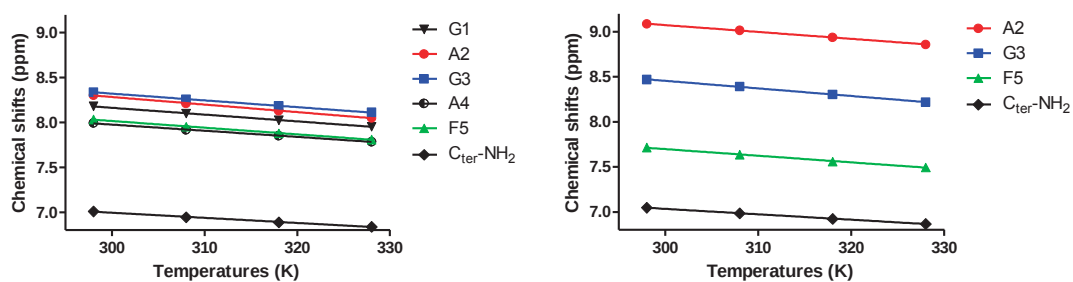
Amide region of the ^1H NMR spectra of peptide **10a** at the indicated temperatures (400 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1).



Amide region of the ^1H NMR spectra of peptide **11** at the indicated temperatures (400 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1).

Supporting Information

Graphical representation of the dependence of amide protons chemical shifts on temperature for peptides **11** (left) and **10a** (right, major rotamer only).



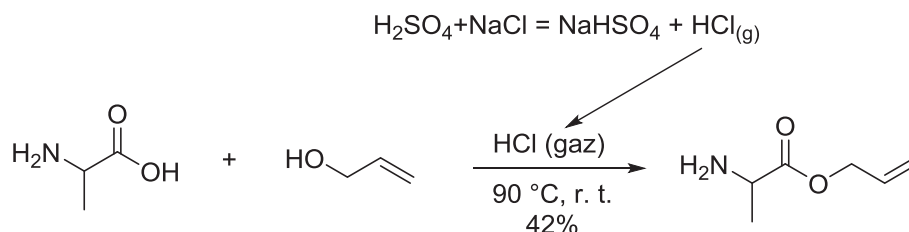
Corresponding slope values with standard errors:

Peptide 11	Slope (ppb/K)
G1	-7.6 ± 0.2
A2	-8.4 ± 0.2
G3	-7.6 ± 0.2
A4	-6.8 ± 0.2
F5	-7.4 ± 0.2
C _{ter} -NH ₂	-5.7 ± 0.2

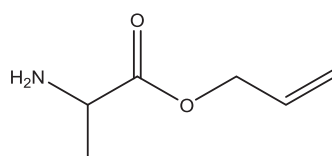
Peptide 10a	Slope (ppb/K)
A2	-7.6 ± 0.2
G3	-8.4 ± 0.2
F5	-7.4 ± 0.3
C _{ter} -NH ₂	-6.0 ± 0.1

Part 3: Supplementary results of development of 13-membered macrocyclic peptides

H₂N-Ala-OAllyl



HCl_(g) produced by adding concentrated sulfuric acid (H₂SO₄) dropwise to sodium chloride (NaCl), was passed through a suspension of α-alanine (4.5g, 50 mmol) in allyl alcohol (50 mL) for 30 min. The solution was heated to 90 °C overnight. Excess allyl alcohol was removed under vacuum, the crude product was treated with saturated Na₂CO₃ solution (100 mL) and extracted with dichloromethane (CH₂Cl₂). The organic phase was washed with saturated NaHCO₃ solution and brine, dried over MgSO₄ and concentrated in vacuo without further purification.

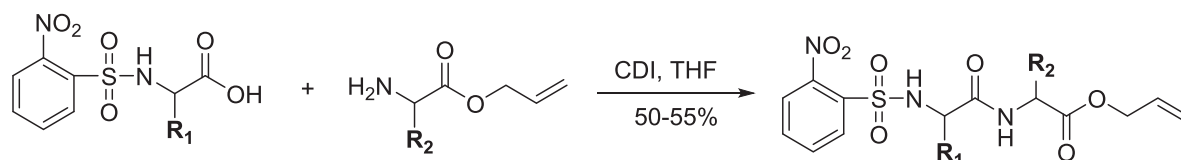


allyl alaninate
Chemical Formula: C₆H₁₁NO₂
Exact Mass: 129.08

Yield: 2.7 g (42%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 6.0 (m, 1H, HC=), 5.38 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, =CH₂), 5.32 (d, *J* = 6.4 Hz 1 H, =CH₂), 4.64 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.64 (q, *J* = 9.6 Hz, 1H, H_α), 1.38 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃)

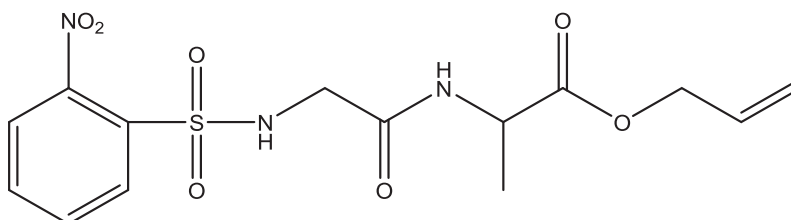
General procedure of synthesis of *o*-Ns-AA₁-AA₂-OAllyl:



CDI (1.2 equiv.) was added to a solution of 2-nitrobenzenesulfonyl protected amino acid (*o*-Ns-AA₁-OH) in THF (10 mL for 2 mmol) and stirred for 20 min before addition of allyl alaninate (1.5 equiv.). The final mixture was stirred overnight at room

temperature. The crude product was concentrated under vacuum. Then it was dissolved in EtOAc, washed with saturated NH_4Cl solution, saturated NaHCO_3 solution and brine, dried over magnesium sulfate (MgSO_4). The product was finally obtained by remove of EtOAc under vacuum without further purification.

***o*-Ns-Gly-Ala-OAllyl**



allyl ((2-nitrophenyl)sulfonyl)glycylalaninate

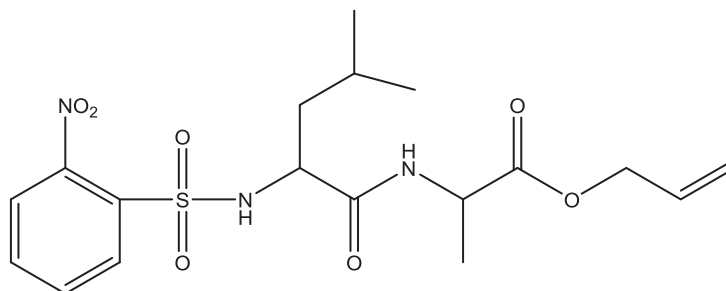
Chemical Formula: $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$

Exact Mass: 371.08

From 2 mmol *o*-Ns-Gly-OH. 370 mg was obtained (50% yield).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.14 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, *o*-Ns), 8.06 (s, 1H, G-NH), 7.94 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, *o*-Ns), 7.79 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, *o*-Ns), 7.77 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, *o*-Ns), 6.84 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, A-NH), 5.92 (m, 1H, HC=), 5.36 (d, $J = 9.8$ Hz 1 H, =CH₂), 5.32 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, =CH₂), 4.66 (d, $J = 7.0$ Hz 2H, O-CH₂), 4.56 (q, $J = 8.2$ Hz, 1H, A-H α), 3.86 (s, 2H, G-CH₂), 1.42 (d, $J = 7.6$ Hz, 3H, CH₃)

***o*-Ns-Gly-Ala-OAllyl**



allyl ((2-nitrophenyl)sulfonyl)leucylalaninate

Chemical Formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$

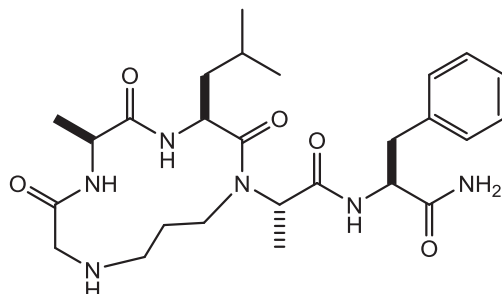
Exact Mass: 427.14

From 2 mmol *o*-Ns-Leu-OH. 469 mg was obtained (55% yield).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.09 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, *o*-Ns), 7.94 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, *o*-Ns), 7.74 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, *o*-Ns), 7.72 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, *o*-Ns), 7.28 (s, 1H, L-NH), 6.01 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, A-NH), 5.70 (m, 1H, HC=), 5.21 (d, $J = 8.8$ Hz 1 H, =CH₂), 5.18 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, =CH₂), 4.30 (m, 3H, O-CH₂, A-H α), 3.76 (t, 1H, L-H α), 1.87-1.63 (m, 5H, L-CH₂, A-CH₃), 0.96 (d, $J = 7.2$ Hz, 6H, L-CH₃)

- Synthesis macrocyclic peptide with dipeptide

Macrocycle c[GALA*]F-NH₂



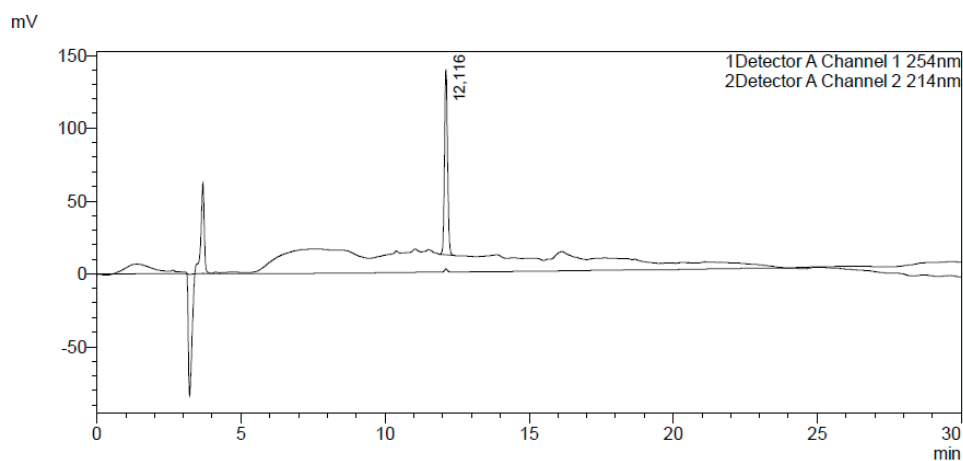
Chemical Formula: C₂₆H₄₀N₆O₅

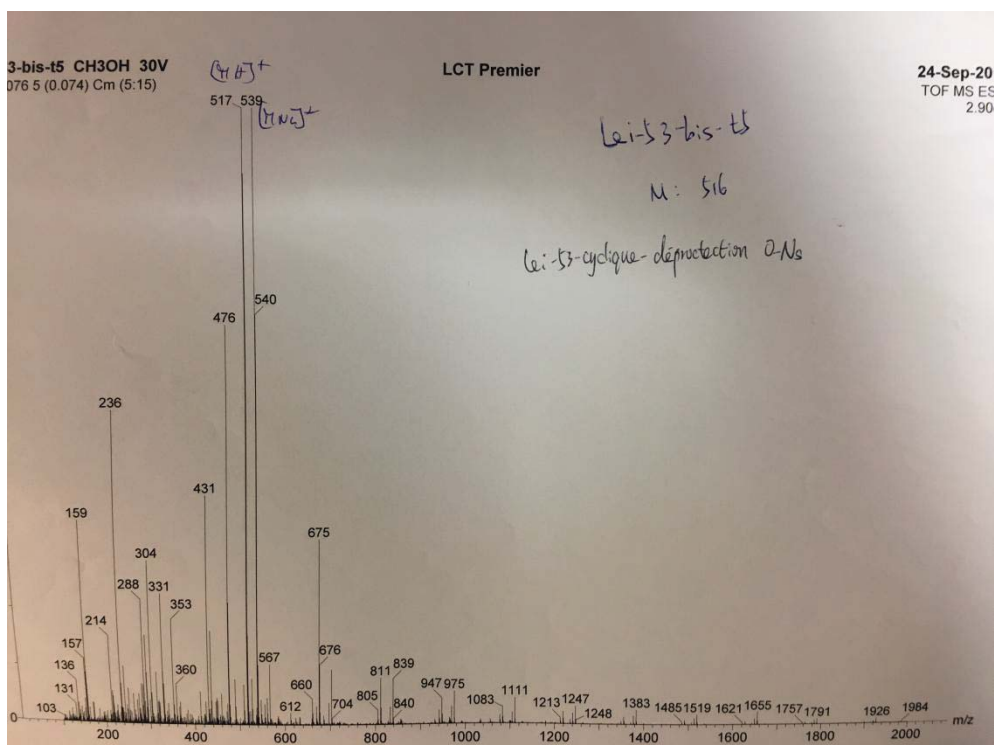
Exact Mass: 516.31

Molecular Weight: 516.64

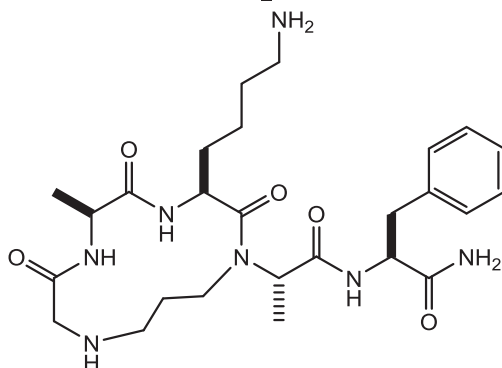
MS (ESI) found: [M+H]⁺ 517, [M+Na]⁺ 539.

HPLC: Rt = 12.1 min (30 – 100 % of solution B in 30 min)





Macrocycle c[GAKA*]F-NH₂



Chemical Formula: C₂₆H₄₁N₇O₅

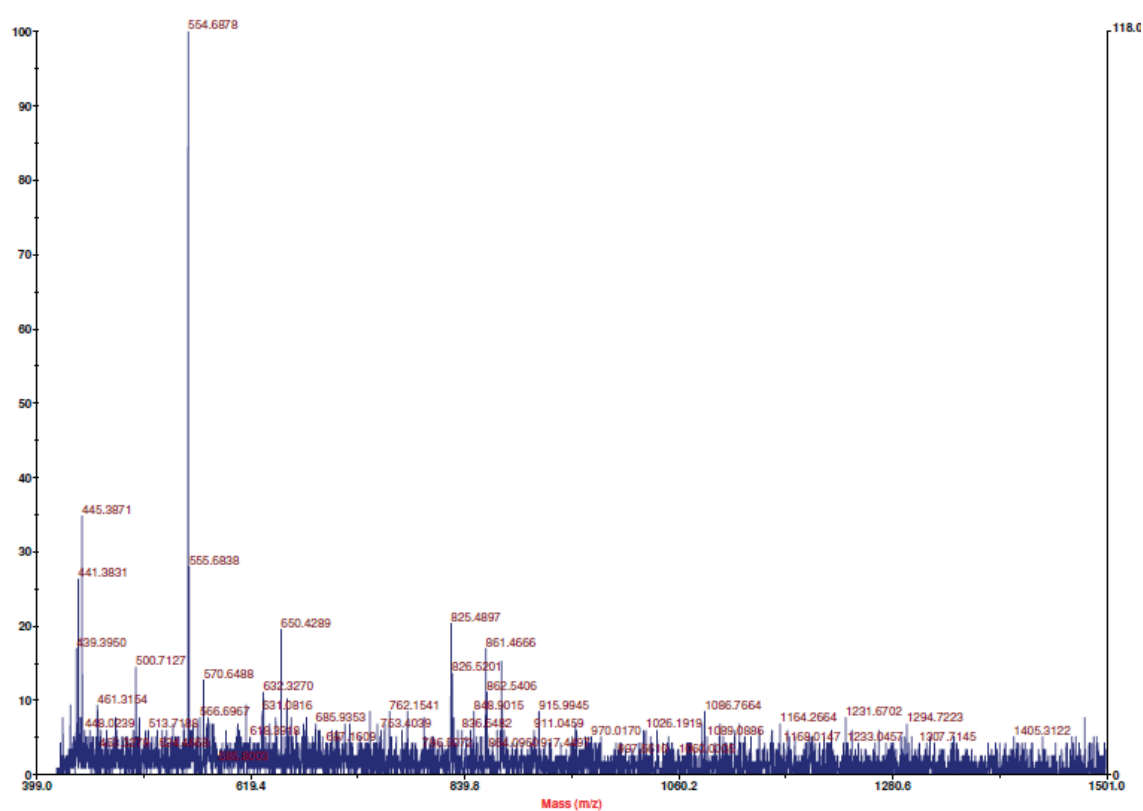
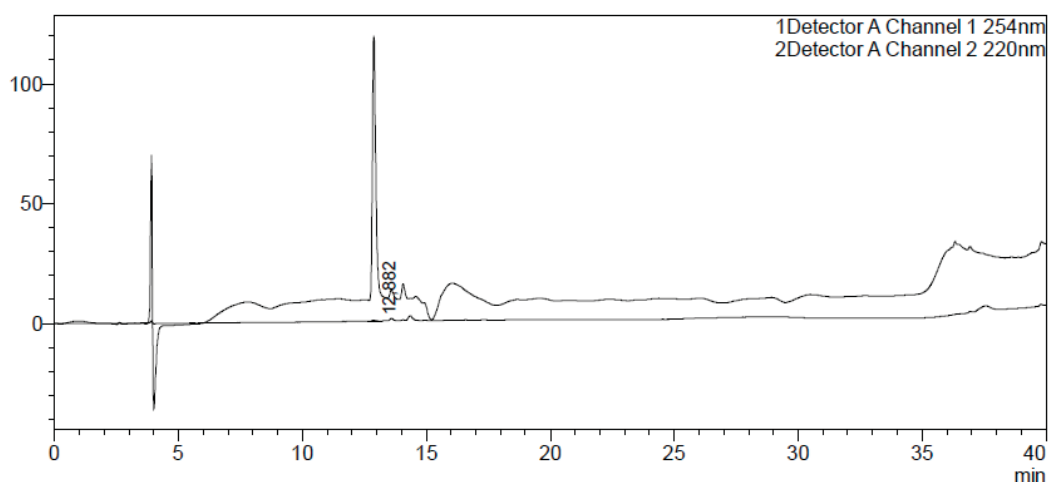
Exact Mass: 531.32

Molecular Weight: 531.66

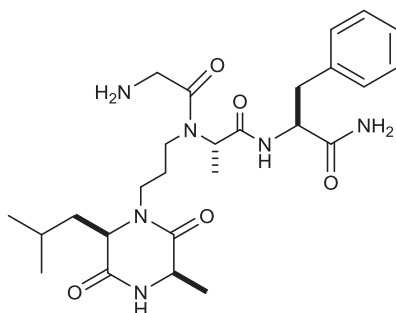
MS (MALDI) found: [M+Na]⁺ 554.68

HPLC: Rt = 12.8 min (10 – 60 % of solution B in 30 min)

mV



Peptide c[LAGA*]F-NH₂ (dicetopiperazine)



Chemical Formula: C₂₆H₄₀N₆O₅

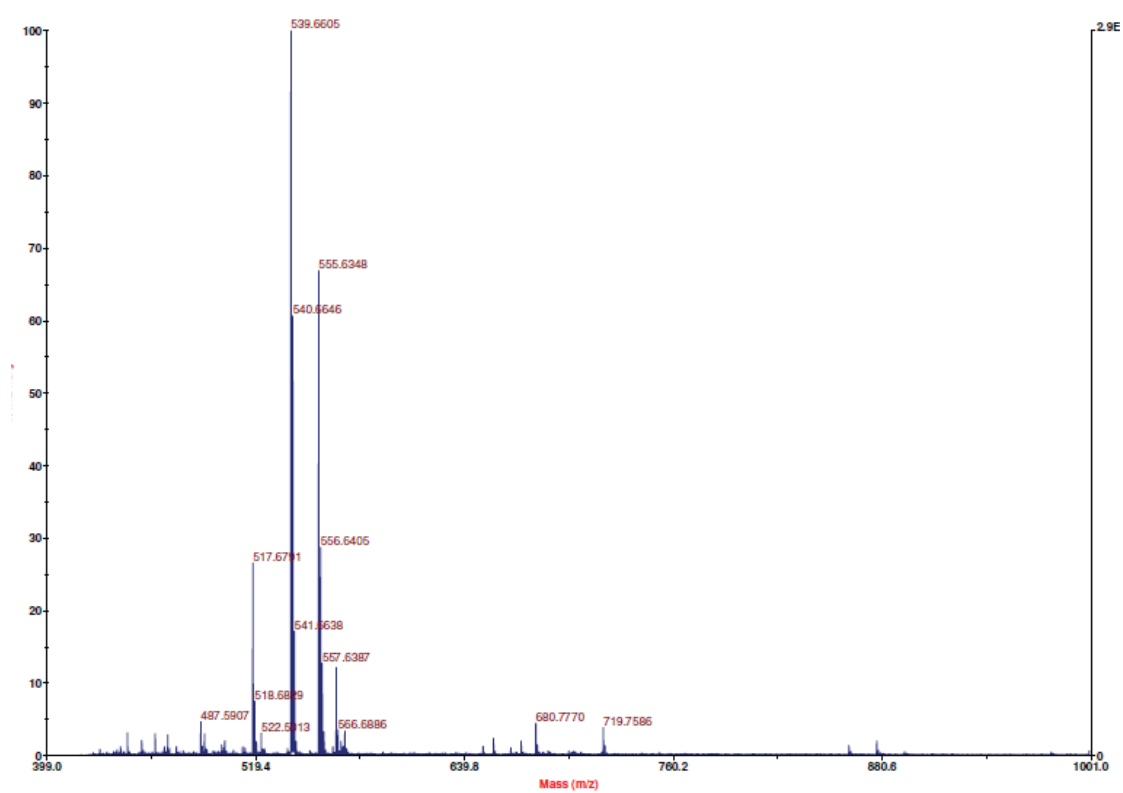
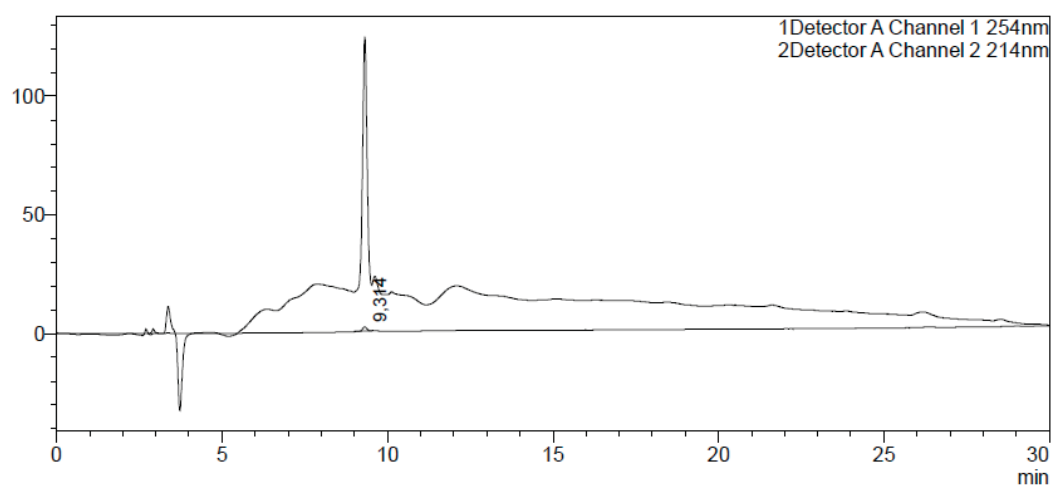
Exact Mass: 516.31

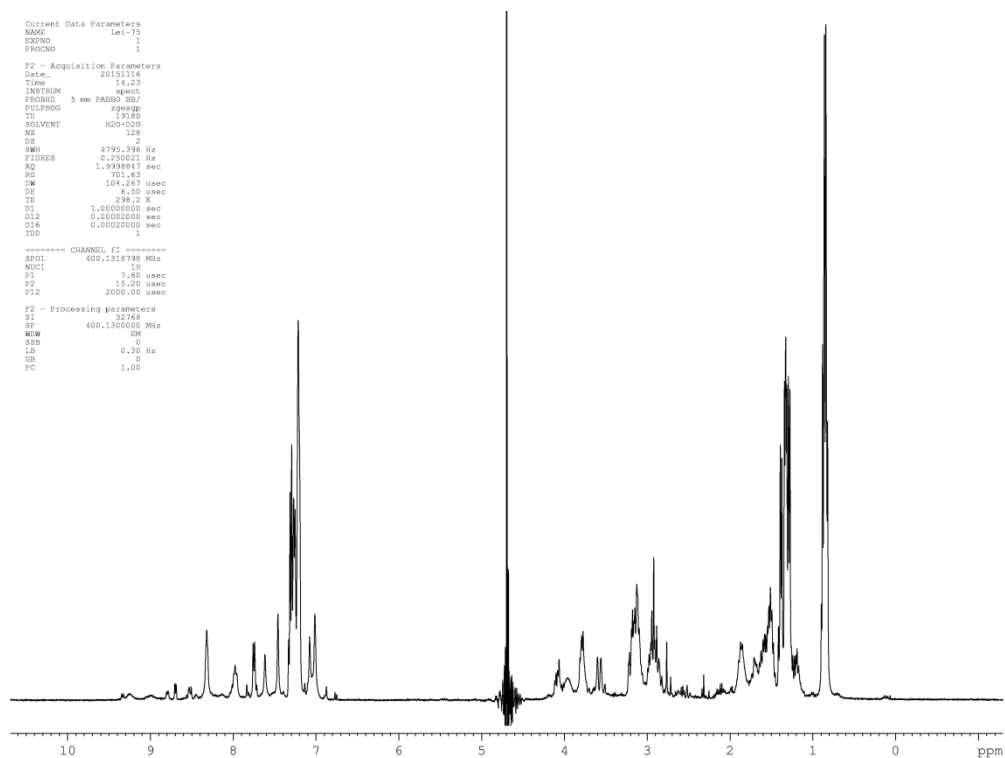
Molecular Weight: 516.64

MS (MALDI) found: [M+H]⁺ 517.67, [M+Na]⁺ 539.66, [M+K]⁺ 555.63

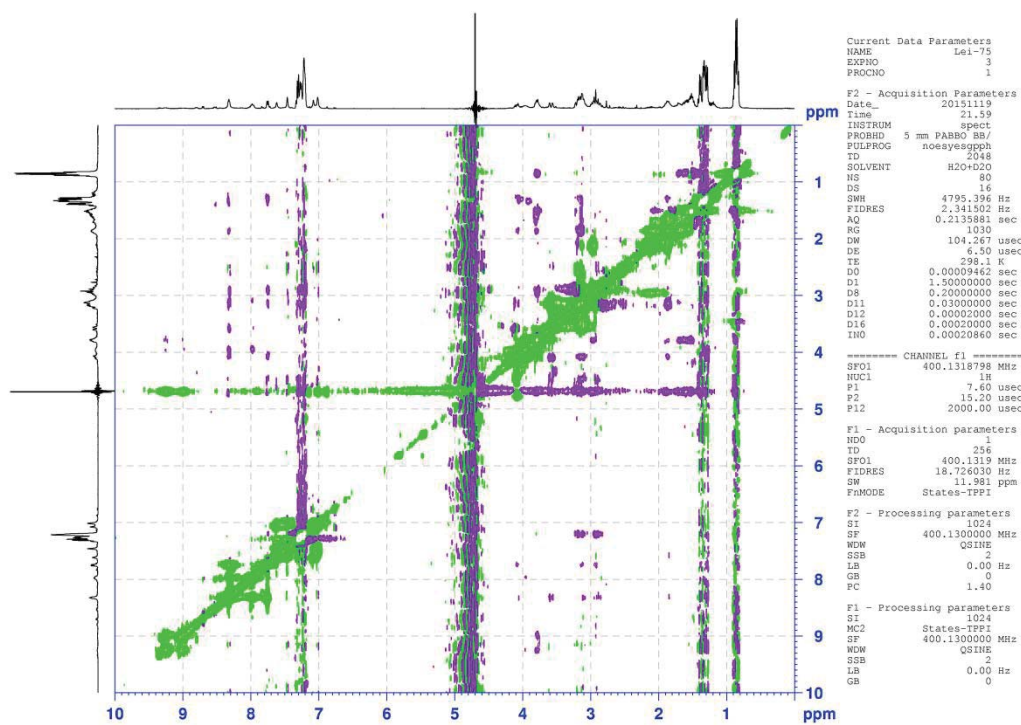
HPLC: Rt = 9.3 min (10 – 60 % of solution B in 30 min)

mV

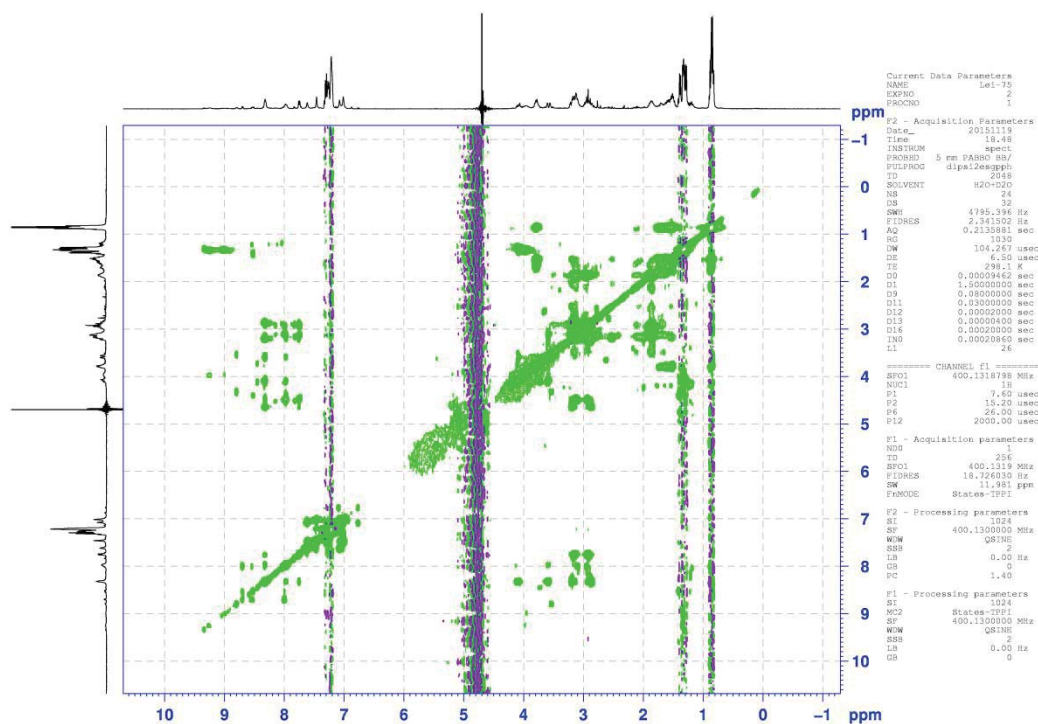




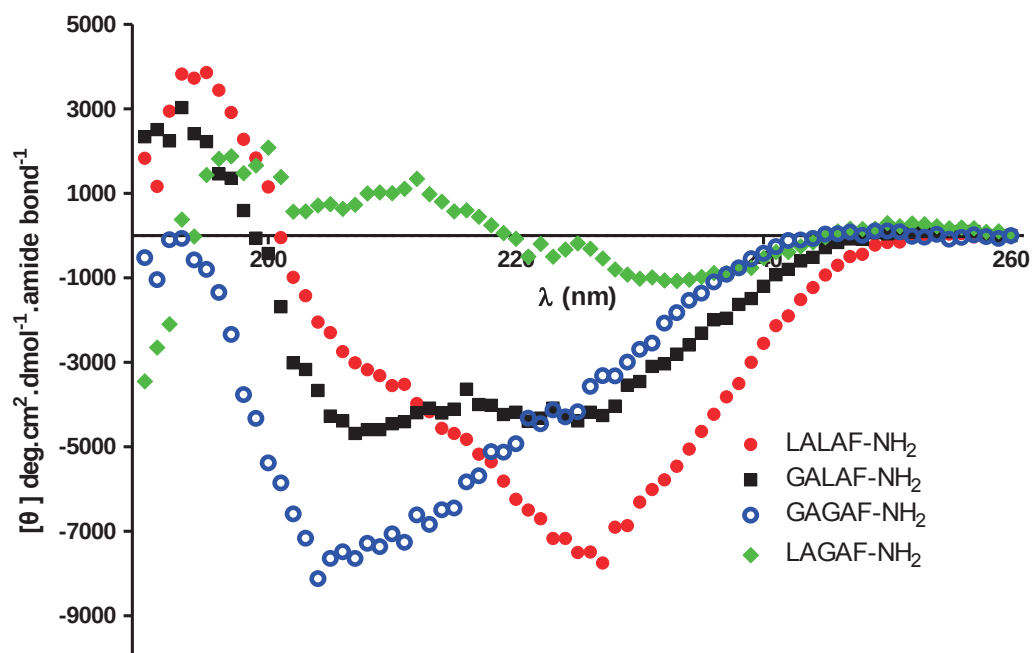
^1H spectrum of peptide c[LAGA*]F-NH₂ (1H, 400 MHz, H₂O)



TOCSY spectrum of peptide c[LAGA*]F-NH₂ (1H, 400 MHz, H₂O/D₂O 9:1)

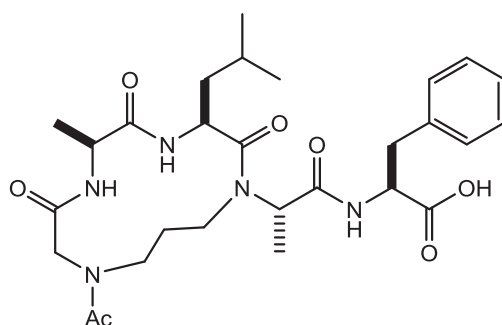


NOESY spectrum of peptide c[LAGA*]F-NH₂ (1H, 400 MHz, H₂O/D₂O 9:1)



Circular dichroism spectrum of peptide c[LAGA*]F-NH₂ comparing to macrocycle c[GAGA*]F-NH₂, c[GALA*]F-NH₂ and c[LALA*]F-NH₂.

Macrocycle Ac-c[GALA*]F-COOH



Chemical Formula: $C_{28}H_{41}N_5O_7$

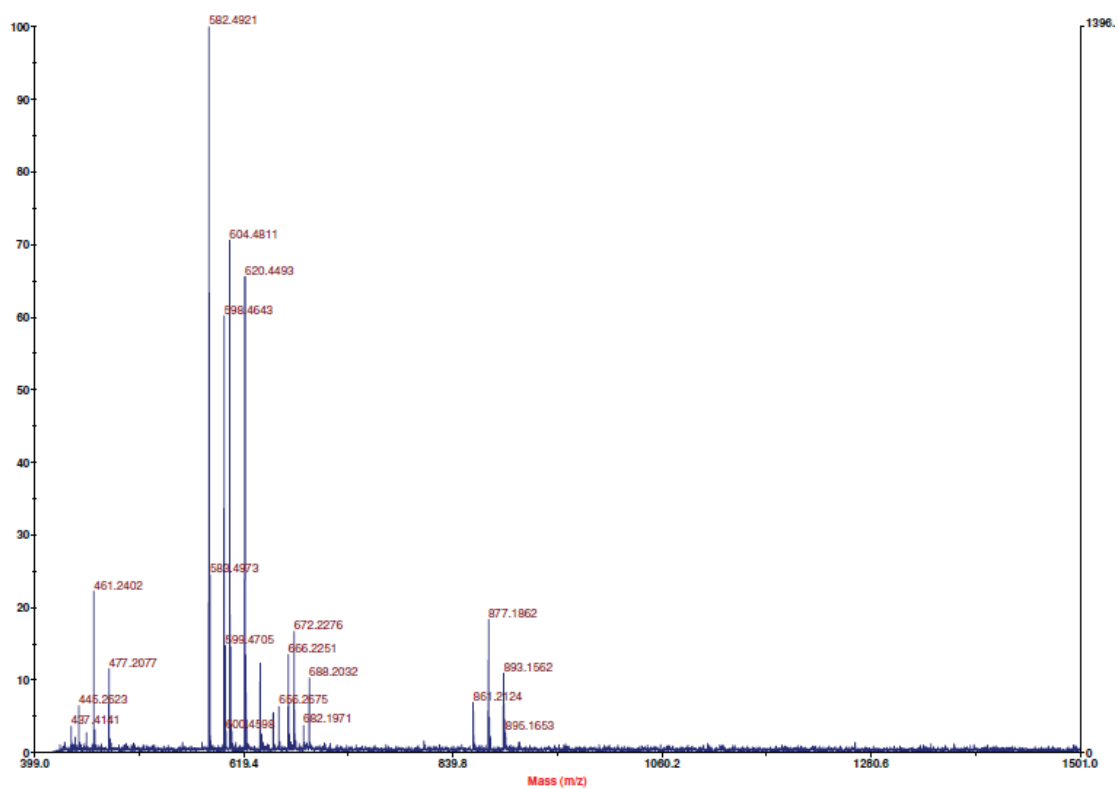
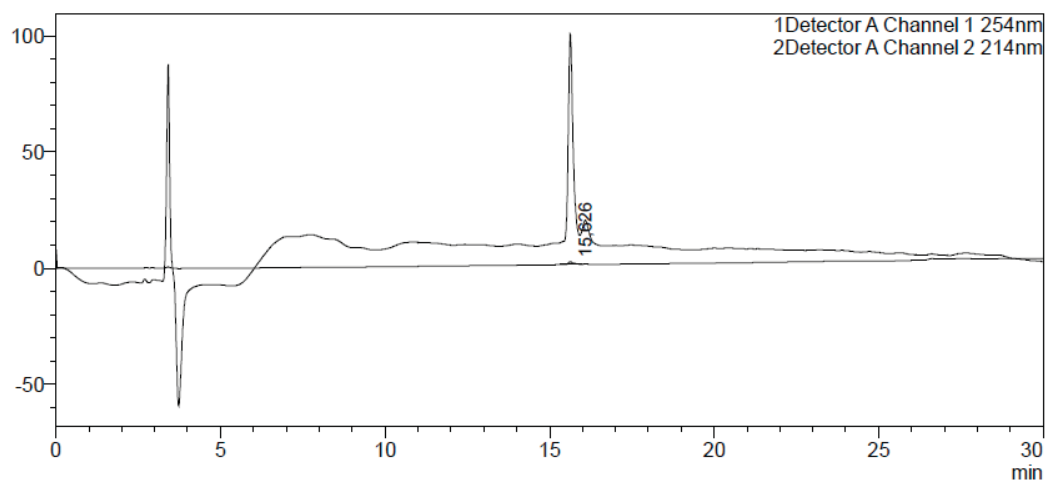
Exact Mass: 559.30

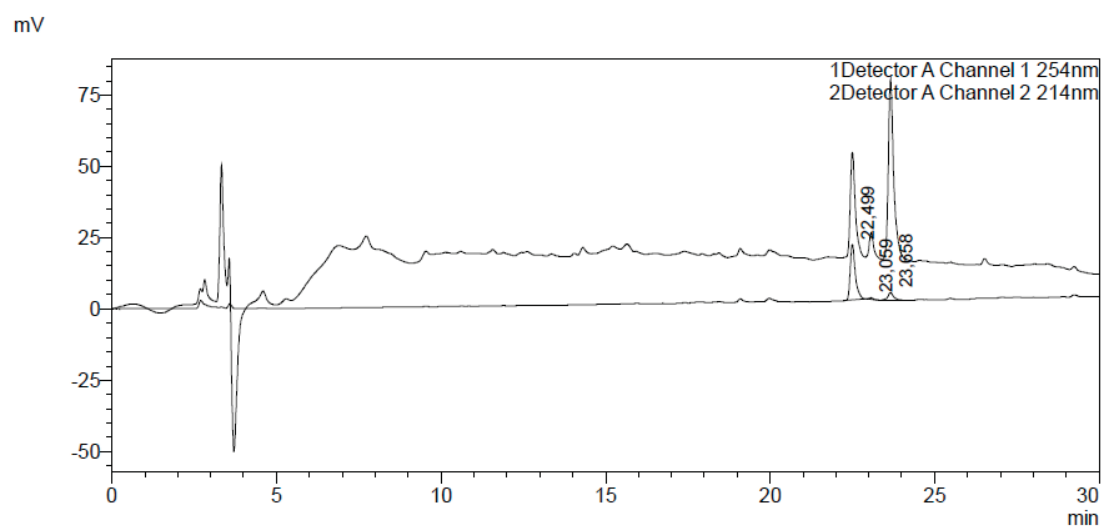
Molecular Weight: 559.66

MS (MALDI) found: $[M+Na]^+$ 582.49, $[M+K]^+$ 598.46

HPLC: Rt = 15.6 min (30 – 100 % of solution B in 30 min)

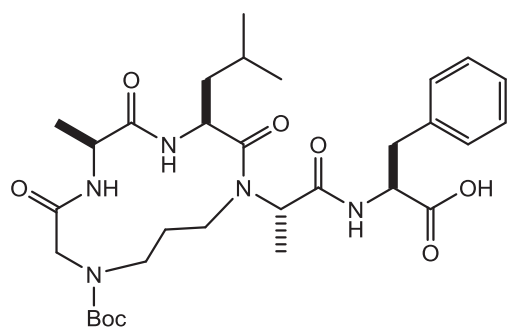
mV





HPLC spectrum of macrocycle Ac-c[LAGA*]F-COOH after treatment with pure TFA.

Macrocycle Boc-c[**GALA***]F-COOH



Chemical Formula: $C_{31}H_{47}N_5O_8$

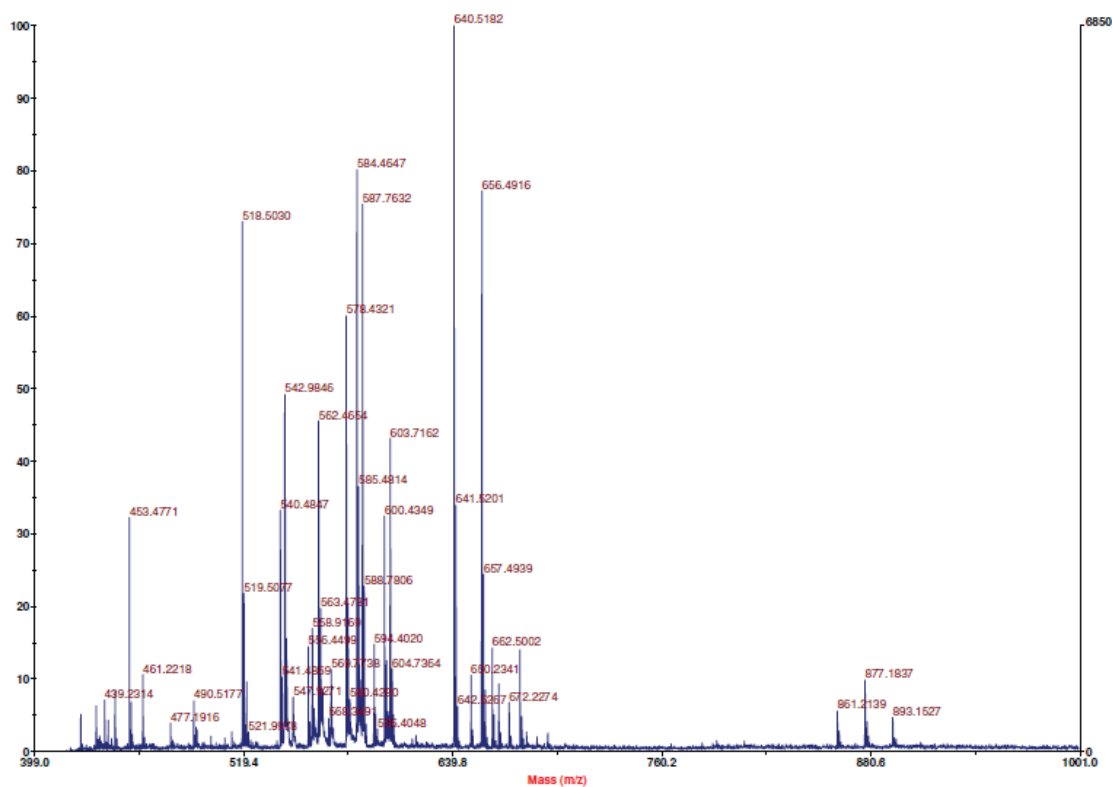
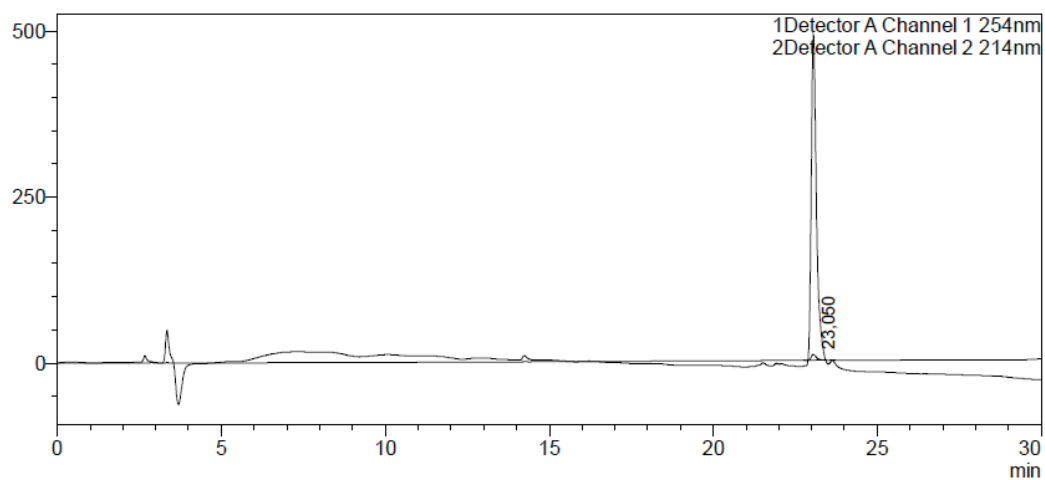
Exact Mass: 617.34

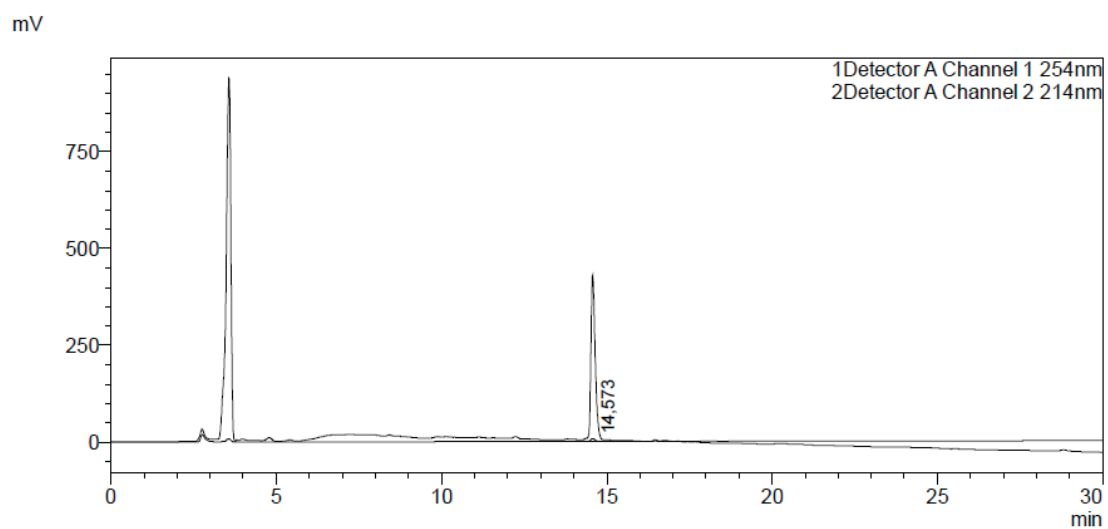
Molecular Weight: 617.74

MS (MALDI) found: $[M+Na]^+$ 640.51, $[M+K]^+$ 656.49

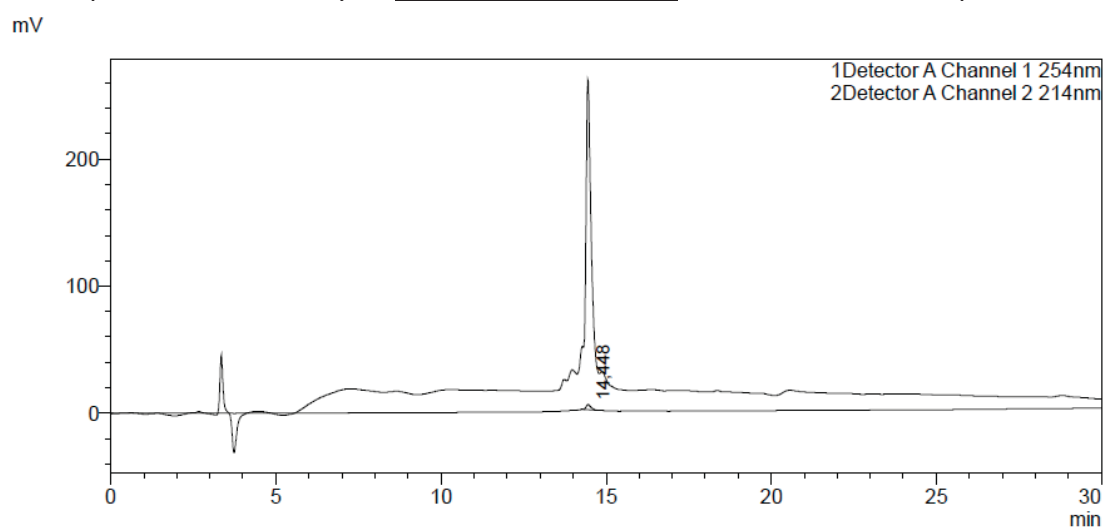
HPLC: Rt = 23.0 min (30 – 100 % of solution B in 30 min)

mV





HPLC spectrum of macrocycle Boc-c[LAGA*]F-COOH after treatment with pure TFA.



HPLC spectrum of macrocycle c[LAGA*]F-COOH.

Bibliographie

- 1 W. Stewart B and P. WILD C. *World Cancer Repport* **2014**
- 2 Hanahan D and Weinberg RA. *Cell*, **2000**, 100, 57-70
- 3 A Crispo, P Brennan, KH Jöckel, et al. *Br J Cancer*, **2004**, 91,1280–1286
- 4 P Brennan, A Crispo, D Zaridze, et al. *Am J Epidemiol*, **2006**, 164, 1233–1241
- 5 GP Pfeiffer, MF Denissenko, M Olivier, et al. *Oncogene*, **2002**, 21, 7435–7451
- 6 Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, et al. *Nature*, **2008**, 452, 633-637
- 7 Colditz GA, Sellers TA, Trapido E. *Nat Rev Cancer*. **2006**, 6, 75-83
- 8 Hanahan D, Weinberg RA. *Cell*, **2011**, 144, 646-674
- 9 Papetti M and Herman IM. *Am J Physiol Cell Physiol*. **2002**, 282,947-970
- 10 Nolte S. Poster *Website Medical Literature Society*, **2016**
- 11 Conway EM, Collen D and Carmeliet P. *Cardiovasc Res*. **2001**, 49, 507-521
- 12 Folkman J. *Nat Med*. **1995**, 1, 27-31
- 13 Klagsbrun M and D'Amore PA. *Annu Rev Physiol*. **1991**, 53, 217-239
- 14 Carmeliet P. *Nat Med*. **2003**, 9:653-660
- 15 Goldmann E. *Proc R Soc Med*. **1908**, 1(Surg Sect), 1-13.
- 16 Ide AG, Baker NH, Warren SL. *AJR*, **1939**, 32, 891–899
- 17 Algire M and Chalkley W. *J Natl Cancer Inst*. **1945**, 6, 73–85
- 18 Greenblatt M, Shubik P. *J Natl Cancer Inst*. **1968**, 41, 1111–1124
- 19 Ehrman RL, Knoth M. *J Natl Cancer Inst*. **1968**, 41, 1329–1341
- 20 Folkman J, Long DM Jr, Becker FF. *Cancer*. **1963**, 16, 453–467
- 21 Gimbrone MA Jr, Aster RH, Cotran RS, et al. *Nature*. **1969**, 222, 33–36
- 22 Folkman J. *N Engl J Med*. **1971**, 285, 1182-1186
- 23 Ferrara N, Kerbel RS. *Nature*. **2005**, 438:967-974
- 24 Al-Husein B, Abdalla M, Trepte M, et al. *Pharmacotherapy*. **2012**, 32, 1095-1111
- 25 Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. *Nat Med*. **2003**, 9, 669-976
- 26 Maden CH, Gomes J, Schwarz Q, et al. *Dev Biol*. **2012**, 369, 277-285
- 27 Dvorak HF. *J Clin Oncol*. **2002**, 20, 4368-4380
- 28 Kerbel RS. *N Engl J Med*. **2008**, 358, 2039-2049
- 29 Ellis LM, Hicklin DJ. *Nat Rev Cancer*. **2008**, 8, 579-591
- 30 Li X, Tjwa M, Van Hove I, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2008**, 28, 1614-1620
- 31 Hagberg CE, Falkevall A, Wang X, et al. *Nature*. **2010**, 464, 917-921
- 32 McColl BK, Baldwin ME, Roufail S. *J Exp Med*. **2003**, 198, 863-868
- 33 Lohela M, Saaristo A, Veikkola T. *Thromb Haemost*. **2003**, 90, 167-184
- 34 Wise LM, Inder MK, Real NC, et al. *Cell Microbiol*. **2012**, 14, 1376-1390
- 35 Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. *Nat Med*. **2001**, 7, 575-583
- 36 Hansen TM, Singh H, Tahir TA, et al. *Cell Signal*. **2010**, 22, 527-532
- 37 Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R. *Science*. **1986**, 232, 1250-1253
- 38 Carmeliet P, Jain RK. *Nature*. **2000**, 407, 249-257
- 39 Ryan DP, Matthews JM. *Curr Opin Struct Biol*. **2005**, 15, 441-446
- 40 Ezkurdia I, Juan D, Rodriguez JM, et al. *Hum Mol Genet*. **2014**, 23, 5866-5878

- 41 Berggård T, Linse S, James P. *Proteomics*. **2007**, 7, 2833-2842
- 42 Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Garland Science*, **2002**, book "Molecular Biology of the Cell. 4th edition."
- 43 Bonetta L. *Nature*. **2010**, 468, 851-854
- 44 Rolland T, Taşan M, Charlotiaux B, et al. *Cell*. **2014**, 159, 1212-1226
- 45 Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, et al. *Cancer Res*. **2008**, 68, 3421-3428
- 46 Vu BT, Vassilev L. *Curr Top Microbiol Immunol*. **2011**, 348, 151-172
- 47 Dorr P1, Westby M, Dobbs S, et al. *Antimicrob Agents Chemother*. **2005**, 49, 4721-4732
- 48 Westermarck J, Ivaska J, Corthals GL. *Mol Cell Proteomics*. **2013**, 12, 1752-1763
- 49 Jones S, Thornton JM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1996**, 93, 13-20
- 50 Lo Conte L, Chothia C, Janin J. *J Mol Biol*. **1999**, 285, 2177-2198
- 51 Cheng AC, Coleman RG, Smyth KT, et al. *Nat Biotechnol*. **2007**, 25, 71-75
- 52 Smith RD, Hu L, Falkner JA, et al. *J Mol Graph Model*. **2006**, 24, 414-425
- 53 Guo W, Wisniewski JA, Ji H. *Bioorg Med Chem Lett*. **2014**, 24, 2546-2554
- 54 Santoro M, Carlomagno F, Romano, et al. *Science*. **1995**, 267, 381-383.
- 55 DeLano WL, Ultsch MH, de Vos AM, et al. *Science*. **2000**, 287, 1279-1283
- 56 Wells JA, McClendon CL. *Nature*. **2007**, 450, 1001-1009
- 57 Shibuya M. *Genes Cancer*. **2011**, 2, 1097-1105
- 58 McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. *Biochim Biophys Acta*. **2007**, 1773, 1263-1284
- 59 Milroy LG, Grossmann TN, Hennig S, et al. *Chem Rev*. **2014**, 114, 4695-4748
- 60 L. Nevola, E. Giralt, *Chem. Commun*. **2015**, 51, 3302 -3315
- 61 T. A. Hill, N. E. Shepherd, F. Diness, et al. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2014**, 53, 13020-13041
- 62 Petros AM, Nettesheim DG, Wang Y, et al. *Protein Sci*. **2000**, 9, 2528-2534
- 63 Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. *Biochem Biophys Res Commun*. **2005**, 333, 328-335
- 64 Holash J, Davis S, Papadopoulos N, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002**, 99, 11393-11398
- 65 Fuller JC, Burgoyne NJ, Jackson RM. *Drug Discov Today*. **2009**, 14, 155-161
- 66 Sperl B, Seifert MH, Berg T. *Bioorg Med Chem Lett*. **2009**, 19, 3305-3309
- 67 Cesa LC, Patury S, Komiyama T, et al. *ACS Chem Biol*. **2013**, 8, 1988-1997
- 68 Zinzalla G, Thurston DE. *Future Med Chem*. **2009**, 1, 65-93
- 69 Wells JA, McClendon CL. *Nature*. **2007**, 450, 1001-1009
- 70 Yang CY, Wang S. *ACS Med Chem Lett*. **2010**, 1, 125-129
- 71 Yang CY, Wang S. *ACS Med Chem Lett*. **2011**, 2, 280-284
- 72 Geppert T, Hoy B, Wessler S, Schneider G. *Chem Biol*. **2011**, 18, 344-353
- 73 Wójcik P, Berlicki Ł. *Bioorg Med Chem Lett*. **2016**, 26, 707-713
- 74 Kuenemann MA, Sperandio O, Labbé CM, et al. *Prog Biophys Mol Biol*. **2015**, 119, 20-32
- 75 M. Pelay-Gimeno, A. Glas, O. Koch, et al. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2015**, 54, 8896-8927
- 76 Huang L, Hofer F, Martin GS, et al. *Nat Struct Biol*. **1998**, 5, 422-426
- 77 Kiel C, Serrano L, Herrmann C. *J Mol Biol*. **2004**, 340, 1039-1058
- 78 K. N. Houk, A. G. Leach, S. P. Kim, et al. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2003**, 42, 4872-4897

79 London N, Raveh B, Movshovitz-Attias D, et al. *Proteins*. **2010**, 78, 3140-3149
 80 Azzarito V, Long K, Murphy NS, et al. *Nat Chem*. **2013**, 5, 161-173
 81 Dharanipragada R. *Future Med Chem*. **2013**, 5, 831-849
 82 C. M. Venkatachalam. *Biopolymers* **1968**, 6, 1425-1436
 83 K.-C. Chou. *Anal. Biochem*. **2000**, 286, 1-16.
 84 Gavenonis J, Sheneman BA, Siegert TR, et al. *Nat Chem Biol*. **2014**, 10, 716-722
 85 White CJ, Yudin AK. *Nat Chem*. **2011**, 3, 509-524
 86 Pelay-Gimeno M, Tulla-Puche J, Albericio F. *Mar Drugs*. **2013**, 11, 1693-1717
 87 Tavassoli A, Lu Q, Gam J, et al. *ACS Chem Biol*. **2008**, 3, 757-764
 88 Miranda E, Nordgren IK, Male AL, et al. *J Am Chem Soc*. **2013**, 135, 10418-10425
 89 Koch O, Klebe G. *Proteins Struct. Funct. Bioinf*. **2009**, 74, 353-367
 90 Nagai U, Sato K, *Tetrahedron Lett*. **1985**, 26, 647-650
 91 Ripka WC, De Lucca GV, Bach II AC, et al. *Tetrahedron*. **1993**, 49, 3593-3608
 92 Hirschmann R, Nicolaou KC, Pietranico S, et al. *J. Am. Chem. Soc*. **1992**, 114, 9217-9218.
 93 Lomlim L, Einsiedel J, Heinemann FW, et al. *J. Org. Chem*. **2008**, 73, 3608-3611
 94 Whitby LR, Ando Y, Setola V, et al. *J. Am. Chem. Soc*. **2011**, 133, 10184-10194
 95 Sibanda BL, Thornton JM. *Nature* **1985**, 316, 170-174
 96 Athanassiou Z, Dias RL, Moehle K, et al. *J Am Chem Soc*. **2004**, 126, 6906-6913
 97 Chatterjee B, Saha I, Raghothama S, et al. *Chemistry*. **2008**, 14, 6192-6204
 98 Stanger HE, Gellman SH. *J. Am. Chem. Soc*. **1998**, 120, 4236-4237
 99 J. M. Langenhan, I. A. Guzei, S. H. Gellman. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2003**, 42, 2402-2405
 100 Fasan R, Dias RL, Moehle K, et al. *Chembiochem*. **2006**, 7, 515-26
 101 Chan LY, Zhang VM, Huang YH, et al. *Chembiochem*. **2013**, 14, 617-624
 102 Almeida AM, Li R, Gellman SH. *J Am Chem Soc*. **2012**, 134, 75-78
 103 Nowick JS, Holmes DL, Mackin G, et al. *J. Am. Chem. Soc*. **1996**, 118, 2764-2765
 104 Koch O, Cole J, Block P, et al. *J Chem Inf Model*. **2009**, 49, 2388-2402
 105 Bullock BN, Jochim AL, Arora PS. *J Am Chem Soc*. **2011**, 133, 14220-14223
 106 Jochim AL, Arora PS. *ACS Chem Biol*. **2010**, 5, 919-923
 107 Azzarito V, Long K, Murphy NS, et al. *Nat Chem*. **2013**, 5, 161-173
 108 Chorev M1, Roubini E, McKee RL, et al. *Biochemistry*. **1991**, 30, 5968-5974
 109 Jackson DY, King DS, Chmielewski J, et al. *J. Am. Chem. Soc*. **1991**, 113, 9391-9392
 110 Jo H, Meinhardt N, Wu Y, et al. *J. Am. Chem. Soc*. **2012**, 134, 17704-17713
 111 Muppidi A, Wang Z, Li X, et al. *Chem. Commun*. **2011**, 47, 9396-9398
 112 Muppidi A, Doi K, Edwardraja S, et al. *J. Am. Chem. Soc*. **2012**, 134, 14734-14737
 113 Leduc AM, Trent JO, Wittliff JL, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 11273-11278
 114 Cantel S, Isaad Ale C, Scrima M, et al. *J. Org. Chem*. **2008**, 73, 5663-5674
 115 Baek S, Kutchukian PS, Verdine GL, et al. *J Am Chem Soc*. **2012**, 134, 103-106
 116 Schafmeister CE, Po J, G. L. Verdine GL. *J Am Chem Soc*. **2000**, 122, 5891-5892
 117 H. E. Blackwell, R. H. Grubbs. *Angew. Chem. Int. Ed*. **1998**, 37, 3281-3284
 118 Blackwell HE, Sadowsky JD, Howard RJ, et al. *J Org Chem*. **2001**, 66, 5291-5302
 119 Grossmann TN, Yeh JT, Bowman BR, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2012**, 109, 17942-17947

- 120 Cui HK, Zhao B, Li Y, et al. *Cell Res.* **2013**, 23, 581-584
- 121 Q. Chu, R. E. Moellering, G. J. Hilinski, et al. *MedChemComm* **2015**, 6, 111-119
- 122 Bird GH, Madani N, Perry AF, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2010**, 107, 14093-14098
- 123 Hilinski GJ, Kim YW, Hong J, et al. *J Am Chem Soc.* **2014**, 136, 12314-12322
- 124 Cabezas E, Satterthwait AC. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3862-3875
- 125 Chapman RN, Dimartino G, Arora PS. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12252-12253
- 126 Patgiri A, Menzenski MZ, Mahon AB, et al. *Nat. Protoc.* **2010**, 5, 1857-1865
- 127 Kushal S, Lao BB, Henchey LK, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 15602-15607
- 128 Takahashi N, Shibuya M. *Clinical Science*, **2005**, 109, 227-241
- 129 Rahimi N. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* **2006**, 11, 818-829
- 130 Stuttfeld E, Ballmer-Hofer K. *IUBMB Life*, **2009**, 61, 915-922
- 131 Koch S, Tugues S, Li X, et al. *Biochem J.* **2011**, 437, 169-183
- 132 Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 30336-30343.
- 133 Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, et al. *EMBO J.* **2001**, 20, 2768-2778
- 134 Youssoufian H, Hicklin DJ, Rowinsky EK. *Clin Cancer Res.* **2007**, 13, 5544-5548
- 135 Delcombel R, Janssen L, Vassy R, et al. *Angiogenesis.* **2013**, 16, 353-371
- 136 Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, et al. *Cell Growth Differ.* **1996**, 7, 213-221
- 137 Kappas NC, Zeng G, Chappell JC, et al. *J Cell Biol.* **2008**, 181, 847-858
- 138 Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, et al. *Nature.* **1995**, 376, 66-70
- 139 Maynard SE, Min JY, Merchan J, et al. *J Clin Invest.* **2003**, 111, 649-658
- 140 Kendall RL, Wang G, DiSalvo J, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* **1994**, 201, 326-330
- 141 Tchaikovski V, Fellbrich G, Waltenberger J. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2008**, 28, 322-328
- 142 Kerber M, Reiss Y, Wickersheim A, et al. *Cancer Res.* **2008**, 68, 7342-7351
- 143 Muramatsu M, Yamamoto S, Osawa T, et al. *Cancer Res.* **2010**, 70, 8211-8221
- 144 Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, et al. *Cancer Cell.* **2002**, 2, 289-300
- 145 Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. *Nature.* **2005**, 438, 820-827
- 146 Wu Y, Hooper AT, Zhong Z, et al. *Int J Cancer.* **2006**, 119, 1519-1529
- 147 Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, et al. *Cell.* **1997**, 91, 695-704
- 148 Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, et al. *J Biol Chem.* **1996**, 271, 7788-7795
- 149 Holash J, Davis S, Papadopoulos N, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**, 99, 11393-11398
- 150 Piossek C, Schneider-Mergener J, Schirner M, et al. *J Biol Chem.* **1999**, 274, 5612-5619
- 151 Piossek C, Thierauch KH, Schneider-Mergener J, et al. *Thromb Haemost.* **2003**, 90, 501-510
- 152 Bazan J, Całkosiński I, Gamian A. *Hum Vaccin Immunother.* **2012**, 8, 1817-1828
- 153 Wiesmann C, Christinger HW, Cochran AG, et al. *Biochemistry.* **1998**, 37, 17765-17772
- 154 Reille-Seroussi M, Gaucher JF, Desole C, et al. *Biochemistry.* **2015**, 54, 5147-5156

- 155 Hetian L, Ping A, Shumei S, et al. *J Biol Chem.* **2002**, 277, 43137-43142
- 156 An P, Lei H, Zhang J, et al. *Int J Cancer.* **2004**, 111, 165-173
- 157 Zhou Z, Zhao C, Wang L, et al. *Am J Cancer Res.* **2015**, 5, 3149-3161
- 158 Brozzo MS, Bjelić S, Kisko K, et al. *Blood.* **2012**, 119, 1781-1788
- 159 Zilberberg L, Shinkaruk S, Lequin O, et al. *J Biol Chem.* **2003**, 278, 35564-35573
- 160 Basile A, Del Gatto A, Diana D, et al. *J Med Chem.* **2011**, 54, 1391-1400
- 161 García-Aranda MI, González-López S, Santiveri CM, et al. *Org Biomol Chem.* **2013**, 11, 1896-1905
- 162 Goncalves V, Gautier B, Coric P, et al. *J Med Chem.* **2007**, 50, 5135-5146
- 163 Gautier B, Goncalves V, Diana D, et al. *J Med Chem.* **2010**, 53, 4428-4440
- 164 García-Aranda MI, Marrero P, Gautier B, et al. *Bioorg Med Chem.* **2011**, 19, 1978-1986
- 165 Takahashi D, Yamamoto T. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 1936-1939
- 166 Merrifield RB. *J Am Chem Soc.* **1963**, 85, 2149-2154
- 167 Palomo JM. *RSC Adv.* **2014**, 4, 32658-32672
- 168 Carpino LA, Han GY. *J Am Chem Soc.* **1970**, 92, 5748-5749.
- 169 Camarero J, Adeva, A, Muir, T. *Lett Pept Sci* **2000**, 7, 17–21
- 170 Harris PW, Brimble MA. *Biopolymers.* **2013**, 100, 356-365
- 171 Mäde V, Els-Heindl S, Beck-Sickinger AG. *Beilstein J Org Chem.* **2014**, 10, 1197-1212
- 172 Izdebski J, Orlowska A, Anulewicz R, et al. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, 43, 184–189
- 173 Els S, Beck-Sickinger AG, Chollet C. *Methods Enzymol.* **2010**, 485, 103–121
- 174 Carpino LA. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397–4398
- 175 Subirós-Funosas R, Prohens R, Barbas R, et al. *Chem.–Eur. J.* **2009**, 15, 9394–9403
- 176 El-Faham A, Subirós Funosas R, Prohens R, et al. *Chem.–Eur. J.* **2009**, 15, 9404–9416
- 177 Pedersen SL, Tofteng AP, Malik L, et al. *Chem Soc Rev.* **2012**, 41, 1826-1844
- 178 Gabriel C, Gabriel S, Grant EH, et al. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 213-224
- 179 Kappe CO. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 6250-6284
- 180 Matsushita T, Hinou H, Fumoto M, et al. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 3051-3063
- 181 Grieco P, Campiglia P, Gomez-Monterrey I, et al. *Synlett*, **2003**, 2216-2218
- 182 Collins JM, Collins MJ. *Biopolymers*, **2003**, 71, P267
- 183 Malik L, Tofteng AP, Pedersen SL, et al. *J. Pept. Sci.* **2010**, 16, 506-512
- 184 Kelly SM, Jess TJ, Price NC. *Biochim Biophys Acta.* **2005**, 1751, 119-139
- 185 Aue WP, Bartholdi E, Ernst RR. *Journal of Chemical Physics*, **1976**, 64, 2229-2246
- 186 Martin GE, Zekter AS. *VCH Publishers*, **1988**, Inc. p. 59
- 187 Williamson MP, Havel TF, Wüthrich K. *J Mol Biol.* **1985**, 182, 295-315
- 188 Braun W et al. *J. Mol. Biol.* **1986**, 187, 125–129
- 189 Zerbe/Bader. *Peptide/Protein NMR*
- 190 Labbé CM, Laconde G, Kuenemann MA et al. *Drug Discov Today.* **2013**, 18, 958-968
- 191 Goncalves V, Gautier B, Garbay C et al. *Anal Biochem.* **2007**, 366, 108-110
- 192 DeCicco-Skinner KL, Henry GH, Cataisson C, et al. *J Vis Exp.* **2014**, 91 : e51312
- 193 Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, et al. *J Cell Biol.* 1988 Oct;107(4):1589-1598

- 194 Ferrara N. *Oncology*. **2005**, 69 Suppl 3, 11-16
- 195 Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, et al. *Nat Rev Cancer*. **2008**, 8, 942-956
- 196 D'Andrea LD, Iaccarino G, Fattorusso R, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2005**, 102, 14215-14220
- 197 Vicari D, Foy KC, Liotta EM, et al. *J Biol Chem*. **2011**, 286, 13612-13625
- 198 El-Mousawi M, Tchistiakova L, Yurchenko L, et al. *J. Biol. Chem*. **2003**, 278, 46681-46691
- 199 Reczek JJ, Rebolini E, Urbach AR. *J. Org. Chem*. **2010**, 75, 2111-2114
- 200 Reille-Seroucci M. **2014**, *thèse d'université Paris Descartes*.
- 201 Iyer S, Darley PI, Acharya KR. *J Biol Chem*. **2010**, 285, 23779-23789.
- 202 Christinger HW, Fuh G, de Vos AM et al. *J Biol Chem*. **2004**, 279, 10382-10388.
- 203 Fuh G, Li B, Crowley C, et al. *J Biol Chem*. **1998**, 273, 11197-11204
- 204 Holash J, Davis S, Papadopoulos N, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002**, 99, 11393-11398
- 205 Brozzo MS, Bjelić S, Kisko K, et al. *Blood*. **2012**, 119, 1781-1788
- 206 Ziaco B, Diana D, Capasso D et al. *Biochem Biophys Res Commun*. **2012**, 424, 290-294.
- 207 Hilinski GJ, Kim YW, Hong J, et al. *J Am Chem Soc*. **2014**, 136, 12314-12322
- 208 Chen S, Gopalakrishnan R, Schaer T, et al. *Nat Chem*. **2014**, 6, 1009-1016
- 209 Cabezas E, Satterthwait A. C. *J. Am. Chem. Soc*. **1999**, 121, 3862-3875.
- 210 Chapman RN, Dimartino G, Arora PS. *J Am Chem Soc*. **2004**, 126, 12252-12253
- 211 Liu J, Wang D, Zheng Q, et al. *J Am Chem Soc*. **2008**, 130, 4334-4337
- 212 Chapman RN, Arora PS. *Org Lett*. **2006**, 8, 5825-5828
- 213 Dimartino G, Wang D, Chapman RN, et al. *Org Lett*. **2005**, 7, 2389-2392
- 214 Patgiri A, Witten MR, Arora PS. *Org Biomol Chem*. **2010**, 8, 1773-1776
- 215 Wang D, Chen K, Kulp Iii JL et al. *J Am Chem Soc*. **2006**, 128, 9248-9256
- 216 Patgiri A, Jochim AL, Arora PS. *Acc Chem Res*. **2008**, 41, 1289-1300
- 217 Henchey LK, Kushal S, Dubey R, et al. *J Am Chem Soc*. **2010**, 132, 941-943
- 218 Dames SA, Martinez-Yamout M, De Guzman RN, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002**, 99, 5271-5276
- 219 Mahon AB, Arora PS. *Chem Commun (Camb)*. 2012, 48, 1416-1418
- 220 Miller SE, Kallenbach NR, Arora PS. *Tetrahedron*. **2012**, 68, 4434-4437
- 221 Miller SE, Watkins AM, Kallenbach NR, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2014**, 111, 6636-6641
- 222 Wang D, Chen K, Dimartino G, et al. *Org Biomol Chem*. **2006**, 4, 4074-4081
- 223 Vernall AJ, Cassidy P, Alewood PF. *Angew Chem Int Ed Engl*. **2009**, 48, 5675-5678
- 224 Morris MB, Ralston GB, Biden TJ, et al. *Biochemistry*. **1995**, 34, 4538-4545.
- 225 Wiczak W, Rekowski P, Kupryszewski G, et al. *Biophys Chem*. **1996**, 58, 303-312
- 226 Mitsunobu O. *Synthesis* **1981**, 1, 1-28
- 227 Miller SC, Scanlan TS. *J. Am. Chem. Soc*. **1997**, 119, 2301-2302
- 228 Miller SC, Scanlan TS. *J. Am. Chem. Soc*. **1998**, 120, 2690-2691
- 229 Fukuyama T, Jow C-K, Cheung M. *Tetrahedron Lett*. **1995**, 36, 6373-6374.
- 230 Corey EJ, Snider BB. *J. Am. Chem. Soc*. **1972**, 94, 6190-6192
- 231 Isidro-Llobet A, Alvarez M, Albericio F. *Chem Rev*. **2009**, 109, 2455-2504
- 232 Hoang HN, Driver RW, Beyer RL et al. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2011**, 50, 11107-11111

- 233 Krishna Y, Sharma S, Ampapathi RS et al. *Org. Lett.* **2014**, 16, 2084-2087
- 234 Jost M, Greie JC, Stemmer N, et al. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2002**, 41, 4267-4269
- 235 Nyfeler R. *Methods Mol Biol.* **1994**, 35, 303-316
- 236 Rinnová M, Lebl M, Souček M. *Letters in Peptide Science.* **1999**, 6, 15-22

Inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR : Conception, synthèse et études structurales de peptides et peptidomimétiques mimes de structures secondaires

Résumé : Les inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR empêchent l'angiogenèse tumorale provoquée par l'activation du VEGFR. Ils jouent un rôle important dans l'arsenal thérapeutique utilisé dans les traitements antitumoraux. Dans ce contexte, nous avons utilisé la méthode de « conception rationnelle » pour développer des antagonistes peptidiques du VEGFR1. Quatre axes de recherche ont été réalisés : 1) peptides modifiés en position C-terminale pour améliorer l'affinité d'un inhibiteur développé antérieurement ; 2) peptides conçus à partir de différents sites d'interaction de trois ligands du VEGFR1 ; 3) peptides mimant l'hélice α 1 du VEGF, avec des modifications de séquences et la stabilisation de la conformation hélice α ; 4) peptides associés à partir de différents sites d'interaction du VEGF. La capacité de ces peptides à inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1 a été évaluée par ELISA et RMN. L'effet anti-angiogénique de certains peptides ayant la meilleure affinité a été évalué par un test d'inhibition de la formation de microtubules dans des HUVEC.

Une grande partie du travail a été également réalisée sur la stabilisation de la structure en hélice α de peptides par un nouveau macrocycle utilisant une stratégie de « remplacement de liaison hydrogène ». Nous avons effectué la conception, la synthèse et la caractérisation physico-chimique de ces peptides macrocycliques. Des études structurales par RMN, dichroïsme circulaire et modélisation moléculaire ont également été effectuées.

Ce travail de thèse a non seulement enrichi la banque d'antagonistes du VEGFR, mais aussi les méthodes de stabilisation de la structure secondaire des peptides.

Mot clés : Angiogenèse, VEGF, VEGFR, antagoniste, peptide, peptidomimétique, interaction protéine-protéine, hélice α , macrocycle.

Inhibitors of the interaction VEGF/VEGFRs: Design, synthesis and structural studies of peptides and peptidomimetics mimicking secondary structures

Summary: The PPIs of the VEGF/VEGFR interaction play an important role in the treatment of cancer. In this context, we rationally designed peptides antagonists of VEGFR1 based on the interaction of its different ligands. Four parts of research have been realized: 1) Design and synthesis of C-terminal modified cyclic peptides based on a known inhibitor of VEGFR1; 2) Synthesis and evaluation of peptides antagonists of VEGFR1 designed from its three ligands; 3) Development of VEGFR1 antagonists derived from the α 1-helix of VEGF; 4) Peptides antagonists mimicking simultaneously two interaction sites of VEGF. The affinity of these peptides antagonists was studied by ELISA and NMR experiments. The most active peptides were evaluated by a tube formation inhibition assay in HUVEC for their anti-angiogenic activities.

Another important part of this work was the development of a new "hydrogen bond surrogate" (HBS) macrocycle to stabilize the α helix structure of peptides. We have designed, synthesized and the characterized new macrocyclic peptides, and carried out extensive structural studies by NMR, CD and molecular modeling.

Therefore, the work of this PhD thesis has resulted in the development of new peptide antagonists of VEGFR with anti-angiogenic effects, and new methods to stabilize the α helical structure of peptides.

Key words: Angiogenesis, VEGF, VEGFR, antagonist, peptide, peptidomimetics, protein-protein interaction, α helix, macrocycle.