

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Institut de chimie des milieux et matériaux de Poitiers - IC2MP
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Sciences pour l'environnement - Gay Lussac
Secteur de recherche : Chimie organique, minérale, industrielle

Présentée par :
Thibaut Legigan

Étude de systèmes moléculaires programmés pour le ciblage thérapeutique d'agents anticancéreux

Directeur(s) de Thèse :
Sébastien Papot, Brigitte Renoux

Soutenue le 21 novembre 2012 devant le jury

Jury :

Président	Jean-Pierre Gesson	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Rapporteur	Jean-Claude Florent	Directeur de recherche CNRS, Institut Curie de Paris
Rapporteur	Pierre-Yves Renard	Professeur des Universités, Université de Rouen
Membre	Sébastien Papot	Maître de conférences, Université de Poitiers
Membre	Brigitte Renoux	Chargée de recherche CNRS, Université de Poitiers
Membre	Yves Blériot	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Membre	Frédéric Coutrot	Maître de conférences, Université de Montpellier 2
Membre	Nicolas Guilbaud	Directeur du Centre de recherche en oncologie expérimentale, Institut de recherche Pierre Fabre, Toulouse

Pour citer cette thèse :

Thibaut Legigan. *Étude de systèmes moléculaires programmés pour le ciblage thérapeutique d'agents anticancéreux* [En ligne]. Thèse Chimie organique, minérale, industrielle . Poitiers : Université de Poitiers, 2012.
Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

THESE

pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS
(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : Sciences Pour l'Environnement - Gay-Lussac
Secteur de Recherche : Chimie Organique, Minérale et Industrielle

Présentée par :

Thibaut LEGIGAN

Etude de systèmes moléculaires programmés pour le ciblage thérapeutique d'agents anticancéreux

Directeurs de Thèse :

M. Sébastien PAPOT, Maître de Conférences, Université de Poitiers
Mme Brigitte RENOUX, Chargée de Recherche CNRS, Université de Poitiers

Soutenue le 21 novembre 2012
devant la Commission d'Examen

JURY

M. J.-P. GESSON	Professeur, Université de Poitiers	Président
M. J.-C. FLORENT	Directeur de Recherche CNRS Institut Curie, Paris	Rapporteurs
M. P.-Y. RENARD	Professeur, Université de Rouen	
M. Y. BLERIOT	Professeur, Université de Poitiers	Examineurs
M. F. COUTROT	Maître de Conférences, Université de Montpellier 2	
M. N. GUILBAUD	Directeur du Centre de Recherche en Oncologie Expérimentale Institut de Recherche Pierre Fabre, Toulouse	
M. S. PAPOT	Maître de Conférences, Université de Poitiers	
Mme B. RENOUX	Chargée de Recherche CNRS, Université de Poitiers	

A Sylvie

A mes Parents

A Charlotte

Je souhaite remercier en premier lieu Monsieur Yves Blériot, Professeur de l'Université de Poitiers, pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe « Synthèse Organique » de l'Institut de Chimie des Milieux et des Matériaux de Poitiers et pour avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à mes directeurs de thèse, Monsieur Sébastien Papot, Maître de Conférences de l'Université de Poitiers, et Madame Brigitte Renoux, Chargée de Recherche CNRS, qui m'ont permis de réaliser et de mener à bien ces travaux. Je leur suis également reconnaissant pour leur disponibilité et leurs qualités humaines et scientifiques. J'ai beaucoup appris à leurs côtés et je leur adresse tous mes remerciements pour ces trois années.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur Jean-Pierre Gesson, Professeur de l'Université de Poitiers, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse et de juger ce travail.

Merci à Monsieur Jean-Claude Florent, Directeur de Recherche à l'Institut Curie à Paris et Monsieur Pierre-Yves Renard, Professeur de l'Université de Rouen, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse et pour leurs jugements très pertinents sur ce manuscrit.

Je remercie également Monsieur Frédéric Coutrot, Maître de Conférences de l'Université de Montpellier 2, et Monsieur Nicolas Guilbaud, Directeur du Centre de Recherche en Oncologie Expérimentale de l'Institut de Recherche Pierre Fabre à Toulouse, pour avoir participé au jury de cette thèse et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux membres de l'équipe « Systèmes Moléculaires Programmés : Isabelle Tranoy-Opalinski, Chargée de Recherche CNRS, pour sa gentillesse, son écoute et l'aide qu'elle a pu m'apportée tout au long de ce travail ; Jonathan Clarhaut, Ingénieur de Recherche, pour son travail concernant l'évaluation biologique des molécules synthétisées durant cette thèse et pour avoir répondu à toutes mes questions concernant la biologie cellulaire ; Mikaël Thomas, Maître de Conférences de l'Université de Poitiers, pour son aide, ses conseils précieux et avec qui j'ai eu un grand plaisir à travailler.

Merci également à tous les doctorants, post-doctorants et ATER avec lesquels j'ai eu plaisir à travailler : Guillaume Compain, Nathalie Fontelle, Romain Barat, Marion Grinda, Fei Liu, Jean Tallineau, Hervé Rogeon, Benoit Metayer, Alexandre le Darz, Virginie Cendret, Fatima El Bahhaj, Nicolas Auberge, Régis Delatouche.

Je tiens à témoigner toute ma sympathie et ma reconnaissance à Jérôme Guillard, Frédéric Lecornué et Eric Bourdeaud pour tous les bons moments passés au laboratoire et à la pause déjeuner.

Mes remerciements s'adressent aussi à tout le personnel du laboratoire : Joëlle Laduranty, Francis Barbot, Martine Mondon, Lilian Ripault, Jérôme Désiré, Charles Gauthier, Jean-Marie Coustard, Philippe Bertrand, Bruno Violeau, Sébastien Thibaudeau, Agnès Mingot, Hélène Carreyre.

Je n'oublie pas Benoît Dupuy, Patrick Urchaga et Irène Maupin pour leur amitié et les bons moments passés durant toutes ces années à Poitiers.

Enfin, je termine par un grand remerciement à mes parents, à ma sœur Charlotte et à Sylvie pour le soutien qu'ils m'apportent au quotidien, sans eux je n'en serais pas là aujourd'hui.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION	9
1. Le cancer	11
1.1 Généralités	11
1.2 Les traitements	12
2. Le ciblage thérapeutique	14
2.1 La reconnaissance de la tumeur	16
2.1.1 Le ciblage des cellules tumorales	16
2.1.1.1 <i>Les conjugués drogue-anticorps</i>	17
2.1.1.2 <i>Les conjugués drogue-ligand</i>	17
2.1.2 Le ciblage du microenvironnement tumoral	18
2.1.2.1 <i>Spécificités structurales du microenvironnement tumoral</i>	19
2.1.2.2 <i>Spécificités chimiques du microenvironnement tumoral</i>	21
2.1.2.3 <i>Spécificités biochimiques du microenvironnement tumoral</i>	21
2.2 Le processus de libération de la drogue	24
2.2.1 Stratégies d'activation chimique	24
2.2.2 Stratégies d'activation enzymatique	25
3. Les vecteurs glucuronylés	27
3.1 La β -glucuronidase	27
3.2 Exemples de vecteurs glucuronylés	27
3.2.1 Vecteur glucuronylé de la 9-amino-camptothécine	28
3.2.2 Vecteurs glucuronylés d'alcools et de phénols	29
3.2.3 Vecteur glucuronylé de la doxorubicine (HMR 1826)	32
3.3 Comment améliorer l'efficacité des vecteurs glucuronylés?	36
3.3.1 La stratégie ADEPT	36
3.3.2 Ciblage de l'angiogénèse pour augmenter la quantité de β -glucuronidase dans les tumeurs	37
3.3.3 Chimio-sensibilisation des tumeurs	39
3.3.4 Développement de nouveaux vecteurs glucuronylés	40

3.3.5	Utilisation de vecteurs glucuronylés dendritiques	43
4.	Présentation du sujet de thèse	46
CHAPITRE 1 : CONCEPTION DE NOUVEAUX VECTEURS GLUCURONYLES ...		49
1.	Conception d'un vecteur glucuronylé de la MMAE	51
1.1	Introduction	51
1.1.1	Rappel bibliographique	52
1.1.2	L'auristatine monométhyle E.....	53
1.2	Synthèse d'un vecteur glucuronylé de la MMAE.....	55
1.2.1	Stratégie de synthèse	56
1.2.2	Synthèse du vecteur 34	56
1.3	Evaluation biologique du vecteur 34	59
1.3.1	Hydrolyse enzymatique.....	59
1.3.2	Evaluation de l'activité antiproliférative du vecteur 34	60
1.3.3	Evaluation de l'efficacité thérapeutique du vecteur 34 chez la souris.....	61
2.	Conception d'un vecteur glucuronylé de la cyclopatamine	63
2.1	Le glioblastome multiforme	63
2.2	Synthèse d'un vecteur glucuronylé hydrosoluble de la cyclopatamine.....	67
2.2.1	Stratégie de synthèse	68
2.2.2	Synthèse de l'intermédiaire 52	69
2.2.3	Synthèse de l'intermédiaire 59	70
2.2.4	Synthèse de la chaîne latérale 62	73
2.2.5	Couplage par cycloaddition [3+2] et déprotection du composé 63	73
2.3	Evaluation biologique du vecteur 47	75
2.3.1	Hydrolyse enzymatique du vecteur 47	75
2.3.2	Evaluation de l'activité antiproliférative du vecteur 47	77
2.4	Conclusion.....	78
CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT DE VECTEURS GLUCURONYLES « SUPER-CIBLES »		81
1.	Introduction	83
2.	Synthèse des vecteurs 68a et 68b.....	89
2.1	Première Stratégie de synthèse.....	89
2.1.1	Schéma rétrosynthétique	89
2.1.2	Résultats obtenus lors de la première stratégie de synthèse.....	90

2.2	Deuxième stratégie de synthèse	92
3.	Evaluations biologiques du vecteur 68b	94
3.1	Hydrolyse enzymatique de 68b	95
3.2	Evaluation de l'activité antiproliférative du vecteur 68b	96
3.3	Evaluation de l'efficacité thérapeutique de 68b in-vivo	97
4.	Conclusion	99
CHAPITRE 3 : CIBLAGE DES RECEPTEURS MEMBRANAIRES DES CELLULES		
CANCEREUSES		101
1.	Introduction	103
1.1	Généralités	103
1.2	Ciblage des récepteurs de l'acide folique	104
2.	Conception d'un conjugué galactosylé acide folique-MMAE	110
2.1	Synthèse du vecteur 85	111
2.1.1	Stratégie de synthèse	111
2.1.2	Synthèse de l'intermédiaire 91	112
2.1.3	Synthèse de la chaîne latérale 93 et couplage à l'intermédiaire 91	113
2.2	Evaluation biologique du vecteur 85	115
2.2.1	Hydrolyse enzymatique	115
2.2.2	Evaluation de l'activité anti-proliférative du vecteur 84	115
2.2.3	Etude de l'efficacité thérapeutique du vecteur 85 chez la souris	119
2.3	Conclusion	120
3.	Etude de nouveaux vecteurs ciblant des récepteurs membranaires des cellules	
cancéreuses		121
3.1	Le ciblage du VEGFR	121
3.1.1	Rappels bibliographiques	121
3.1.2	Synthèse des vecteurs galactosylés 94a et 94b incorporant le motif CBO-P11	124
3.1.3	Hydrolyse enzymatique du vecteur 94a	126
3.1.4	Conclusion et perspectives	127
3.2	Le ciblage du PSMA	127
3.2.1	Rappels bibliographiques	127
3.2.2	Synthèse du vecteur galactosylé 98 incorporant un motif DUPA	130
3.2.2.1	Synthèse du ligand de ciblage 108	131

3.2.2.2	Couplage de l'alcyne 91 à l'azoture 108	133	
3.2.3	Conclusion et perspectives	134	
3.3	Le ciblage du récepteur de l'asialoglycoprotéine (ASGPR).....	134	
3.3.1	Rappels bibliographiques	134	
3.3.2	Synthèse du vecteur galactosylé 112 incorporant un motif galactose.....	136	
3.3.2.1	Synthèse du ligand de ciblage 115	137	
3.3.2.2	Couplage de l'alcyne 91 et de l'azoture 115	138	
3.3.3	Conclusion et perspectives	139	
4.	Conclusion.....	139	
 CHAPITRE 4 : ETUDE D'UN SYSTEME MOLECULAIRE ENTRELACE CONÇU POUR LA VECTORISATION D'ALCOOLS ET D'ACIDES CARBOXYLIQUES.... 141			
1.	Introduction	143	
1.1	Rappels sur les molécules entrelacées.....	143	
1.2	Stratégies pour la synthèse de rotaxane.....	146	
1.3	Les systèmes moléculaires enzymo-sensibles.....	149	
1.4	Présentation du projet.....	152	
2.	Synthèse du vecteur 133.....	154	
2.1	Stratégie de synthèse	154	
2.2	Synthèse du macrocycle 163	157	
2.2.1	Préparation de la dianiline 151	157	
2.2.2	Synthèse du composé diactivé 160	160	
2.2.3	Réaction de macrocyclisation	162	
2.3	Préparation des esters de taxol 168 , 169a et 169b	163	
2.4	Réaction de rotaxanation par reconnaissance active par le cuivre (I)	164	
3.	Tests d'hydrolyse enzymatique	166	
3.1	Hydrolyse enzymatique du macrocycle 163	166	
3.2	Hydrolyse enzymatique des rotaxanes 133a et 133b	167	
4.	Conclusion.....	167	
 CONCLUSION GENERALE			169
 PARTIE EXPERIMENTALE			175
1.	Généralités	177	
1.1	Réactifs chimiques et solvants	177	

1.2 Suivi des réactions et purification	177
1.3 Analyse des composés synthétisés	177
1.4 Analyse et purification par HPLC	178
2. Hydrolyses enzymatiques	180
3. Modes opératoires	182
BIBLIOGRAPHIE	261
PUBLICATIONS ASSOCIÉES À CE MANUSCRIT	277

ABREVIATIONS

Notes aux lecteurs : par soucis de commodités, les abréviations de termes anglais ne sont pas traduites en français dans cette liste.

α -T	α -tocophérol
Ac	acétyle
AcOEt	acétate d'éthyle
ADEPT	Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy
ADN	acide désoxyribonucléique
All	allyle
Alloc	carbonate d'allyle
ASGPR	récepteur de l'asialoglycoprotéine
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CRMPO	Centre Régional de Mesure Physique de l'Ouest
CuAAC	Copper (I) Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition reaction
DAVLBH	désacétylvinblastine monohydrazone
DCC	dicyclohexyle carbodiimide
DCM	dichlorométhane
DEPT	Directed Enzyme Prodrug Therapy
DHA	acide docosahexanoïque
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DMT	dose maximale tolérée
DUPA	acide 2-[3-(1,3)-dicarboxylpropyl]ureido]pentanedioïque
ECA	Enzyme de Conversion de l'Angiotensine
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique

EP	éther de pétrole
EPR	Enhanced Permeability and Retention
éq.	équivalent
Et	éthyle
FR	Folate Receptors
GBM	glioblastome multiforme
GDEPT	Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy
GLUT	Glucose Uptake Transporters
HDACi	inhibiteur d'histones désacétylases
HMPA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)méthacrylamide
HMTTA	1,1,4,7,10,10-hexaméthyltriéthylènetétramine
HOBt	hydroxybenzotriazole
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
i.v.	intra-veineuse
IC ₅₀	concentration à 50% d'inhibition
LC/MS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometry
LEAPT	Lectin Directed Enzyme Activated Prodrug Therapy
mAb	anticorps monoclonal
Me	méthyle
MMAE	auristatine monométhyle E
MMP	métalloprotéase matricielle
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
OGFr	Opioid Growth Factor receptor
PEG	polyéthylène glycol

Abréviations

PMPA	acide 2-(phosphonométhyl)pentanedioïque
PMT	Prodrug MonoTherapy
ppm	partie par million
PSA	prostate-specific antigene
PSMA	Prostate-Specific Membrane Antigen
Ptc	Patched
Rdt	rendement
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
s.c.	sous-cutané
SHH	Sonic Hedgehog
SM	Spectrométrie de Masse
SMHR	Spectrométrie de Masse Haute Résolution
Smo	Smoothened
TA	température ambiante
TBAI	iodure de tétrabutylammonium
TBDMS	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyl
TBDMSCl	chlorure de <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
Ts	tosyle
uPA	urokinase-type-plasminogen activator
VDA	Vascular Disrupting Agent
VDEPT	Virus Directed Enzyme Prodrug Therapy
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

INTRODUCTION

1. Le cancer

1.1 Généralités

Le terme de cancer regroupe un grand nombre de pathologies ayant pour point commun la prolifération rapide et anarchique d'un faible nombre des cellules composant notre organisme. En effet, les cellules saines se développent, se divisent et meurent selon un processus inscrit dans leur matériel génétique. Les cellules cancéreuses résultent, quant à elles, d'un dérèglement de ce cycle échappant ainsi aux mécanismes de régulation et de contrôle de la prolifération cellulaire. En se multipliant de façon anarchique, ces cellules cancéreuses donneront naissance à une tumeur qui se développera en envahissant puis en détruisant l'organe dont elle est issue. Tout au long de l'évolution de la pathologie, des cellules cancéreuses peuvent se détacher de la tumeur primaire, migrer à travers la circulation sanguine ou le système lymphatique et vont se fixer sur de nouveaux organes afin de donner naissance à de nouvelles tumeurs appelées métastases.

Le cancer est aujourd'hui un problème majeur de santé publique en raison du nombre de personnes atteintes et du nombre de décès qu'il provoque dans le monde. Ainsi, le cancer est devenu depuis 2008 la première cause de mortalité en France devant les maladies cardiovasculaires. L'Institut de Veille Sanitaire estime que 365 500 nouveaux cas de cancer et 147 500 décès associés à cette maladie ont été recensés en 2011 en France. Ces données indiquent que, chez l'homme, trois types de cancer sont les plus fréquemment rencontrés et engendrent à eux seuls près de 50% de la mortalité enregistrée. Il s'agit du cancer du poumon, du cancer colorectal et du cancer de la prostate. (**Figure 1**).¹

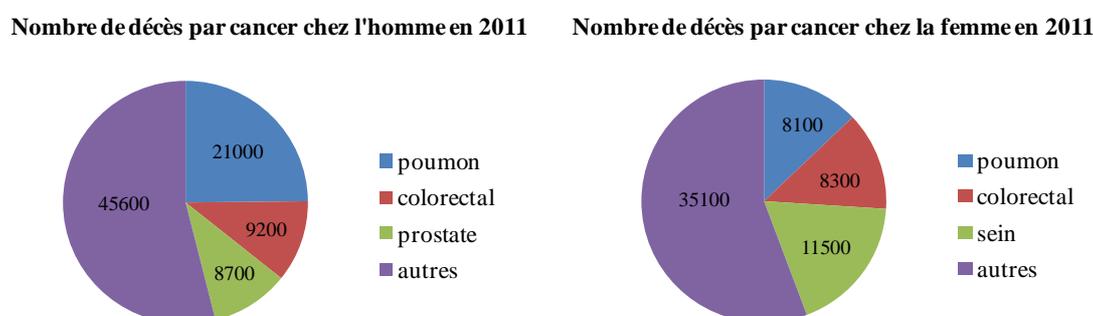


Figure 1 – Répartition de la mortalité par cancer en France (2011)

¹ Projection de l'Incidence et de la Mortalité par Cancer en France en 2011 - Synthèse des Résultats, *Institut de Veille Sanitaire, 2011*, Disponible à partir de l'URL <http://www.invs.sante.fr>

Chez la femme, le cancer du sein est le plus meurtrier devant le cancer colorectal et le cancer du poumon. Il est important de souligner que le nombre de cas de cancer recensés a doublé en 30 ans. Cette nette augmentation peut être corrélée à l'évolution démographique de la population française. En effet, nous sommes aujourd'hui plus nombreux et vivons plus longtemps qu'il y a 30 ans. Le nombre de décès a lui aussi augmenté avec 20 000 décès supplémentaires entre 1980 et 2011 (**Figure 2**). Cependant une baisse sensible de la mortalité est observée au cours de la dernière décennie (150 045 décès en 2000 contre 147 500 en 2011). Cette diminution peut être attribuée aux progrès scientifiques réalisés au cours des dernières décennies au niveau de la prévention, du diagnostic et du traitement de certains types de cancer. Néanmoins, l'arsenal thérapeutique actuellement disponible reste encore insuffisant pour le traitement de la plupart des tumeurs.

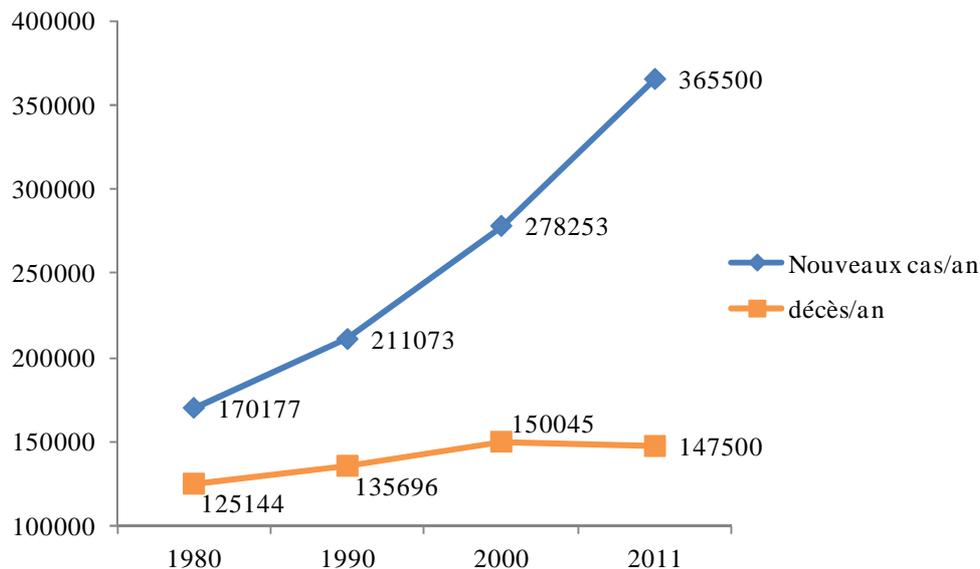


Figure 2 - Evolution du nombre de nouveaux cas et de décès dus au cancer en France entre 1980 et 2008

1.2 Les traitements

Actuellement, six types de traitement sont utilisés pour combattre le cancer. Ces thérapies peuvent être appliquées seules ou en combinaison selon le type de cancer, son agressivité, sa taille, sa localisation ainsi que l'état général du patient.

La chirurgie reste à ce jour un traitement de choix pour traiter les tumeurs solides. Elle permet l'ablation totale de la masse tumorale mais aussi des ganglions les plus proches afin

d'éviter tout risque de métastases. Bien que cette méthode soit très efficace dans le cas de tumeurs non invasives, elle s'avère toutefois insuffisante dans le cadre du traitement de cancers agressifs présentant de nombreuses métastases.

La radiothérapie est une technique basée sur l'irradiation des zones tumorales par des rayons X ou γ . Cette méthode permet de détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier tout en préservant les tissus sains avoisinants. A l'heure actuelle, un patient sur deux environ bénéficie d'un traitement par radiothérapie souvent associé à la chirurgie ou la chimiothérapie.

La photothérapie dynamique est une méthode récente consistant à appliquer sur des lésions cancéreuses de la peau un agent photo-sensibilisant qui détruira la tumeur après exposition à un rayonnement UV.

L'hormonothérapie est une thérapie concernant exclusivement les cancers dits hormonodépendants tels que les cancers du sein ou de la prostate. En effet, la croissance de ces deux types de tumeurs peut être stimulée par la présence d'hormones (estrogènes pour le cancer du sein et androgènes pour le cancer de la prostate). L'hormonothérapie agit donc en bloquant ces hormones afin de stopper la croissance tumorale. Deux techniques majeures sont possibles : la castration chimique ou physique stoppant la production de ces hormones et l'utilisation d'antagonistes interagissant avec les récepteurs des cellules cancéreuses empêchant ainsi les hormones naturelles de s'y fixer.

L'immunothérapie a pour but de stimuler le système immunitaire du patient afin qu'il produise lui-même des moyens de défense capables de détruire les cellules cancéreuses. Cette technique a vu le jour grâce au développement et à l'émergence de nouveaux composés immunostimulants tels que des anticorps monoclonaux, des lymphocytes T étrangers, des interleukines ou bien des vaccins. A titre d'exemple, la société Merck a mis au point un vaccin nommé Gardasil® actif contre les papillomavirus de type 16 et 18 (HPV16 et 18) à l'origine de 70% des cancers du col de l'utérus.

La chimiothérapie consiste en l'administration de substances chimiques afin de détruire les cellules cancéreuses. C'est une méthode de choix dans le cadre de la lutte contre le cancer car elle permet de traiter aussi bien des tumeurs localisées en combinaison avec la

radiothérapie ou la chirurgie, que des tumeurs circulantes tels que les lymphomes et les leucémies. Actuellement, l'arsenal thérapeutique dont dispose les oncologues est constitué de plus d'une cinquantaine d'agents anticancéreux. En revanche, beaucoup de ces composés sont relativement anciens et de toxicité élevée, parmi lesquels le méthotrexate (découvert en 1949), le cis-platine et le 5-fluorouracile (utilisés depuis 1965) ou bien la doxorubicine (utilisée depuis 1969).² Cependant, le nombre de molécules anticancéreuses disponibles sur le marché s'accroît constamment. A titre d'exemple, la vinflunine est commercialisée sous le nom de Jaylor® par les laboratoires Pierre Fabre depuis 2010. Cette molécule est indiquée pour le traitement du cancer de la vessie.³

Dans la majorité des cas, ces molécules utilisées cliniquement présentent une faible sélectivité envers les cellules cancéreuses. Ainsi les chimiothérapies engendrent la destruction d'un grand nombre de cellules saines ce qui provoque de lourds effets secondaires (anémie, vomissement, diarrhée, toxicité hématologique, neurologique, cardiaque) souvent à l'origine de l'arrêt prématuré du traitement.

Le développement de nouvelles stratégies conçues pour détruire sélectivement les tumeurs sans affecter les organes sains représente donc un intérêt majeur dans la lutte contre le cancer. Dans ce cadre, deux voies sont actuellement étudiées : la découverte de nouvelles molécules possédant une activité plus sélective grâce au ciblage de spécificités tumorales et le développement de nouveaux systèmes permettant la vectorisation d'agents anticancéreux connus.

2. Le ciblage thérapeutique

L'objectif du ciblage thérapeutique est de véhiculer un médicament vers son site d'action à l'aide d'un vecteur non-toxique, puis de régénérer son activité anticancéreuse exclusivement au niveau de la tumeur (**Figure 3**). Cette approche présente plusieurs avantages par rapport à la chimiothérapie classique. En effet, la localisation sélective de l'agent cytotoxique dans la zone tumorale devrait limiter les effets secondaires rencontrés

2 Bailly, C. *Actual. Chim.* **2003**, 11-12, 118-122.

3 (a) Gerullis, H.; Ecke, T.; Eimer, C.; Wishahi, M.; Otto, T. *Anti-Cancer Drugs* **2011**, 22, 9-17. **(b)** Fahy, J.; Duflos, A.; Ribet, J.-P.; Jacquesy, J.-C.; Berrier, C.; Jouannetaud, M.-P.; Zunino, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8576-8577.

dans le cadre de la chimiothérapie classique. De plus, la faible toxicité du vecteur pourrait permettre d'augmenter la quantité d'agent actif administrée dans l'organisme et ainsi d'accroître sa concentration au niveau de la tumeur pour un traitement plus efficace.

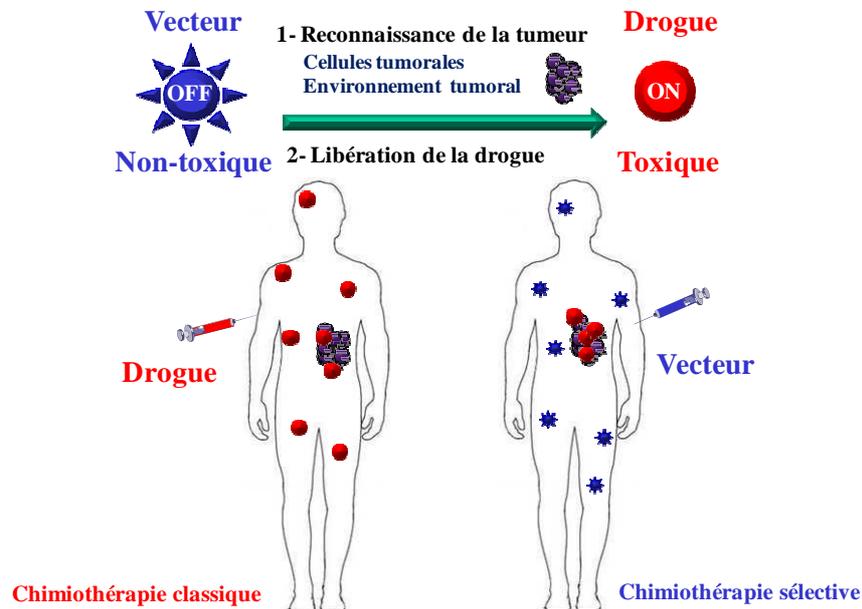


Figure 3 - Principe du ciblage thérapeutique

Le succès du ciblage thérapeutique dépend principalement de deux facteurs :

(1) La sélectivité avec laquelle le vecteur va reconnaître la tumeur : le choix de la spécificité tumorale permettant de différencier les tissus cancéreux des tissus sains est crucial afin d'accumuler de manière sélective et efficace le vecteur au niveau de la tumeur. A ce jour, les différentes cibles exploitées sont présentes au niveau des cellules cancéreuses ou du microenvironnement tumoral.

(2) Le contrôle du processus de libération de la drogue : la libération de l'agent actif ne doit être effective que lorsque le vecteur se situe dans la zone tumorale afin d'éviter la libération anarchique de la drogue dans tout l'organisme. Il est donc essentiel que le vecteur soit parfaitement stable dans l'organisme et qu'il se décompose uniquement sous l'action d'un stimulus associé à la malignité. Dans ce cadre, des processus de libération chimique ou enzymatique ont été étudiés.

2.1 La reconnaissance de la tumeur

2.1.1 Le ciblage des cellules tumorales

Certaines cellules tumorales surexpriment à leur surface des récepteurs ou des antigènes permettant de les différencier des cellules saines (**Tableau 1**).⁴ Ces particularités ont ainsi permis le développement de vecteurs incorporant dans leurs structures les anticorps ou les ligands correspondants afin d'accumuler de puissants agents cytotoxiques dans les cellules tumorales. L'interaction ligand-récepteur ou anticorps-antigène sera, dans la majorité des cas, suivis de l'internalisation du vecteur par endocytose, puis par la libération intracellulaire de l'agent actif.

	Receptors	Antigens
Vascular receptors	Integrins ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) Nucleolin Aminopeptidase N Endoglin Vascular endothelial growth factor receptor (VEGF 1-4)	Cluster of differentiation (e.g. CD20, CD33) Carcinoembryonic antigen Blood group carbohydrates Mucin type glycoproteins (MUC1, CanAg) Lewis Y, Lewis X Cancer testis antigens (CT7, MAGE-A3) Prostate-specific membrane antigen
Plasma protein receptors	Low-density lipoprotein receptor Transferrin receptor	
Peptide receptors	Somatostatin receptor Bombesin receptor Neuropeptide Y receptors	
Receptors for growth factors and vitamins	Luteinizing-hormone-releasing-hormone receptor Folate receptors (FR- α , FR- β , FR- γ) Epidermal growth factor receptors (e.g. EGF1, EGF2, Her2) Transforming growth factor receptor Fibroblast growth factor receptors	
Carbohydrate receptors	Asialoglycoprotein receptor Galectins (e.g. galectin 1, galectin 3) Selectins (e.g. E-selectin, P-selectin) Hyaluronic acid receptors (CD44, RHAMM, HARLEC)	

Tableau 1 - Exemples d'antigènes et de récepteurs surexprimés par les cellules tumorales

Un grand nombre d'études ont ainsi pu démontrer que le ciblage des récepteurs ou des antigènes membranaires des cellules cancéreuses est une stratégie extrêmement prometteuse. En effet, cette technique présente une grande sélectivité et peut être adaptée à une large gamme de tumeurs en modulant le ligand ou l'anticorps de ciblage ainsi que la nature de l'agent cytotoxique utilisé.

⁴ Kratz, F.; Müller, I. A. ; Ryppa, C; Warnecke A. *ChemMedChem* **2008**, 3, 20-53.

2.1.1.1 Les conjugués drogue-anticorps

A ce jour, plusieurs conjugués drogue-anticorps ont été développés comme le Mylotarg (retiré du marché depuis 2010) et Adcetris™ (Bretuximab Vedotin, Seattle Genetics).⁵ Ce dernier a obtenu une autorisation de mise sur le marché en août 2011 aux Etats-Unis (après une procédure accélérée). Il est recommandé pour le traitement du lymphome anaplasique à grandes cellules et le lymphome hodgkinien (**Figure 4**). Ce composé est un conjugué associant un puissant agent anticancéreux, l'auristatine monométhyle E, à un anticorps dirigé contre l'antigène CD30 surexprimé à la surface des cellules cancéreuses.⁶

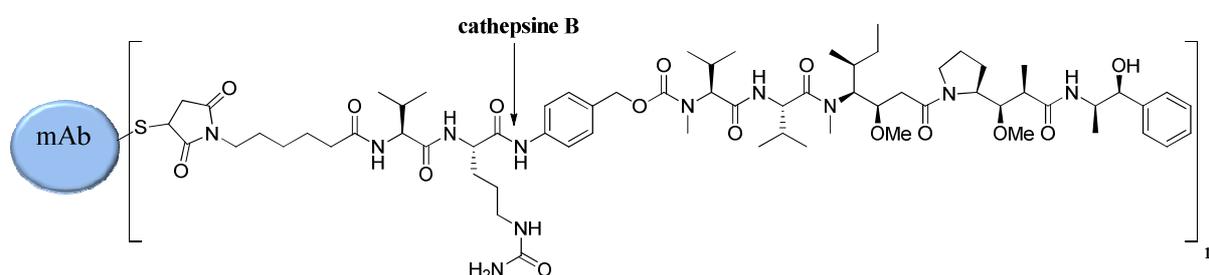


Figure 4 - Structure de Adcetris™

Après internalisation du conjugué dans la cellule cancéreuse par endocytose, le vecteur est activé par la cathepsine B présente dans les lysosomes pour conduire à la libération de l'auristatine monométhyle E après immolation du motif (4-aminobenzoyloxy)carbamate.

2.1.1.2 Les conjugués drogue-ligand

D'autres vecteurs ciblant les récepteurs des cellules cancéreuses sont actuellement en cours d'évaluation chez l'homme. Ainsi, il a été démontré que l'acide folique est un bon candidat pour le ciblage des cellules tumorales de par sa forte affinité pour son récepteur ($K_d = 0,1 - 1 \text{ nM}$).⁷ De plus, le récepteur de l'acide folique est surexprimé dans de nombreux cas de cancer alors que son expression est extrêmement réduite dans les tissus sains.⁸ Ces

⁵ Casi, G.; Neri, D. *J. Controlled Release* **2012**, *161*, 422-428.

⁶ (a) Doronina, S. O.; Toki, B. E.; Torgov, M. Y.; Mendelsohn, B. A.; Cerveny, C. G.; Chace, D. F.; DeBlanc, R. L.; Gearing, R. P.; Bovee, T. D.; Siegall, C. B.; Francisco, J. A.; Wahl, A. F.; Meyer, D. L.; Senter, P. D. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 778-784. (b) Francisco, J. A.; Cerveny, C. G.; Meyer, D. L.; Mixan, B. J.; Klussman, K.; Chace, D. F.; Rejniak, S. X.; Gordon, K. A.; DeBlanc, R.; Toki, B. E.; Law, C.-L.; Doronina, S. O.; Siegall, C. B.; Senter, P. D.; Wahl, A. F. *Blood* **2003**, *102*, 1458-1465.

⁷ Elnakat, H.; Ratnam, M. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2004**, *56*, 1067-1084.

⁸ (a) Weitman, S. D.; Lark, R. H.; Coney, L. R.; Fort, D. W.; Frasca, V.; Zurawski, V. R. Jr.; Kamen, B. A. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 3396-3401. (b) Low, P. S.; Antony, A. C. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2004**, *56*, 1055-1058.

propriétés ont permis le développement de nombreux conjugués de l'acide folique en association avec différents agents anticancéreux. C'est le cas, par exemple d'un conjugué associant l'acide folique et un dérivé de la vinblastine, EC145, développé par la société Endocytes (**Figure 5**).⁹

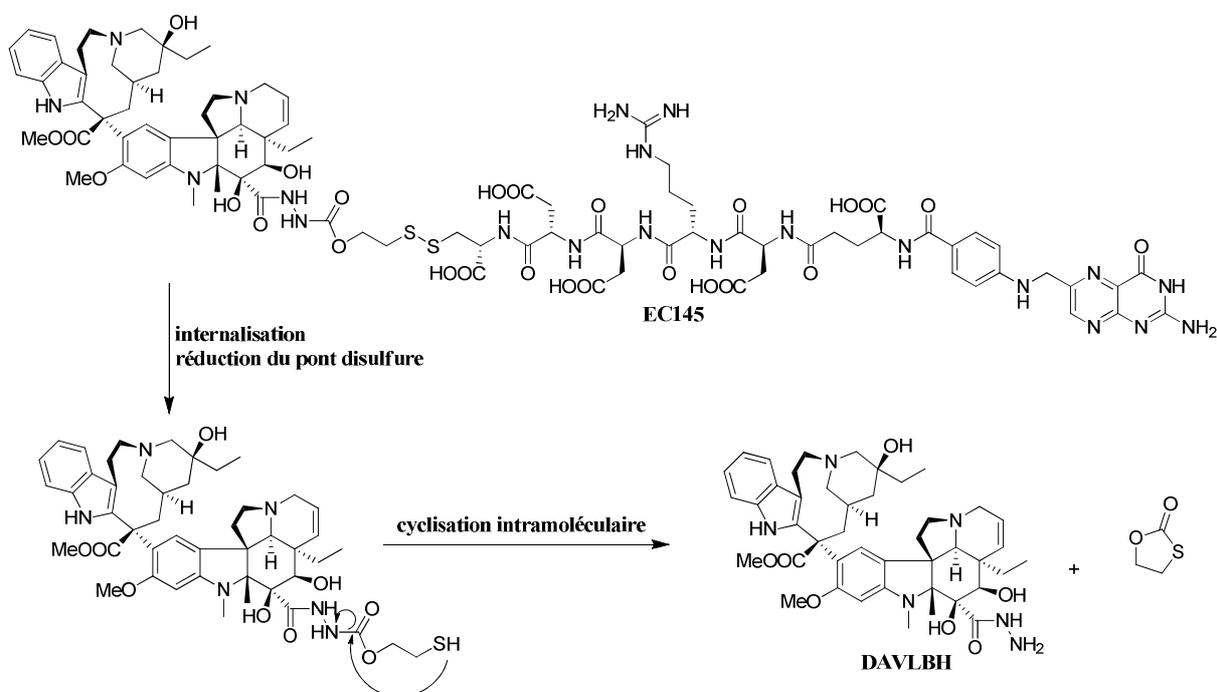


Figure 5 - Mécanisme de libération de DAVLBH à partir de EC145

Ce composé a récemment été évalué pour le traitement de patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules au cours d'une étude clinique de phase II. Le mode d'action du vecteur EC145 suit un processus constitué de trois étapes. Après internalisation du vecteur au sein de la cellule cancéreuse le pont disulfure est réduit. Le thiol ainsi généré permet la libération de la désacétylvinblastine monohydrazone après cyclisation intramoléculaire.

2.1.2 Le ciblage du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral présente plusieurs particularités qui le différencie des tissus sains. Ces spécificités sont d'ordre structurales, chimiques ou biochimiques et ont été exploitées pour cibler les tissus cancéreux.

⁹ (a) Reddy, J. A. ; Dorton, R. ; Westrick, E. ; Dawson, A. ; Smith, T. ; Xu, L.-C. ; Vetzal, M. ; Kleindl, P. ; Vlahov, I. R. ; Leamon, C. P. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4434–4442. (b) Li, J. ; Sausville, E. A. ; Klein, P. J. ; Morgenstern, D. ; Leamon C. P. ; Messmann, R. A. ; LoRusso, P. *J. Clin. Pharmacol.* **2009**, *49*, 1467-1476.

2.1.2.1 Spécificités structurales du microenvironnement tumoral.

Au cours de la croissance tumorale, l'angiogénèse devient massive afin de répondre aux besoins croissants en énergie et en nutriments des cellules cancéreuses.¹⁰ Ainsi, la vascularisation rapide des tissus cancéreux engendre une construction anarchique de nouveaux vaisseaux présentant de larges cavités dont le diamètre peut varier entre 100 et 1200 nm en fonction de la localisation de la tumeur.¹¹ A titre de comparaison, le diamètre des interstices entre les cellules endothéliales des tissus sains est beaucoup plus réduit et ne dépasse pas 2 nm.¹² Cette différence structurale marquée rend les tumeurs particulièrement perméables aux macromolécules alors que ces dernières sont beaucoup trop volumineuses pour s'infiltrer à travers l'endothélium des tissus sains. De plus, les tumeurs présentent un drainage lymphatique faible ou inexistant, limitant ainsi l'élimination de ces macromolécules hors des tissus cancéreux. La combinaison de ces deux phénomènes, connue sous le nom d'effet de perméabilité et de rétention accrue ou effet EPR (Enhanced Permeability and Retention), permet l'accumulation passive de vecteurs macromoléculaires au niveau des tumeurs (**Figure 6**).¹³

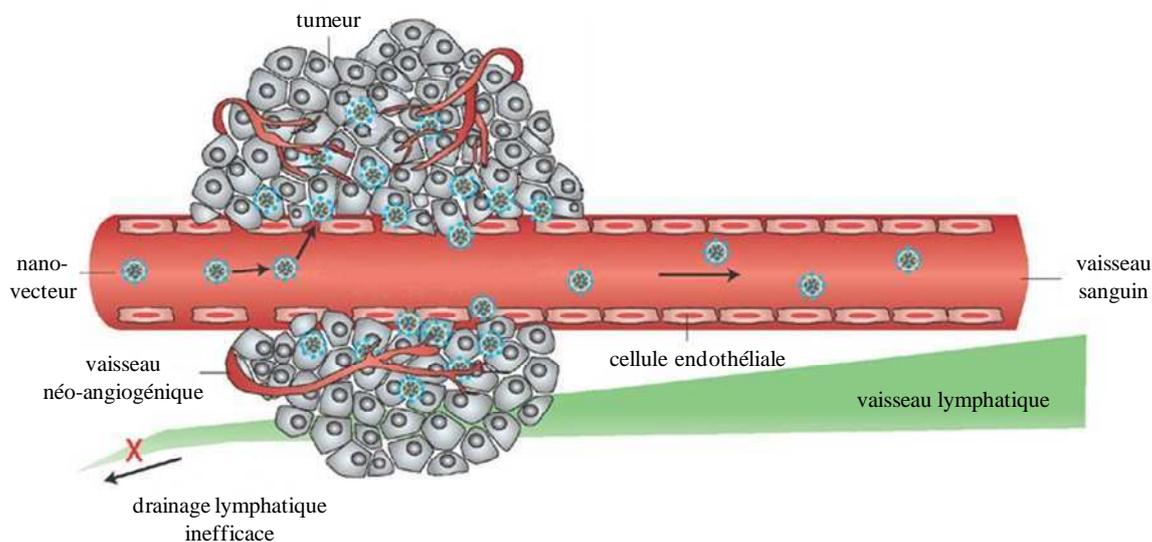


Figure 6 - Mécanisme d'accumulation sélective de nanovecteurs par effet EPR (illustration adaptée de Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. *Nature Nanotech.* **2007**, *2*, 751-760.)

10 Bikfalvi, A. B. *Cancer* **2003**, *90*, 449-458.

11 (a) Hobbs, S. K. ; Monsky, W. L. ; Yuan F. ; Roberts, W. G. ; Griffith, L. ; Torchilin, V. P. ; Jain, R. K. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 4607-4612. **(b)** Yuan F. ; Dellian, M. ; Fukumura, D. ; Leunig, M. ; Berk, D. A. ; Torchilin, V. P. ; Jain, R. K. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 3752-3756.

12 Jang, S. H. ; Wientjes, M. G. ; Lu, D. ; Au, J. L. S. *Pharmaceut. Res.* **2003**, *20*, 1337-1350.

13 (a) Iyer, A. K. ; Khaled, G. ; Fang, J. Maeda, H. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 812-818. **(b)** Maeda, H. ; Greish, K. ; Fang, J. *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *193*, 103-121. **(c)** Tanaka, T. ; Shiramoto, S. ; Miyashita, M. ; Fujishima, Y. ; Kaneo, Y. *Int. J. Pharm.* **2004**, *277*, 39-61.

Ainsi, de nombreux vecteurs parmi lesquels des liposomes, des polymères et des dendrimères se sont avérés efficaces pour le ciblage de cette particularité du microenvironnement tumoral.¹⁴ Ces vecteurs sont généralement mieux tolérés que les agents anticancéreux correspondants et présentent un effet thérapeutique comparable. De plus, leur utilisation augmente de 10 à 100 fois le temps de demi-vie plasmatique du principe actif dans l'organisme. En effet, les macromolécules de masse moléculaire supérieure à 40 kDa ne sont pas éliminées efficacement par les reins, leur conférant ainsi une demi-vie plasmatique accrue.¹⁵

A titre d'exemple, le composé PK1, un polymère de *N*-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide (HMPA) sur lequel des unités doxorubicine ont été fixées grâce à des bras espaceurs de type peptidique, a fait l'objet d'une évaluation clinique de phase II (**Figure 7**).¹⁶ Il a été montré que la dose maximale tolérée (DMT) de ce composé est cinq fois supérieure à celle de la doxorubicine utilisée seule et s'accompagne d'une réduction de la cardiotoxicité induite par l'usage des anthracyclines. La masse moléculaire élevée de PK1 ($M \approx 30$ kDa) lui permet d'être accumulé de manière préférentielle au sein des tissus cancéreux par effet EPR. Le vecteur macromoléculaire est alors internalisé par les cellules tumorales par endocytose puis dégradé par des protéases lysosomales pour conduire à la libération de molécules actives de doxorubicine.

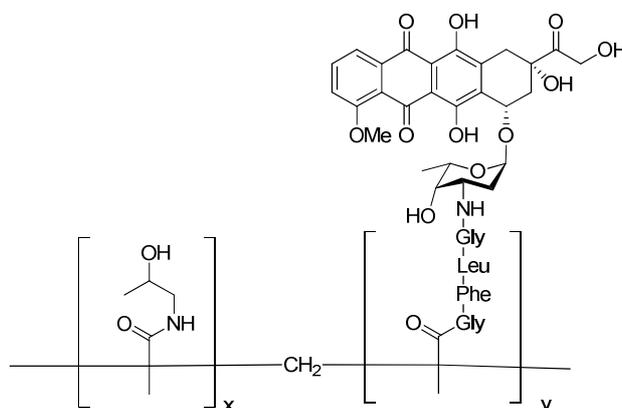


Figure 7 - Structure de PK1

14 (a) Bildstein, L.; Dubernet, C.; Couvreur P.; *Adv. Drug Discover. Rev.* **2011**, *63*, 3-23. **(b)** Haag, R.; Kratz, F. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2006**, *45*, 1198-1215.

15 (a) Venturoli, D.; Rippe, B. *Am. J. Physiol. - Renal* **2005**, *288*, 605-613. **(b)** Maeda, H. *Adv. Enzyme Regul.* **2001**, *41*, 189-207.

16 Vasey, P. A.; Kaye S. B.; Morrison, R.; Twelves C.; Wilson P.; Duncan, R.; Thomson, A. H.; Murray, L. S.; Hilditch T. E.; Murray, T.; Burtles S.; Fraier, D.; Frigerio, E.; Cassidy, J. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 83-94.

2.1.2.2 Spécificités chimiques du microenvironnement tumoral.

Le microenvironnement tumoral se distingue également des tissus sains par deux propriétés particulières : un pH plus acide¹⁷ et un potentiel réducteur plus important.¹⁸ Ces différences ne sont cependant pas assez marquées pour permettre d'être exploitées comme éléments de reconnaissance des tumeurs mais peuvent cependant être utilisées comme activateurs chimiques de vecteurs au sein de la zone tumorale.

2.1.2.3 Spécificités biochimiques du microenvironnement tumoral.

Certaines enzymes sont surexprimées dans le microenvironnement tumoral.¹⁹ Dès lors, l'utilisation de vecteurs substrats de ces enzymes est une approche attractive dans le cadre du ciblage thérapeutique. Ainsi, l'activation du substrat par l'enzyme permettra la libération d'un agent cytotoxique sélectivement au niveau de la zone tumorale.

La majorité des enzymes surexprimées naturellement sont des protéases issues de deux familles : les cathepsines²⁰ et les métalloprotéases matricielles (MMP).²¹ A titre d'exemple, l'équipe de Sinha a décrit le vecteur de l'auristatine monométhyle **1** comme étant substrat du légumine, ²² une enzyme protéolytique présente en concentration importante dans la majorité des tumeurs solides.²³ Après reconnaissance puis activation du vecteur par le légumine, l'aniline **2** est libérée puis se décompose spontanément via une élimination 1,6 suivie d'une décarboxylation pour conduire à la libération de l'agent cytotoxique (**Figure 8**).

17 Warburg, O. *Science* **1956**, *123*, 309-314.

18 Brown, J. M.; Wilson, W. R. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 437-447.

19 Rooseboom, M.; Commandeur, J. N. M.; Vermeulen, N. P. E. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 53-102.

20 Gocheva, V.; Joyce, J. A. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 60-64.

21 Egeblad, M.; Werb, Z. *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, *2*, 161-174.

22 Bajjuri, K. M. ; Liu, Y. ; Liu, C. ; Sinha, S. C. *ChemMedChem*, **2011**, *6*, 54-59.

23 Liu, C. ; Sun, C. ; Huang, H. ; Janda, K. ; Edgington, T. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 2957-2964.

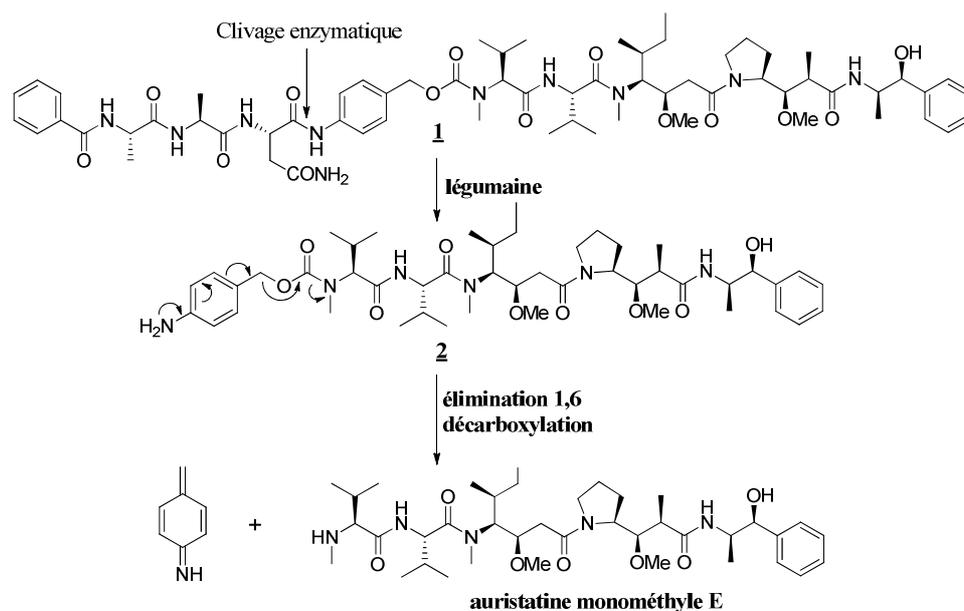


Figure 8 - Structure et décomposition du vecteur 1

La PSA (prostate-specific antigen) est également une protéase présente en concentration élevée chez les patients atteints de cancers de la prostate.²⁴ Son étude a permis de concevoir un vecteur de la vinblastine **3** dont la décomposition, catalysée par la PSA, génère des composés hautement cytotoxiques au niveau de la zone tumorale (**Figure 9**).²⁵

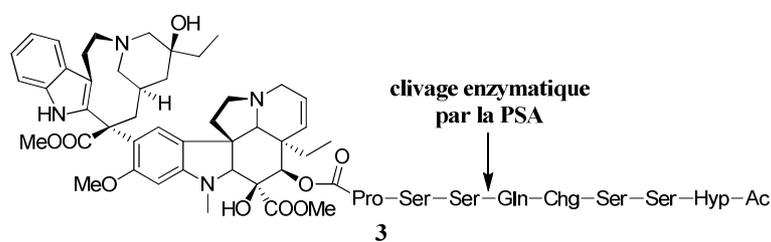


Figure 9 - Structure du vecteur 3

Une autre enzyme, la β -glucuronidase, appartenant à la famille des glycosidases, est aussi surexprimée dans la plupart des tumeurs présentant des zones de nécrose.²⁶ L'utilisation de cette enzyme dans le cadre du ciblage thérapeutique sera développée dans la suite de ce manuscrit.

24 Silver, D. A. ; Pellicer, I. ; Fair, W. R. ; Heston, W. D. ; Cordon-Cardo, C. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 81-85.

25 De Feo-Jones, D. ; Brady S. F. ; Feng, D.-M. ; Wong, B. K. ; Boylar, T. ; Haskell, K. ; Kieffer, D. M. ; Leander, K. ; McAvoy, E. ; Lumma, P. ; Pawluczyk, J. M. ; Wai, J. ; Motzel, S. L. ; Keenan, K. ; Van Zwieten, M. ; Lin, J. H. ; Garsky, V. M. ; Freidinger, R. ; Oliff, A. ; Jones, R. E. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *7*, 451-459.

26 Bosslet, K. ; Czech, J. ; Hoffmann, D. *Tumor Target.* **1995**, *1*, 45-50.

L'utilisation de ces vecteurs peut être envisagée dans le cadre de deux stratégies de vectorisation distinctes. A ce jour, la plus répandue est la stratégie PMT (Prodrug MonoTherapy) qui consiste à cibler des enzymes naturellement surexprimées dans le microenvironnement tumoral.

Ces vecteurs peuvent également être utilisés dans le cadre de stratégies de type DEPT (Directed Enzyme Prodrug Therapy). Ces protocoles se déroulent suivant deux étapes successives. La première étape consiste en la vectorisation d'une enzyme afin d'augmenter sa concentration dans le microenvironnement tumoral, puis, un vecteur substrat de l'enzyme est administré afin d'être activé de manière sélective au niveau de la tumeur. Ces stratégies diffèrent selon le mode de vectorisation de l'enzyme. Ainsi on distingue l'ADEPT (Antigen Directed Enzyme Prodrug Therapy)²⁷ permettant de vectoriser l'enzyme au moyen d'anticorps, le GDEPT ou VDEPT (gene ou Virus Directed Enzyme Prodrug Therapy)²⁸ et le LEAPT (Lectin Directed Enzyme Activated Prodrug Therapy)²⁹.

De nombreuses études portant sur la vectorisation de plusieurs enzymes (carboxypeptidases, aminopeptidases, β -glucuronidase, β -lactamase) ainsi que sur l'utilisation de vecteurs de plusieurs drogues (doxorubicine, méthotrexate, camptothécine, paclitaxel, moutarde de l'acide benzoïque) ont permis d'évaluer l'efficacité du protocole ADEPT. Par ailleurs, cette stratégie a fait l'objet d'études cliniques de phase I et II.³⁰ Des essais menés chez des patients atteints de cancers colorectaux ont montré qu'il était possible d'augmenter la concentration de l'enzyme d'un facteur 10 000 dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains, permettant ainsi d'activer le vecteur de façon sélective. Cependant l'utilisation de ces anticorps entraîne généralement l'apparition de réponses immunogéniques ne permettant pas au traitement d'être prolongé afin d'obtenir une rémission totale de la tumeur.

27 (a) Bagshawe, K. D.; Sharma, S. K.; Springer, C. J.; Rogers, G. T. *Ann. Oncol.* **1994**, *5*, 879-891. **(b)** Bagshawe, K. D. *Current Drug Targets* **2009**, *10*, 152-157. **(c)** Tietze, L. F.; Krewer, B.; *Chem. Biol. Dru. Des.* **2009**, *74*, 205-211.

28 Niculescu-Duvaz, I.; Spooner, R.; Marais, R.; Springer, C. J. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 4-22.

29 Robinson, M. A.; Charlton, S. T.; Garnier, P.; Wang, X.-T.; Davis, S. S.; Perkins, A. C.; Frier, M.; Duncan, R.; Savage, T. J.; Wyatt, D. A.; Watson, S. A.; Davis, B. G. *P. Nat. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14527-14532.

30 (a) Napier, M. P.; Sharma, S. K.; Springer, C. J.; Bagshawe, K. D.; Green, A. J.; Martin, J.; Stribbling, S. M.; Cushen, N.; O'Maley, D.; Begent, R. H. J. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 765-772. **(b)** Mayer, A.; Francis, R. J.; Sharma, S. K.; Tolner, B.; Springer, C. J.; Martin, J.; Boxer, G. M.; Bell, J.; Green, A. J.; Hartley, J. A.; Cruickshank C.; Wren, J.; Chester, K. A.; Begent, R. H. J. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 6509-6516.

2.2 Le processus de libération de la drogue

La reconnaissance de la tumeur doit être suivie d'un processus efficace de libération de l'agent cytotoxique. En effet, la libération de l'agent actif doit être réalisée uniquement au niveau de la zone à traiter pour limiter les effets secondaires observés en chimiothérapie classique. Ce processus peut être initié par une activation chimique ou enzymatique du vecteur, la drogue pouvant être ainsi libérée directement ou à la suite d'une cascade de réactions.

2.2.1 Stratégies d'activation chimique

Les différents processus d'activation chimique mis au point au cours des dernières décennies sont basés sur l'instabilité de certains groupements fonctionnels dans les milieux acide ou réducteur caractérisant les tumeurs. Cependant, les vecteurs activables chimiquement doivent rester parfaitement stables dans les conditions physiologiques rencontrées dans les tissus sains afin d'assurer avec succès le ciblage thérapeutique des tissus cancéreux.

Le pH du microenvironnement tumoral est un élément qui peut être exploité afin d'activer des vecteurs puisqu'il est inférieur de 0,5 à 1 unité par rapport à celui du sang ou des tissus sains.³¹ Ainsi des groupements fonctionnels tels que des trityles, des acétals, des hydrazones, des imines ont été utilisés afin d'activer des vecteurs au niveau de la tumeur.³² Cependant, en raison du pH faiblement acide du microenvironnement tumoral, cette approche n'est efficace qu'avec des vecteurs présentant une rétention accrue au niveau des tissus cancéreux.

Ceci peut être parfaitement illustré par l'étude du vecteur dendritique **4** (**Figure 10**).³³ Ce dendrimère comporte seize unités doxorubicine reliées à sa structure par des fonctions hydrazone. Une fois le vecteur accumulé de manière sélective au niveau des tissus cancéreux

31 Tannock, I. F.; Rotin, D. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4373-4384.

32 (a) Jain, R.; Standley, S. M.; Fréchet, J. M. J. *Macromolecules* **2007**, *40*, 452-457. (b) Heffernan, M. J.; Murthy, N. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1340-1342. (c) Tomlinson, R.; Heller, J.; Brocchini, S.; Duncan, R. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1096-1106. (d) Tomlinson, R.; Klee, M.; Garrett, S.; Heller, J.; Duncan, R.; Brocchini, S. *Macromolecules* **2002**, *35*, 473-480.

33 Lee, C. C.; Gillies, E. R.; Fox, M. E.; Guillaudeu, S. J.; Fréchet, J. M.; Dy, E. E.; Szoka, F. C. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 16649.

par effet EPR, le pH acide du milieu catalyse la libération des molécules actives de doxorubicine par hydrolyse du lien hydrazone.

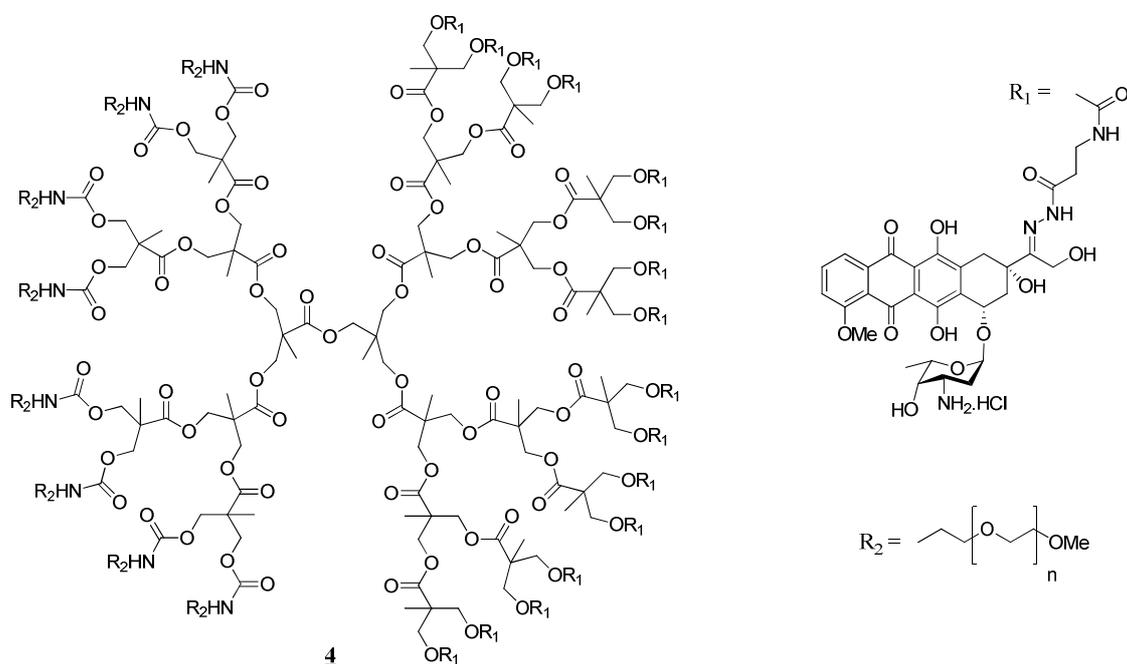


Figure 10 - Structure du vecteur 4

En raison d'une vascularisation déficiente, les tissus tumoraux sont généralement mal oxygénés ce qu'il leur confère un caractère réducteur marqué. Ainsi de nombreux vecteurs ont été conçus afin d'être activés dans des conditions réductrices. A ce titre, plusieurs types de fonction ont été étudiés pour leur aptitude à activer un vecteur par une réduction chimique. Il s'agit de quinones, de N-oxydes, d'aromatiques substitués par un groupement nitro et de dérivés comportant un pont disulfure tel que le composé EC145 décrit précédemment (**Figure 5**).³⁴

2.2.2 Stratégies d'activation enzymatique

Tout comme le processus d'activation chimique, l'activation enzymatique doit être réalisée spécifiquement au niveau de la tumeur. L'enzyme permettant l'activation du vecteur peut être naturellement exprimée ou bien préalablement ciblée au moyen de stratégies de type DEPT. Bien qu'il soit possible de libérer directement l'agent cytotoxique après l'activation

34 (a) Naylor, M. A.; Thompson, P. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 17-29. **(b)** Denny, W. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 577-595. **(c)** Denny, W. A.; *Aust. J. Chem.* **2004**, *57*, 821-828. **(d)** Denny, W. A. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2005**, *15*, 635-646.

enzymatique, il s'est généralement avéré nécessaire d'introduire un espaceur éloignant la drogue du substrat afin que celui-ci soit convenablement reconnu par le site enzymatique. Ainsi, l'activation enzymatique sera suivie de la décomposition spontanée du bras espaceur pour conduire rapidement à la libération de la drogue (**Figure 11**).

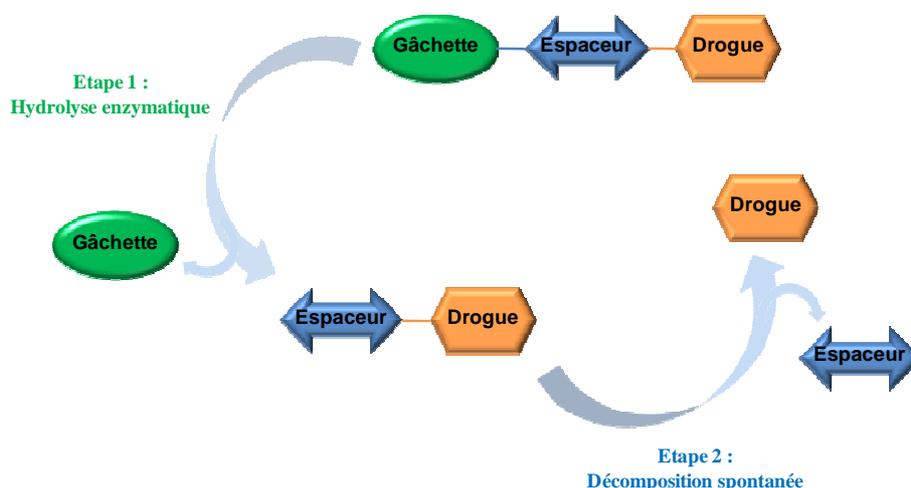


Figure 11 - Schéma de libération de la drogue dans le cadre d'un vecteur constitué de trois parties

Un nombre important d'espaceurs auto-immolables ont été développés dans plusieurs approches de ciblage thérapeutique.³⁵ Bien que différents mécanismes de libérations aient été étudiés (β -élimination, élimination 1,4, élimination 1,8, cyclisations), ce sont les espaceurs conduisant à une élimination 1,6 qui ont été les plus utilisés (exemple du vecteur de l'auristatine monométhyle E **1** représenté **Figure 8**).

Depuis plusieurs années, notre laboratoire a acquis une expertise solide dans ce domaine de recherche. Notre équipe a en effet développé plusieurs nouveaux vecteurs ciblant la β -glucuronidase, une enzyme naturellement surexprimée dans la grande majorité des tumeurs solides.

35 (a) Papot, S.; Tranoy, I.; Tillequin, F.; Florent, J.-C.; Gesson, J.-P. *Curr. Med Chem. Anti Canc. Agents* **2002**, 2, 155-185. **(b)** Tranoy-Opalinsky, I.; Fernandes, A.; Thomas, M.; Gesson, J.-P.; Papot, S. *Anti Canc. Agents Med. Chem.* **2008**, 8, 618 - 637.

3. Les vecteurs glucuronylés

3.1 La β -glucuronidase

La β -glucuronidase humaine est une enzyme lysosomale non circulante hydrolysant les liaisons *O*-glycosidiques des glucuronides d'anomérisation β . Cette enzyme est peu sélective de la partie aglycone et de nombreux glucuronides en sont des substrats. La présence d'une concentration élevée de β -glucuronidase dans les tissus cancéreux a été mise en évidence dès 1947 par Fishman et Anlyan.³⁶ Par la suite, il a été montré que la β -glucuronidase est localisée au niveau des zones nécrotiques des tumeurs de plus de deux millimètres de diamètre.³⁷ L'activité de l'enzyme est ici extracellulaire alors que celle-ci est confinée dans les lysosomes des cellules saines. La présence de β -glucuronidase est attribuée aux neutrophiles et macrophages qui sécrètent cette enzyme dans les zones nécrotiques des tumeurs ainsi qu'au niveau des métastases.³⁸

En 1988, le professeur Tietze a été le premier à décrire la β -glucuronidase comme une cible particulièrement intéressante dans le cadre de l'activation de vecteurs au niveau du microenvironnement tumoral.³⁹ De plus, les vecteurs glucuronylés présentent une hydrophilie marquée leur conférant une faible capacité à traverser les membranes cellulaires. Ainsi, ces composés sont généralement moins toxiques que les agents anticancéreux correspondants et peuvent donc être utilisés à de fortes doses afin d'augmenter la concentration de l'espèce active au niveau de la tumeur et ainsi obtenir une meilleure efficacité thérapeutique.

3.2 Exemples de vecteurs glucuronylés

A ce jour, de nombreux vecteurs ciblant la β -glucuronidase ont été synthétisés et ce concept a été décliné avec différentes familles d'anticancéreux. Ces composés possèdent dans leur grande majorité un bras espaceur permettant au glucuronide d'être reconnu par l'enzyme.

³⁶ Fishman, W. H.; Anlyan, A. J. *Science* **1947**, *106*, 66-67.

³⁷ Bosslet, K.; Straub, R.; Blumrich, M.; Czech, J.; Sperker, B.; Kroemer, H. K.; Gesson, J.-P.; Koch, M.; Monneret, C. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1195-1201.

³⁸ Juan, T.-Y.; Roffler, S. R.; Hou, H.-S.; Huang, S.-M.; Chen, K.-C.; Leu, Y.-L.; Prijovich, Z. M.; Yu, C. P.; Wu, C.-C.; Sun, G.-H.; Cha, T.-L. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 4600-4611.

³⁹ Tietze, L. F.; Seele, R.; Leiting, B.; Krash, T. *Carbohydr. Res.* **1988**, *180*, 253-262.

3.2.1 Vecteur glucuronylé de la 9-amino-camptothécine

Le groupe de Roffler a, par exemple, étudié le vecteur glucuronylé de la 9-amino-camptothécine **5** (Figure 12).⁴⁰ La 9-amino-camptothécine est une molécule inhibitrice de la topoisomérase I ayant fait l'objet de nombreuses études cliniques de phase II sur différents types de cancers (reins, prostatas, ovaires, poumons, seins, glioblastomes ...). Cependant, son utilisation dans le cadre de traitement par chimiothérapie classique est limitée par son manque de sélectivité envers les tissus cancéreux ainsi que par sa faible hydrosolubilité.

L'unité 9-amino-camptothécine est fixée sur un espaceur de type 4-(hydroxyméthyl)phénol par une fonction carbamate stable *in-vivo*. L'activation enzymatique du vecteur **5** par la β -glucuronidase conduit à la formation du phénolate **6**. Celui-ci subit alors une élimination 1,6 pour former un acide carbamique intermédiaire qui régénère spontanément l'aniline correspondante après décarboxylation.

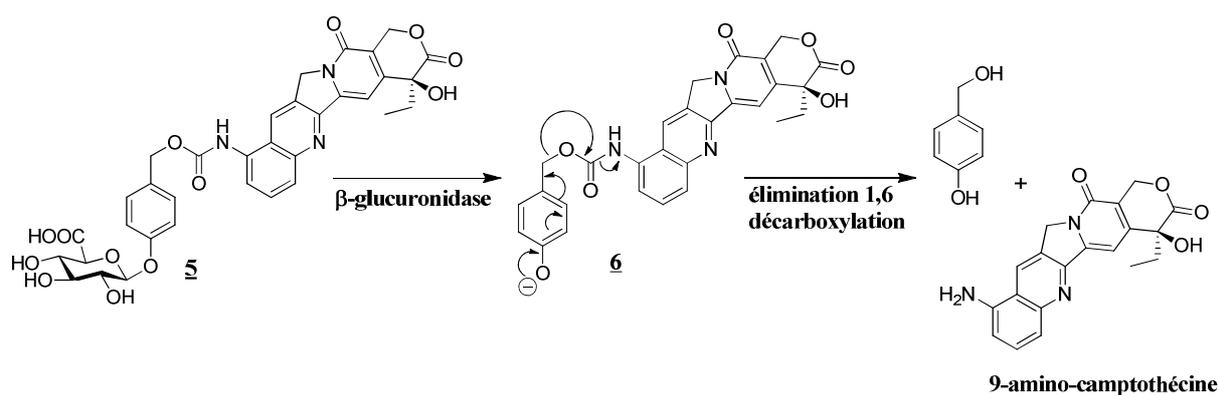


Figure 12 - Structure et décomposition du vecteur **5**

Le vecteur glucuronylé **5** s'est révélé être 1800 fois plus soluble à pH 7,0 que la 9-amino-camptothécine. L'évaluation *in vitro* indique qu'en absence de β -glucuronidase, le vecteur **5** est 20 à 80 fois moins toxique que la 9-amino-camptothécine sur cinq lignées cellulaires issues de différentes tumeurs alors qu'en présence de l'enzyme, les deux composés présentent des IC₅₀ similaires.

L'efficacité thérapeutique du vecteur **5** a été évaluée *in vivo* sur des xénogreffes de tumeurs humaines implantées chez la souris. Cette étude a montré que ce vecteur est aussi

⁴⁰ Leu, Y. L.; Roffler, S. R.; Chern, J. W. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3623 - 3628.

efficace que la 9-amino-camptothécine sur une xénogreffe du colon de type LS174T et induit une regression de la croissance tumorale de 80% en comparaison avec les tumeurs non traitées sans provoquer d'effets secondaires (**Figure 13**).⁴¹

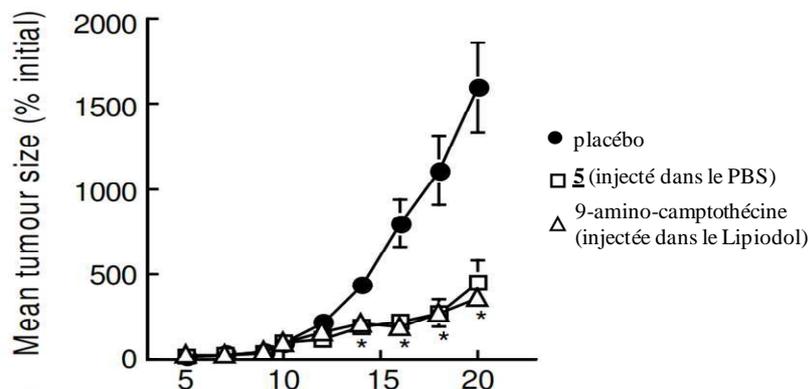


Figure 13 - Evaluation de l'activité anticancéreuse du vecteur **5** (50 mg/kg administré en i.v. au jour 10) en comparaison avec la 9-aminocamptothécine (3 mg/kg administré en s.c. au jour 10).

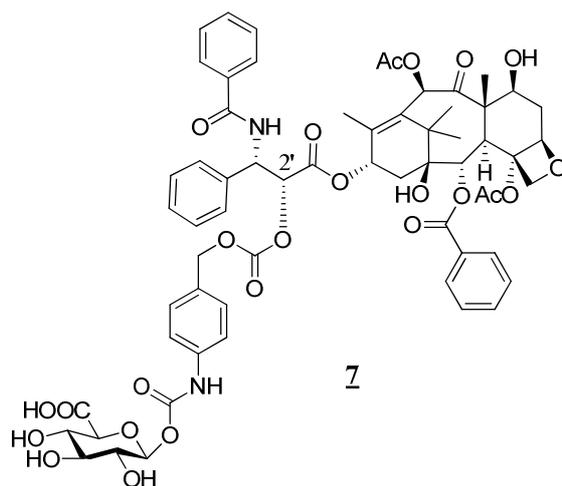
3.2.2 Vecteurs glucuronylés d'alcools et de phénols

Comme nous venons de le voir, l'utilisation de bras espaceurs de type 4-(hydroxyméthyl)phénol est bien adapté à la vectorisation d'agents anticancéreux présentant des fonctions amine ou aniline du fait de la stabilité de la fonction carbamate *in-vivo*.

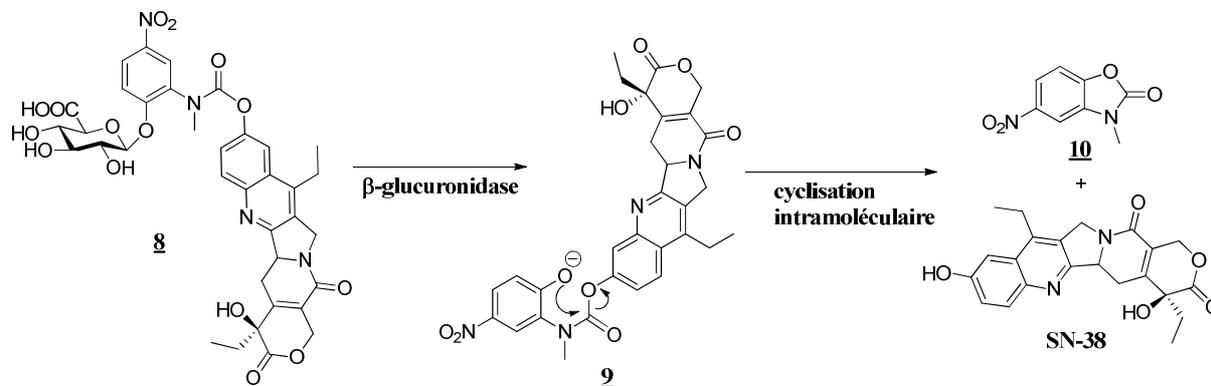
Cependant, cette stratégie n'est pas applicable pour des molécules comportant uniquement des alcools ou des phénols tels que le paclitaxel ou SN-38, un composé hautement cytotoxique dérivé de la camptothécine. En effet, il est connu que les fonctions carbonates permettant de relier la drogue à l'espaceur sont rapidement hydrolysées dans le plasma par des estérases conduisant à la libération anarchique de la molécule active dans l'organisme. A titre d'exemple, l'étude du vecteur **7** comportant une unité paclitaxel reliée à l'espaceur par une fonction carbonate (**Figure 14**) a révélé que 65% de ce composé s'était dégradé après 24 heures d'incubation en présence de sérum de fœtus de veau dans le tampon phosphate.⁴²

⁴¹ Prijovich, Z. M.; Chen, B.-M.; Leu, Y.-L.; Chern, J.-W.; Roffler, S. R. *Brit. J. Cancer* **2002**, *86*, 1634 - 1638.

⁴² El Alaoui, A; Schmidt, F.; Monneret, C.; Florent, J.-C. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9628 - 9636.

Figure 14 - Structure du vecteur **7**

De nouveaux espaceurs auto-immolables ont donc été développés pour véhiculer ce type de composés. Par exemple, le vecteur de SN-38 **8** présente un espaceur de type 2-(méthylamino)-4-nitrophénol.⁴³ Après activation enzymatique du vecteur **8**, le carbamate **9** subit une réaction de cyclisation intramoléculaire pour aboutir à la formation de la benzoxazolone **10** et à la libération d'une molécule active de SN-38 (Figure 15).

Figure 15 - Structure et décomposition du vecteur **8**

Alors que le vecteur est stable pendant plus de 48 heures en solution dans le tampon phosphate (pH 7,2), l'addition de β -glucuronidase (*E. Coli* ; β -glu : 10 U/mL ; **8** : 300 μ M) induit la libération de l'agent actif avec une demi-vie de 12,7 minutes.

Cette stratégie de libération a aussi été appliquée à la vectorisation du paclitaxel. Cependant, ce vecteur s'est avéré être un mauvais substrat de l'enzyme en raison de

⁴³ Angenault, S.; Thiro, S.; Schmidt, F.; Monneret, C.; Pfeiffer, B.; Renard, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 947-950.

l'encombrement stérique important généré par l'agent actif.⁴⁴ Pour pallier ce problème, notre équipe a proposé un nouveau procédé de libération faisant appel à deux espaceurs pour éloigner la molécule d'intérêt du motif glucuronide et ainsi améliorer la reconnaissance enzymatique du vecteur (**Figure 16**).⁴⁵

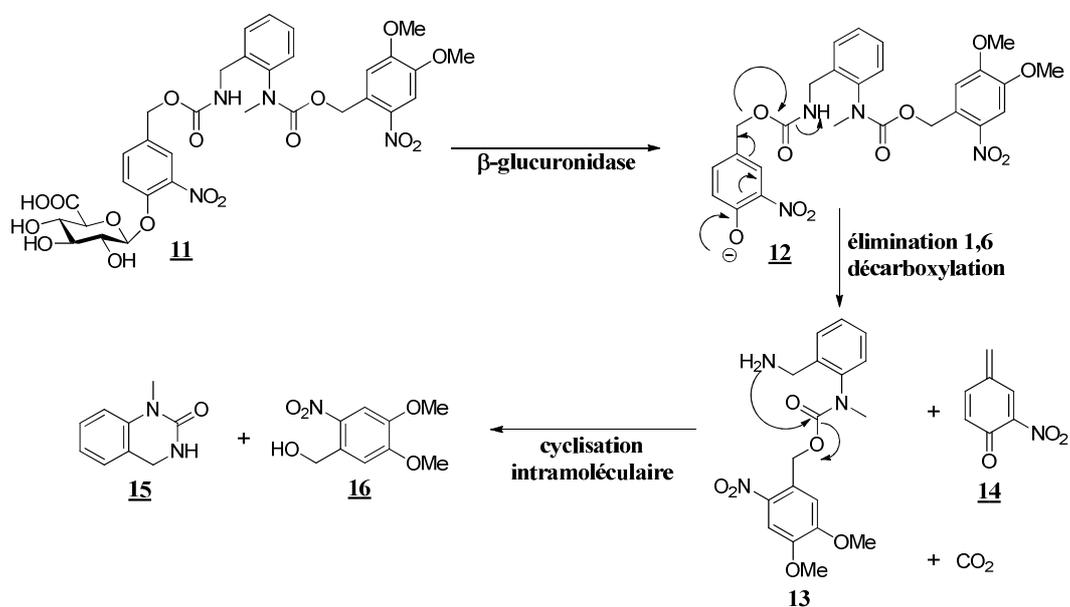


Figure 16 - Structure et décomposition du vecteur 11

L'activation du vecteur modèle **11** par la β -glucuronidase conduit à la formation du phénolate **12**. Le premier espaceur se décompose rapidement (moins de deux minutes) selon une élimination 1,6 pour former, après décarboxylation, la méthylène-quinone **14** et le carbamate aromatique **13**. Une réaction de cyclisation intramoléculaire conduit à la formation de la quinazolinone **15** et à la libération de l'alcool modèle **16** (temps de demi vie de **13** : 18 heures).

L'équipe du Dr. Monneret a adopté une stratégie similaire pour vectoriser le docetaxel (**Figure 17**).⁴⁶ Les vecteurs **17a-b** comportent un premier espaceur de type 4-(hydroxyméthyl)-2-nitrophényl carbamate ou 2-amino-4-(hydroxyméthyl)phényl carbamate se décomposant selon une élimination 1,6 après hydrolyse du déclencheur glucuronylé. Cette réaction conduit à la formation de l'intermédiaire **18**. Le deuxième espaceur de type *N,N'*-diméthyléthane-1,2-diamine se décompose ensuite selon une réaction de cyclisation

⁴⁴ Schmidt, F.; Ugureanu, I.; Duval, R.; Poupon, A.; Monneret, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *11*, 2129-2134.

⁴⁵ Papot, S.; Rivault, F.; Tranoy, I.; Gesson, J.-P. *Synlett* **2001**, *1*, 164-166.

⁴⁶ Bouvier, E.; Thiriot, S.; Schmidt, F.; Monneret, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 969-977.

intramoléculaire pour former le composé **19** et libérer la molécule de docetaxel. Le test d'hydrolyse enzymatique a montré que ces deux vecteurs sont stables pendant plus de 24 heures dans des conditions physiologiques alors qu'en présence de β -glucuronidase, la libération totale de l'agent anticancéreux a été observée après 20 minutes d'incubation.

Les vecteurs **17a** et **17b** sont respectivement 337 et 187 fois moins toxiques que le docetaxel sur des cellules cancéreuses de type L1210, montrant ainsi le caractère détoxifiant induit par la présence de motifs glucuronides.

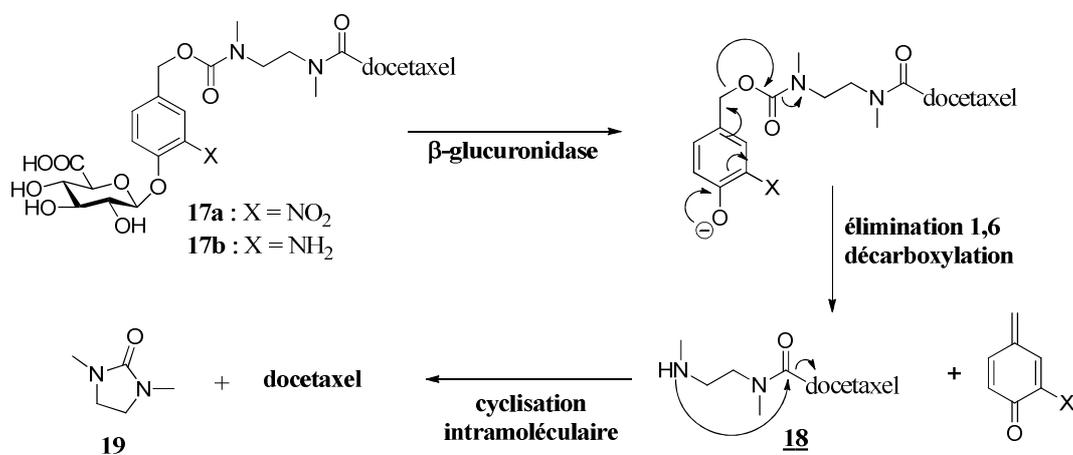


Figure 17 - Structure et décomposition des vecteurs **17a-b**

3.2.3 Vecteur glucuronylé de la doxorubicine (HMR 1826)

Notre équipe a acquis une solide expérience dans la préparation de vecteurs glucuronylés. En collaboration avec l'équipe du Docteur Monneret, l'équipe du Professeur Koch et les laboratoires Hoescht-Marion Roussel (devenus depuis Sanofi-Aventis), notre laboratoire a développé le premier vecteur glucuronylé de la doxorubicine : HMR 1826 (**Figure 18**).⁴⁷

⁴⁷ Florent, J.-C.; Dong, X.; Gaudel, G.; Mitaku, S.; Monneret, C.; Gesson, J.-P.; Jacquesy, J.-C.; Mondon, M.; Renoux, B.; Andrianomenjanahary, S.; Michel, S.; Koch, M.; Tillequin, F.; Gerken, M.; Czech, J.; Straub, R.; Bosslet, K. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3572-3581.

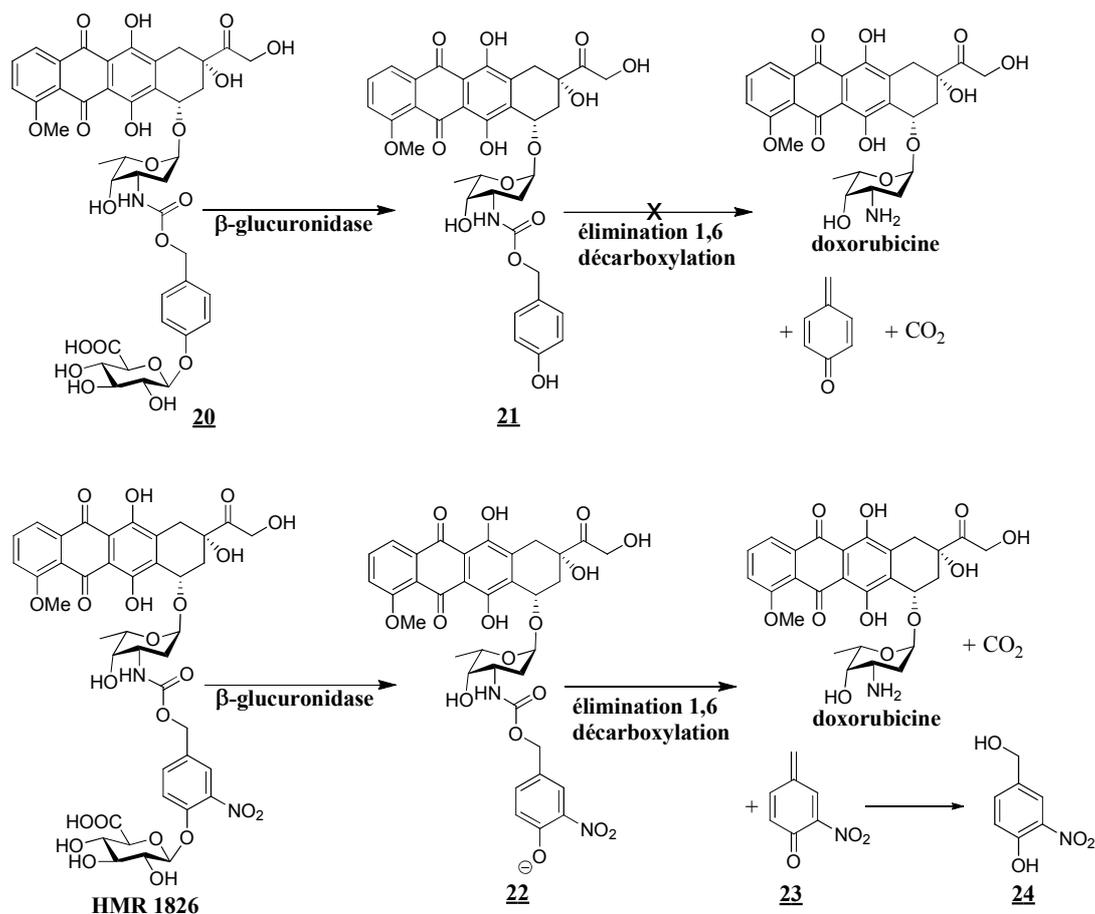


Figure 18 - Structure et décomposition de HMR 1826

Alors que les glucuronides directs d'anthracyclines sont de mauvais substrats pour la β -glucuronidase,⁴⁸ la présence d'un espaceur reliant la drogue au déclencheur est essentielle pour la bonne reconnaissance enzymatique du vecteur par l'enzyme. Des premiers essais ont montré que le processus de libération de la doxorubicine à partir du vecteur **20** s'arrête au stade du phénol **21** et ne conduit pas à la libération de l'agent anticancéreux.

Pour pallier ce problème, un second vecteur de la doxorubicine, HMR 1826 a été conçu. La substitution de l'espaceur en *ortho* du phénol par un groupement nitro permet de diminuer le pKa du phénol **22** et favorise ainsi la réaction d'élimination 1,6.

L'évaluation préliminaire de HMR 1826 a montré que ce vecteur est 80 fois moins toxique que la doxorubicine chez la souris (DMT HMR 1826 : 1,8 mmol/kg ; DMT

48 Haisma, H. J.; Boven, E.; Van Muijen, M.; de Jong, J.; van der Vijgh W. J. F.; Pinedo, H. M. *Brit. J. Cancer* **1992**, *66*, 474-478.

doxorubicine : 0,022 mmol/kg). De plus, l'injection d'une dose de 250 mg/kg de HMR 1826 chez le singe ne présente pas de toxicité (dose létale de doxorubicine chez le singe : 4,2 mg/kg).

L'efficacité thérapeutique de ce vecteur glucuronylé a été testée sur des xénogreffes de plusieurs tumeurs humaines implantées chez la souris (**Figure 19**) au cours d'une PMT (Prodrug Mono Therapy). Lors de ces essais, trois injections de HMR 1826 ont été réalisées aux jours 1, 4 et 7 avec des doses comprises entre 250 et 375 mg/kg. Les résultats enregistrés ont été comparés à ceux obtenus lors du traitement de ces mêmes tumeurs par trois doses de doxorubicine (4,5 mg/kg).

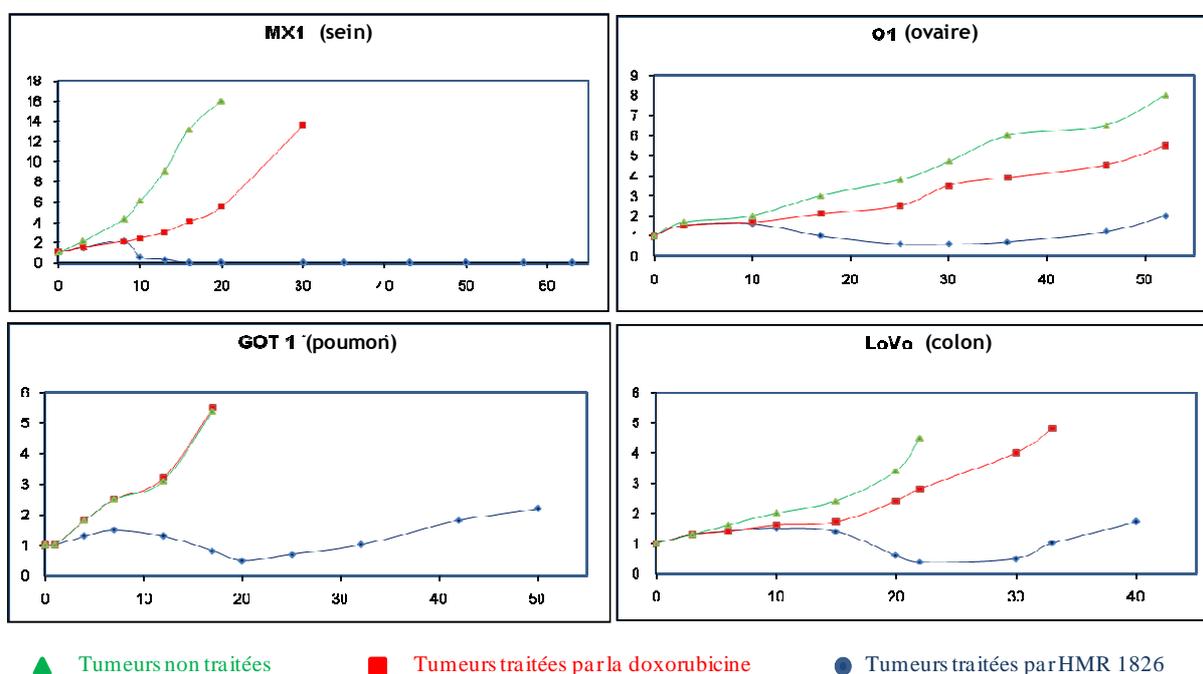


Figure 19 - Efficacité thérapeutique de HMR 1826 au cours d'une PMT - Aire relative moyenne de la tumeur en fonction du temps (jours).

Il a ainsi été montré que, dans tous les cas, HMR 1826 produisait un effet anti tumoral supérieur à celui enregistré avec la doxorubicine. HMR 1826 possède une efficacité non négligeable sur une tumeur pulmonaire alors que celle-ci est insensible au traitement par la doxorubicine. De plus, ce vecteur permet une régression totale et durable d'une tumeur mammaire. Cependant, des effets secondaires tels que des saignements de nez ont été observés lorsque HMR 1826 est utilisé à des doses supérieures à 250 mg/kg.⁴⁹

⁴⁹ Graaf, M.; Boven, E.; Scheeren, H.W.; Haisma, H.J.; Pinedo, H.M. *Curr. Pharm. Design* **2002**, *15*, 1391-1403.

Au regard des résultats obtenus pour HMR 1826, l'utilisation de vecteurs glucuronylés dans le cadre d'une chimiothérapie ciblée semble donc être une voie prometteuse. En effet, ces résultats montrent bien que l'administration de ce type de composés permet d'augmenter la concentration de l'agent anticancéreux au niveau de la tumeur tout en limitant sa distribution dans les tissus sains.³⁷

Néanmoins, l'utilisation de vecteurs glucuronylés se confronte à deux limitations majeures affectant leur efficacité. Tout d'abord, la β -glucuronidase a une faible activité dans le microenvironnement tumoral. En effet, cette enzyme possède une activité enzymatique optimale à pH 4. Dans le microenvironnement tumoral, le pH est généralement compris entre 6 et 7, et la β -glucuronidase voit alors son activité réduite à environ 10 % de son activité maximale.⁵⁰ Dans ces conditions, la cinétique de la réaction enzymatique est considérablement ralentie et la quantité de substance active délivrée dans les tissus ciblés est généralement insuffisante pour induire une rémission totale et durable de la masse tumorale.

La deuxième limitation rencontrée lors de l'utilisation de vecteurs glucuronylés réside dans leur faible temps de demi-vie plasmatique. En effet, ces composés sont rapidement éliminés par les reins en raison de leurs caractères hydrophiles marqués et leurs faibles poids moléculaires. L'administration de fortes doses est donc nécessaire pour obtenir une efficacité thérapeutique maximale. Ceci est incompatible avec une éventuelle utilisation clinique notamment en raison des difficultés rencontrées lors de l'administration de telles quantités de composé.

La β -glucuronidase étant exprimée dans la majorité des tumeurs solides et des métastases, elle est une cible particulièrement importante dans le cadre du ciblage thérapeutique. Dès lors, de nouvelles stratégies doivent être mises au point pour contourner ces deux limitations et ainsi permettre l'utilisation de vecteurs glucuronylés lors de chimiothérapies chez l'homme. A ce jour, plusieurs voies ont été explorées pour pallier ces problèmes.

50 (a) Ho, K.-J. *BBA - Protein Struct. M.* **1985**, 827, 197-206. **(b)** Zenser, T. V.; Lakshmi, V. M.; Davis, B. B. *Drug Metab. Dispos.* **1999**, 27, 1064-1067.

3.3 Comment améliorer l'efficacité des vecteurs glucuronylés?

3.3.1 La stratégie ADEPT

L'activité réduite de la β -glucuronidase dans le microenvironnement tumoral limite la quantité d'agents anticancéreux délivrée au niveau de la tumeur. Par conséquent, la stratégie ADEPT semble être un bon moyen d'augmenter de manière artificielle la quantité d'enzyme présente dans le microenvironnement tumoral. A ce titre, l'efficacité thérapeutique de HMR 1826 a été évaluée au cours d'un protocole ADEPT dans le cadre du traitement d'un carcinome humain de type LoVo implanté chez la souris immune.⁵¹

Lors de cette étude, le ciblage préalable de l'enzyme a été réalisé avec une protéine de fusion permettant de reconnaître les cellules cancéreuses et présentant l'activité de la β -glucuronidase humaine. Cette protéine remplace avantageusement les conjugués anticorps-enzymes utilisés habituellement. En effet, celle-ci peut être préparée plus aisément grâce à la technique de l'ADN recombinant qui permet d'obtenir un produit plus homogène avec un rendement plus élevé. Afin de reconnaître l'antigène cible, cette protéine de fusion comporte dans sa structure un fragment humanisé d'anticorps murin (mAb BW 431/23) ce qui permet de minimiser la réponse immunitaire. De plus, cette protéine de fusion est plus petite qu'un conjugué anticorps/enzyme lui permettant ainsi de mieux pénétrer au sein de la tumeur.⁵²

Sept jours après son injection par voie intraveineuse, la quantité de protéine de fusion détectée au niveau de la tumeur est 100 fois plus élevée que dans les tissus sains, créant ainsi une fenêtre thérapeutique favorable pour l'administration de HMR 1826. En effet, cette stratégie permet d'atteindre des concentrations de β -glucuronidase comprises entre 2000 et 200 ng d'enzyme par gramme de tumeurs entre 3 et 7 jours après le début du protocole alors que cette concentration n'est que de 20 à 100 ng/g de tumeur dans le cadre d'une PMT.²⁶ Ainsi, une seule dose de 250 mg/kg de HMR 1826 entraîne un arrêt significatif de la croissance tumorale et ce jusqu'à vingt jours après son application (**Figure 20**).

⁵¹ Bosslet, K.; Czech, J.; Hoffmann, D. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 2151 - 2159.

⁵² Bosslet, K.; Czech, J.; Lorenz, P.; Sedlacek, H. H.; Schuermann, M.; Seeman, G. *Brit. J. Cancer* **1992**, *65*, 234-238.

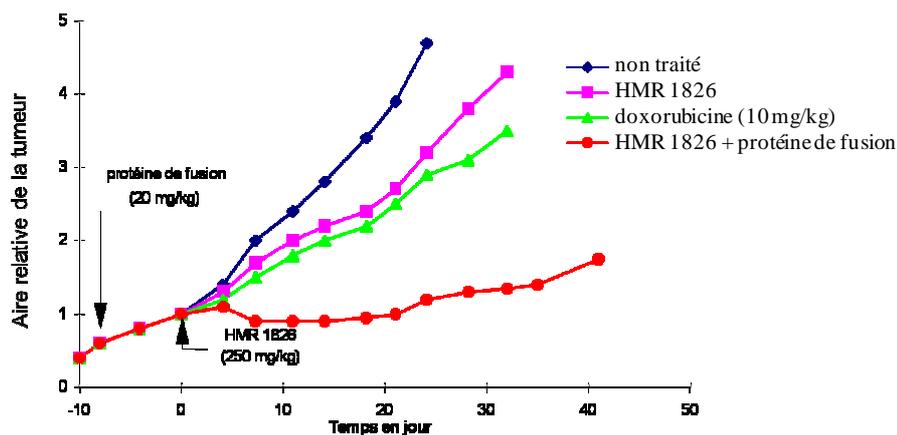


Figure 20 - Efficacité thérapeutique de HMR 1826 au cours d'un protocole ADEPT.

En comparaison avec le traitement réalisé avec de la doxorubicine seule, l'utilisation de HMR 1826 permet dans ce contexte de multiplier par 12 la concentration de la drogue au niveau de la tumeur 8 heures après son administration. De plus, la concentration de doxorubicine dans les tissus sains s'est avérée être 5 fois inférieure à celle enregistrée lors du traitement avec la drogue seule.

Cette stratégie présente donc un avantage certain en comparaison avec la PMT. Alors qu'une bonne réponse antitumorale est obtenue après une seule injection de HMR 1826 (250 mg/kg), il est en effet nécessaire d'injecter trois doses comprises entre 250 et 375 mg/kg de ce même vecteur pour obtenir une efficacité comparable lors d'une PMT. Cependant, en raison de son coût particulièrement élevé, de sa mise en œuvre difficile et de la possible réponse immunogénique liée à l'utilisation d'anticorps, la stratégie ADEPT ne semble aujourd'hui plus d'actualité.

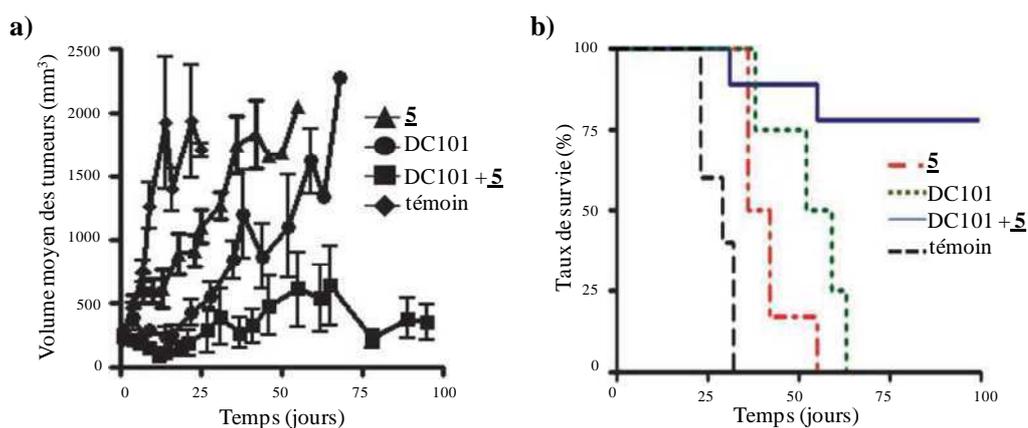
3.3.2 Ciblage de l'angiogénèse pour augmenter la quantité de β -glucuronidase dans les tumeurs

La présence de β -glucuronidase dans les tumeurs de plus de 2 mm de diamètre est étroitement liée à l'inflammation des tissus cancéreux. En réponse à cette inflammation, des neutrophiles et des macrophages sécrétant cette enzyme seront recrutés au sein des tissus cancéreux.³⁷

Une nouvelle approche visant ainsi à augmenter la quantité de β -glucuronidase dans les tumeurs a été développée par l'équipe de Roffler.³⁸ Cette stratégie se déroule en deux temps. Un composé antiangiogénique tel que l'anticorps DC101 dirigé contre le VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor) est tout d'abord administré chez des souris nude présentant des xénogreffes de tumeurs du colon. Ce premier traitement induit la normalisation des vaisseaux sanguins et une forte inflammation des tissus cancéreux se traduisant par un recrutement plus efficace des neutrophiles et des macrophages. Il a ainsi été montré qu'il était possible d'augmenter d'un facteur 10 le nombre de neutrophiles dans les tissus cancéreux traités par cet anticorps par rapport aux tumeurs témoins.

Dans un deuxième temps, un vecteur glucuronylé est administré à la souris. Il a ainsi été postulé que la grande quantité d'enzyme produite par les neutrophiles et les macrophages ainsi recrutés devrait permettre l'activation d'un nombre de vecteurs plus important en comparaison avec une PMT classique.

Cette stratégie a été évaluée en combinaison avec le vecteur glucuronylé de la 9-amino-camptothécine 5 sur des tumeurs du colon de type LS174T chez la souris nude (**Figure 21**). Alors que le vecteur 5 ne présente que peu d'efficacité thérapeutique sur ce type de tumeur, l'administration répétée de l'anticorps DC101 suivie d'une seule injection du vecteur 5 (50 mg/kg) a permis d'inhiber la croissance tumorale et a nettement prolongé la survie des souris.



**Figure 21 – (a) Efficacité thérapeutique du vecteur 5 en combinaison avec l'anticorps DC101
(b) Courbe de survie des souris**

L'augmentation de la quantité de β -glucuronidase au moyen d'anticorps actifs contre l'angiogénèse est donc une stratégie prometteuse dans le cadre de l'optimisation de

l'efficacité antitumorale des vecteurs glucuronylés. De plus, cette approche semble être plus facilement applicable chez les patients qu'une stratégie de type ADEPT.

3.3.3 Chimio-sensibilisation des tumeurs

La modification de la composition des tissus tumoraux pour les rendre plus sensibles à l'action des agents anticancéreux est une stratégie permettant d'augmenter l'efficacité thérapeutique des traitements contre le cancer. Cette modification de la composition des tissus cancéreux peut être induite par la prise d'un régime alimentaire spécial enrichi en acides gras polyinsaturés tel que l'acide docosahexanoïque (DHA).⁵³ L'augmentation de la sensibilité de tumeurs mammaires au traitement par des anthracyclines grâce au DHA a été prouvée lors de tests réalisés chez le rat ainsi que lors d'une étude clinique de phase II sur des patientes atteintes de cancers du sein présentant des métastases.⁵⁴

Le DHA est un acide gras hautement insaturé capable de s'incorporer dans les membranes phospholipidiques des cellules proliférant rapidement telles que les cellules cancéreuses. Avec ses six doubles liaisons, le DHA incorporé dans les membranes des cellules malignes est facilement peroxydé par les radicaux libres générés par les anthracyclines dont la doxorubicine. Ce phénomène entraîne ainsi des dommages irréversibles au niveau de ces cellules cancéreuses et permet donc d'augmenter l'activité cytotoxique des agents anticancéreux alors que cette approche n'affecte pas les cellules saines.⁵⁵ En outre, il a été démontré lors d'une étude menée chez le rat que cet effet peut être augmenté par l'addition d'agents pro-oxydants, tels que le couple ascorbate de sodium - ménadione (dans un ratio 100/1) dans le régime alimentaire. A l'inverse, l'introduction d'antioxydants tel que l' α -tocophérol dans le régime alimentaire abolit l'effet bénéfique de la supplémentation en DHA (**Figure 22**).⁵⁶

53 Biondo, P. D.; Brindley, D. N.; Sawyer, M. B.; Field, C. J. *J. Nutr. Biochem.* **2008**, *19*, 787-796.

54 (a) Colas, S.; Mahéo, K.; Denis, F.; Goupille, C.; Hoinard, C.; Champeroux, P.; Tranquart, F.; Bougnoux, P. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 5879-5886. (b) Bougnoux, P.; Hajjaji, N.; Ferrasson, M. N.; Giraudeau, B.; Couet, C.; Le Floch, O. *Brit. J. Cancer* **2009**, *101*, 1978-1985.

55 Germain, E.; Chajès, V.; Cognault, S.; Lhuillery, C.; Bougnoux, P. *Int. J. Cancer* **1998**, *75*, 578-583.

56 Colas, S.; Germain, E.; Arab, K.; Mahéo, K.; Goupille, C.; Bougnoux, P. *Nutr. Cancer* **2005**, *51*, 178-183.

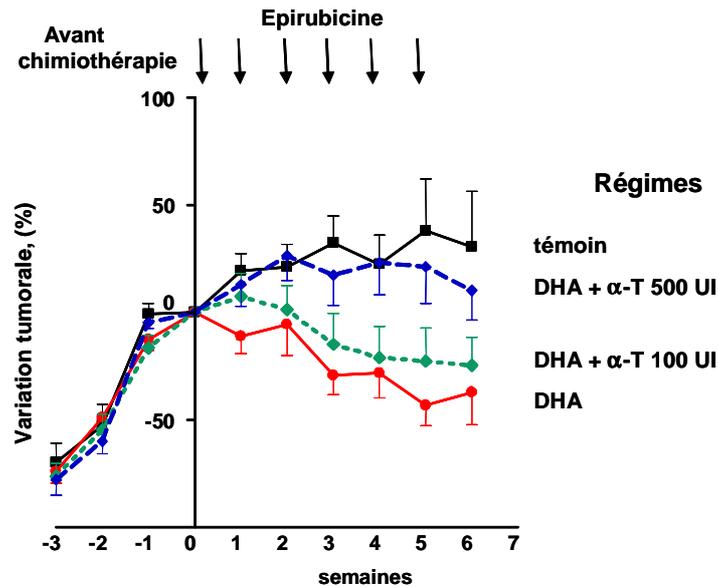


Figure 22 - Effet d'une supplémentation nutritionnelle en DHA et en α -tocophérol (α -T) sur la croissance de tumeurs mammaires au cours d'une chimiothérapie à base d'anthracycline

Notre équipe et celle du Professeur Philippe Bougnoux (Inserm UMR 1069 - Université de Tours) ont proposé de combiner le ciblage de la β -glucuronidase du microenvironnement tumoral à la chimiosensibilisation des tumeurs par le DHA. Cette stratégie pourrait donc être une alternative permettant d'augmenter l'efficacité thérapeutique de vecteurs glucuronylés d'anthracyclines tel que HMR 1826 dans le cadre d'une stratégie PMT.⁵⁷

Ainsi, le potentiel du DHA à sensibiliser les tumeurs à une chimiothérapie par HMR 1826 a été évalué sur un modèle de tumeurs mammaires chimio-induites chez le rat femelle. De façon inattendue, une efficacité plus faible de HMR 1826 chez les rates dont le régime alimentaire avait été enrichi en DHA a été constaté en comparaison avec les rates présentant un régime alimentaire témoin. Il semblerait que le DHA atténuerait la réponse inflammatoire des tissus cancéreux et, par conséquent, serait à l'origine d'une diminution de la quantité de β -glucuronidase dans la zone tumorale. A ce jour, cette hypothèse reste à vérifier.

3.3.4 Développement de nouveaux vecteurs glucuronylés

Lors d'un traitement par chimiothérapie classique, ce sont généralement des combinaisons d'agents anticancéreux qui sont administrées afin d'obtenir une efficacité

⁵⁷ Chevalier, S.; Goupille, C.; Mahéo, K.; Domingo, I.; Dussiau, C.; Renoux, B.; Bougnoux, P.; Papot, S. *Clin. Lipidol.* **2010**, *5*, 233-243.

thérapeutique optimale. La composition du traitement est alors définie selon le type de tumeur à traiter. Par analogie, il pourrait être envisagé d'utiliser des combinaisons de vecteurs glucuronylés présentant un effet de synergie dans le cadre d'une polychimiothérapie ciblée. A terme, cette stratégie pourrait aboutir à des traitements plus efficaces et mieux tolérés par les patients avec des doses de vecteurs beaucoup plus faibles que celles administrées lors d'une PMT classique. Pour développer cette stratégie, il est nécessaire de préparer des vecteurs glucuronylés permettant la vectorisation d'une large gamme d'agents anticancéreux afin de tester l'efficacité de différentes combinaisons.

A ce titre, notre équipe a développé des vecteurs glucuronylés d'inhibiteurs d'histone désacetylases (HDACi), une famille d'enzymes jouant un rôle fondamental dans la régulation de la transcription des gènes.⁵⁸ De plus, un effet de synergie résultant de l'association de cette famille d'anticancéreux avec des inhibiteurs de la topoisomérase II telle que la doxorubicine a été démontré.⁵⁹ Notre équipe s'est intéressée à la vectorisation de deux HDACi : CI-994 et MS-275 (**Figure 23**).⁶⁰ Ces deux composés appartiennent à la famille des benzamides et font actuellement l'objet d'évaluations cliniques. Bien que CI-994 et MS-275 soient des agents anticancéreux prometteurs, ils sont à l'origine d'effets secondaires importants et présentent une très faible solubilité dans l'eau. Il peut donc s'avérer judicieux de vectoriser ces composés sous forme de vecteurs glucuronylés pour contourner ces deux limitations majeures. Tout comme HMR 1826, les vecteurs **25** (CI-994) et **26** (MS-275) possèdent un bras espaceur de type nitrobenzylphénoxy carbamate alors que, dans le cas du vecteur **27**, CI-994 est directement relié au motif glucuronide.

58 Markus, B.; Veit, W.; Athanassios, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3186-3216.

59 (a) Marchion, D. C.; Bicaku, E.; Daud, A. I.; Richon, V.; Sullivan, D. M.; Munster, P. N. *J. Cell. Biochem.* **2004**, *92*, 223-237. (b) Marchion, D. C.; Bicaku, E.; Daud, A. I.; Sullivan, D. M.; Munster, P. N. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1993-2000. (c) Marchion, D. C.; Bicaku, E.; Turner, J. G.; Schmitt, M. L.; Morelli, D. R.; Munster, P. N. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 794-801.

60 Thomas, M.; Clarhaut, J.; Tranoy-Opalinski, I.; Gesson, J.-P.; Roche, J.; Papot, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8109-8116.

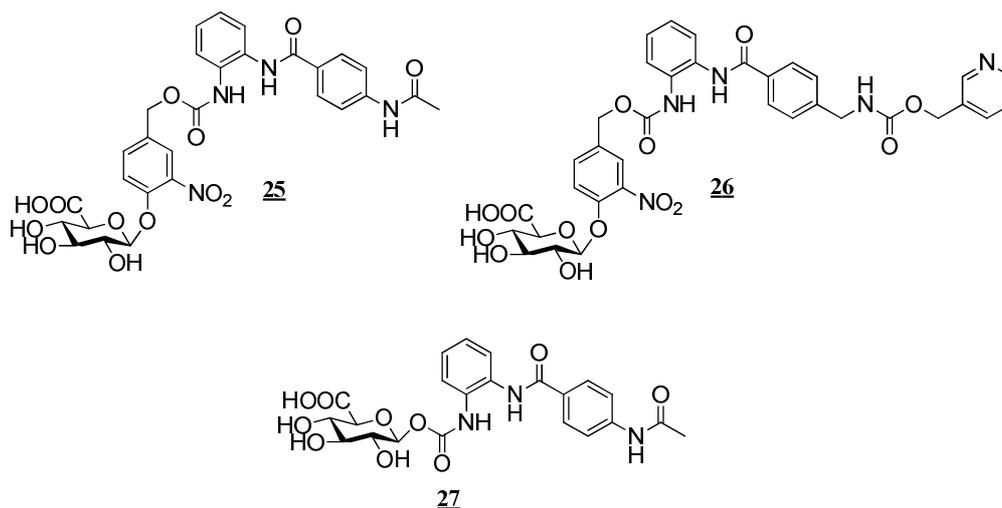


Figure 23 - Structures des vecteurs glucuronylés de CI-994 **25** et **27** et de MS-275 **26**

Les deux vecteurs de CI-994 **25** et **27** sont au moins 12,5 fois plus solubles dans l'eau que CI-994 (0,08 mg/mL). De plus, ces vecteurs sont de très bons substrats de la β -glucuronidase et dans ces deux cas, la libération totale de l'agent anticancéreux a été observée en moins de cinq minutes. L'évaluation de l'activité antiproliférative des vecteurs glucuronylés **25** et **27** a été réalisée sur une lignée de cellules de cancer pulmonaire non à petites cellules de type NCI-H661. Incubés seuls, ces vecteurs ne montrent que peu de toxicité vis-à-vis des cellules à la plus haute dose testée de 300 μ M. Cependant, en présence de β -glucuronidase, **25** et **27** retrouvent une activité similaire à celle enregistrée pour CI-994 (20 μ M).

Le potentiel du vecteur de MS-275 **26** a été évalué de la même manière que le vecteur **25** sur des lignées tumorales de type H661. En présence de β -glucuronidase, ce composé conduit rapidement à la libération de MS-275 alors qu'il est stable dans des conditions de pH et de température physiologiques. De plus, **26** ne présente aucune toxicité jusqu'à la plus forte dose testée de 100 μ M lorsqu'il est incubé seul dans le milieu de culture cellulaire. En revanche, en présence de l'enzyme, le vecteur **26** possède une activité antiproliférative comparable à celle de MS-275 (IC_{50} : 1,5 μ M).

L'évaluation de ces vecteurs *in-vitro* montre que la dérivation de ces HDACi sous forme de vecteurs glucuronylés réduit considérablement leurs toxicités. L'étude *in-vivo* de ces vecteurs en combinaison avec HMR 1826 devrait être réalisée prochainement.

3.3.5 Utilisation de vecteurs glucuronylés dendritiques

L'augmentation du nombre de molécules actives libérées après une seule activation enzymatique est une alternative extrêmement intéressante afin de pallier la faible quantité ainsi que la faible activité de la β -glucuronidase présente dans le microenvironnement tumoral. Ce concept a été développé dès 2003 par les groupes de Shabat⁶¹ et De Groot⁶². Ces deux équipes ont montré qu'il était possible de libérer plusieurs agents actifs après l'activation chimique d'un dendrimère auto-immolable. Ces dendrimères sont généralement constitués d'une gâchette connectée à une arborescence d'espaceurs auto-immolables au bout desquels se trouvent des agents actifs. Ainsi, après activation de la gâchette par un stimulus associé à la tumeur, les espaceurs vont se décomposer pour aboutir à la libération de l'ensemble des molécules d'intérêts (**Figure 24**).

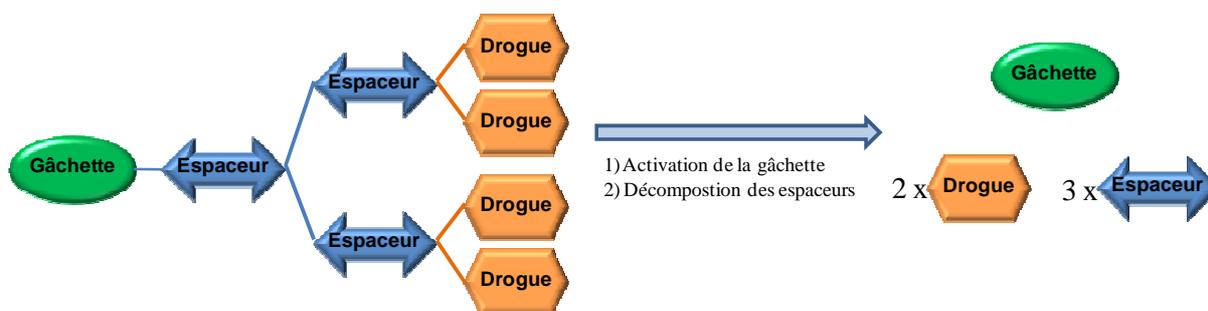


Figure 24 - Architecture d'un dendrimère auto-immolable et processus de libération des drogues.

Notre groupe a développé des vecteurs dendritiques ciblant la β -glucuronidase surexprimée naturellement dans le microenvironnement des tumeurs solides. A ce titre, le vecteur glucuronylé **28** a été conçu afin de libérer deux molécules de doxorubicine après une seule hydrolyse enzymatique (**Figure 25**).⁶³ Ce vecteur est composé d'un espaceur identique à celui utilisé pour HMR 1826 assurant une bonne reconnaissance enzymatique du glucuronide et d'un amplificateur de type 2,4-bis-(hydroxyméthyl)aniline servant de point d'ancrage aux deux molécules de doxorubicine.

61 (a) Amir, R. J.; Pessah, N.; Shamis, M., Shabat, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4494-4499. **(b)** Haba, K.; Popkov, M.; Shamis, M.; Lerner, R. A.; Barbas, C. F., III; Shabat, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 716-720. **(c)** Erez, R.; Segal, E.; Miller, K.; Satchi-Fainaro, R.; Shabat, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 4327-4335. **(d)** Shamis, M.; Lode, H. N.; Shabat, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1726-1731.

62 de Groot, F. M. H.; Albrecht, C.; Koekkoek, R.; Beusker, P. H.; Scheeren, H. W. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4490-4494.

63 Grinda, M.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Papot, S. *MedChemComm* **2012**, *3*, 68-70.

Ainsi, l'activation sélective de la gâchette dans le microenvironnement tumoral déclenche la décomposition spontanée du premier espaceur *via* une élimination 1,6 pour libérer l'aniline **29**. Cet intermédiaire va alors subir une nouvelle élimination 1,6 (ou 1,4) afin de libérer une première molécule de doxorubicine. L'aniline **31** est régénérée dans les conditions physiologique à partir de la méthylène azaquinone **30** et subit une élimination 1,4 (ou 1,6) pour aboutir à la libération de la deuxième molécule de doxorubicine.

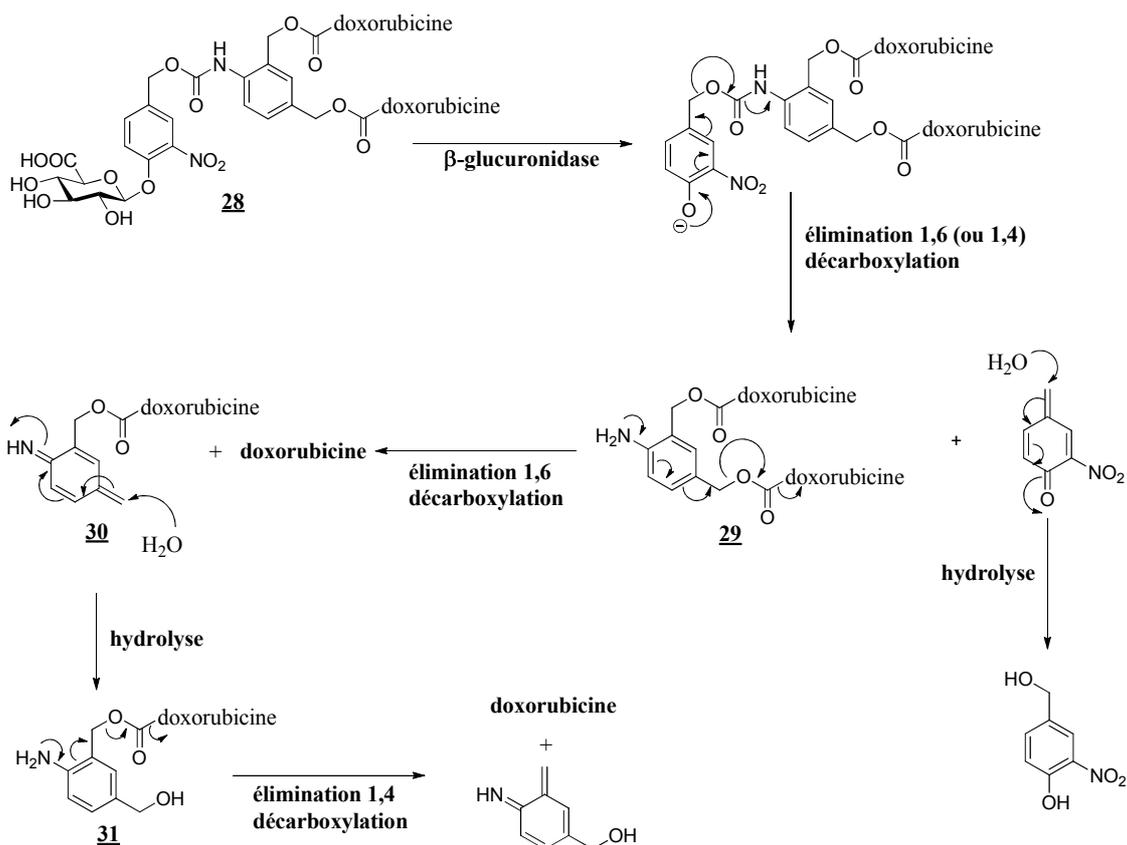


Figure 25 - Structure du dimère **28** et mécanisme de libération de la doxorubicine

Le vecteur **28** est stable sur une période de 10 jours lorsque celui-ci est incubé dans du tampon phosphate à 37°C. Aucune dégradation n'a été observée lorsque le vecteur est placé dans du sérum de boeuf pendant 24h. De plus, l'hydrolyse enzymatique du vecteur **28** en présence de β -glucuronidase conduit à la libération des deux molécules de doxorubicine en moins de 6 heures.

La cytotoxicité du vecteur glucuronylé **28** a été testée sur des cellules cancéreuses du poumon de type H661 en comparaison avec le vecteur monomérique de la doxorubicine HMR-1826. En absence de β -glucuronidase, **28** ne présente pas de toxicité à la plus forte dose

testée de 1 μM . Cependant, en présence de l'enzyme, le vecteur dimérique **28** présente une cytotoxicité deux fois supérieure à celles enregistrées pour HMR 1826 et la doxorubicine utilisée seule (IC_{50} **28** : 110 nM ; IC_{50} HMR 1826 : 280 nM ; IC_{50} doxorubicine : 250 nM).

Comme nous l'avons vu, ce système permet de libérer de manière efficace deux molécules de doxorubicine après une seule activation enzymatique. L'évaluation *in-vitro* de l'activité antiproliférative du vecteur **28** a montré, que celui-ci était deux fois plus toxique que HMR 1826 en présence de la même quantité de β -glucuronidase.

Notre groupe a ensuite entrepris la synthèse de vecteurs glucuronylés hétérodimériques afin de véhiculer simultanément deux agents actifs présentant des modes d'actions différents. Ainsi, le vecteur **32** permet de libérer, après une seule hydrolyse enzymatique, une molécule de doxorubicine et une molécule de MS-275 (**Figure 26**).⁶⁴

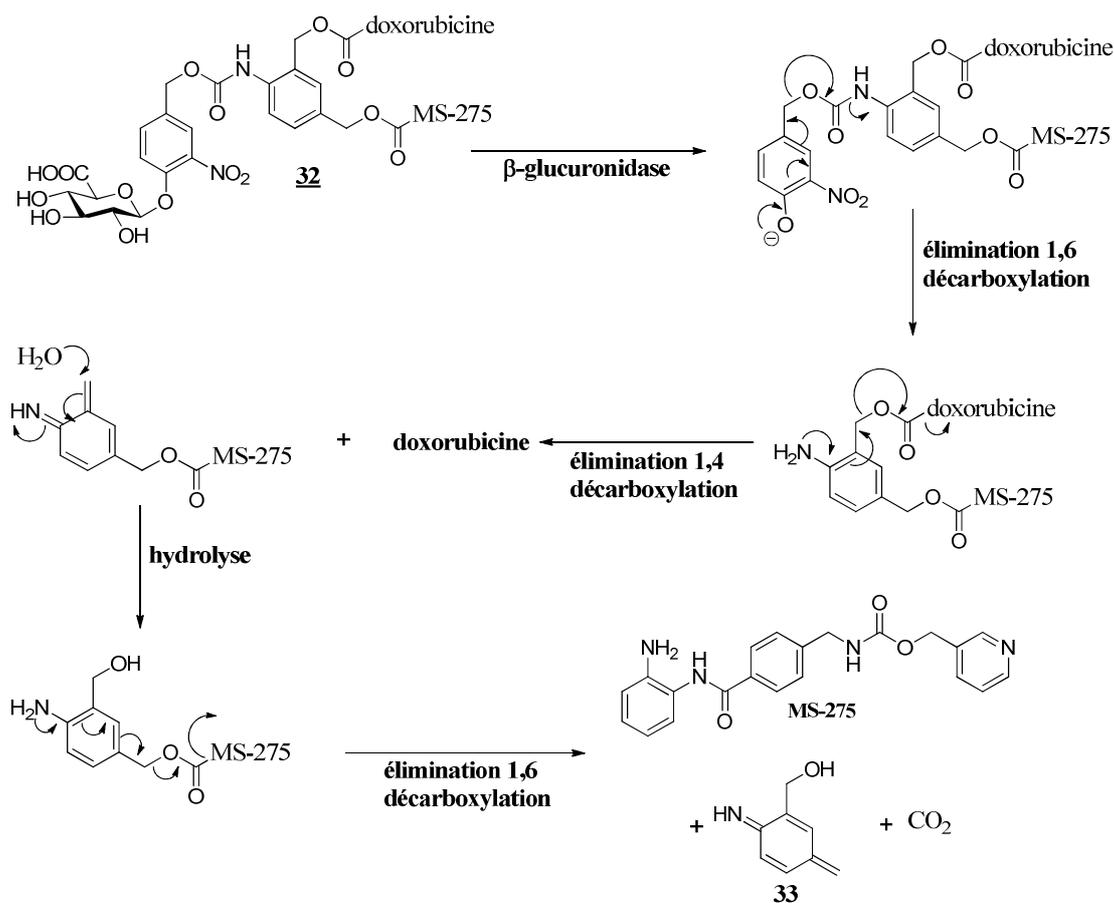


Figure 26 - Structure et décomposition de l'hétérodimère **32**

⁶⁴ Grinda, M.; Clarhaut, J.; Tranoy-Opalinski, I.; Renoux, B.; Monvoisin, A.; Cronier, L.; Papot, S. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 2137-2141.

Tout d'abord, la stabilité du vecteur **32** a été évaluée dans le tampon phosphate ainsi que dans du sérum de boeuf. Dans les deux cas, aucune décomposition n'a été observée après 24 heures d'incubation à 37°C. L'hydrolyse enzymatique du composé **32** a ensuite été étudiée en présence de β -glucuronidase. Lorsque le vecteur **32** est incubé en présence de l'enzyme, une hydrolyse rapide de la liaison *O*-glycosidique est observée aboutissant à la libération totale de la doxorubicine et MS-275 en 5 et 18 heures respectivement. Ce résultat est en désaccord avec les travaux de Shabat qui montrent que la réaction d'élimination 1,4 est toujours précédée de la réaction d'élimination 1,6.^(ref Shabat 61) La nature des espèces libérées semble donc influencer sur la cinétique de libération, bien qu'aucune hypothèse n'ait à ce jour été avancée pour expliquer ce résultat.

L'activité cytotoxique du vecteur **32** a été testée sur des cellules mésothéliales cancéreuses de type H290. Incubé seul, le vecteur hétérodimérique ne présente pas de signe de cytotoxicité jusqu'à la plus forte dose testée de 1 μ M. Cependant, en présence de β -glucuronidase, le vecteur **32** présente une IC₅₀ cinq fois supérieure à celle enregistrée pour un mélange équimolaire de doxorubicine et de MS-275 (IC₅₀ **32** : 50 nM ; IC₅₀ dox + MS-275 : 250 nM) et huit fois supérieure à celle de HMR 1826 seul avec la même quantité d'enzyme. Cette différence importante de cytotoxicité semble être le résultat de la libération de la méthylène azaquinone **33** pouvant agir comme agent cytotoxique.

Les évaluations biologiques des vecteurs glucuronylés dimériques **28** et **32** ont montré des activités supérieures à celle des monomères correspondants, démontrant ainsi le bénéfice de cette approche. La libération multiple de drogues après une seule hydrolyse enzymatique est donc une stratégie prometteuse pour pallier la faible activité de la β -glucuronidase présente dans les tissus cancéreux.

4. Présentation du sujet de thèse

Les travaux présentés dans la suite de ce manuscrit s'inscrivent dans le cadre du développement de "Systèmes Moléculaires Programmés" qui, de par leurs structures, sont capables de reconnaître les tissus cancéreux puis de libérer un agent cytotoxique de manière sélective. Ces travaux permettront d'élargir le panel des vecteurs existant en ciblant différentes spécificités tumorales et en vectorisant des agents cytotoxiques possédant

différents modes d'actions. A terme, l'association de ces différents vecteurs au cours d'un même traitement peut elle aussi être envisagée. La composition de cette polychimiothérapie ciblée pourra ainsi être adaptée en fonction des caractéristiques tumorales rencontrées. Il pourrait en découler des traitements plus efficaces et mieux supportés par les patients tirant bénéfice du mode d'action spécifique de chacun des vecteurs utilisés.

Le **chapitre I** traitera des travaux effectués dans le cadre de la conception de deux nouveaux vecteurs glucuronylés, de l'auristatine monométhyle E et de la cyclopamine. Le vecteur de l'auristatine monométhyle E (MMAE), agent cytotoxique extrêmement puissant, a été développé dans le but de pallier la faible activité de la β -glucuronidase dans le microenvironnement tumoral. Il a ainsi été postulé que l'activation enzymatique d'un vecteur libérant une drogue plus puissante que la doxorubicine devrait conduire à une efficacité thérapeutique supérieure à celle de HMR 1826. Un vecteur de la cyclopamine, inhibiteur de la voie de signalisation hedgehog, a lui aussi été étudié. La cyclopamine est un agent anticancéreux actif contre les cellules souches cancéreuses supposées être à l'origine des récurrences rencontrées lors du traitement du glioblastome multiforme, une des formes les plus agressives des cancers touchant le cerveau. Cependant, ce composé peut aussi induire la destruction des cellules souches saines, pouvant provoquer de lourds effets secondaires. Le transport de la cyclopamine dans l'organisme grâce à un vecteur glucuronylé peut donc être une solution de choix pour un traitement plus sélectif du glioblastome.

Dans un **deuxième chapitre** nous étudierons la conception d'un vecteur "super-ciblé" interagissant avec deux spécificités tumorales. En effet, malgré la complexité croissante des vecteurs développés, ces systèmes ne permettent, bien souvent, de cibler qu'une seule des particularités liées à la malignité. L'efficacité de ces vecteurs est alors limitée par la faible abondance des cibles surexprimées, par le faible niveau de différenciation entre tissus tumoraux et tissus sains et par la variabilité avec laquelle ces particularités sont exprimées d'un individu à l'autre. Pour pallier ce problème, nous proposons d'étudier un nouveau vecteur glucuronylé de la doxorubicine. Ce dernier possède un groupement maléimide lui permettant de se coupler à l'albumine présente en quantité importante dans le plasma. Ainsi, après son injection dans l'organisme, c'est un vecteur macromoléculaire qui sera formé *in-situ*. Celui-ci pourra cibler à la fois les défauts de vascularisation liés à la néo-angiogénèse tumorale et la β -glucuronidase surexprimée naturellement dans les tissus cancéreux. De plus, le couplage à l'albumine plasmatique d'un vecteur glucuronylé permettra d'augmenter le temps de demi-vie

plasmatique de ce type de composé et de pallier la faible activité de l'enzyme en augmentant le temps de présence du vecteur au niveau de la tumeur.

Le **chapitre 3** traitera quant à lui du ciblage des récepteurs surexprimés à la surface des cellules tumorales. Un vecteur galactosylé de l'auristatine monométhyle E a tout d'abord été développé afin de cibler le récepteur de l'acide folique surexprimé dans de nombreux types de cancer. Ce concept a ensuite été élargi au ciblage du récepteur de l'asialoglycoprotéine surexprimé dans le cadre de tumeurs hépatiques, du PSMA (cancer prostatique) et du VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) présent à la surface des cellules endothéliales tumorales.

La vectorisation d'agents anticancéreux présentant uniquement des fonctions dérivatisables telles que des alcools et des acides carboxyliques comme le paclitaxel reste encore problématique à ce jour. En effet, ces composés sont généralement véhiculés sous forme d'esters, de carbonates ou d'amides hydrolysables par des estérases et des protéases présentes dans le plasma sanguin. Ce phénomène est à l'origine de la libération anarchique du composé actif dans tout l'organisme pouvant alors entraîner la destruction des tissus sains. Dans ce cadre, notre équipe, en collaboration avec le Pr. David Leigh, a conçu le premier rotaxane enzymo-sensible permettant de protéger un peptide actif, la met-enképhaline, de l'action des protéases plasmatiques. L'activité du peptide est ensuite régénérée après désentrelacement du vecteur catalysée par la β -galactosidase. Lors de cette thèse, ce concept a été étendu à la vectorisation du paclitaxel sous forme d'esters protégés de l'hydrolyse par les estérases grâce à un macrocycle autoimmolable agissant comme un bouclier moléculaire. Ces travaux seront présentés dans le **chapitre 4**.

CHAPITRE 1 : CONCEPTION DE NOUVEAUX VECTEURS GLUCURONYLES

A ce jour, seuls des vecteurs glucuronylés de dérivés d'anthracyclines,⁴⁷ d'une moutarde à l'azote⁶⁵ et de la 9-aminocapthécine⁴¹ ont été testés *in vivo*. Il convient donc d'étudier de nouveaux vecteurs glucuronylés véhiculant différents anticancéreux pour le traitement d'un large panel de tumeurs. Dans ce chapitre, deux nouveaux vecteurs ont été étudiés. Il s'agit d'un vecteur de l'auristatine monométhyle E (MMAE), un agent cytotoxique très puissant, qui permettra de contourner le problème lié à la faible activité de la β -glucuronidase dans le microenvironnement tumoral. Le deuxième vecteur est conçu pour véhiculer la cyclophosphamide, un composé anticancéreux dont le mode d'action est différent de celui des agents cytotoxiques classiques. A ce titre, la cyclophosphamide est active sur des lignées cellulaires de cellules souches initiatrices du glioblastome, généralement résistantes aux traitements par chimiothérapie conventionnels.

1. Conception d'un vecteur glucuronylé de la MMAE

1.1 Introduction

L'activité réduite de la β -glucuronidase dans le microenvironnement tumoral limite la quantité de drogue libérée par activation enzymatique de vecteurs. Le ciblage de cette enzyme par des vecteurs de drogues peu toxiques ne permet donc pas d'obtenir une rémission totale de la masse tumorale. Pour pallier ce problème, on peut envisager de vectoriser des agents cytotoxiques extrêmement puissants possédant une action anticancéreuse à très faibles doses. Compte tenu des excellents résultats obtenus par notre équipe dans le cadre de la conception de vecteurs glucuronylés de divers agents anticancéreux, nous avons choisi d'étendre notre concept au vecteur glucuronylé de la MMAE **34**, un composé issu de la famille des dolastatines, cent à mille fois plus puissant que la plupart des molécules utilisées cliniquement comme le paclitaxel et la doxorubicine. (**Figure 27**).

65 Chen, B.-M.; Chan, L.-Y.; Wang, S.-M.; Wu, M.-F.; Chern, J.-W.; Roffler, S. R. *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 392-402.

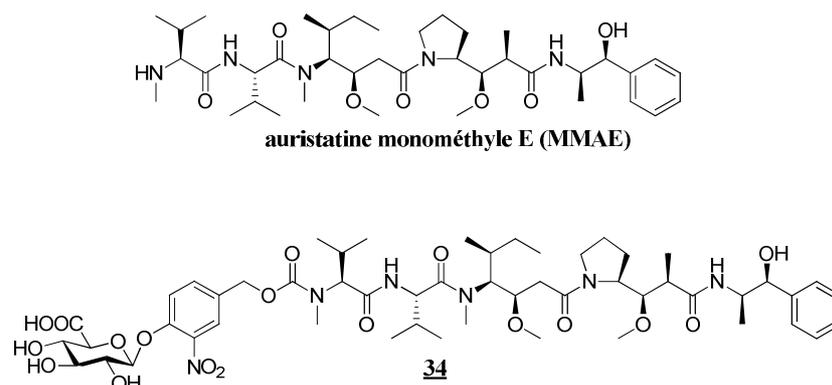


Figure 27 - Structure de la MMAE et du vecteur **34**

1.1.1 Rappel bibliographique

Le Professeur Tietze a suggéré que les vecteurs utilisés dans le cadre de l'ADEPT devaient répondre à deux critères pour que cette stratégie soit efficace.⁶⁶ Il s'agit de la forte toxicité des drogues véhiculées ($IC_{50} < 10$ nM) et de la valeur de QIC_{50} ⁶⁷ des vecteurs devant être supérieure à 1000. Ce concept n'est cependant pas limité à l'évaluation préliminaire des vecteurs conçus pour l'ADEPT et peut aussi être appliqué aux vecteurs utilisés en PMT.

A titre d'exemple, cette même équipe a développé les prodrogues glucuronylées **35a** et **35b** d'un analogue de la duocarmycine SA (**Figure 28**), l'un des agents anticancéreux le plus puissant connus à ce jour.⁶⁸ En effet, cet antibiotique naturel possède une IC_{50} d'environ 10 pM sur différentes lignées de cellules cancéreuses et agit en s'intercalant dans le petit sillon de la molécule d'ADN puis en alkylant celle-ci par l'intermédiaire de son motif spiro-méthylcyclopropylcyclohexadiénone. Bien que l'ester de méthyle **35b** ne soit pas directement substrat de la β -glucuronidase, les auteurs ont montré que celui-ci pouvait être converti *in situ* en acide glucuronique **35a** sous l'action des carboxyestérases présentes dans les milieux de culture cellulaires. Après l'hydrolyse enzymatique du vecteur **35a**, le motif spiro-méthylcyclopropylcyclohexadiénone est généré dans les conditions physiologiques *via* une cyclisation intramoléculaire de Winstein pour conduire à la formation de l'agent cytotoxique **36**. L'étude de la toxicité des vecteurs **35a** et **35b** a été effectuée sur des cellules d'adénocarcinome pulmonaire de type A549. En présence de β -glucuronidase, les vecteurs

⁶⁶ Tietze, L. F.; Herzig, T.; Feuerstein, T.; Schuberth, I. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1634-1645.

⁶⁷ Le QIC_{50} est un paramètre traduisant la différence de toxicité observée entre vecteur non activé et activé. Il est défini comme étant le rapport : (IC_{50} du vecteur)/(IC_{50} du vecteur + enzyme).

⁶⁸ Tietze, L. F.; Scuster, H. J.; Schmuck, K.; Schuberth, I., Alves, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6312-6318.

35a et **35b** présentent une très grande cytotoxicité avec des valeurs d'IC₅₀ comprises entre 0,9 et 2,1 nM (après 12 jours d'incubation) alors qu'en absence d'activation enzymatique, ces deux vecteurs se sont révélés être respectivement 700 et 1600 fois moins toxiques.

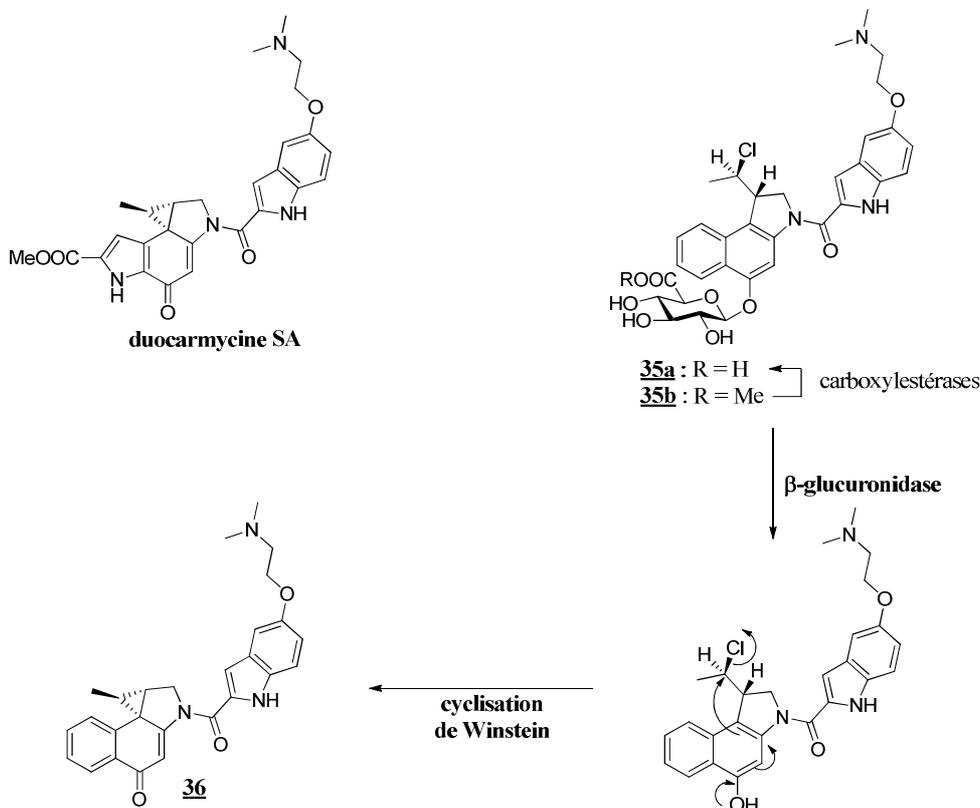


Figure 28 - Structure et décomposition du vecteur d'un analogue de la duocarmycine SA **35**

1.1.2 L'auristatine monométhyle E

La famille des dolastatines regroupe à l'origine une quinzaine d'oligopeptides isolés d'un mollusque marin vivant dans l'Océan Indien, *Dolabella Auricularia*. L'équipe du Professeur Pettit a montré à la fin des années quatre-vingt que deux de ces composés sont particulièrement cytotoxiques : la dolastatine 10⁶⁹ et la dolastatine 15 (**Figure 29**).⁷⁰

69 (a) Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Herald, C. L.; Tuinman, A. A.; Boettner, F. E.; Kizu, H.; Schmidt, J. M.; Baczynskyj, L.; Tomer, K. B.; Bontems, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6883-6885. **(b)** Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Hogan, F.; Lloyd-Williams, P.; Herald, D. L.; Burkett, D. D.; Clewlow, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5463-5465.

70 Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Dufresne, C.; Cerny, R. L. Herald, C. L.; Schmidt, J. M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 6005-6006.

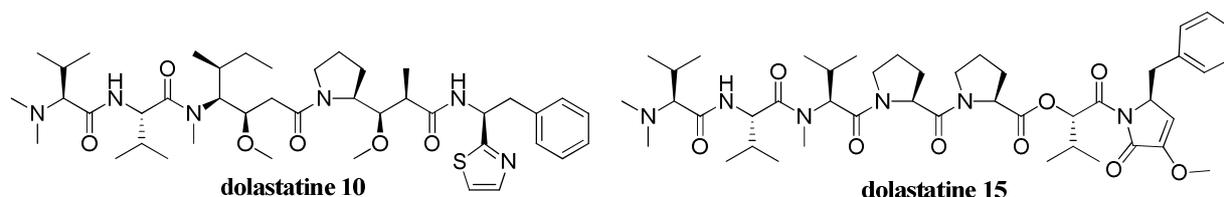


Figure 29 - Structure de la dolastatine 10 et 15

Ce sont de puissants inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline. Leur mode d'action est comparable à celui des alcaloïdes de Vinca (vinblastine, vincristine), des combrestatines et des maytansinoïdes⁷¹ et inverse à celui des taxanes (paclitaxel, docétaxel) qui inhibent la dépolymérisation des microtubules. De plus, ces composés provoquent d'importants dommages au niveau des vaisseaux sanguins tumoraux (VDA : Vascular Disrupting Agent) ce qui leur confère une activité *in vivo* accrue par rapport à celle du taxol.⁷² L'évaluation de l'efficacité thérapeutique de ces composés a fait l'objet de nombreux travaux. Il a ainsi été montré que les dolastatines possèdent un pouvoir cytotoxique extrêmement élevé envers des lignées cellulaires tumorales leucémiques, du sein, de l'ovaire et de l'endomètre ainsi que sur certaines lignées de cellules lymphoblastiques avec des IC₅₀ de l'ordre du pM. Une plus faible cytotoxicité de l'ordre du nM est observée sur des lignées de mélanome et de cancer du poumon.⁷³ Par ailleurs, la dolastatine 10 a vu son efficacité thérapeutique confirmée lors de traitement de xéno greffes de tumeurs du poumon, de l'ovaire et de la prostate chez la souris⁷⁴ et a fait l'objet d'évaluations cliniques de phase I⁷⁵ et II⁷⁶ chez des patients atteints de cancers de la prostate présentant des métastases. Cependant, cette dernière étude a révélé qu'en raison de son importante toxicité (DMT estimée à 400 µg/m² chez l'homme), les faibles doses de dolastatine 10 administrées aux patients lors du traitement ne permettent pas d'obtenir de réponses satisfaisantes. En effet, seuls 20% des patients traités présentent une stabilisation de l'évolution de la masse tumorale.

⁷¹ Bhattacharyya B.; Wolff, J. *FEBS Letters* **1977**, *75*, 159-162.

⁷² Prokopiou, E. M.; Cooper, P. A.; Pettit, G. R.; Bibby, M. C.; Shnyder, S. D. *Mol. Med. Rep.* **2010**, *3*, 309-313.

⁷³ Villalonda-Caléro M.; Degen, D.; Barlozzari, T.; von Hoff, D. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **1995**, *36*, 2349.

⁷⁴ (a) Kalemkerian, G. P.; Ou, X.; Adil, M. R.; Rosati, R.; Khouli, M. M.; Madan, S. K.; Pettit, G. R. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1999**, *43*, 507-515. (b) Aherne, G. W.; Hardcastle, A.; Valenti, M.; Bryant, A.; Rogers, P.; Pettit, G. R.; Srirangam, J. K.; Kelland, L. R. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1996**, *38*, 225-232. (c) Turner, T.; Jackson, W. H.; Pettit, G. R.; Wells, A.; Kraft, A. S. *Prostate* **1998**, *34*, 175-181.

⁷⁵ Madden, T.; Tran, H. T.; Beck, D.; Huie, R.; Newman, R. A.; Pusztai L.; Wright, J. J.; Abbruzzese *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 1293-1301.

⁷⁶ Vaishampayan, U.; Glode, M.; Du, W.; Kraft, A.; Hudes, G.; Wright, J.; Hussain, M. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 4205-4208.

Dès lors, des études de relations structure-activité ont permis la conception de nouveaux analogues synthétiques de la dolastatine 10 moins toxiques comme l'auristatine monométhyle E (MMAE) (**Figure 27**).⁷⁷ Ces nouvelles molécules sont de bons candidats pour la conception de nouveaux vecteurs dans le cadre d'une chimiothérapie ciblée. Ainsi, il a été montré qu'il était possible de véhiculer la MMAE grâce à un anticorps dirigé contre les cellules cancéreuses (cas du Bretuximab Vedotin **Figure 4**) ou bien sous la forme d'un vecteur ciblant les protéases présentes dans le microenvironnement des tumeurs (cas du vecteur **1** **Figure 8**).

1.2 Synthèse d'un vecteur glucuronylé de la MMAE

Dans le cas du vecteur **34** (**Figure 30**), la MMAE est reliée au motif glucuronide par l'intermédiaire d'un espaceur de type nitrobenzyloxy carbamate. Ainsi, lorsque le vecteur **34** sera incubé en présence de β -glucuronidase, la cinétique de libération de l'agent anticancéreux devrait être comparable à celle de HMR 1826. De plus, des études antérieures menées au laboratoire ont montré que la libération d'espèces issues de la décomposition de l'espaceur telles que la méthylène quinone **23** ou bien l'alcool benzylique **24** n'affecte en rien l'activité catalytique de la β -glucuronidase.

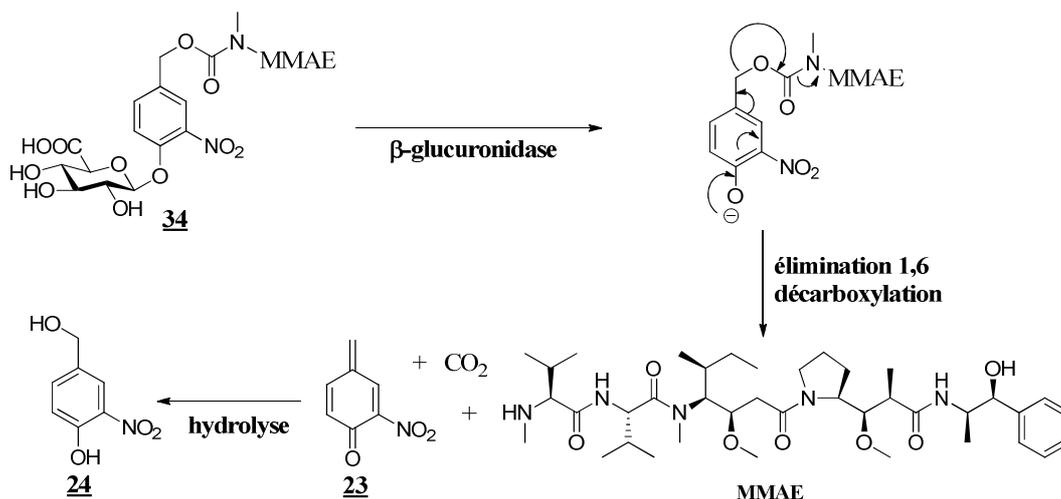


Figure 30 - Mécanisme de libération de la MMAE à partir du vecteur **34**

⁷⁷ Pettit, G. R.; Srirangam, J. K.; Barkoczy, J.; Williams, M. D.; Boyd, M. R.; Hamel, E.; Pettit, R. K.; Hogan, F.; Bai, R.; Chapuis, J. C.; McAllister, S. C.; Schmidt, J. M. *Anti-Cancer Drug Des.* **1998**, *13*, 243-277.

1.2.1 Stratégie de synthèse

La stratégie de synthèse suivante a été retenue afin de préparer le vecteur **34** (Figure 31).

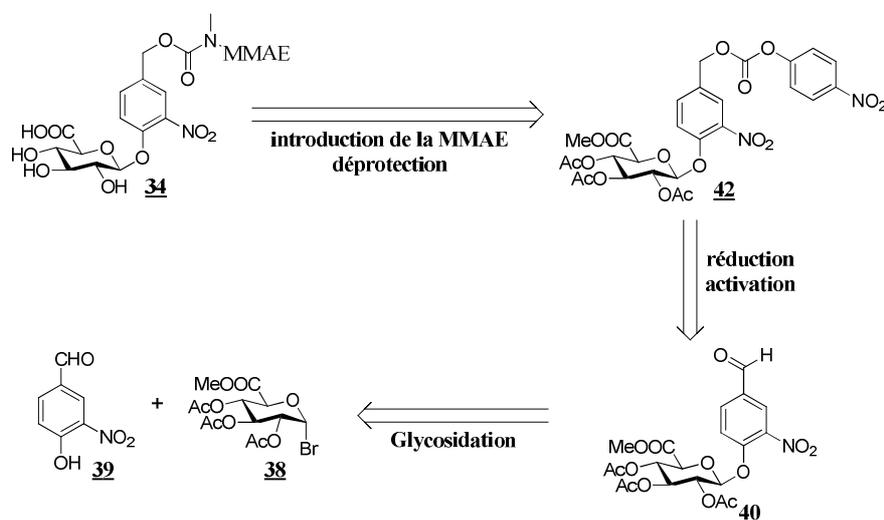


Figure 31 - Stratégie de synthèse pour le vecteur **34**

Le vecteur **34** sera obtenu après introduction de la MMAE à partir du carbonate activé **43**⁴⁷ puis déprotection du motif glucuronide. Le composé **43** pourra être préparé à partir du benzaldéhyde **41** après réduction puis activation de l'alcool benzylique en présence de chloroformiate de *para*-nitrophényle. Une réaction de glycosylation diastéréosélective entre le 3-nitro-4-hydroxybenzaldéhyde commercial **40** et le glucuronide bromé **39** permettra d'obtenir le glucuronide d'anométrie β **41**.

1.2.2 Synthèse du vecteur 34

La synthèse du carbonate **43** est réalisée en six étapes à partir de la D-(+)-glucuronolactone commerciale **37** (Figure 32) selon un protocole précédemment développé au laboratoire.

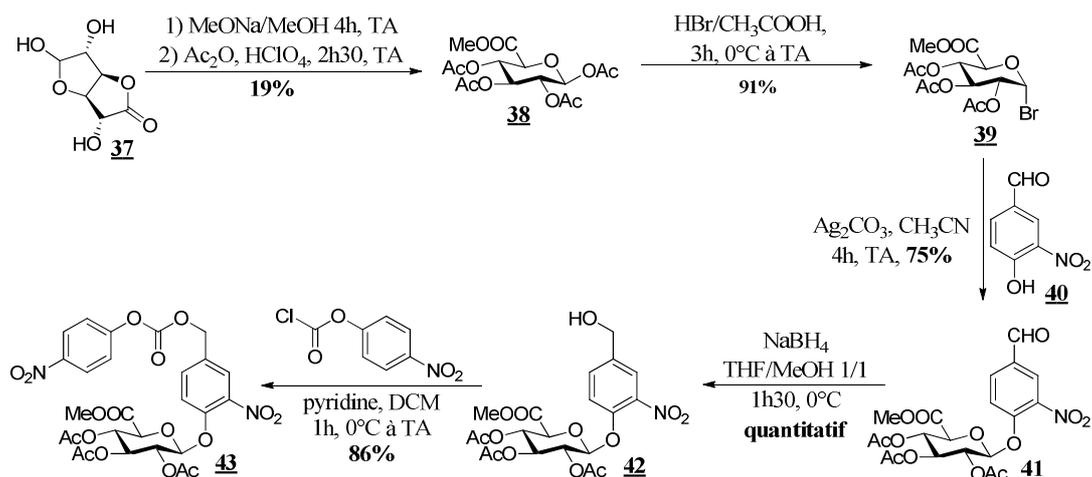


Figure 32 - Synthèse du carbonate activé **43**

Le glucuronide bromé **39** est préparé à partir de la lactone **37** selon la méthode décrite par Bollenback.⁷⁸ Tout d'abord, la D-(+)-glucuronolactone est ouverte par du méthanolate de sodium pour obtenir l'ester de méthyle correspondant sous forme pyranique. Celui-ci est alors traité par de l'anhydride acétique en présence d'une quantité catalytique d'acide perchlorique pour conduire au glucuronide peracétylé **38**, isolé par précipitation avec un rendement de 19% sur deux étapes. Il est à noter que seul le glucuronide peracétylé d'anométrie β précipite au cours de cette dernière réaction. Ceci est confirmé par l'analyse RMN ¹H du composé obtenu après filtration du mélange réactionnel, montrant un doublet à 5,77 ppm avec une constante de couplage de 8,0 Hz caractéristique d'un β -glucuronide.

La position anomérique du glucuronide **38** est ensuite activée grâce à une réaction de substitution nucléophile de l'acétate correspondant par un ion bromure en présence d'acide bromhydrique dans l'acide acétique. Le composé **39** est ainsi obtenu avec un bon rendement de 91%. L'analyse RMN ¹H de ce composé présente un doublet à 6,64 ppm avec une constante de couplage de 4,0 Hz nous permettant de confirmer la configuration α du glucuronide.

Une réaction de glycosylation entre le sucre bromé **39** et le 3-nitro-4-hydroxybenzaldéhyde **40** dans les conditions décrites par Koenigs et Knorr⁷⁹ conduit à la formation du glucuronide **41** de stéréochimie exclusivement β avec un rendement de 75%. En effet, le traitement du glucuronide **39** en présence de carbonate d'argent conduit à la formation

⁷⁸ Bollenback, G. N.; Long, J. W.; Benjamin, D. G.; Lindquist, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 3310-3315.

⁷⁹ Koenigs, W.; Knorr, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957-981.

d'un ion carboxonium stabilisé par l'oxygène de la fonction acétate en position 2 (**Figure 33**). L'ion acyloxonium cyclique ainsi formé est alors ouvert par l'attaque nucléophile du phénol sur la position anomérique, principalement par la face β présentant le moins d'encombrement stérique, pour former le composé **41**.

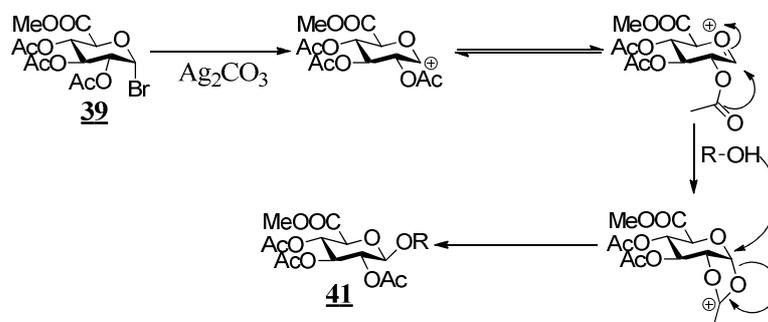


Figure 33 - Mécanisme de glycosylation en présence de carbonate d'argent

La fonction aldéhyde du composé **41** est alors réduite en présence de NaBH_4 de manière quantitative. L'alcool benzylique **42** ainsi obtenu est activé par le chloroformiate de *para*-nitrophényle en présence de pyridine dans le dichlorométhane. Cette réaction permet d'obtenir le composé **43** avec un rendement de 86%. La formation du carbonate mixte de *para*-nitrophényle est confirmée par l'analyse RMN ^1H du composé **43** présentant deux doublets à 7,21 et 8,19 ppm avec une constante de couplage de 9,0 Hz, caractéristiques des protons du carbonate aromatique *para*-substitué.

L'introduction de la MMAE sur le carbonate mixte **43** ainsi que la déprotection du motif glucuronide ont été réalisées selon la méthode décrite par Senter (**Figure 34**).⁸⁰ Ainsi, la substitution nucléophile du 4-nitrophényle par la fonction amine terminale de la MMAE en présence de HOBt et de DIPEA dans un mélange DMF/pyridine conduit à la formation du composé **44** avec un bon rendement de 68%.

Enfin, le clivage des acétates et de l'ester de méthyle a été réalisé en présence de LiOH pendant 15 minutes à 0°C. Après purification par HPLC semi-préparative, le vecteur **34** est obtenu avec un bon rendement de 78% et une pureté supérieure à 95%, compatible avec son utilisation *in-vivo*. La déprotection totale du motif glucuronide est confirmée par l'analyse

⁸⁰ Jeffrey, S. C.; Andreyka, J. B.; Bernhardt, S. X.; Kissler, K. M.; Kline, T.; Lenox, J. S.; Moser, R. F.; Nguyen, M. T.; Okeley, N. M.; Stone, I. J.; Zhang, X.; Senter, P. D. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 831-840.

RMN ^1H du vecteur **34** indiquant la disparition des signaux caractéristiques des acétates et de l'ester de méthyle.

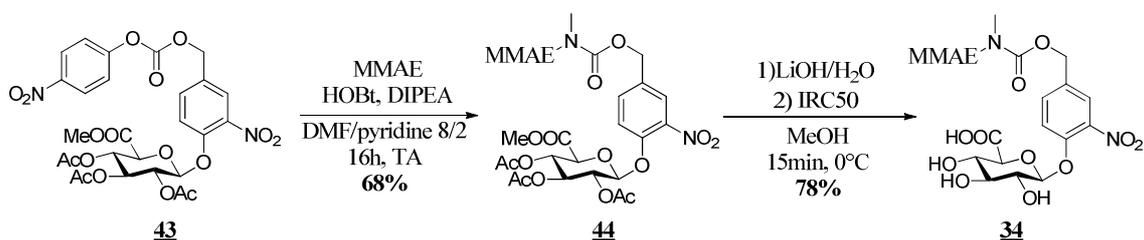


Figure 34 - Introduction de la MMAE et déprotection du glucuronide

1.3 Evaluation biologique du vecteur **34**

1.3.1 Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique du vecteur **34** a été réalisée selon un protocole standard utilisé au laboratoire afin de s'assurer de la libération rapide de la MMAE. Ce test a été effectué en présence du vecteur **34** (0,1 mg/mL) et d'un excès de β -glucuronidase (*Escherichia Coli* ; 133 U/mL) dans un tampon phosphate dont le pH est compatible avec l'utilisation de cette enzyme (0,02 M ; pH=7) à 37°C. La composition du mélange réactionnel a été suivie au cours du temps par HPLC. Ainsi, après 7 minutes d'incubation en présence de l'enzyme, on observe la libération de la MMAE, la formation de l'alcool benzylique **24** et une trace du vecteur **34** (la réaction est complète en moins de 35 minutes). Afin de vérifier que la libération de la MMAE n'est pas due à la décomposition du vecteur **34** dans les conditions physiologiques, ce dernier a été incubé dans du tampon phosphate (0,02 M ; pH = 7) à 37°C pendant 24 heures. L'évolution de cette solution a été suivie par HPLC et aucune dégradation du vecteur n'a été constatée.

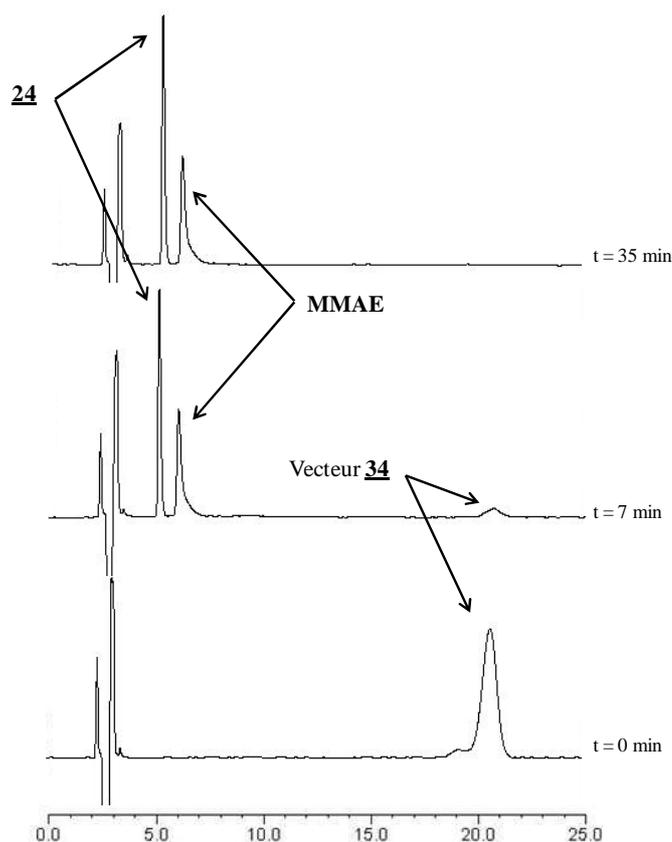


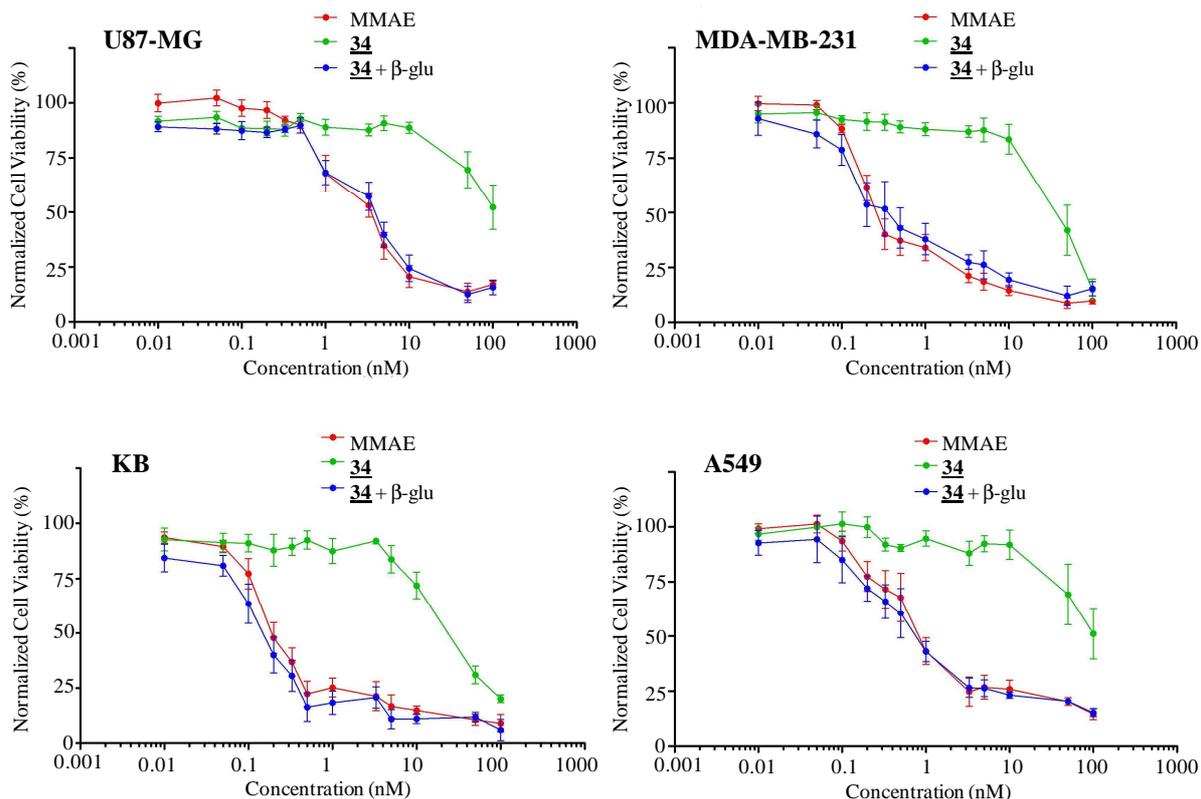
Figure 35 - Suivi HPLC de l'hydrolyse enzymatique du vecteur **34** en présence de β -glucuronidase (méthode A)

1.3.2 Evaluation de l'activité antiproliférative du vecteur 34

L'activité antiproliférative de ce vecteur a été évaluée sur différentes lignées cellulaires humaines. Ces expériences ont permis de quantifier les valeurs de l' IC_{50} ⁸¹ du vecteur **34** en présence ou en absence de β -glucuronidase dans le milieu de culture. L'activité cytotoxique du vecteur a été mesurée après 72 heures d'incubation (**Figure 36**).

Incubé seul, **34** est peu toxique sur l'ensemble des lignées cellulaires testées jusqu'à une dose de 10 nM. En revanche, en présence de β -glucuronidase, le vecteur **34** possède dans tous les cas une activité antiproliférative comparable à celle de la MMAE avec des valeurs d' IC_{50} comprises entre 0,19 et 2,49 nM. La différence de cytotoxicité observée entre le vecteur activé et non activé varie, selon les lignées cellulaires, d'un facteur 7 à 132. Ces résultats illustrent bien le caractère détoxifiant induit par l'utilisation de motifs glucuronylés.

⁸¹ Pour déterminer la valeur de l' IC_{50} , le nombre de cellules est mesuré après traitement avec différentes concentrations de substance active. Dans chaque cas, on détermine le rapport [nombre de cellules restantes / nombres de cellules initiales] \times 100. La concentration en substance active qui permet d'obtenir une valeur de ce rapport égale à 50 correspond à l' IC_{50} .



IC ₅₀ (nM)	U87-MG	A549	KB	MDA-MB-231
MMAE	2,49	0,59	0,19	0,25
34	21,20	23,65	20,82	20,88
34 + β-glucuronidase	2,94	0,52	0,16	0,22

Figure 36 - Etude de la cytotoxicité du vecteur **34** sur différentes lignées cellulaires (U87-MG : glioblastome ; A549 : adénocarcinome des cellules épithéliales basales ; MDA-MB-231 : adénocarcinome du sein ; KB : carcinome oral)

1.3.3 Evaluation de l'efficacité thérapeutique du vecteur 34 chez la souris

Une étude préliminaire d'évaluation de l'efficacité thérapeutique et la toxicité du vecteur **34** a été effectuée *in-vivo* sur des tumeurs pulmonaires sous-cutanées d'origine murine (LLC) implantées dans le flanc gauche de souris de type C57BL/6. Ce test a été réalisé par le Dr. Jonathan Clarhaut appartenant à l'équipe CIC INSERM 802 de l'Université de Poitiers.

L'efficacité du vecteur **34** utilisé à une dose de 0,5 mg/kg a été comparée à celles d'une dose non toxique de MMAE (0,1 mg/kg)⁸² et de HMR 1826 (100 mg/kg). Chaque composé a été testé sur un groupe constitué de six animaux. Le protocole de traitement retenu pour cette étude prévoit trois injections par voie intraveineuse de chacun de ces composés, réalisées 7, 11 et 14 jours après l'implantation de la tumeur. Après 20 jours d'étude, les souris ont été euthanasiées et le poids des tumeurs a été mesuré.

Ce test préliminaire a montré que le vecteur **34**, la MMAE et HMR 1826 entraînent une régression de la masse tumorale d'environ 25% en comparaison avec le groupe témoin (**Figure 37**). Bien que l'activité antitumorale du vecteur **34** reste modeste à cette dose, elle est obtenue à une dose molaire 238 fois plus faible que celle utilisée pour HMR 1826. A la vue de ce résultat encourageant, une nouvelle étude *in-vivo* devra être menée pour déterminer la dose à laquelle l'activité anticancéreuse du vecteur **34** sera maximale.

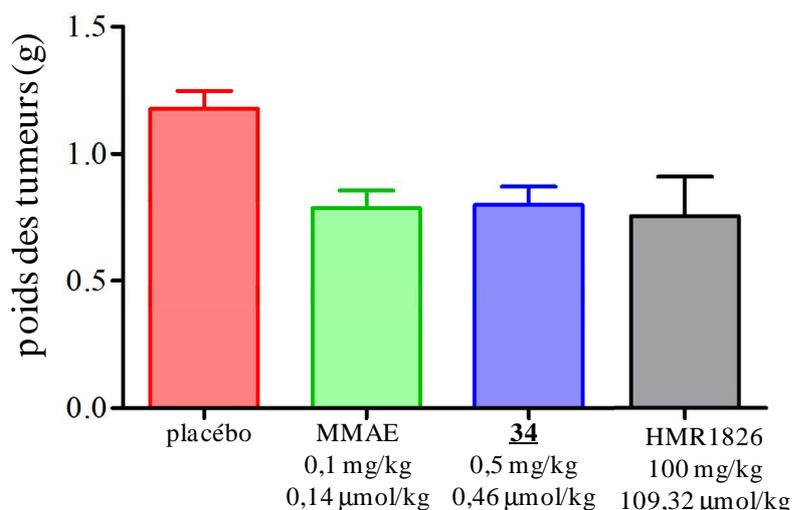
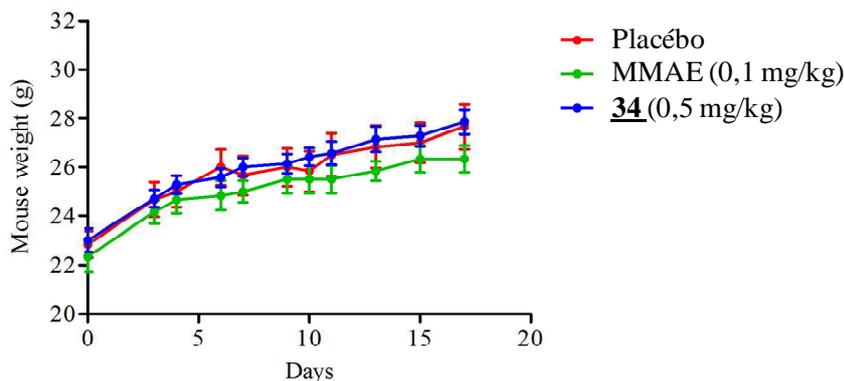


Figure 37 - Efficacité thérapeutique du vecteur **34**

L'évolution du poids des souris a été également suivie lors de cette étude. On observe aussi bien pour les souris traitées par la MMAE que par le vecteur **34** une légère progression du poids des souris tout au long du protocole. Ce résultat indique qu'il n'y a pas de toxicité aiguë pour ces composés aux doses testées (**Figure 38**).

⁸² Le choix de cette dose a été motivée par le fait qu'une étude réalisée par notre équipe a montré qu'une seule administration de MMAE à 0,5 mg/kg induisait une perte de poids trop importante chez la souris de type BALB/c pour poursuivre le protocole de traitement envisagé.

Figure 38 - Suivi du poids des souris traitées par la MMAE et le vecteur 34

2. Conception d'un vecteur glucuronylé de la cycloamine

2.1 Le glioblastome multiforme

Bien que des composés possédant une très forte cytotoxicité ainsi que de larges spectres d'action aient été développés, il existe des formes de cancer insensibles à tout type de chimiothérapie. C'est le cas, par exemple, du glioblastome multiforme (GBM) ou astrocytome de grade IV, la forme la plus commune et la plus agressive des tumeurs primaires touchant le cerveau chez l'adulte. La médiane de survie des patients atteints par ce type de cancer ne dépasse pas un an et peut être corrélée au caractère hautement invasif de la tumeur même après résection totale de la masse tumorale accompagnée de traitements par radiothérapie ou chimiothérapie.⁸³

L'origine de ce type de cancer provient des astrocytes ainsi que des cellules souches cancéreuses présentes au niveau de la masse tumorale. Ces dernières sont résistantes aux traitements par chimiothérapie (principalement avec du temozolomide vendu sous le nom de Temodal®) combinée ou non à la radiothérapie et contribuent à la croissance et au renouvellement de la masse tumorale en produisant un grand nombre de cellules cancéreuses différenciées.

⁸³ Demuth, T.; Berens, M. E. *J. Neuro-oncol.* **2004**, *70*, 217-228.

Ces cellules souches, généralement en dormance, ne se divisent pas aussi rapidement que les cellules cancéreuses classiques et échappent donc aux traitements par chimiothérapie classique composés de dérivés agissant sur la division cellulaire (familles des topoisomérases, agents alkylants, poisons du fuseau mitotique, etc). Le développement de nouveaux traitements capables de détruire les cellules souches cancéreuses permettrait d'enrayer l'auto-renouvellement des tumeurs. Ces nouvelles thérapies limiteraient ainsi l'agressivité de certains cancers et diminueraient les risques de récurrences après ablation chirurgicale de la masse tumorale.

A ce jour, l'une des principales cibles thérapeutiques étudiées afin de détruire les cellules souches cancéreuses est l'inhibition de la voie de signalisation Hedgehog. Cette voie de signalisation est impliquée dans la différenciation et la prolifération des cellules souches ainsi que dans le développement des différents organes présents chez les mammifères. Outre pour le glioblastome multiforme, son fonctionnement anormal a été observée dans de nombreux types de tumeurs telles que les tumeurs du sein,⁸⁴ de la prostate,⁸⁵ gastrique,⁸⁶ et du poumon.⁸⁷

L'activation de la voie de signalisation Hedgehog débute par la fixation de la protéine extracellulaire sonic hedgehog (SHH) à un récepteur membranaire appelé Patched (Ptc). Cette fixation inhibe Ptc et conduit à l'activation du récepteur membranaire Smoothed (Smo). L'activation de Smo entraîne l'expression de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire *via* les facteurs de transcriptions Gli1 et Gli2 (**Figure 39**).

84 Kubo, M.; Nakamura, M.; Tasaki, A.; Yamanaka, N.; Nakashima, H.; Nomura, M.; Kuroki, S.; Katano, M. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 6071-6074.

85 Karhadkar S. S.; Bova, G. S.; Abdallah, N.; Dhara, S.; Gardner, D.; Maitra, A.; Isaacs, J. T.; Berman, D. M.; Beachy, P. A. *Nature* **2004**, *431*, 707-712.

86 Berman, D. M.; Karhadkar S. S.; Maitra, A.; De Oca, R. M.; Gerstenblith, M. R.; Briggs, K.; Parker, A. R.; Shimada, Y.; Eshleman, J. R.; Watkins, D. N.; Beachy, P. A. *Nature* **2003**, *422*, 313-317.

87 Shahi, M. H.; Lorente, A.; Castresana, J. S. *Oncol. Rep.* **2008**, *19*, 681-688.

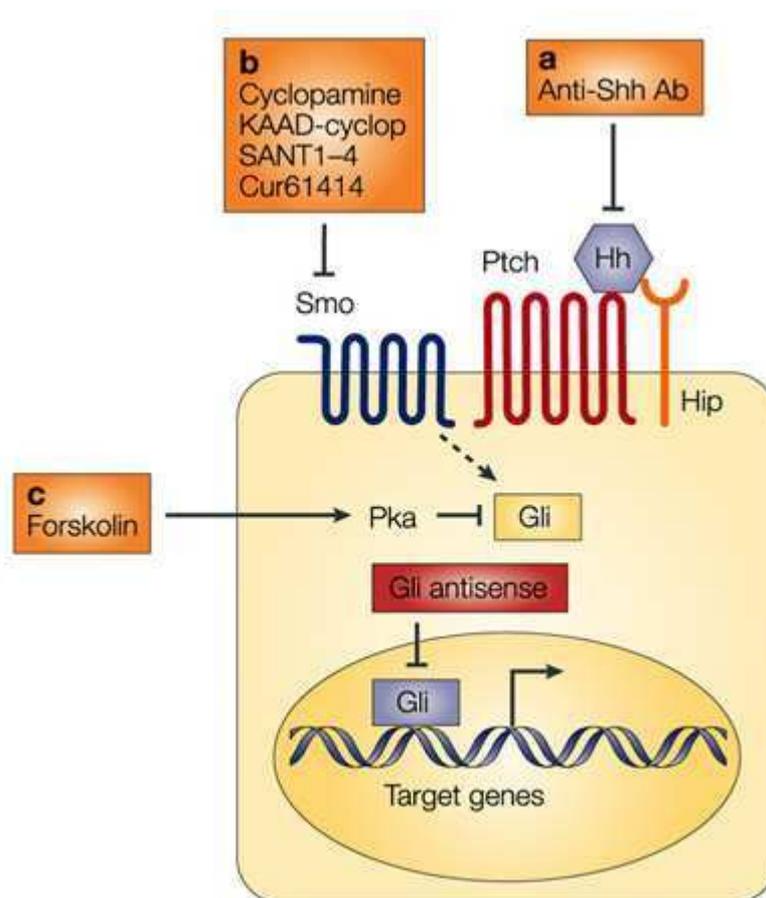


Figure 39 - Voie de signalisation Hedgehog (illustration adaptée de Pasca di Magliano, M.; Hebrok, M. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 903-911.)

De nombreux travaux ont permis la découverte et le développement de nouvelles molécules inhibant la voie Hedgehog.⁸⁸ Le premier inhibiteur de cette voie de signalisation est la cyclopamine, un alcaloïde naturel extrait de *Veratrum Californicum*.⁸⁹ Ce composé est connu pour ses propriétés tératogènes à l'origine de cas d'holoprosencéphalies (syndrome associé à de sévères altérations du développement du système nerveux central ainsi que des anomalies faciales telles que la cyclopie) chez l'agneau né de brebis ayant consommé *Veratrum Californicum*.

La cyclopamine agit en inhibant l'activité du récepteur membranaire Smoothened, interrompant ainsi la voie de signalisation Hedgehog de cellules cancéreuses.⁹⁰ Plusieurs études ont démontré que la cyclopamine induit la destruction de populations de cellules

88 (a) Mahindroo, N.; PUNCHIHEWA, C.; FUJII, N. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3829-3845. **(b)** Stanton, B. Z.; Peng, L. F. *Mol. BioSyst.* **2010**, *6*, 44-54.

89 Cooper, M. K.; Porter, J. A.; Young, K. E.; Beachy, P. A. *Science* **1998**, *280*, 1603-1607.

90 (a) Kiselyov, A. S. *Anti Canc. Agents Med. Chem.* **2006**, *6*, 445-449. **(b)** Kiselov, A. S.; Tkachenko, S. E.; Balakin, K. V.; Ivachtenko, A. V. *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, *11*, 1087-1101. **(c)** Lauth, M.; Toftgard, *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2007**, *8*, 457-461.

souches cancéreuses sur des modèles *in vitro* et *in vivo* et empêche la formation de tumeurs après l'injection intracrânienne de cellules de glioblastome humaines chez la souris.⁹¹ Bien que la cyclophamide soit un agent anticancéreux prometteur, son utilisation lors d'un traitement par chimiothérapie peut provoquer de sérieux dommages au niveau des tissus sains, les cellules souches somatiques étant elles-aussi Hh-dépendantes. De plus, son utilisation *in vivo* est limitée par sa très faible hydrosolubilité.⁹²

Afin de contourner ces deux problèmes, notre équipe a développé le vecteur **45**⁹³ conçu pour délivrer la cyclophamide au niveau de la tumeur après activation par la β -glucuronidase présente en quantité importante dans le cas du glioblastome multiforme (**Figure 40**).⁹⁴

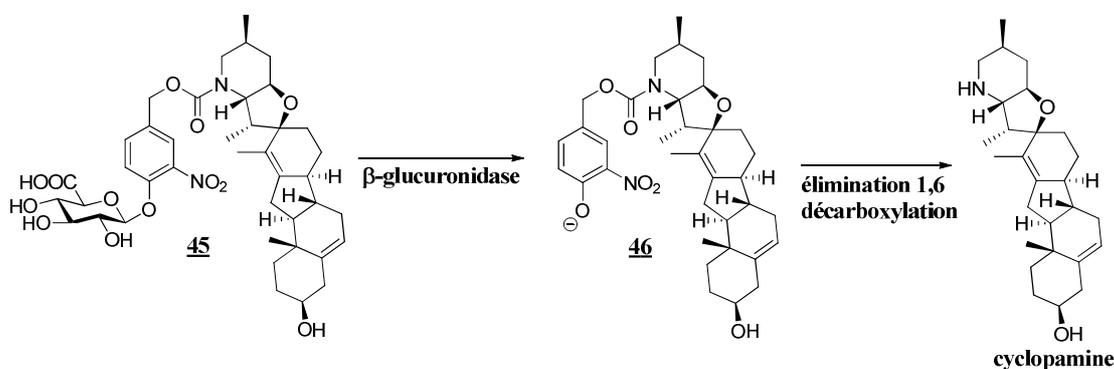


Figure 40 - Structure et décomposition du vecteur **45**

L'activité anti-proliférative du vecteur **45** a été évaluée sur des cellules de glioblastome humaines de type U87. Incubé seul, le vecteur glucuronylé de la cyclophamide présente peu de toxicité vis-à-vis des cellules U87 jusqu'à la plus haute dose testée de 200 μ M. En revanche, en présence de β -glucuronidase, **45** présente une valeur d' IC_{50} similaire à celle enregistrée pour la cyclophamide (IC_{50} **44** : 21 μ M ; IC_{50} cyclophamide : 15,5 μ M). Ce phénomène peut être expliqué par la libération de la cyclophamide en présence de β -glucuronidase régénérant ainsi son activité.

91 (a) Bar, E. E.; Chaudhry, A.; Lin, A.; Fan, X.; Schreck, K.; Matsui, W.; Piccirillo, S.; Vescovi, A. L.; DiMeco, F.; Olivi, A.; Eberhart, C. G. *Stem Cells* **2007**, *10*, 2524-2533. (b) Clement, V.; Sanchez, P.; de Tribolet, N.; Radovanovic, I.; Ruiz I Altaba, A. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, 165-172. (c) Kolterud, A.; Toftgard R.; *Drug Discov. Today Ther. Strateg.* **2007**, *4*, 229-235.

92 Keeler R. F.; Baker, D. C. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1989**, *192*, 153-156.

93 Hamon, F.; Renoux, B.; Chadéneau, C.; Muller, J.-M.; Papot, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 1678-1682.

94 Nygren, C.; von Holst, H.; Månsson, J. E.; Fredman, P. *Acta Neurochir.* **1997**, *139*, 146-150.

L'hydrolyse enzymatique du vecteur **45** menée en présence de β -glucuronidase conduit rapidement à la formation du phénolate **46**. Cet intermédiaire se décompose alors lentement pour libérer totalement la cyclophamine en 28 heures. Au cours de cette expérience, la précipitation du phénol intermédiaire **46** a été observée dès sa formation. La cinétique lente de libération de la molécule active est donc le résultat d'une solubilisation progressive du phénol dans le tampon phosphate. Ce phénomène est un problème majeur limitant l'utilisation de ce vecteur *in vivo*. En effet, la libération de la molécule active après hydrolyse enzymatique du vecteur au niveau du microenvironnement tumoral doit être un processus rapide afin de limiter la diffusion de l'espèce espaceur-drogue vers les tissus sains.

2.2 Synthèse d'un vecteur glucuronylé hydrosoluble de la cyclophamine

Un nouveau vecteur de la cyclophamine **47** a été conçu pour pallier la faible hydrosolubilité de l'intermédiaire **46** décrit précédemment (**Figure 41**).⁹⁵

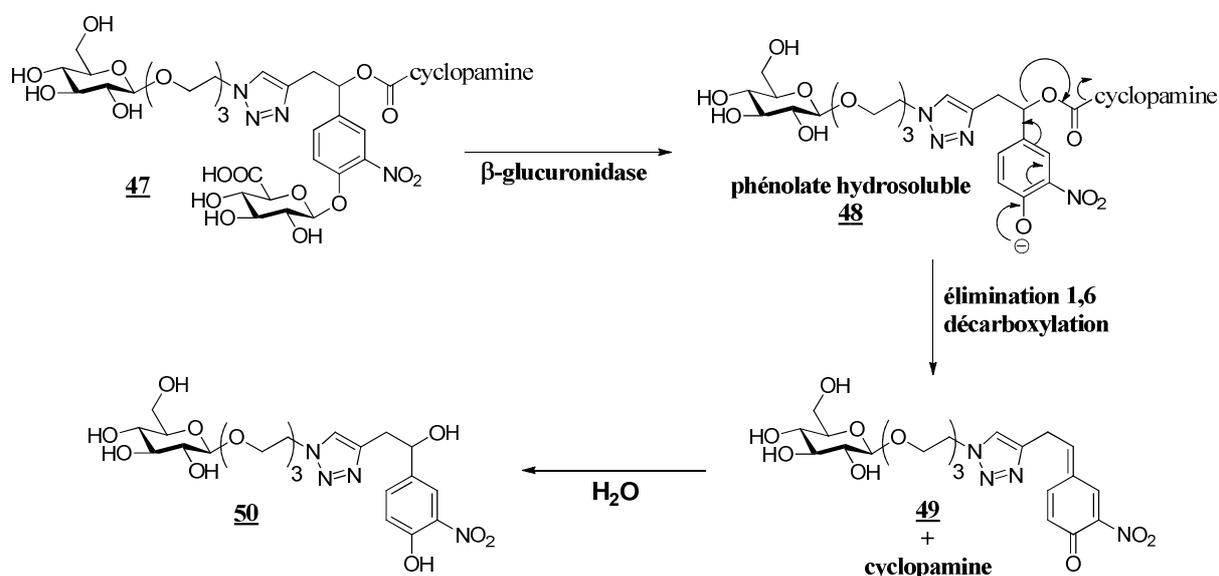


Figure 41 - Structure et décomposition du vecteur **47**

Ce vecteur comporte une chaîne latérale hydrophile de type poly(éthylène glycol) glycosylée en son extrémité. Grâce à la présence de cette chaîne latérale, le phénol intermédiaire **48**, formé après l'hydrolyse enzymatique du vecteur **47**, devrait être

⁹⁵ Renoux, B.; Legigan, T.; Bensalma, S.; Chadéneau, C.; Muller, J.-M.; Papot, S. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8459-8464.

parfaitement soluble dans l'eau. Dans ces conditions, la cyclopamine devrait donc être libérée plus rapidement à partir de l'intermédiaire hydrosoluble **48**, par comparaison au vecteur précédent **45**.

2.2.1 Stratégie de synthèse

La stratégie de synthèse retenue pour la préparation du vecteur **47** repose sur l'utilisation de l'unité centrale **51** (Figure 42). Ce composé comporte trois fonctions chimiques distinctes permettant d'assembler de manière successive les différentes unités composant ce vecteur. Ainsi, le déclencheur glycosydique pourra être introduit de manière chimiosélective sur le phénol par une réaction de glycosylation. L'agent cytotoxique sera ensuite fixé par l'intermédiaire d'une fonction carbamate sur l'alcool benzylique préalablement activé sous la forme d'un carbonate de *para*-nitrophényle. Enfin, un large panel de chaînes latérales hydrophiles comportant un azoture pourront être couplées avec l'alcyne vrai par une réaction de cycloaddition [3+2] catalysée par le cuivre I (réaction de "click chemistry").⁹⁶

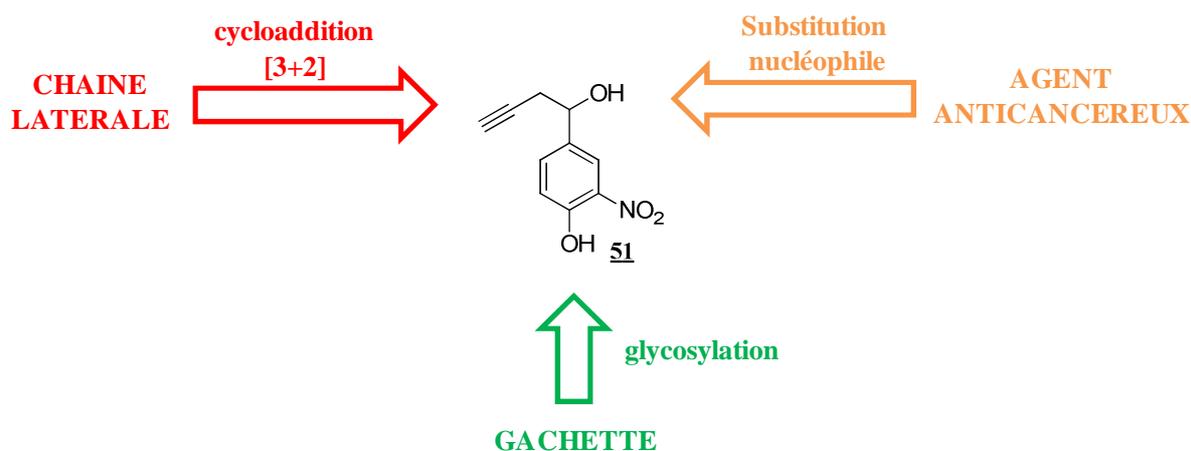


Figure 42 - Structure de la plateforme **51**

En raison du coût élevé de la cyclopamine, il est nécessaire que chaque étape soit parfaitement maîtrisée pour permettre l'obtention du composé final avec un très bon rendement. Les alcools et la fonction acide carboxylique du glucuronide seront donc protégés respectivement sous forme de carbonates et d'ester d'allyle. Le glucuronide pourra ainsi être déprotégé en une seule étape en présence de palladium (0). Le choix de ces groupements

⁹⁶ (a) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599. (b) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.

protecteurs a été motivé par le fait qu'ils peuvent être clivés dans des conditions douces,⁹⁷ alors que l'utilisation de conditions basiques nécessaires à la déprotection d'acétates et d'esters de méthyle employés classiquement entraîne généralement une dégradation partielle du composé, avec notamment l'élimination du groupement acétate en position 4 du glucuronide (**Figure 43**).

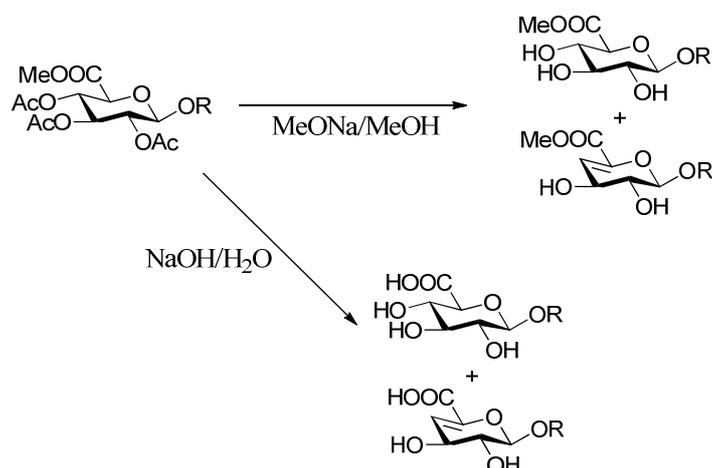


Figure 43 - Dégradation du glucuronide en milieu basique

De plus, la déprotection tardive du motif glucuronide présente l'avantage de faciliter la synthèse de ce type de composés en conservant des intermédiaires relativement apolaires, solubles dans les solvants organiques usuels et purifiables par chromatographie sur gel de silice, et ce, jusqu'à la dernière étape.

2.2.2 Synthèse de l'intermédiaire **52**

L'alcool benzylique **52** a été synthétisé en deux étapes à partir du 3-nitro-4-hydroxybenzaldéhyde commercial **40** selon une méthode précédemment développée au laboratoire. (**Figure 44**).⁹⁸

⁹⁷ De Mesmaecker, A.; Hoffmann, P.; Ernst, B. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3773-3776.

⁹⁸ Thomas, M.; Clarhaut, J.; Strale P.-O.; Tranoy-Opalinski, I.; Roche, J.; Papot, S. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 1006-1010.

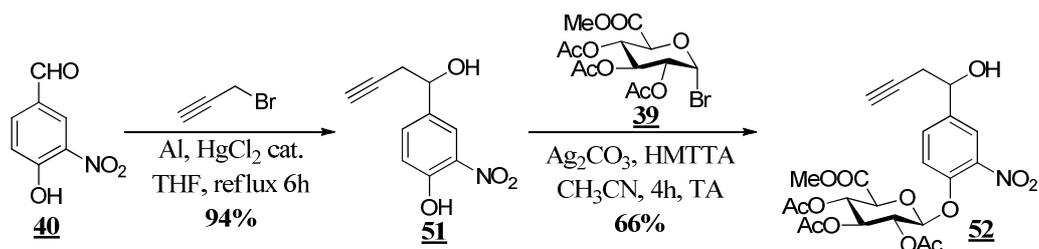


Figure 44 - Synthèse de l'intermédiaire **52**

Dans un premier temps, l'addition de tripropargylaluminium, formé à partir de bromure de propargyle en présence d'aluminium métallique et d'une quantité catalytique de HgCl_2 dans le THF, sur le 3-nitro-4-hydroxybenzaldéhyde **40** conduit à la formation de l'unité centrale **51** sous forme d'un mélange racémique avec un excellent rendement de 94%. L'analyse RMN ^1H du composé **51** révèle la disparition du signal à 10,05 ppm correspondant au proton de la fonction aldéhyde ainsi que l'apparition d'un multiplet à 4,92 ppm caractéristique du proton en position benzylique.

Enfin, la réaction de glycosylation chimiosélective entre le sucre bromé **39** et la fonction phénol du composé **51** a été réalisée en présence de Ag_2CO_3 et de HMTTA (1,1,4,7,10,10-hexaméthyltriéthylènetétramine) dans les conditions décrites par Stazi.⁹⁹ Une étude antérieure menée au laboratoire a montré, qu'en absence de HMTTA, l'ion Ag^+ est complexé de manière irréversible par la fonction alcyne. Dans ces conditions, aucune trace de produit de glycosylation n'a été détectée. L'utilisation de HMTTA permet donc de complexer préférentiellement l'argent et facilite la réaction de glycosylation. Ainsi, le glucuronide **52** a été obtenu avec un rendement de 66% sous forme d'un mélange de diastéréoisomères non séparables par chromatographie flash sur gel de silice. L'analyse RMN ^1H du composé **52** présente un signal à 99,5 ppm indiquant qu'un seul anomère a été isolé au cours de la réaction.

2.2.3 Synthèse de l'intermédiaire **59**

La synthèse du composé **59** débute tout d'abord par le changement des groupements protecteurs du glucuronide en cinq étapes à partir du composé **52**, selon la méthode décrite par Grinda et al.⁶⁴ (Figure 45).

⁹⁹ Stazi, F.; Palmisano, G.; Turconi, M.; Clini, S.; Santagostino, M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1097-1103.

Tout d'abord, l'alcool benzylique du composé **52** a été protégé sous forme d'éther silylé en présence de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle et d'imidazole dans le DMF. Le composé **53** a ainsi été obtenu avec un très bon rendement de 91%. L'analyse RMN ¹H du composé **53** confirme la protection de l'alcool avec l'apparition de signaux à 0,89, 0,09 et -0,04 ppm correspondant respectivement au *tert*-butyle ainsi qu'aux deux méthyles portés par l'atome de silicium.

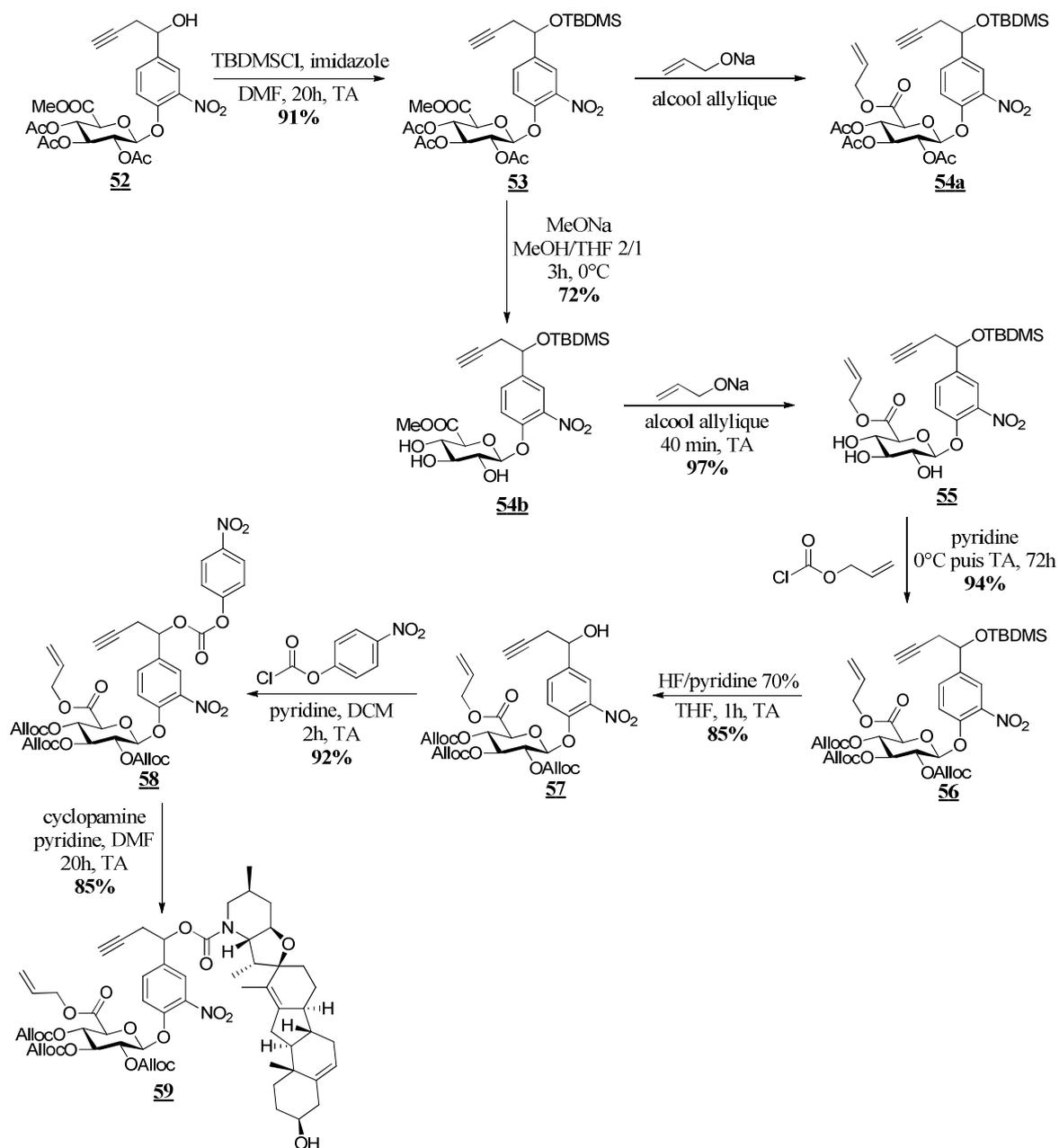


Figure 45 - Synthèse de l'intermédiaire **59**

Plusieurs essais ont ensuite été réalisés pour transestérifier de manière simultanée les acétates et l'ester de méthyle du motif glucuronide en présence d'allylate de sodium dans l'alcool allylique. Cependant, dans ces conditions, la déprotection des fonctions alcool du glucuronide n'a pas été observée et seul l'ester d'allyle **54a** a été obtenu. Nous avons donc tout d'abord procédé au clivage des acétates du glucuronide par du méthanolate de sodium dans un mélange THF/méthanol à 0°C. Cette réaction conduit à la formation du composé **54b** sous la forme de deux diastéréoisomères avec un bon rendement de 72%. L'ester de méthyle **54b** a ensuite été transestérifié par l'allylate de sodium dans l'alcool allylique pour conduire au composé **55** avec rendement de 97%. Le spectre RMN ^1H de **55** révèle la disparition du singulet à 3,80 ppm de l'ester de méthyle au profit de quatre multiplets à 5,97, 5,38, 5,30 et 4,75 ppm caractéristiques de l'ester d'allyle.

Les alcools libres du glucuronide ont été protégés sous forme de carbonate d'allyle en présence de chloroformiate d'allyle dans la pyridine. Après 72 heures de réaction, le composé **56** a été isolé avec un très bon rendement de 94%. L'éther silylé **56** a ensuite été clivé par un traitement avec HF/pyridine dans le THF afin d'obtenir l'alcool benzylique **57** avec un rendement de 85%. La déprotection de cet alcool a été confirmée par RMN ^1H du composé **57** et se traduit par la disparition des signaux à 0,89, 0,09 et -0,05 ppm du groupement *tert*-butyldiméthylsilyle.

L'alcool benzylique **57** est ensuite activé en présence de chloroformiate de *para*-nitrophényle et de pyridine dans le dichlorométhane. Cette réaction permet d'isoler le composé **58** avec un rendement de 92%. Enfin, la cycloamine est introduite par substitution nucléophile en présence de pyridine et le composé **59** est obtenu sous la forme de deux diastéréoisomères inséparables avec un bon rendement de 85%. L'introduction chimiosélective de la cycloamine par sa fonction amine secondaire est confirmée par analyse RMN ^{13}C du composé **59** montrant la présence de deux signaux à 153,9 et 153,5 tous deux caractéristiques de la fonction carbamate.

2.2.4 Synthèse de la chaîne latérale **62**

La chaîne latérale hydrosoluble **62** a été préparée en trois étapes à partir du pentaacétate de D-glucose selon la stratégie de synthèse décrite ci-dessous (**Figure 46**).¹⁰⁰

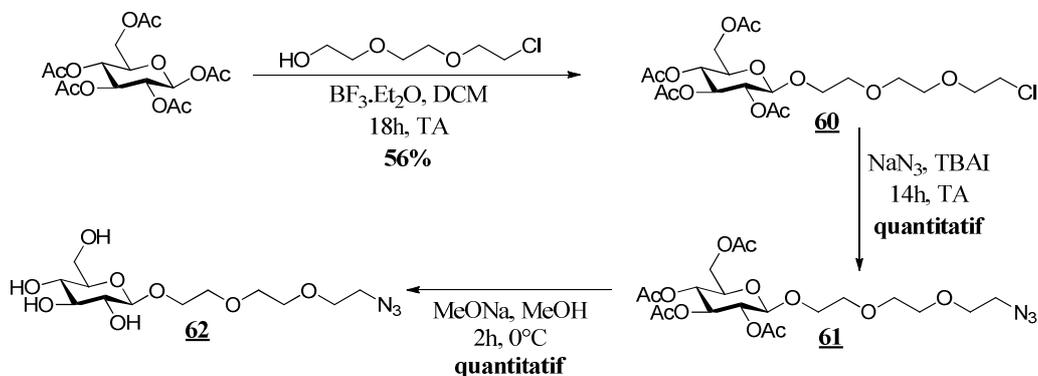


Figure 46 - Synthèse de la chaîne latérale **62**

Le pentaacétate de D-glucose et le 2-[2-(2-chloroéthoxy)-éthoxy]éthanol sont tout d'abord mis en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ dans le dichlorométhane. Le composé **60** est obtenu avec un rendement de 56% après purification du brut réactionnel par chromatographie sur gel de silice. Le spectre RMN ^1H de ce composé révèle la présence d'un doublet anomérique à 4,65 ppm avec une constante de couplage de 8,0 Hz indiquant l'anomérie β du sucre. Le dérivé chloré **60** est ensuite substitué par l'azoture de sodium en présence d'iodure de tétrabutylammonium dans le DMF. Dans ces conditions, l'azoture **61** est isolé de manière quantitative. Enfin, les acétates du motif glucose sont clivés par du méthanolate de sodium dans du méthanol à 0°C pour donner le composé **62** de manière quantitative.

2.2.5 Couplage par cycloaddition [3+2] et déprotection du composé **63**

Le couplage entre l'azoture **62** et l'alcyne **59** par une réaction de cyclisation [3+2] catalysée par le cuivre (I) a été réalisée en présence de $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6$ (**Figure 47**).¹⁰¹ Cette réaction permet d'isoler le composé **63** avec un bon rendement de 78%. Ce catalyseur présente l'avantage de pouvoir être utilisé dans le dichlorométhane, solvant dans lequel les composés **59**, **62** et **63** sont parfaitement solubles. De plus, la grande solubilité du composé **63** dans les

¹⁰⁰ Bouillon, C.; Meyer, A.; Vidal, S.; Jochum, A.; Chevotot, Y.; Cloarec, J.-P.; Praly, J.-P.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4700-4702.

¹⁰¹ Jean, M.; Le Roch, M.; Renault, J.; Uriac, P. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2663-2665.

solvants organiques usuels permet de le purifier de manière extrêmement simple par chromatographie flash sur gel de silice.

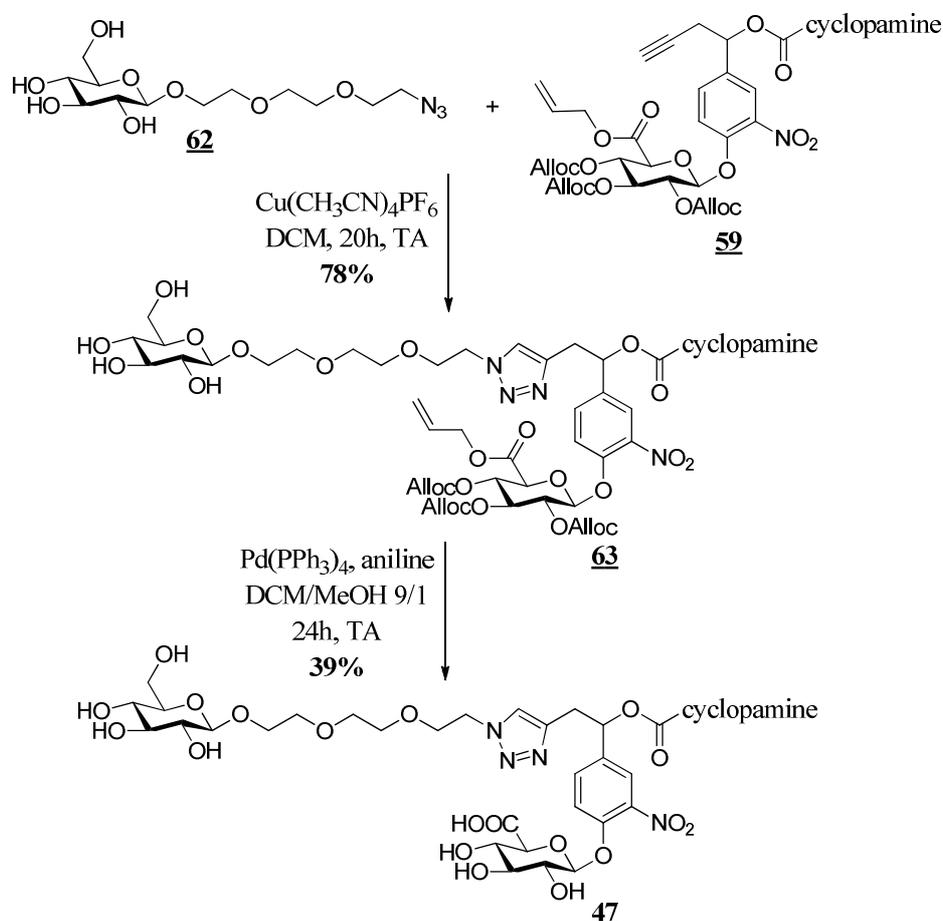


Figure 47 - Synthèse du vecteur **47**

La dernière étape de déprotection de l'ester et des carbonates d'allyle du motif glucuronide a été réalisée en présence de palladium-tétrakis(triphénylphosphine) et d'aniline dans un mélange dichlorométhane / méthanol 9/1. Le mécanisme de cette réaction prévoit tout d'abord l'addition oxydante du complexe de palladium(0) sur le carbonate d'allyle pour conduire à la formation d'un complexe π -allylique de palladium **64** et d'un anion alkoxycarboxylate **65**. Ce dernier donne l'alcoolate correspondant après la perte d'une molécule de CO_2 . Le complexe π -allylique de palladium subit ensuite l'attaque nucléophile de l'aniline générant ainsi la formation de l'alcool déprotégé, de la *N*-allylaniline et du palladium (0) (**Figure 48**).

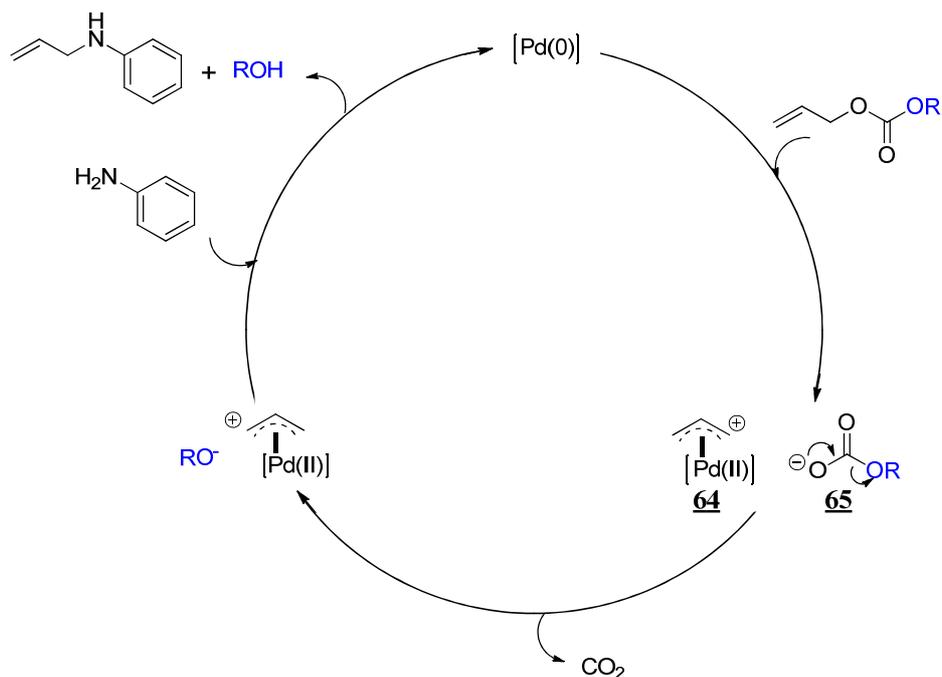


Figure 48 - Mécanisme de la réaction de déprotection des carbonates et de l'ester d'allyle

Cette réaction a permis d'obtenir le vecteur **47** avec un rendement de 39% et une pureté supérieure à 95% après purification par chromatographie semi-préparative. L'analyse RMN ^1H du composé **47** a montré la disparition des signaux caractéristiques des protons allyliques confirmant ainsi la déprotection totale du motif glucuronide.

2.3 Evaluation biologique du vecteur **47**

2.3.1 Hydrolyse enzymatique du vecteur 47

La stabilité du vecteur **47** a tout d'abord été évaluée dans un tampon phosphate (0,02 M ; pH=7) à 37°C pendant 24h. Dans ces conditions, aucune dégradation du composé n'a été détectée. L'hydrolyse enzymatique du vecteur **47** (0,1 mg/mL) a ensuite été effectuée à 37°C dans du tampon phosphate en présence de β -glucuronidase (*E. Coli* ; 133 U/mL). La composition du mélange réactionnel a été suivie au cours du temps par LC/MS (**Figure 49**).

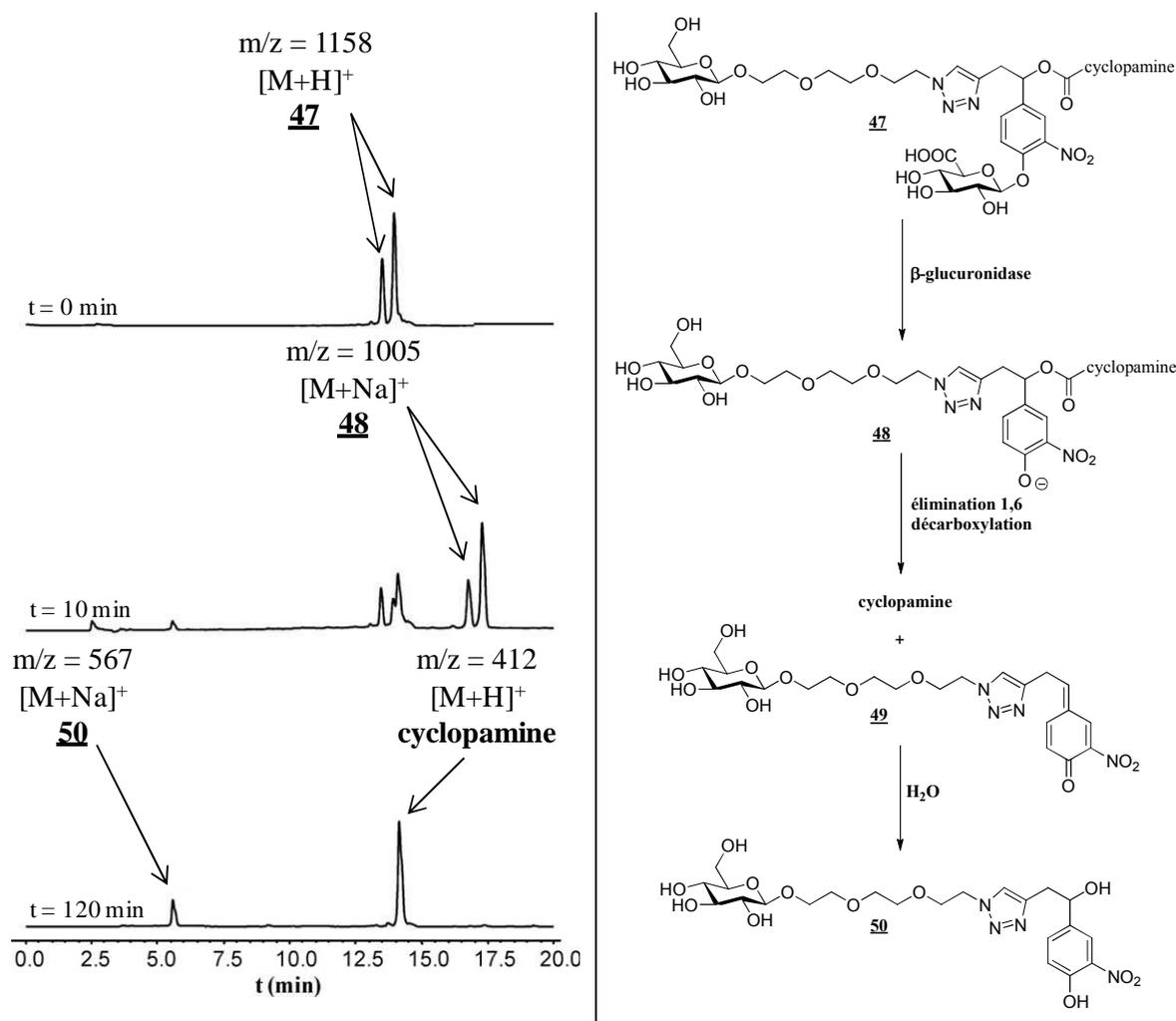


Figure 49 - Suivi de l'hydrolyse enzymatique du vecteur hydrosoluble **47**

Dans ces conditions, le vecteur **47** s'est avéré être un bon substrat de la β -glucuronidase, même en présence de groupements très encombrants tels que la cyclopamine et la chaîne poly(éthylène glycol) glycosylée. Après 10 minutes d'incubation en présence de l'enzyme, la cyclopamine et l'intermédiaire **48** sont détectés dans le milieu. Ce dernier disparaît totalement en moins de deux heures au profit de la libération de l'agent actif et de la formation de l'alcool benzylique **50**.

Ce résultat montre clairement que le vecteur **47** permet une libération de la cyclopamine beaucoup plus rapide que dans le cas du vecteur **45** (28 heures). De plus, la précipitation du phénolate **48** n'a pas été observée dans le milieu. Cet intermédiaire est donc plus soluble dans le tampon phosphate que son analogue **46** grâce à l'introduction de la chaîne latérale hydrophile.

2.3.2 Evaluation de l'activité antiproliférative du vecteur 47

L'activité antiproliférative du vecteur **47** a tout d'abord été évaluée en collaboration avec l'équipe du Pr. Jean-Marc Muller (CNRS FRE 3511, Université de Poitiers) sur des cellules de glioblastome de type U87, en présence ou en absence de β -glucuronidase dans le milieu de culture. L'activité cytotoxique du vecteur a été mesurée après cinq jours d'incubation (**Figure 50**).

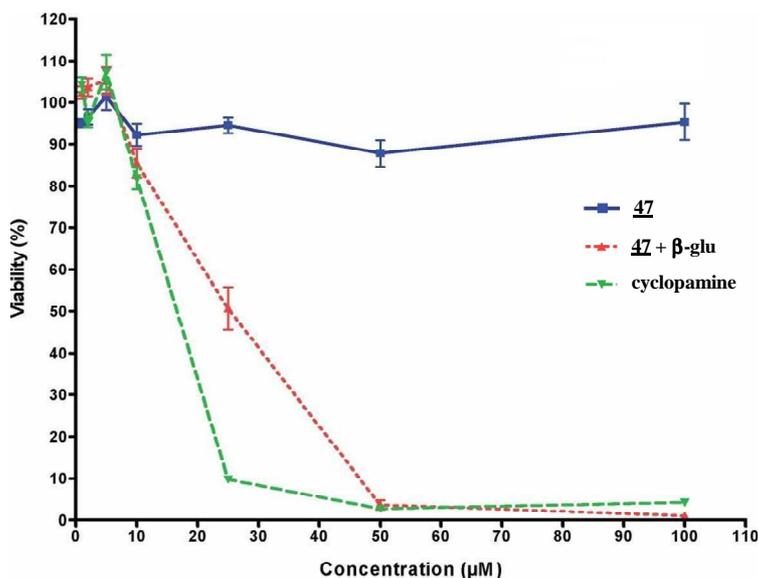


Figure 50 - Activité antiproliférative de **47** sur une lignée de cellules gliales U87

Incubé seul, le vecteur **47** n'affecte pas la viabilité des cellules jusqu'à la plus haute dose testée de 100 μM . En présence de l'enzyme, l'activité antiproliférative du vecteur **47** est restaurée avec une valeur d' IC_{50} comparable à celle enregistrée lors de l'utilisation de la cyclopatamine seule (IC_{50} **47** + β -glu : 24,5 μM ; IC_{50} cyclopatamine : 16,5 μM).

La destruction des cellules souches cancéreuses à l'origine des récurrences observées après ablation de la tumeur pourrait aboutir à des traitements plus efficaces du glioblastome multiforme. L'activité antiproliférative du vecteur **47** a donc été évaluée sur quatre lignées de cellules souches initiatrices du glioblastome multiforme prélevées chez des patients (**Figure 51**). Ces travaux ont été réalisés par l'équipe du Dr Lucie Karayan-Tapon (INSERM U935 Université de Poitiers - CHU Poitiers).

Alors que le témozolomide, molécule de référence indiquée contre les tumeurs cérébrales,¹⁰² exerce une action antiproliférative très faible contre cette population cellulaire (IC₅₀ moyen témozolomide : 503 μM), le vecteur **47**, incubé en présence de β-glucuronidase, est 110 fois plus actif avec une valeur de IC₅₀ comparable à celle de la cyclopamine (IC₅₀ **47** + β-glu : 4,6 μM ; IC₅₀ cyclopamine : 8,3 μM). En revanche, en l'absence de l'enzyme, le vecteur **47** ne présente pas de cytotoxicité jusqu'à la plus haute dose testée de 40 μM.

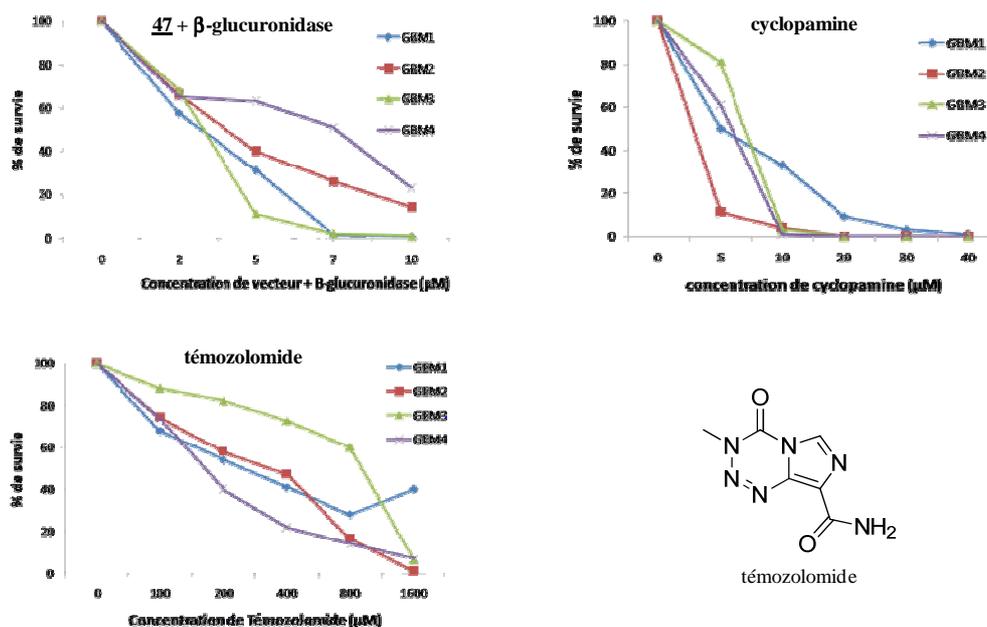


Figure 51 - Activité antiproliférative de **47** sur différentes lignées de cellules initiatrices du glioblastome prélevées chez des patients.

2.4 Conclusion

Lors de cette étude, deux nouveaux vecteurs glucuronylés ont été synthétisés. Un vecteur de la MMAE **34** a tout d'abord été conçu pour pallier la faible activité de la β-glucuronidase dans le microenvironnement tumoral. Les résultats obtenus lors de cette étude montrent, qu'en absence de β-glucuronidase, le vecteur **34** est significativement moins toxique que la MMAE sur différentes lignées cellulaires cancéreuses. En revanche lorsque l'enzyme est additionnée au milieu de culture, le vecteur **34** retrouve une cytotoxicité comparable à celle de la MMAE utilisée seule. Une première évaluation de l'efficacité thérapeutique du vecteur **34** a été réalisée sur un modèle de tumeur pulmonaire d'origine murine implanté chez

102 (a) Nagasawa, D. T.; Chow, F.; A. Yew; W. Kim; N. Cremer; I. Yang *Neurosurg. Clin. N. Am.* **2012**, *23*, 307-322. **(b)** Bower, M.; Newlands, E. S.; Bleehen, N. M.; Brada, M.; Begent, R.J.; Calvert, H.; Colquhoun, I.; Lewis, P.; Brampton, M. H. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1997**, *40*, 484-488.

la souris. Le vecteur de la MMAE présente une efficacité thérapeutique similaire à celle de HMR 1826 et ce, à une dose 238 fois plus faible. Ce résultat est très encourageant et montre donc la validité de notre approche. A la dose utilisée, l'activité anticancéreuse du vecteur **34** reste néanmoins modeste puisque la régression de la masse tumorale n'est que de 25% par rapport au groupe témoin. Ces travaux devront donc être poursuivis avec de nouvelles études *in-vivo* qui permettront de déterminer la dose à laquelle l'activité anticancéreuse du vecteur **34** sera maximale.

Ces travaux ont aussi permis l'étude d'un nouveau vecteur glucuronylé de la cyclopamine **47**, un inhibiteur de la voie de signalisation Hedgehog actif contre les cellules souches cancéreuses à l'origine du caractère hautement invasif du glioblastome multiforme. Ce vecteur comporte une chaîne latérale hydrosoluble permettant de contourner les problèmes de solubilité rencontrés lors de l'étude du premier vecteur glucuronylé de la cyclopamine **45**. Il a ainsi été montré que l'hydrolyse enzymatique de ce nouveau vecteur **47** en présence de β -glucuronidase conduit à la libération de la cyclopamine environ 14 fois plus rapidement que pour son analogue **45** (2 heures vs. 28 heures). La cinétique de décomposition du vecteur **47** devient alors compatible avec son utilisation chez l'animal. L'évaluation de l'activité antiproliférative du vecteur **47** a été réalisée sur une lignée de cellules de glioblastome U87 ainsi que sur quatre types de cellules souches initiatrices du glioblastome prélevées chez des patients. Incubé seul, le vecteur ne possède pas d'activité cytotoxique au plus fortes doses testées, alors qu'en présence de β -glucuronidase, l'activité de **47** est comparable à celle de la cyclopamine. De plus, le vecteur est 110 fois plus actif que le témozolomide utilisé cliniquement sur ces derniers échantillons. Ces résultats très prometteurs ont conduit à une évaluation de l'activité thérapeutique du vecteur **47** sur des tumeurs gliales chez la souris. Cette étude est actuellement en cours. L'activité antiproliférative du vecteur **47** sur des cellules souches initiatrices du glioblastome en combinaison à la radiothérapie est elle aussi étudiée. Ces travaux permettront à terme de développer de nouvelles voies pour un traitement plus efficace et plus sélectif du glioblastome multiforme.

**CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT DE
VECTEURS GLUCURONYLES « SUPER-
CIBLES »**

1. Introduction

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les vecteurs glucuronylés ont un temps de demi-vie plasmatique limitant leur utilisation *in vivo*. Ces composés présentent un caractère hydrophile marqué ainsi qu'une masse moléculaire faible et sont éliminés rapidement par le rein. En effet, la glucuronylation est un mécanisme de détoxification utilisé chez les animaux afin d'excréter plus facilement les substances toxiques de l'organisme.

Pour résoudre ce problème, le couplage de vecteurs glucuronylés à des macromolécules peut être une alternative particulièrement intéressante. En effet, les macromolécules de masse moléculaire supérieure à 40 kDa sont reconnues pour ne pas être éliminées efficacement par les reins.¹² Ainsi des vecteurs glucuronylés macromoléculaires devraient présenter un temps de demi-vie plasmatique accrue par rapport à leurs homologues de faible poids moléculaire. De plus, cette stratégie pourrait également permettre de contourner le problème associé à la faible activité de la β -glucuronidase dans le microenvironnement tumoral en augmentant la rétention du vecteur dans la zone à traiter par effet EPR (Enhanced Permeability and Retention).

A l'image des vecteurs de la doxorubicine PK1 (**Figure 7**) et **4** (**Figure 10**), plusieurs types de macromolécules tels que des polymères, des dendrimères et des liposomes ont été utilisés pour véhiculer des agents anticancéreux. Cependant, nous pouvons nous interroger sur le devenir et la possible toxicité de ces macromolécules synthétiques après la libération de l'agent cytotoxique. Des macromolécules naturelles telles que l'albumine ont, elles aussi, été utilisées pour le transport de composés actifs. A titre d'exemple, l'Abraxane® (commercialisé par Celgene) est une formulation injectable de paclitaxel encapsulé dans des nanoparticules d'albumine indiquée pour le traitement du cancer du sein métastatique.¹⁰³

De nombreux paramètres telles qu'une masse moléculaire élevée (66,5 kDa), une durée de demi-vie plasmatique importante (19 jours), une bonne stabilité dans les milieux biologiques et une grande abondance dans le plasma (40 g/L en moyenne ; 60% des protéines plasmatiques) font de l'albumine endogène un très bon candidat pour le transport et le ciblage

103 Miele, E.; Spinelli, G. P.; Miele, E.; Tomao, F.; Tomao, S. *Int. J. Nanomedicine* **2009**, *4*, 99-105.

passif d'agents anticancéreux.¹⁰⁴ L'équipe du Professeur Kratz a tiré profit de cette protéine plasmatique pour proposer un nouveau concept basé sur le couplage sélectif de composés de faibles poids moléculaires au résidu cystéine 34 de l'albumine endogène. Cette réaction de couplage a lieu directement dans le plasma du patient après injection par intraveineuse du vecteur. Cette stratégie présente plusieurs avantages. Elle permet de former un conjugué uniforme en contrôlant le nombre de molécules actives liées à l'albumine. De plus, les vecteurs utilisés dans ce cadre sont faciles d'accès et peuvent être préparés en utilisant des techniques classiques de synthèse organique. Enfin, cette stratégie permet d'éviter une possible réponse immunogénique liée à l'utilisation d'albumine exogène.

Afin d'exploiter ce concept, l'équipe de Kratz a développé un vecteur acido-sensible de la doxorubicine DOXO-EMCH (**Figure 52**).¹⁰⁵ DOXO-EMCH est capable de se lier rapidement et de façon covalente à l'albumine plasmatique par l'intermédiaire d'une réaction de Michael entre la cystéine 34 de l'albumine et le motif maléimide porté par le vecteur. La macromolécule ainsi formée s'accumule de manière sélective au niveau de la zone tumorale par effet EPR. La doxorubicine est alors libérée après hydrolyse du lien hydrazone catalysée par le pH acide du microenvironnement tumoral ou après internalisation par endocytose.

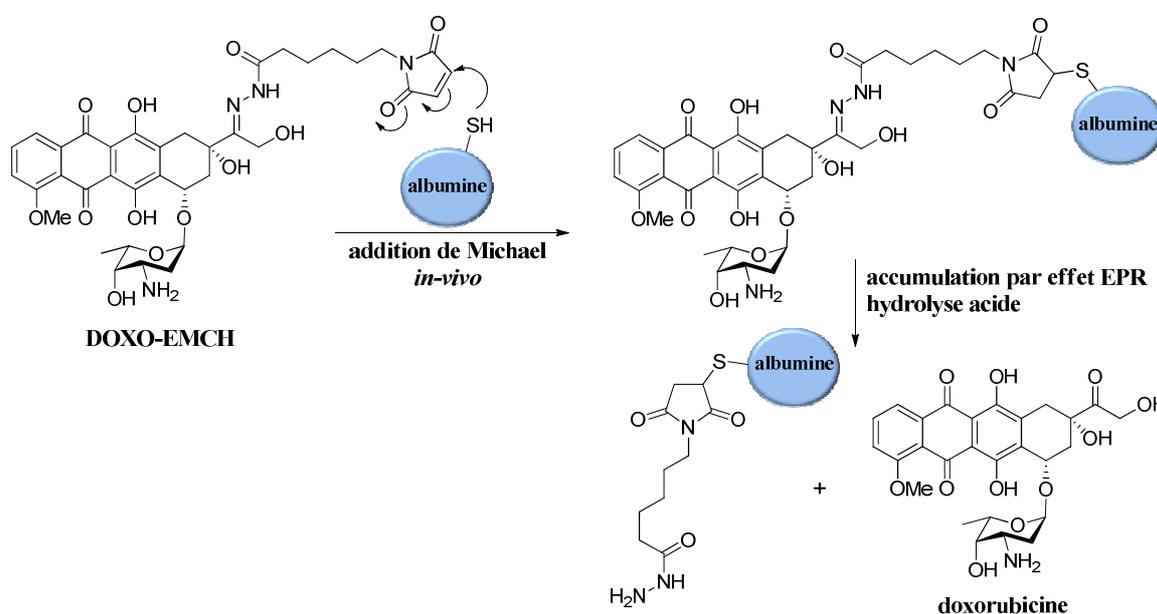


Figure 52 - Structure de DOXO-EMCH et mécanisme de libération de la doxorubicine

104 (a) Kratz, F. J. *Control. Release* **2008**, *132*, 171-183. (b) Elsadek, B.; Kratz, F. J. *Control. Release* **2012**, *157*, 4-28.

105 Kratz, F.; Warnecke, A.; Scheuermann, K.; Stockmar, C.; Schwab, J.; Lazar, P.; Drückes, P.; Esser, N.; Dreves, J.; Rognan, D.; Bissantz, C.; Hinderling, C.; Folkers, G.; Fichtner, I.; Unger, C. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5523-5533.

L'évaluation biologique de DOXO-EMCH a tout d'abord été effectuée sur des tumeurs de carcinome mammaire de type MDA-MB-435 et MCF-7 implantées chez la souris nude ainsi que sur un modèle murin de tumeur rénale de type RENCA. Dans tous les cas, ce vecteur présente une meilleure activité anticancéreuse que la doxorubicine à des doses seulement deux à trois fois supérieures à celle utilisée pour la drogue seule. Ces résultats prometteurs ont conduit à l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de DOXO-EMCH dans une étude clinique de phase I¹⁰⁶ et fait actuellement l'objet d'une étude clinique de phase II. Ce concept a ensuite été étendu à la vectorisation de différentes molécules cytotoxiques dont des dérivés du *cis*-platine¹⁰⁷ et de la camptothécine.¹⁰⁸

Bien que DOXO-EMCH présente une bonne efficacité anticancéreuse, ce composé possède une DMT seulement 3 à 4,5 fois supérieure à celle de la doxorubicine chez la souris (A titre d'exemple, HMR 1826 est 80 fois moins toxique que la doxorubicine). Cette faible différence de toxicité entre vecteur et agent cytotoxique peut s'expliquer par l'hydrolyse peu sélective de la fonction hydrazone dans l'organisme.

Il a ainsi été montré sur des xénogreffes de tumeurs ovariennes de type A2780 chez la souris nude, que l'administration de DOXO-EMCH à la dose maximale tolérée (3×24 mg/kg en équivalent doxorubicine) entraîne la régression totale de masse tumorale mais s'accompagne de lourds effets secondaires se traduisant par une perte de poids des souris de l'ordre de 31%.¹⁰⁹ La doxorubicine (2×8 mg/kg) ne présente, quant à elle, qu'un effet modéré sur la croissance tumorale et provoque une perte de poids de 21%. Pour pallier ces lourds effets secondaires, les auteurs ont proposé d'administrer en combinaison ces deux composés à des doses deux fois moindres (DOXO-EMCH : 3×12 mg/kg ; doxorubicine : 3×4 mg/kg ; injections hebdomadaires). Ce protocole de traitement a permis d'obtenir la rémission totale des tumeurs ainsi traitées avec une perte de poids de seulement 12%.

Pour améliorer la sélectivité avec laquelle l'agent cytotoxique sera libéré, des systèmes permettant le double ciblage des défauts d'architectures liés à la néo-angiogénèse et des enzymes surexprimées dans le microenvironnement tumoral ont été développés. L'équipe de

106 Unger, C.; Häring, B.; Medinger, M.; Drevs, J.; Steinbild, S.; Kratz, F.; Mross, K. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4858-4866.

107 (a) Warnecke, A.; Fichtner, I.; Garmann, D.; Jaehde, U.; Kratz, F. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1349-1359.

(b) Garmann, D.; Warnecke, A.; Kalayda, G. V.; Kratz, F.; Jaehde, U. *J. Control. Release* **2008**, *13*, 100-106

108 Warnecke, A.; Kratz, F. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 377-387.

109 Kratz, F.; Fichtner, I.; Graeser, R. *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 1743-1749.

Kratz s'est ainsi intéressée au ciblage des protéases naturellement surexprimée dans les tumeurs solides. Dans ce cadre, des vecteurs de la doxorubicine et de la camptothécine ont été conçus afin d'être sélectivement activés par une large variété d'enzymes protéolytiques telles que la cathepsine B,¹¹⁰ des métalloprotéases matricielles de type 2 et 9,¹¹¹ la PSA (prostate-specific antigen)¹¹² ainsi que la uPA (urokinase-type-plasminogen activator), une protéase surexprimée dans le cas de tumeurs mammaires, ovariennes ou cervicales.¹¹³ Un des exemples les plus récents est l'étude du vecteur **66** se couplant *in-vivo* à l'albumine plasmatique et pouvant être activé par la cathepsine B par l'intermédiaire du dipeptide Phe-Lys spécifiquement reconnu par cette enzyme (**Figure 53**).¹¹⁴

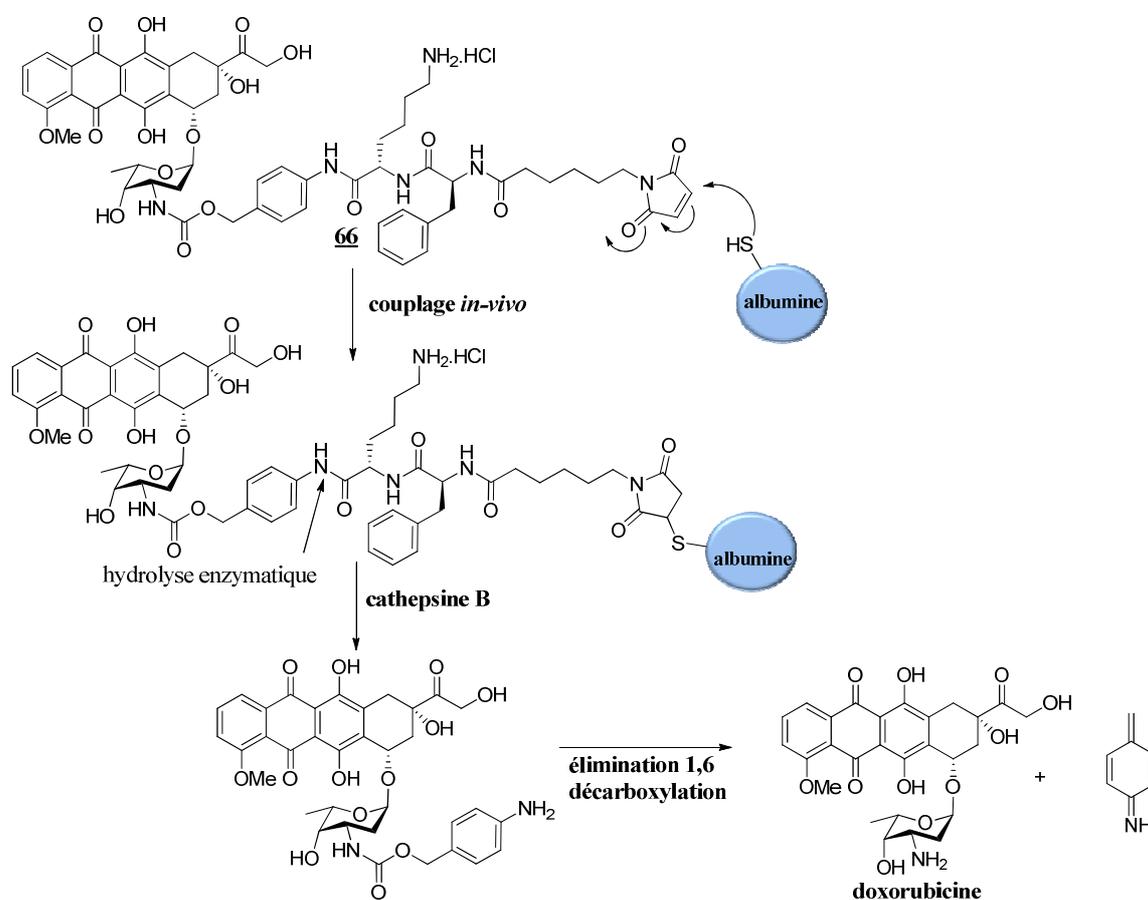


Figure 53 - Structure et mode d'action du vecteur de la doxorubicine **66**

110 Schmid, B.; Chung, D.-E.; Warnecke, A.; Fichtner, I.; Kratz, F. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 702-716.

111 Kratz, F.; Dreves, J.; Bing, G.; Stockmar, C.; Scheuermann, K.; Lazar, P.; Unger, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2001-2006.

112 (a) Elsadek, B.; Graeser, R.; Warnecke, A.; Unger, C.; Saleem, T.; El-Melegy, N.; Madkor, H.; Kratz, F. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 234-238. (b) Elsadek, B.; Graeser, R.; Esser, N.; Schäfer-Obodozie, C.; Abu Ajaj, K.; Unger, C.; Warnecke, A.; Saleem, T.; El-Melegy, N.; Madkor, H.; Kratz, F. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 3434-3444. (c) Graeser, R.; Chung, D.-E.; Esser, N.; Moor, S.; Schächtele C.; Unger, C.; Kratz, F. *Int. J. Cancer*, **2008**, *122*, 1145-1154.

113 Chung, D.-E.; Kratz, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5157-5163.

114 Abu Ajaj, K.; Graeser, R.; Fichtner, I.; Kratz, F. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2009**, *64*, 413-418.

Ainsi, après couplage avec l'albumine plasmatique, le vecteur sera alors accumulé au niveau de la tumeur par effet EPR puis activé par la cathepsine B pour conduire à la libération de la doxorubicine active après immolation du bras espaceur. L'efficacité thérapeutique du vecteur **66** a été démontrée lors de tests réalisés sur des xénogreffes de tumeur mammaires (MDA-MB-231) chez la souris nude. L'usage du vecteur **66** à des doses trois fois supérieures à la dose maximale tolérée pour la doxorubicine a conduit à une réponse anti-tumorale bien supérieure à celle enregistrée pour la drogue seule.¹¹⁴

La conception de vecteurs bi-fonctionnels incorporant deux agents anticancéreux différents et pris en charge par l'albumine plasmatique par l'intermédiaire d'un motif maléimide a elle aussi été étudiée. A titre d'exemple, le vecteur **67** permet la libération d'une molécule de doxorubicine et d'une molécule de paclitaxel après une double activation par la cathepsine B (**Figure 54**).¹¹⁵

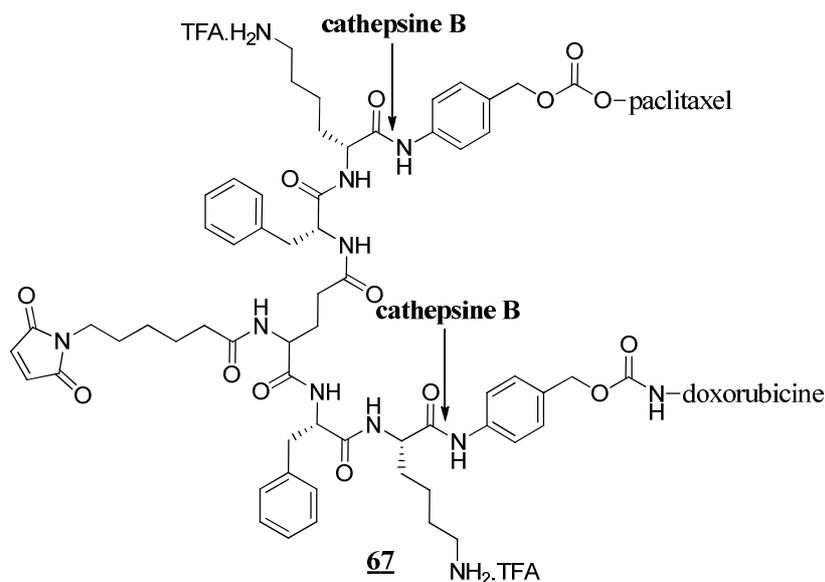


Figure 54 - Structure du vecteur **67**

Alors que le pH optimum de la cathepsine B est de 3,5,¹¹⁶ la quantité d'espèce active libérée après activation enzymatique des vecteurs **66** et **67** sera limitée par la faible activité de l'enzyme dans le microenvironnement tumoral (pH compris entre 6 et 6,5). Cette stratégie d'activation est cependant plus adaptée pour des vecteurs pouvant être internalisés par endocytose dans les cellules tumorales, à l'image du conjugué drogue-anticorps Bretuximab

¹¹⁵ Abu Ajaj, K.; Biniossek, M. L.; Kratz, F. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 390-396.

¹¹⁶ Butor, C.; Griffiths, G.; Aronson, Jr, N. N.; Varki, A. *J. Cell Sci.* **1995**, *108*, 2213-2219.

Vedotin (**Figure 4**). En effet, une fois internalisé, le vecteur demeurera plus longtemps en présence de l'enzyme et le pH plus acide rencontré dans les lysosomes permettra une activation plus efficace.

L'ensemble de ces travaux montre que le transport de vecteurs de molécules anticancéreuses par l'albumine plasmatique est un concept extrêmement prometteur dans le cadre du ciblage thérapeutique permettant de cibler simultanément plusieurs particularités tumorales. Dans ce cadre, le vecteur de la doxorubicine **68** ciblant la β -glucuronidase et mettant à profit les défauts de vascularisation liés à la néo-angiogénèse tumorale a été conçu (**Figure 55**).¹¹⁷

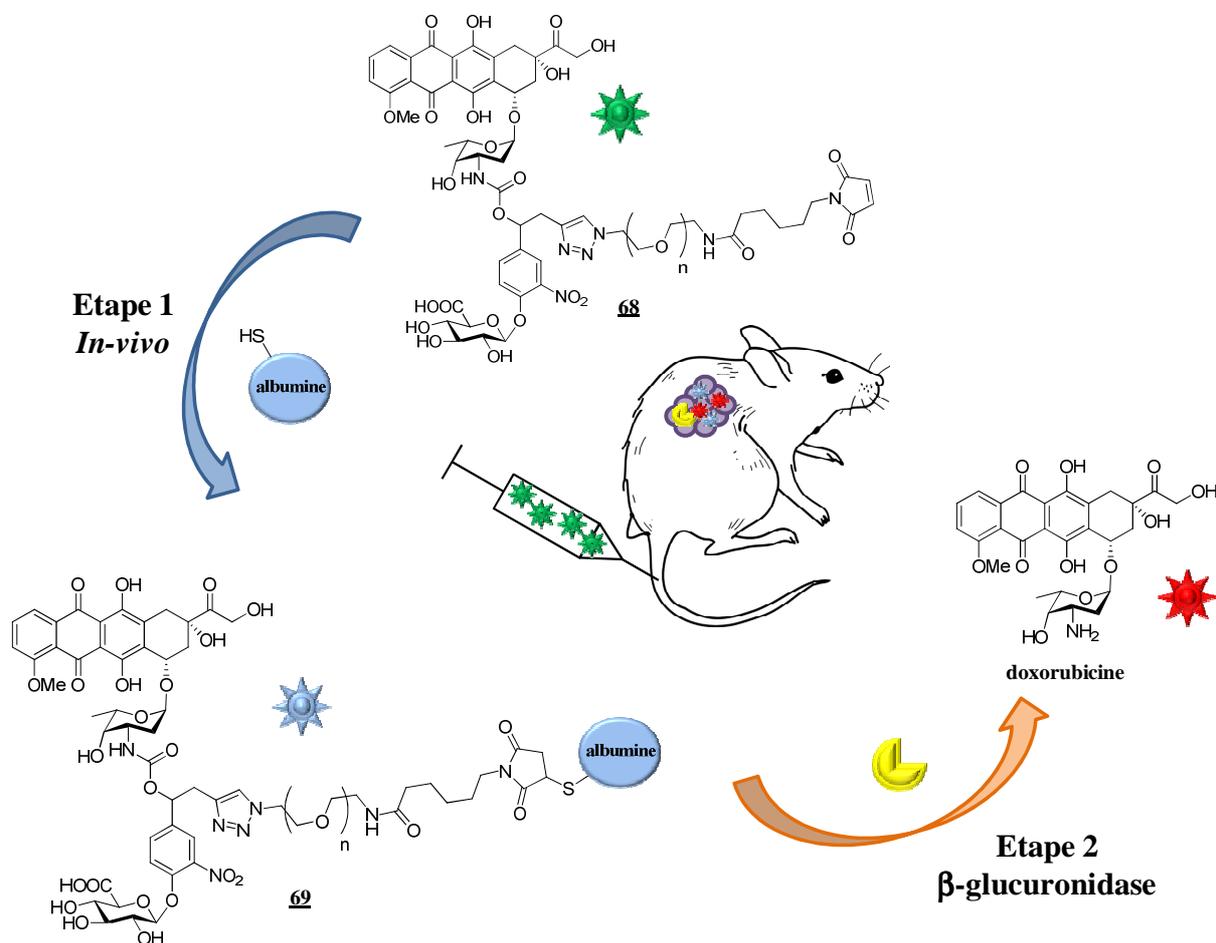


Figure 55 - Structure et mode d'action du vecteur **68**

Ce vecteur comporte un déclencheur enzymo-sensible de type glucuronide, une unité doxorubicine, ainsi qu'un groupement maléimide relié à l'unité centrale par une chaîne

¹¹⁷ Legigan, T.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Berjeaud, J.-M.; Guilhot, F.; Papot, S. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4516-4520.

hydrosoluble de type poly(éthylène glycol). Après administration par voie intraveineuse, **68** peut réagir avec la fonction thiol de la cystéine 34 de l'albumine plasmatique *via* une addition de Michael sur le motif maléimide pour former le vecteur macromoléculaire **69**.

En raison de sa masse moléculaire élevée, le vecteur macromoléculaire "super-ciblé" **69** devrait posséder un temps de demi-vie plasmatique bien supérieur à celui généralement observé pour les vecteurs glucuronylés classiques tel que HMR 1826. De plus, le composé **69** pourra s'accumuler de manière sélective au niveau du microenvironnement tumoral par effet EPR où il sera activé par la β -glucuronidase pour libérer une molécule active de doxorubicine. Enfin, la rétention accrue du conjugué **69** dans les tissus cancéreux devrait permettre de pallier la faible activité de la β -glucuronidase.

2. Synthèse des vecteurs **68a** et **68b**

Pour favoriser l'administration de molécules actives par i.v. chez l'animal, il peut s'avérer nécessaire d'incorporer des motifs hydrosolubles tels que des chaînes PEG (polyéthylène glycol) à la structure de ces composés pour s'assurer d'une bonne solubilisation. De plus, comme nous l'avons vu pour le vecteur de la cycloamine **47**, l'hydrosolubilité des vecteurs a un effet important sur la cinétique d'élimination des agents anticancéreux. Dans ce cadre, les vecteurs **68a** et **68b** ont été synthétisés. Ces composés se différencient par le nombre d'unité éthylène glycol composant leurs chaînes latérales. Ainsi, **68a** présente une chaîne latérale composée de trois unités éthylène glycol alors que **68b** en possède dix. Il sera alors possible de comparer l'hydrosolubilité de ces composés et de définir lequel des deux sera le meilleur candidat pour les tests biologiques.

2.1 Première Stratégie de synthèse

2.1.1 Schéma rétrosynthétique

La première stratégie de synthèse étudiée pour préparer les vecteurs **68a** et **68b** est identique à celle décrite pour le vecteur de la cycloamine **47** (Figure 56). **68a** et **68b** pourront être formés après couplage de l'alcyne **75** et des azotures **73a** et **73b** par une réaction

de cycloaddition [3+2] catalysée par le cuivre (I) puis déprotection du motif glucuronide. L'intermédiaire **75** pourra quant à lui être obtenu après l'introduction de la doxorubicine sur le carbonate mixte **58** décrit précédemment. Enfin, les azotures **73a** et **73b** pourront être préparés par couplage peptidique entre les amines **72a** et **72b** et l'ester de *N*-hydroxysuccinimide intermédiaire **71**.

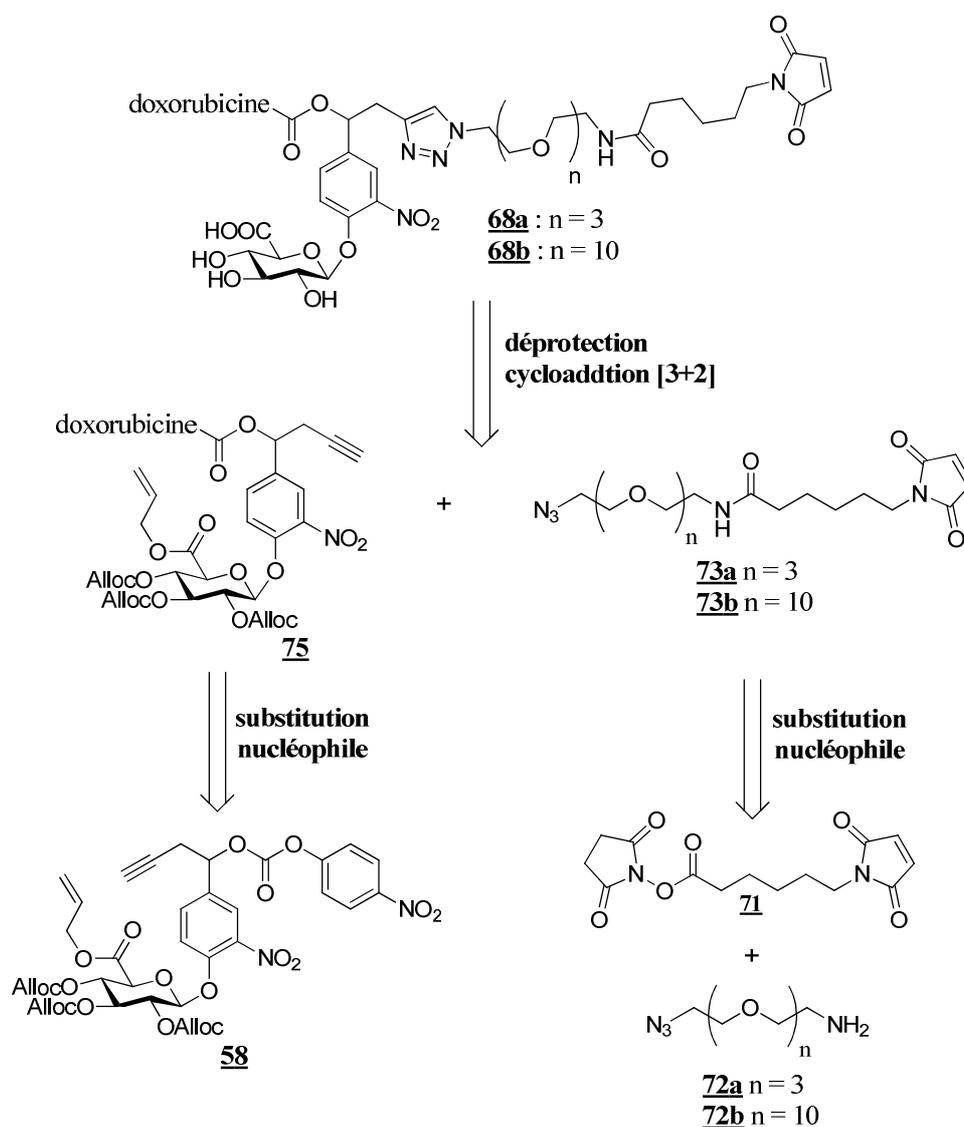


Figure 56 - Stratégie de synthèse pour les vecteurs **68**

2.1.2 Résultats obtenus lors de la première stratégie de synthèse

L'ester de *N*-hydroxysuccinimide **71** a été préparé en deux étapes "one-pot" à partir de l'anhydride maléique commercial selon la méthode décrite par Song¹¹⁸ (**Figure 57**).

¹¹⁸ Song, H. Y.; Ngai M. H.; Song, Z. Y.; MacAry, P. A.; Hopley, J.; Lear, M. J.; *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3400-3406.

L'ouverture de l'anhydride cyclique par l'acide 6-aminohexanoïque conduit tout d'abord au diacide **70**. Celui-ci est ensuite mis en présence de NHS et d'EDC à 35°C afin d'obtenir l'intermédiaire **71** avec un rendement de 63% sur deux étapes.

La formation du composé **71** a été confirmée par analyse RMN ¹H. Celle-ci se traduit par la présence d'un singulet à 6,67 ppm correspondant aux deux protons éthyléniques du groupement maléimide ainsi que d'un singulet large à 2,81 ppm, caractéristique des quatre protons du motif *N*-hydroxysuccinimide.

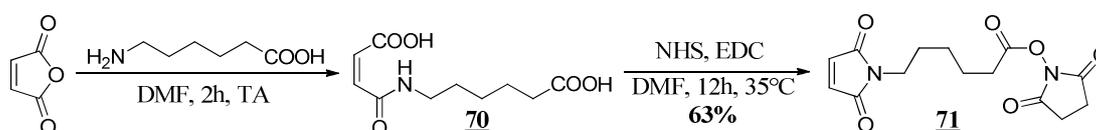


Figure 57 - Synthèse de l'intermédiaire **71**

De nombreux essais ont ensuite été réalisés pour synthétiser l'azoture **73a** à partir de l'ester de NHS **71** et de l'amine **72a** (Figure 58). Cependant, malgré les différentes conditions testées (solvants, température, présence ou non d'agents d'activation), l'obtention de bruts complexes n'a pas permis d'isoler le composé recherché.

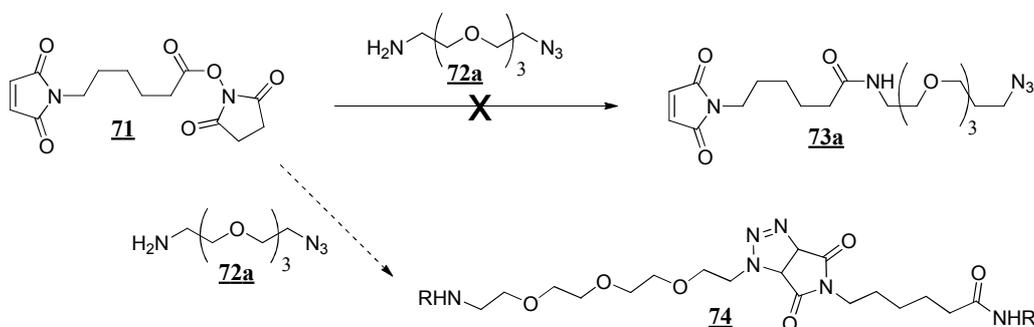


Figure 58 - Synthèse de l'azoture **73a**

Par contre, la formation de nombreux sous-produits a été observée et peut être expliquée par la possible réaction de cycloaddition [3+2] entre l'azoture et le maléimide conduisant à la formation de 1,2,3-triazolines complexes représentées par le composé **74**.¹¹⁹ A titre d'exemple, l'équipe de Garner a exploité cette réaction pour synthétiser plusieurs

119 (a) Guerin, D. J.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2134-2136. (b) Quayle, J. M.; Slawin, A. M. Z.; Philp, D. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7229-7233. (c) Garner, P.; Sunitha, K.; Shanthilal, T. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3525-3528.

triazolines, dans des conditions similaires à celle que nous avons étudiées, avec de très bons rendements (**Figure 59**).¹²⁰

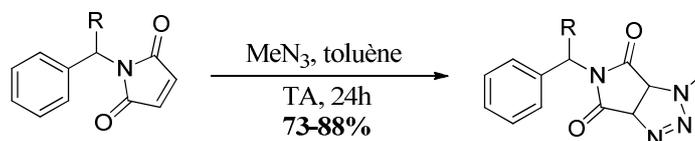


Figure 59 - Synthèse de triazolines décrite par Garner (R = H ; CO₂Me ; CH₂OH ; CH₂OAc ; CH₂OTBDMS)

2.2 Deuxième stratégie de synthèse

Une deuxième stratégie de synthèse a été mise en place afin d'éviter la formation de dérivés de type 1,2,3-triazoline. Le groupement maléimide pourra, dans ce cas, être introduit par une réaction de substitution nucléophile entre l'ester de NHS **71** et les amines primaires **76a** et **76b** (**Figure 60**). Une stratégie similaire a été adoptée avec succès par Senter lors de la préparation de vecteurs glucuronylés présentant un groupement maléimide.⁸⁰

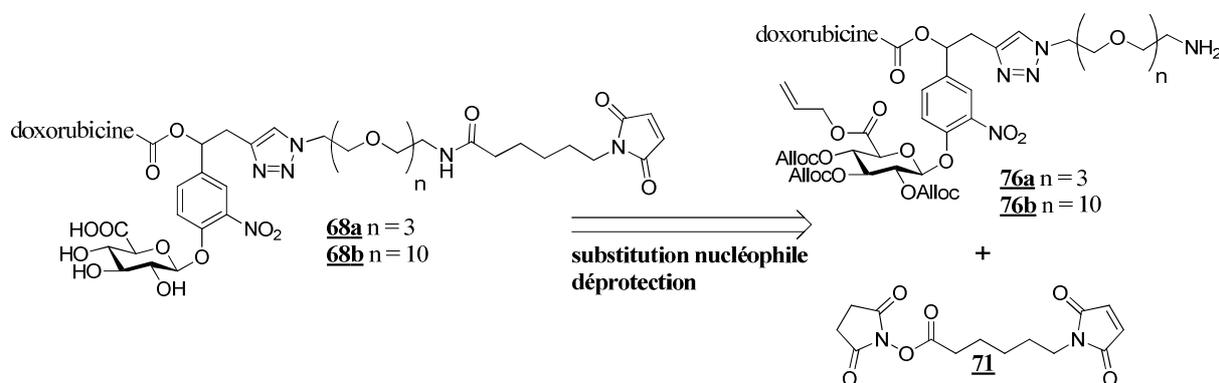


Figure 60 – Seconde stratégie de synthèse pour la préparation des vecteurs **68a** et **68b**

Tout d'abord, la doxorubicine a été introduite sur le carbonate **58** par réaction de substitution nucléophile en présence de triéthylamine et de HOBt dans le DMF. Cette réaction permet d'obtenir le composé **75** sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères avec un bon rendement de 83%. Les azotures **72a** et **72b** ont ensuite été couplés au composé **75** par une réaction de cycloaddition [3+2] catalysée par Cu(CH₃CN)PF₆ dans le dichlorométhane (**Figure 61**).

¹²⁰ Garner, P.; Ho, W. B.; Grandhee, S. K.; Youngs, W. J.; Kennedy, V. O. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5893-5903.

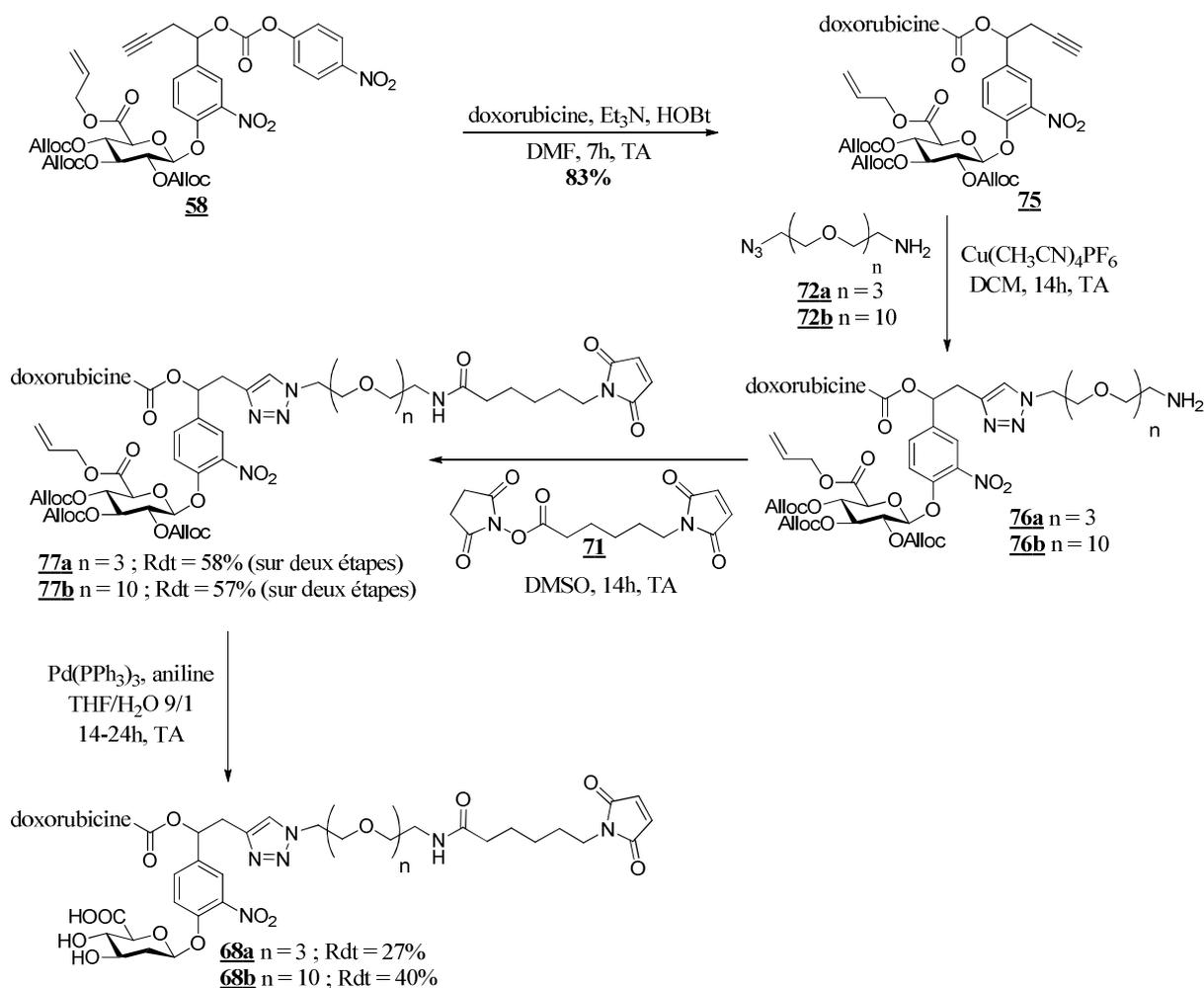


Figure 61 - Synthèse des vecteurs **68a** et **68b**

A ce stade, une étape de complexation du cuivre s'est avérée nécessaire. En effet, le cuivre (II) issu de la réaction de cycloaddition se complexe fortement au motif anthraquinonique de la doxorubicine pour former un complexe violet pouvant précipiter dans le milieu réactionnel.¹²¹ Ce phénomène est bien connu et semble être à l'origine de la cardiotoxicité des anthracyclines lorsque celles-ci sont complexées par des cations métalliques présents dans l'organisme comme le fer (II) et (III). Ces complexes peuvent ainsi générer des radicaux libres endommageant de manière irréversible les cellules cardiaques.¹²² Cette étape de décomplexation a été réalisée en présence par d'EDTA disodique en solution dans du tampon phosphate (0,2 M ; pH 7,2). L'utilisation d'un tampon phosphate est nécessaire pour éviter la dégradation des composés **76a** et **76b**. En effet, des conditions trop

121 (a) Feng, M.; Yang, Y.; He, P.; Fang, Y. *Spectrochim. Acta A* **2000**, *56*, 581-587. (b) Jung, K.; Reszka, R. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2001**, *49*, 87-105.

122 (a) Cakir, S.; Biçer, E.; Coşkun, E.; Cakir, O. *Bioelectrochemistry* **2003**, *60*, 11-19. (b) Beralso, H.; Garnier-Suillerot, A.; Tosi, L.; Lavelle, F. *Biochemistry* **1985**, *24*, 284-289.

basiques entraînent, par exemple, une réaction d'élimination 1,4 aboutissant à la formation de l'aglycone **78** et du sucre **79** (Figure 62).

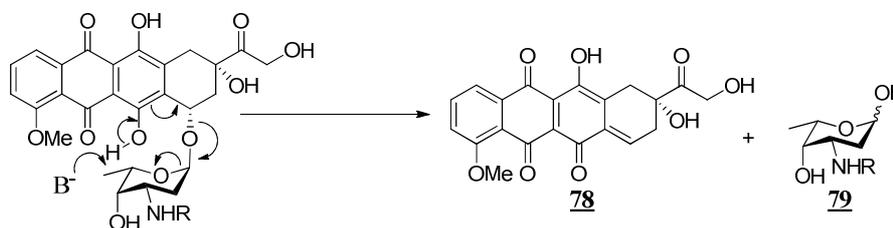


Figure 62 – Décomposition de la doxorubicine en milieu basique

Après décomplexation du cuivre, les triazoles **76a** et **76b** sont directement remis en réaction en présence de l'ester de NHS **71** dans le DMSO. Cette réaction de substitution nucléophile conduit à la formation des vecteurs protégés **77a** et **77b** sous la forme de deux diastéréoisomères avec des rendements respectifs de 58 et 57% (calculés sur deux étapes). L'introduction de la chaîne latérale a été confirmée par spectrométrie de masse haute résolution ainsi que par RMN ^1H avec l'apparition d'un singulet à 6,69 ppm caractéristique des protons éthyléniques du groupement maléimide.

Enfin, la déprotection du motif glucuronide a été réalisée en une étape en présence de palladium (0) tetrakis-triphénylphosphine et d'aniline dans un mélange THF/ H_2O . Les vecteurs **68a** et **68b** sont obtenus sous la forme de deux diastéréoisomères avec des rendements respectifs de 27 et 40% et une pureté supérieure à 95% après purification par chromatographie semi-préparative.

3. Evaluations biologiques du vecteur **68b**

Des tests préliminaires ont montré que seul le vecteur **68b** possédant la chaîne poly(éthylène glycol) la plus longue, présentait une solubilité suffisante dans un mélange PBS/DMSO 10% pour être administré chez l'animal (Solubilité **68a** : <10 mg/mL ; Solubilité **68b** : >20 mg/mL). Ce vecteur a donc été retenu pour poursuivre notre étude.

3.1 Hydrolyse enzymatique de **68b**

68b (0,1 mg/mL) a été incubé à 37°C dans du tampon phosphate (0,02M, pH = 7) en présence d'albumine plasmatique humaine (15,9 mg/mL) pour démontrer la formation du vecteur macromoléculaire **69** (Figure 55). La composition de la solution a été suivie par HPLC. Après deux heures d'incubation, plus de 90% du vecteur **68b** ont réagi avec l'albumine plasmatique. Ce phénomène se traduit par la disparition progressive des deux pics correspondant aux deux diastéréoisomères de ce vecteur. La cinétique de formation du composé **69** est donc compatible avec le temps de demi-vie plasmatique des vecteurs glucuronylés tels que HMR 1826 (généralement compris entre 0,4 et 2,6 heures).⁴⁴

Cinq heures après l'addition de l'albumine, le vecteur macromoléculaire **69** (Figure 63) est alors mis en présence de β -glucuronidase (*E. Coli* ; 133 U/mL). La libération totale de la doxorubicine est alors observée après cinq heures d'incubation en présence de l'enzyme (Figure 63, t = 10h).

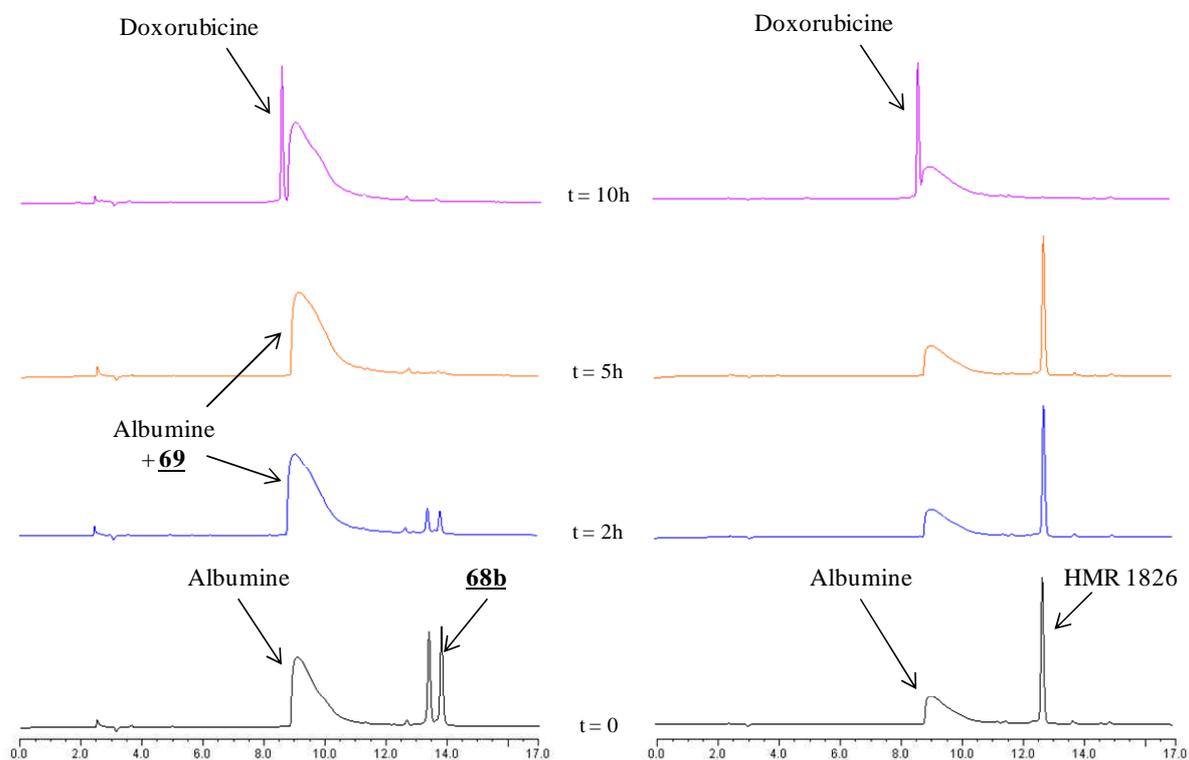


Figure 63 - Hydrolyse enzymatique de **68b** en comparaison avec HMR 1826

Cette expérience a également été réalisée avec HMR 1826, vecteur glucuronylé de la doxorubicine ne présentant pas de groupement maléimide. Dans ces conditions, HMR 1826

s'est montré parfaitement stable et aucune réaction de couplage n'a été observée. Ce résultat confirme donc que le couplage entre l'albumine et **68b** s'effectue par une réaction de Michael entre la fonction thiol de l'albumine et le groupement maléimide du vecteur.

3.2 Evaluation de l'activité antiproliférative du vecteur **68b**

L'activité antiproliférative du vecteur **68b** a été évaluée sur des lignées cellulaires cancéreuses humaines de type H290, MDA-MB-231, U87-MG ainsi que sur un modèle murin de cancer pulmonaire de type LLC. L'activité cytotoxique du vecteur a été mesurée après 48 heures d'incubation.

En absence de β -glucuronidase, **68b** ne montre aucun signe de toxicité sur ces différentes lignées cellulaires jusqu'à la plus forte dose testée de 2 μ M. Cependant, lorsque l'enzyme est ajoutée au milieu de culture, le vecteur retrouve une valeur d'IC₅₀ similaire à celle observée lors du traitement par la doxorubicine (**Tableau 2**).

	H290	MDA-MB-231	U87-MG	LLC
doxorubicine	320 \pm 24	340 \pm 26	790 \pm 171	207 \pm 34
68b	-	-	-	-
68b + β -glu	310 \pm 62	320 \pm 65	850 \pm 34	173 \pm 36

Tableau 2 - activité antiproliférative de **68b en présence ou en absence de β -glucuronidase (nM)**
(H290 : mésothéliome ; MDA-MB-231 : adénocarcinome du sein ; U87-MG : glioblastome ;
LLC : modèle murin de cancer pulmonaire)

Une étude réalisée sur les cellules de type LLC a permis de comparer l'activité antiproliférative de **68b** à celle de HMR 1826 (**Figure 64**). Il a ainsi été montré, qu'en absence de β -glucuronidase, **68b** est quatre fois moins toxique que ce dernier (IC₅₀ **68b** : 14 μ M ; IC₅₀ HMR 1826 : 3,5 μ M) alors qu'en présence de l'enzyme ces deux composés présentent une cytotoxicité comparable à celle de la doxorubicine (IC₅₀ **68b** : 173 nM ; IC₅₀ HMR 1826 : 199 nM).

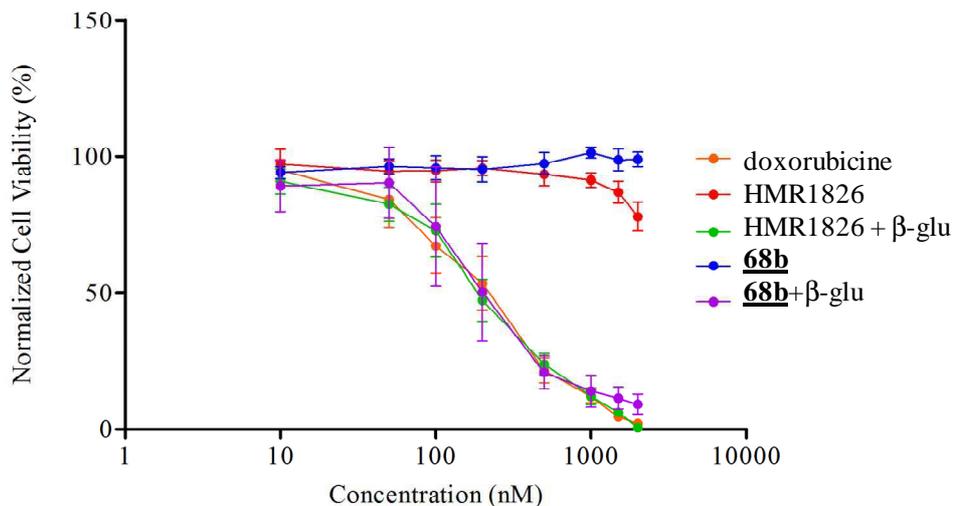


Figure 64 - activité antiproliférative de **68b** en comparaison avec HMR 1826

Afin d'expliquer ce phénomène, nous pouvons supposer que le vecteur **68b** se couple à l'albumine présente dans le milieu de culture pour former un vecteur macromoléculaire ne pouvant pas diffuser passivement dans les cellules. La plus faible toxicité de **68b** par rapport à HMR 1826 pourrait aussi être liée à l'hydrophilie apportée par la chaîne latérale de type poly(éthylène glycol) de **68b** qui limite la diffusion passive du vecteur à travers la membranaire cellulaire et donc son activation par la β -glucuronidase lysosomale.

3.3 Evaluation de l'efficacité thérapeutique de **68b** *in-vivo*

L'efficacité du vecteur **68b** a été comparée à celles de HMR 1826 et de la doxorubicine sur des tumeurs pulmonaires sous-cutanées d'origine murine (LLC) implantées sur des souris de type C57BL/6. Une dose de 43,6 $\mu\text{mol/kg}$ (23,7 mg/kg équivalent doxorubicine) de chacun de ces vecteurs a été administrée par voie intraveineuse aux jours 4 et 11 après la transplantation de la tumeur. La doxorubicine a, quant à elle, été utilisée à la dose maximale tolérée ($2 \times 13,7 \mu\text{mol/kg}$; $2 \times 8 \text{ mg/kg}$) selon le même protocole d'administration.

A l'issue du traitement, il a été observé une faible efficacité thérapeutique pour HMR 1826 avec un rapport T/C_{max} (volume des tumeurs traitées / volume des tumeurs du groupe placebo à J17) de 69%. A l'inverse, **68b**, à la même dose, présente une bonne réponse antitumorale ($T/C_{\text{max}} = 24\%$) légèrement supérieur à celle de la doxorubicine ($T/C_{\text{max}} = 31\%$)

(Figure 65). En comparaison avec HMR 1826, le résultat obtenu pour **68b** à la même dose confirme que cette stratégie permet d'augmenter le temps de demi-vie plasmatique et la rétention intratumorale des vecteurs glucuronylés par effet EPR.

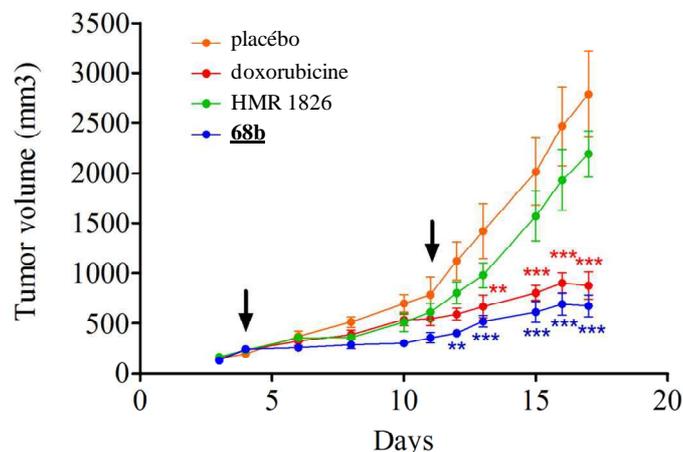


Figure 65 - Suivi du volume des tumeurs traitées par la doxorubicine, HMR 1826 et **68b**

La toxicité des différents composés utilisés lors de ce protocole a également été évaluée. On constate que le traitement par la doxorubicine entraîne de lourds effets secondaires, notamment une perte de poids importante (- 21%) chez les souris traitées (Figure 66). A l'inverse, les traitements par HMR 1826 et **68b** ont été bien tolérés et aucun signe majeur lié à d'éventuels effets secondaires n'a été observé.

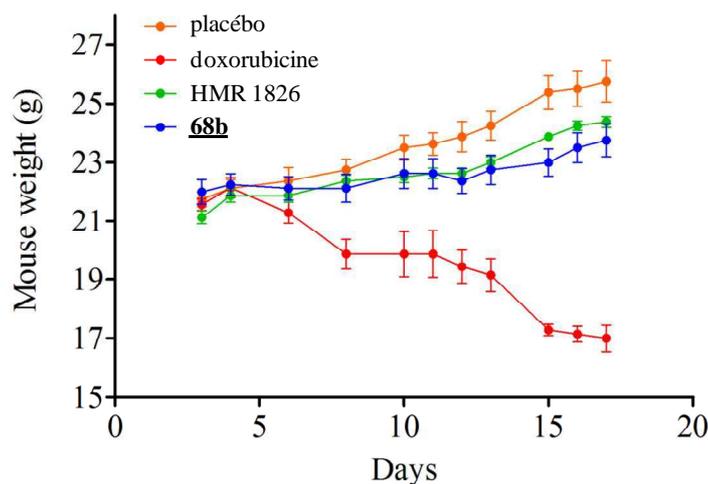


Figure 66 - Suivi du poids des souris traitées par la doxorubicine, HMR 1826 et **68b**

Enfin, une analyse histopathologique des reins a été effectuée afin d'évaluer la toxicité néphrétique généralement induite par les anthracyclines. Cette analyse a révélé une atrophie

des tissus pericapsulaires des reins chez les souris traitées par la doxorubicine pouvant être corrélée à la perte de poids observée chez ses animaux (**Figure 67**). Les souris traitées par **68b** ne présentent pas de signes microscopiques liés à la toxicité rénale de la doxorubicine.

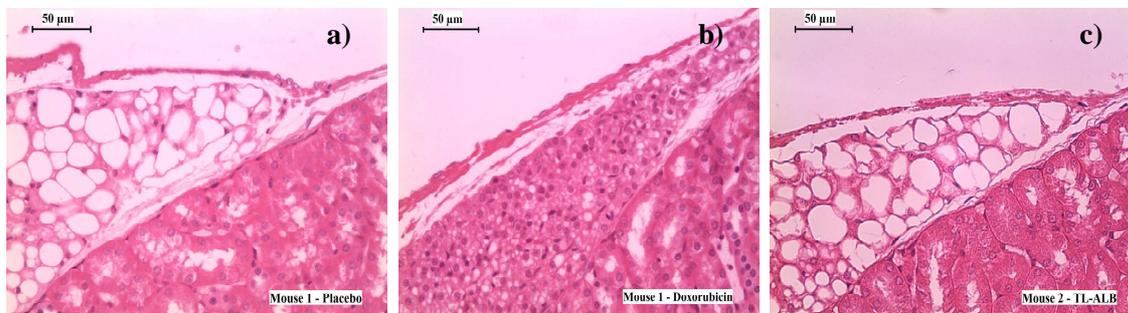


Figure 67 - analyse histopathologique des reins chez les souris a) non traitées ; b) traitées par la doxorubicine ; c) traitées par **68b**

4. Conclusion

Le but de cette étude était de contourner le faible temps de demi-vie plasmatique des vecteurs glucuronylés et l'activité réduite de la β -glucuronidase dans le microenvironnement tumoral. Dans ce cadre, nous avons réalisé la synthèse et l'évaluation biologique du nouveau vecteur glucuronylé « super ciblé » de la doxorubicine **68b**, comportant un groupement maléimide pouvant se coupler *in-vivo* avec une fonction thiol de l'albumine plasmatique grâce à une réaction de Michael. Le vecteur macromoléculaire **69** ainsi formé permet de cibler deux spécificités tumorales : les défauts de vascularisation liés à la néo-angiogénèse tumorale et la β -glucuronidase surexprimée dans les tissus cancéreux. La formation rapide du composé **69** a été vérifiée lors d'un test d'hydrolyse enzymatique au cours duquel le vecteur **68b** a été incubé en présence d'albumine plasmatique dans des conditions physiologiques. L'activation du vecteur macromoléculaire **69** par la β -glucuronidase pour conduit à la libération rapide et totale de la doxorubicine.

L'efficacité thérapeutique de ce nouveau vecteur a été évaluée sur un modèle de tumeur pulmonaire d'origine murine implantée chez la souris. Ces essais ont montré que **68b** présente une activité anticancéreuse supérieure à celle de HMR 1826 à des doses seulement trois fois supérieures à la dose maximale tolérée pour la doxorubicine. L'ensemble des

résultats obtenus lors de cette étude confirme donc que le double ciblage des tumeurs au moyen de vecteurs glucuronylés macromoléculaires est une approche très prometteuse pour le développement de traitements plus sélectifs des tumeurs.

Enfin, il est intéressant de noter que l'utilisation de vecteur glucuronylé possédant un motif maléimide n'est pas limitée au couplage avec la cystéine 34 de l'albumine plasmatique. A titre d'exemple, l'équipe de Senter a décrit la synthèse de vecteurs glucuronylés comportant un motif maléimide pouvant se fixer à des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes surexprimés par les cellules cancéreuses.^{76,123}

¹²³ Jeffrey, S. C.; De Brabander, J.; Miyamoto, J.; Senter, P. D. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 277-280.

**CHAPITRE 3 : CIBLAGE DES
RECEPTEURS MEMBRANAIRES DES
CELLULES CANCEREUSES**

1. Introduction

1.1 Généralités

Au cours des trente dernières années, le ciblage actif de récepteurs ou d'antigènes membranaires surexprimés à la surface des cellules cancéreuses au moyen de ligands ou d'anticorps s'est avéré être une stratégie de choix pour le développement de nouveaux traitements plus sélectifs des tissus cancéreux.

En effet, l'utilisation d'anticorps ou de ligands de faibles poids moléculaires possédant une affinité pour un récepteur particulier permet le transport ainsi que l'internalisation au sein des cellules tumorales de molécules anticancéreuses généralement non sélectives des tissus à traiter. Cette stratégie permet donc d'éviter la libération de composés cytotoxiques au niveau des cellules ne présentant pas ces récepteurs et ainsi de limiter les effets secondaires observés au cours d'une chimiothérapie classique. Récemment, la validité de cette approche a été démontrée pour le traitement des lymphomes avec la mise sur le marché du Bretuximab Vedotin (Adcetris®) par Seattle Genetics (**Figure 4**). Cependant, l'utilisation d'anticorps peut être limitée par leur faible pénétration dans les tumeurs du fait de leur taille importante et par leur temps de demi-vie élevé pouvant être à l'origine de toxicité à long terme.

De nombreux travaux ont permis d'identifier plusieurs récepteurs membranaires surexprimés à la surface des cellules tumorales. Ainsi, le récepteur de la transferrine,¹²⁴ les sélectines,¹²⁵ les intégrines,¹²⁶ les GLUT (Glucose Uptake Transporters),¹²⁷ les galectines,¹²⁸ le récepteur de l'acide hyaluronique,¹²⁹ le récepteur de l'acide folique, le récepteur de l'asialoglycoprotéine¹³⁰ et le PSMA (Prostate-Specific Membrane Antigen)¹³¹ se sont révélés être de bons candidats pour le ciblage actif des cellules cancéreuses.

124 Gomme, P. T.; McCann, K. B.; *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 267-273.

125 Kneuer, C.; Ehrhardt, C.; Radomski, M. W.; Bakowsky, U. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 1034-1040.

126 Armaout, M. A.; Goodman, S. L.; Xiong, J.-P. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 641-651.

127 (a) Smith, T. A. D. *Br. J. Biomed. Sci.* **1999**, *56*, 285. **(b)** Medina, R. A.; Owen, G. I. *Biol. Res.* **2002**, *35*, 9. **(c)** Ito, F.; Fukusato, T.; Nemoto, T.; Sekihara, H.; Seyama, Y.; Kubota, S. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 1080-1090.

128 Danguy, A.; Camby, I.; Kiss, R. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1572*, 285-293.

129 (a) Culty, M.; Nguyen, H. A.; Underhill, C. B. *J. Cell. Biol.* **1992**, *116*, 1055-1062. **(b)** Weigel, P. H.; Yik, J. H. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1572*, 341-363.

130 (a) Geffen, I.; Spiess, M. *Int. Rev. Cytol.* **1992**, *137B*, 181-219. **(b)** Trerè, D.; Fiume, L.; Badiali De Giorgi, L.; Di Stefano, G.; Migaldi, M.; Derenzini, M. *Br. J. Cancer* **1999**, *81*, 404-408.

A ce titre, un grand nombre de vecteurs incorporant des ligands de ciblage spécifiques de ces récepteurs ont été conçus. Ces composés possèdent généralement un mode d'action constitué de quatre étapes (**Figure 68**). Tout d'abord, le vecteur reconnaît les cellules tumorales par l'intermédiaire de son ligand de ciblage en se fixant sur les récepteurs membranaires correspondants. Le couple récepteur - vecteur est alors internalisé au sein de la cellule par endocytose. Les conditions acides et réductrices ainsi que certaines enzymes telles que des protéases ou des glycosidases rencontrées au niveau des endosomes/lysosomes entraînent la dégradation du vecteur conduisant ainsi à la libération de l'agent anticancéreux. Le composé actif exerce alors son action cytotoxique après translocation nucléaire ou dans le cytoplasme. Les récepteurs membranaires sont, dans certains cas, être recyclés à la surface de la cellule et permettent l'internalisation de nouveaux vecteurs.

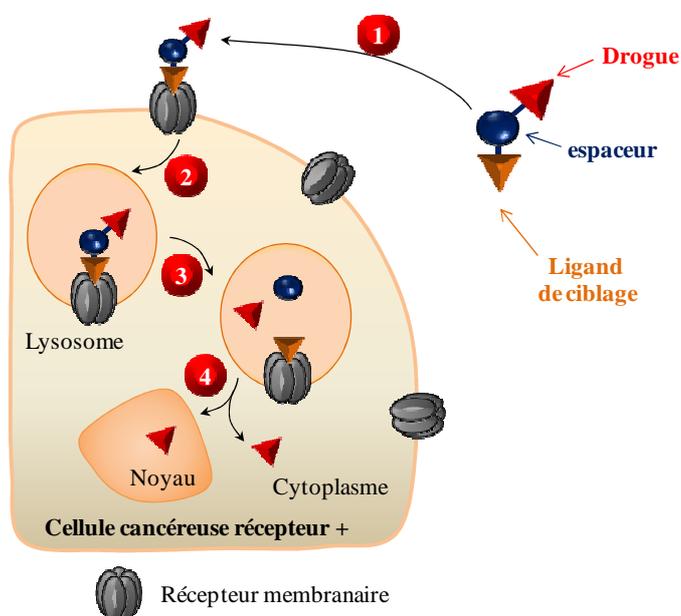


Figure 68 - Mode d'action des vecteurs ciblant les récepteurs membranaires des cellules tumorales
1 : reconnaissance de la cellule tumorale ; 2 : internalisation du couple vecteur-récepteur ;
3 : dégradation du vecteur dans le lysosome ;
4 : translocation nucléaire ou cytoplasmique de l'espèce active

1.2 Ciblage des récepteurs de l'acide folique

Dans le cadre du ciblage actif des particularités exprimées par les cellules cancéreuses, le ciblage du récepteur de l'acide folique (FR1 et FR2) a rencontré un fort intérêt au cours des

131 (a) Silver, D. A.; Pellicer, I.; Fair, W. R. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 81-85. (b) Ghosh, A.; Heston, W. D. W. *J. Cell Biochem.* **2004**, *91*, 528-539.

dernières années.¹³² En effet, ce récepteur membranaire est présent dans plusieurs types de cancer chez l'Homme, tels que le cancer du sein, de l'ovaire, du poumon et la leucémie aiguë myéloïde alors que son expression est extrêmement réduite voire inexistante dans les tissus sains.

A l'instar de EC145, un conjugué associant l'acide folique à un dérivé de la désacétylvinblastine décrit précédemment (**Figure 4**), de nombreux vecteurs ciblant les récepteurs de l'acide folique ont été développés. Il a ainsi été montré que cette stratégie permet le transport d'une large gamme d'agents anticancéreux tels que des dérivés de la maytansine,¹³³ du *cis*-platine,¹³⁴ d'un analogue de l'épothilone (Epopolate),¹³⁵ de la mitomycine C,¹³⁶ du taxol,¹³⁷ de la doxorubicine,¹³⁸ de la camptothécine,¹³⁹ ainsi que d'un métabolite actif du 5-fluorouracile (FdUMP).¹⁴⁰ L'évaluation de l'efficacité thérapeutique de certains de ces vecteurs a fourni des résultats *in-vivo* très encourageants, notamment chez l'homme, à travers l'étude du conjugué EC145⁸ (essais cliniques de phase II et III) et du vecteur Epopolate (essais cliniques de phase I).

Le ciblage du récepteur de l'acide folique n'est pas limité à la vectorisation d'agent anticancéreux. Cette stratégie peut aussi être appliquée à la vectorisation d'agents d'imagerie médicale et de radiotraceurs¹⁴¹ afin de localiser avec précision l'emplacement des tumeurs dont les cellules surexpriment ce récepteur membranaire.¹⁴² Il a ainsi été montré que l'injection du conjugué acide folique-fluorescéine thiourée **80** à des patientes atteintes de

132 (a) Xia, W.; Low, P. S. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6811-6824. **(b)** Leamon, C. P.; Reddy, J. A. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2004**, *56*, 1127-1141. **(c)** D'Alincourt Salazar M.; Ratnam, M. *Cancer Metast. Rev.* **2007**, *26*, 141-152. **(d)** Low, P. S.; Henne, W. A.; Doorneweerd, D. D. *Accounts Chem. Res.* **2008**, *41*, 120-129. **(e)** Vlahov, I. R.; Leamon, C. P. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1357-1369.

133 Reddy, J. A.; Westrick, E.; Santhapuram, H. K. R.; Howard, S. J.; Miller, M. L.; Vetzal, M.; Vlahov, I.; Chari, R. V. J.; Goldmacher, V. S. *Cancer Res.* **2007**, *13*, 6376-6382.

134 Aronov, O.; Horowitz, A. T.; Gabizon, A.; Gibson, D. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 563-574.

135 Vlahov, I. R.; Vite, G. D.; Kleindl, P. J.; Wang, Y.; Santhapuram, H. K. R.; You, F.; Howard, S. J.; Kim, S.-H.; Lee, F. Y.; Leamon, C. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4578 - 4581.

136 Reddy, J. A.; Westrick, E.; Vlahov, I.; Howard, S. J.; Santhapuram, H. K.; Leamon, C. P. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *58*, 229-236.

137 Lee J. W.; Lu, J. Y.; Low, P. S.; Fuchs, P. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2397-2414.

138 Bae, Y.; Jang, W.-D.; Nishiyama, N.; Fukushima, S.; Kataoka, K. *Mol. BioSyst.* **2005**, *1*, 242-250.

139 Henne W. A.; Doorneweerd, D. D.; Hilgenbrink, A. R.; Kularatne, S. A.; Low, P. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5350-5355.

140 Liu, J.; Kolar, C.; Lawson, T. A.; Gmeiner, W. H. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5655-5663.

141 (a) Fischer, C. R.; Müller, C.; Reber, J.; Müller, A.; Krämer, S. D.; Ametamey, S. M.; Schibli, R. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 805-813. **(b)** Ke, C.-Y.; Mathias, C. J.; Green, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7421-7426. **(c)** Leamon, C. P.; Parker, M. A.; Vlahov, I. R.; Xu, L. C.; Reddy, J. A.; Vetzal, M.; Douglas, N. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1200-1210.

142 Segal E. I.; Low, P. S. *Cancer Metast. Rev.* **2008**, *27*, 655-664.

cancers ovariens permettait à des chirurgiens en charge de l'ablation des tissus cancéreux, une détection visuelle plus aisée des métastases avec une précision proche du millimètre (**Figure 69**).¹⁴³

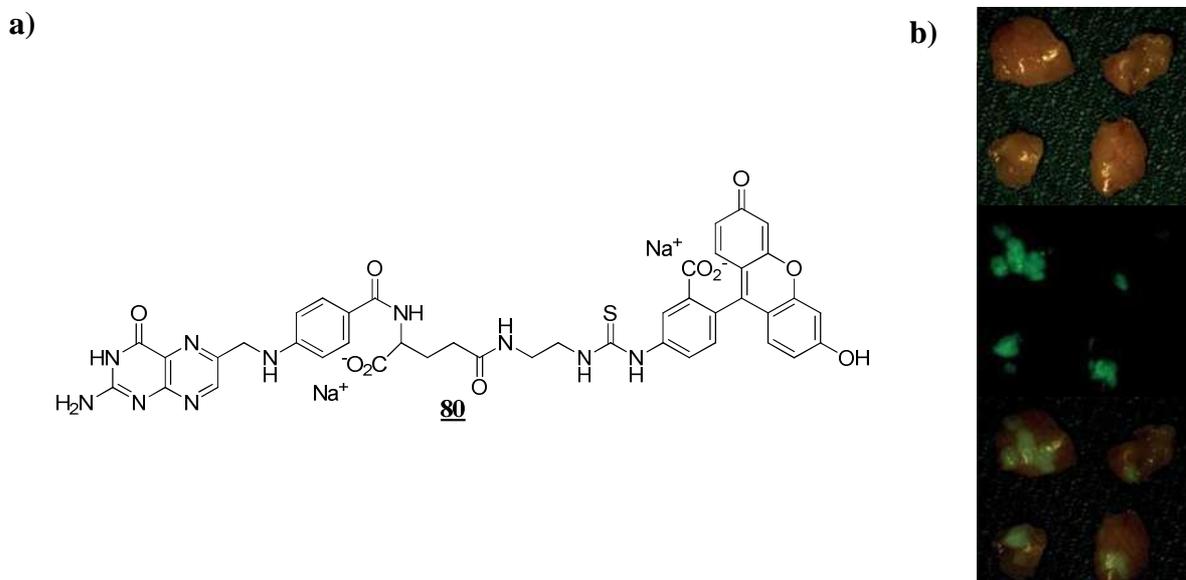


Figure 69 - (a) structure du conjugué acide folique-fluorescéine thiourée 80 (b) quantification *ex-vivo* de l'internalisation du composé 80 dans les métastases par fluorescence

Ce concept peut aussi rentrer en compte dans le cadre d'une médecine personnalisée. A titre d'exemple, le vecteur EC20, un conjugué de l'acide folique véhiculant du technétium 99m, permet d'identifier de manière non-invasive les tumeurs et métastases surexprimant le FR et de prédire l'efficacité avec laquelle un vecteur cytotoxique ciblant ce récepteur pourra atteindre son site d'action.¹⁴⁴

La plupart des conjugués acide folique-drogue conçus à ce jour présentent des systèmes de libération de l'agent cytotoxique sensibles aux conditions acides (hydrazone)¹²⁹ ou réductrices (pont disulfure)^{8,124,127,130} rencontrées dans les lysosomes ou les endosomes. Cependant, ces groupements activables chimiquement sont relativement instables dans le plasma sanguin et conduisent ainsi à la libération non contrôlée d'une partie de l'agent actif

¹⁴³ van Dam, G. M.; Themelis, G.; Crane, L. M. A.; Harlaar, N. J.; Pleijhuis, R. G.; Kelder, W.; Sarantopoulos, A.; de Jong, J. S.; Arts, H. J. G.; van der Zee, A. G. J.; Bart, J.; Low, P. S.; Ntziachristos, V. *Nature Medicine* **2011**, *17*, 1315-1320.

¹⁴⁴ Leamon, C. P.; Parker, M. A.; Vlahov, I. R.; Xu, L.-C.; Reddy, J. A.; Vetzal, M.; Douglas, N. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1200-1210.

dans l'organisme.¹⁴⁵ Dès lors, l'usage de vecteurs activables par des enzymes lysosomales ou endosomales telle que la β -galactosidase dont l'activité est inexistante dans le plasma, reste une solution de choix pour limiter la toxicité des conjugués vis à vis des tissus sains.

Dans ce cadre, notre équipe a développé le vecteur galactosylé de la doxorubicine **81** comportant un motif acide folique (**Figure 70**).⁹⁸ Ce ligand de ciblage va permettre l'internalisation par endocytose du vecteur au sein des cellules cancéreuses exprimant à leur surface le récepteur de l'acide folique. Dès lors, la β -galactosidase intracellulaire va catalyser la rupture de la liaison glycosidique pour conduire à la formation du phénolate intermédiaire **82**. Ce dernier subira alors une élimination 1,6 suivie d'une décarboxylation pour aboutir à la libération de la méthylène-quinone **83** et d'une molécule de doxorubicine qui induira la mort de la cellule après translocation nucléaire.

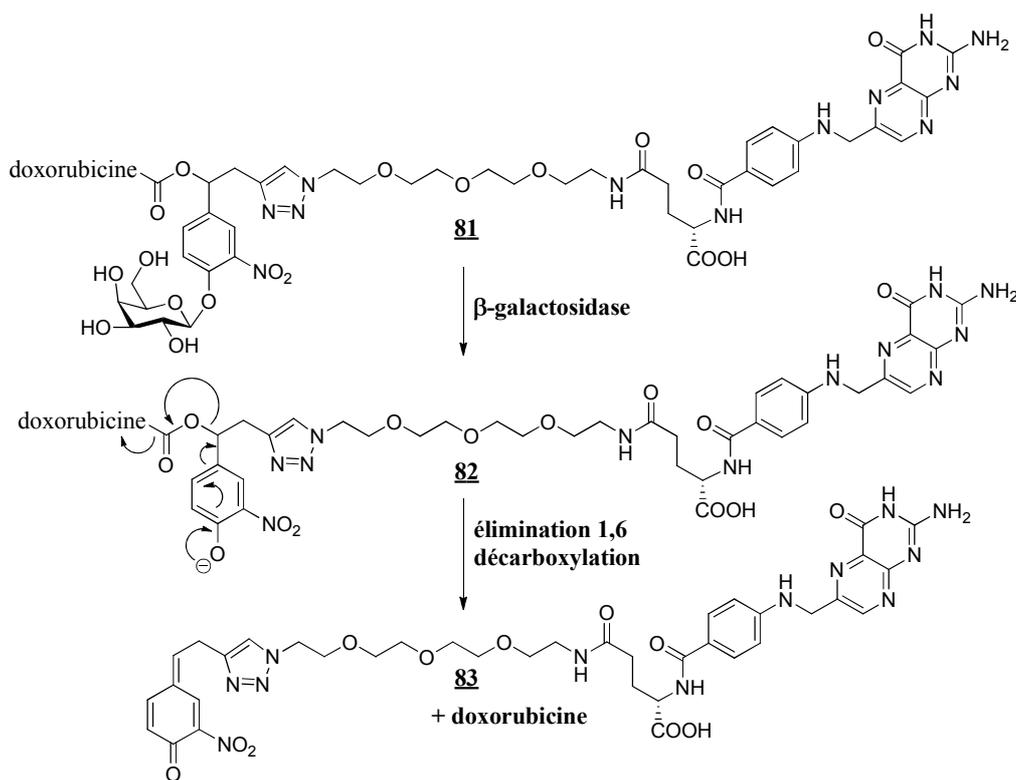


Figure 70 - Structure et décomposition du vecteur **81**

L'hydrolyse enzymatique du vecteur **81** a été évaluée dans des conditions physiologiques en présence β -galactosidase (bovine, *Escherichia Coli*). Il a ainsi été montré

145 (a) Ducry, L.; Stump, B. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 5-13 et références citées dans cet article. **(b)** Abu Ajaj, K.; El-Abadla, N.; Welker, P.; Azab, S.; Zeisig, R.; Fichtner, I.; Kratz, F. *Eur. J. Cancer* **2012**, *48*, 2054-2065.

que la doxorubicine était totalement libérée en moins d'une heure dans les conditions physiologiques de pH et de température. Ce résultat indique que le déclencheur enzymatique de type galactoside est parfaitement accessible pour l'enzyme, et ce, malgré la présence de groupements particulièrement encombrants tels que l'unité doxorubicine ou la chaîne latérale. Afin de vérifier que la libération enzymatique n'était pas due à la dégradation du vecteur, **81** a été incubé dans du plasma humain (pH 7 ; 37°C) pendant 24 heures. Dans ces conditions, le vecteur **81** est parfaitement stable et aucune trace de doxorubicine n'a été détectée.

Grace à la fluorescence de la doxorubicine, des expériences d'imagerie confocale ont pu être réalisées sur des cellules cancéreuses de type HeLa (FR+) et A549 (FR-) afin de démontrer que l'internalisation du vecteur **81** est corrélée à la surexpression du récepteur de l'acide folique (**Figure 71**).

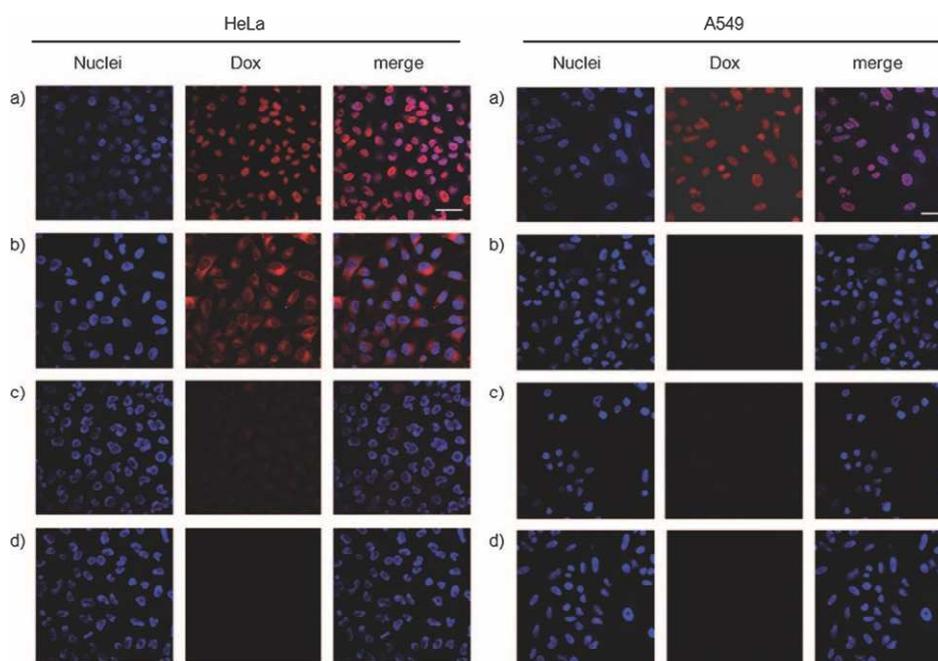


Figure 71 – Etude de l'internalisation sélective du vecteur **81** par microscopie confocale sur des cellules de type HeLa et A549 (a) traitement des cellules par la doxorubicine ; (b) traitement des cellules par le vecteur **81** ; (c) traitement des cellules par le vecteur **81** + acide folique (1 mM) ; (d) traitement des cellules par le vecteur **84**

Cette étude a prouvé que seules les cellules HeLa possédant le récepteur étaient en mesure d'internaliser le vecteur **81** alors que la doxorubicine pénètre passivement à travers les membranes des deux lignées cellulaires. Pour vérifier que l'internalisation sélective du vecteur est initiée par la reconnaissance du récepteur, la même expérience a été réalisée en saturant préalablement le milieu de culture avec de l'acide folique (1 mM). Dans ces

conditions, la pénétration du composé **81** dans les cellules HeLa est considérablement réduite. Ce résultat montre que l'interaction du folate avec son récepteur est essentielle dans le processus d'internalisation du vecteur **81**. Une expérience supplémentaire a permis de vérifier qu'aucune internalisation n'est observée avec le vecteur galactosylé **84** de la doxorubicine non conjugué à l'acide folique (**Figure 72**).

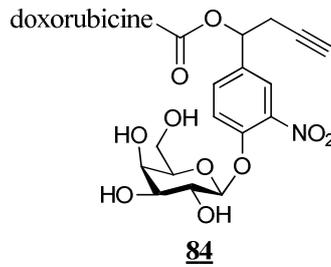


Figure 72 – structure du vecteur **84**

Enfin, l'activité antiproliférative du vecteur **81** a été évaluée sur ces mêmes lignées cellulaires pour confirmer que l'endocytose de ce composé est suivie de la libération intracellulaire de la doxorubicine. Alors que **81** possède une cytotoxicité importante envers les cellules HeLa (IC_{50} **81** : 220 nM ; IC_{50} dox : 52 nM), celui-ci est non toxique envers les cellules A549 à la plus haute dose testée de 1000 nM (IC_{50} dox : 190 nM) (**Figure 73**). Ces résultats sont donc en accord avec le niveau d'expression du récepteur de l'acide folique dans ces deux lignées cellulaires et montrent bien la sélectivité du vecteur **81**.

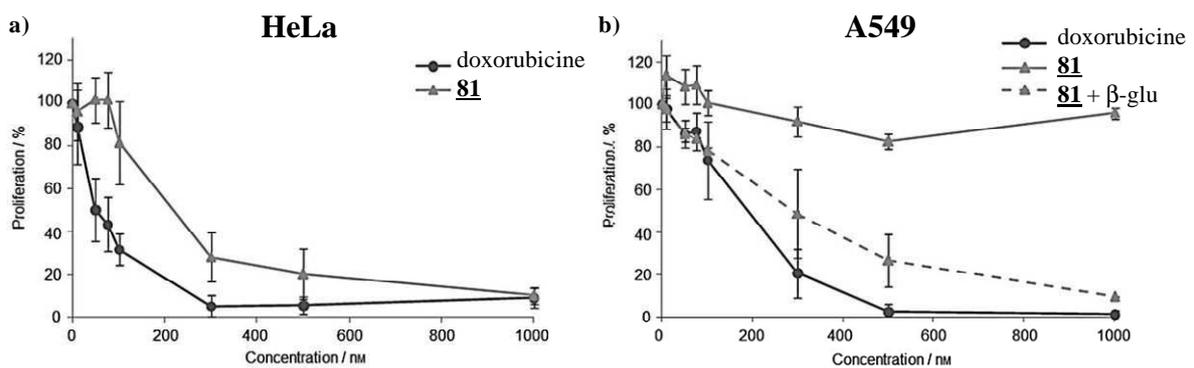


Figure 73 – Activité antiproliférative du vecteur **81** sur les cellules HeLa (FR+) (a) et sur les cellules A549 (FR-) (b)

2. Conception d'un conjugué galactosylé acide folique-MMAE

Bien que les résultats obtenus lors des tests *in-vitro* soient prometteurs, l'efficacité thérapeutique du vecteur **81** chez l'animal pourrait être limitée par la toxicité insuffisante de la doxorubicine dans cette approche.^{6a} En effet, le nombre de récepteurs susceptibles d'internaliser le vecteur au sein de la cellule étant restreint (1 à 10 millions de récepteur par cellule),¹⁴⁶ seule une faible quantité d'agent cytotoxique pourra être acheminée dans les cellules cancéreuses. Il paraît donc nécessaire d'utiliser des drogues extrêmement puissantes (calychéamycine, maytansinoïdes, auristatines, duocarmycines) pour que ce type de vecteur induise une réponse antitumorale satisfaisante. Pour prouver la validité de ce nouveau système *in-vivo*, nous avons conçu le vecteur **85** dédié au ciblage de la MMAE (**Figure 74**).¹⁴⁷ Ce vecteur pourra être internalisé sélectivement par les cellules cancéreuses surexprimant le FR puis être activé par la β -galactosidase lysosomale pour libérer une molécule active de MMAE.

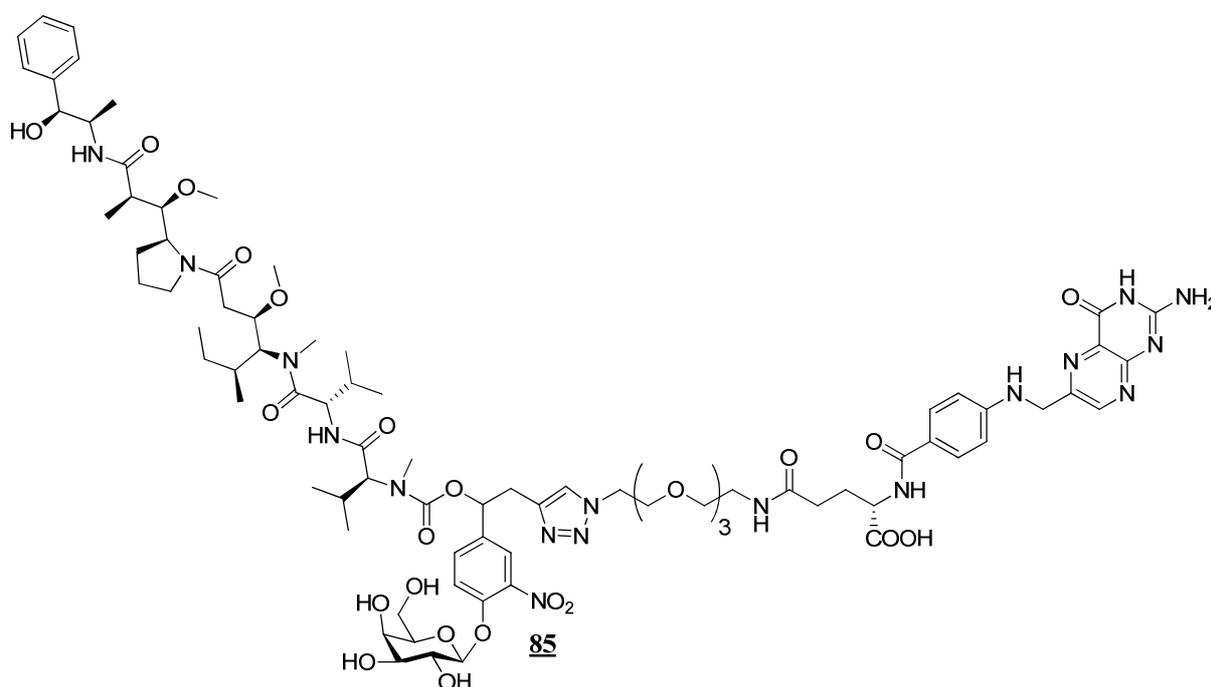


Figure 74 – Structure du vecteur galactosylé de la MMAE **85**

146 Parker, N.; Turk, M. J.; Westrick, E.; Lewis, J. D.; Low, P. S.; Leamon, C. P. *Anal. Biochem.* **2005**, *338*, 284-293.

147 Legigan, T.; Clarhaut, J.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Renoux, B.; Thomas, M.; Le Pape, A.; Lerondel, S.; Papot, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, doi : 10.1002/anie.201204935.

2.1 Synthèse du vecteur **85**

2.1.1 Stratégie de synthèse

La stratégie de synthèse retenue pour la préparation du vecteur **85** est décrite **Figure 75**. Le vecteur **85** pourra être obtenu après introduction de la chaîne latérale **93** sur l'alcyne **91** par réaction de cycloaddition [3+2] catalysée par le cuivre (I). **93** pourra être préparé par couplage peptidique entre l'acide folique commercial **92** et le composé pégylé **72a**.

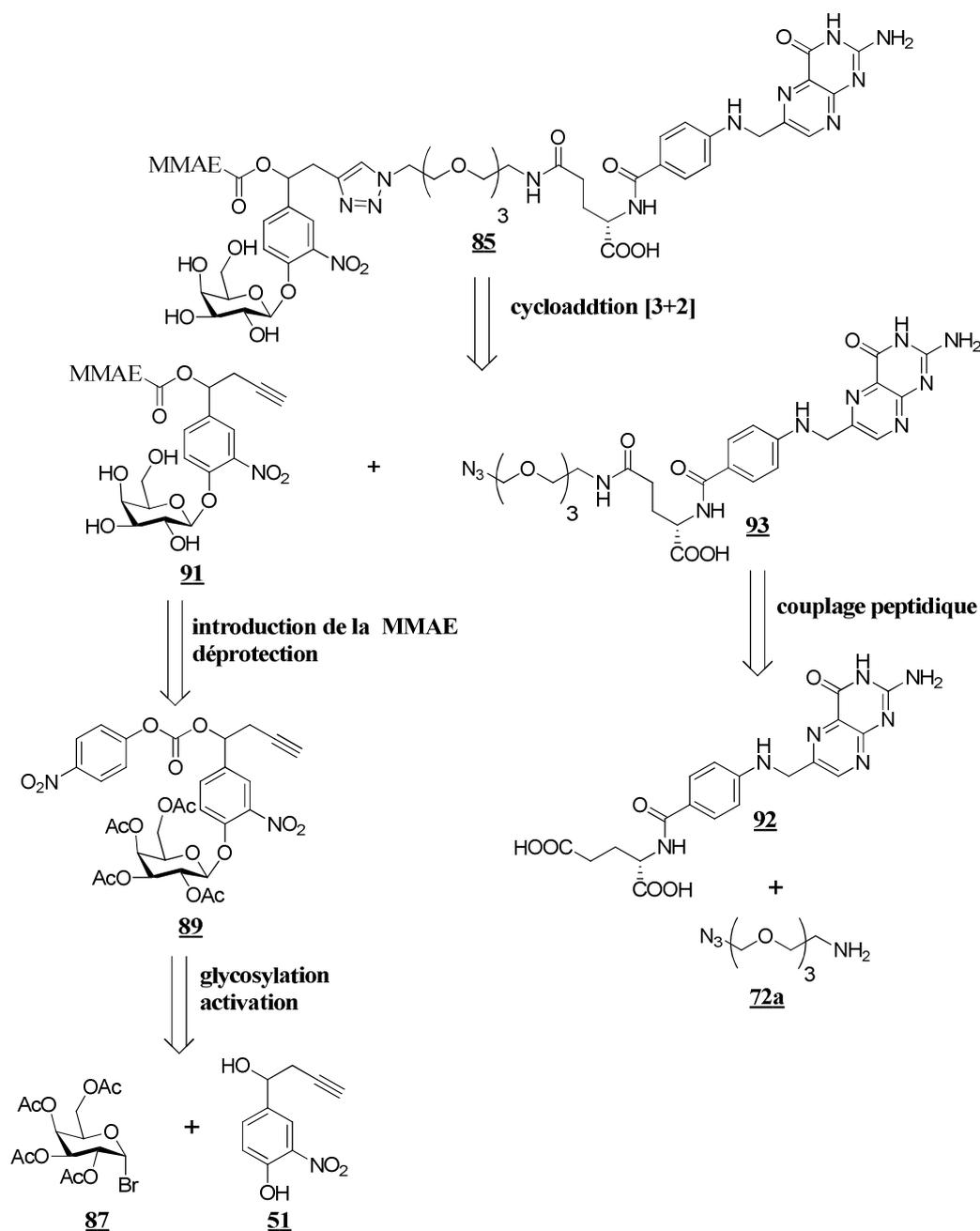


Figure 75 - Stratégie de synthèse pour le vecteur **85**

91 sera, quant à lui, obtenu après introduction de la MMAE sur le carbonate mixte **89** puis déprotection du motif galactoside. Une étape glycosylation entre le galactoside bromé **87** et l'unité centrale **51** suivie de l'activation de l'alcool benzylique correspondant conduiront à la préparation de **89**.

2.1.2 Synthèse de l'intermédiaire 91

La synthèse de l'intermédiaire **91** a été réalisée en cinq étapes à partir du pentaacétyl- β -D-galactose (**Figure 76**).¹³⁸ La première étape consiste en la bromation de la position anomérique du galactoside en présence d'acide bromhydrique dans l'acide acétique. Cette réaction conduit à la formation du composé **87** avec un bon rendement de 87%. L'analyse RMN ¹H de ce composé indique la présence d'un doublet à 6,68 ppm avec une constante de couplage de 4,0 Hz permettant de confirmer la configuration α du galactoside.

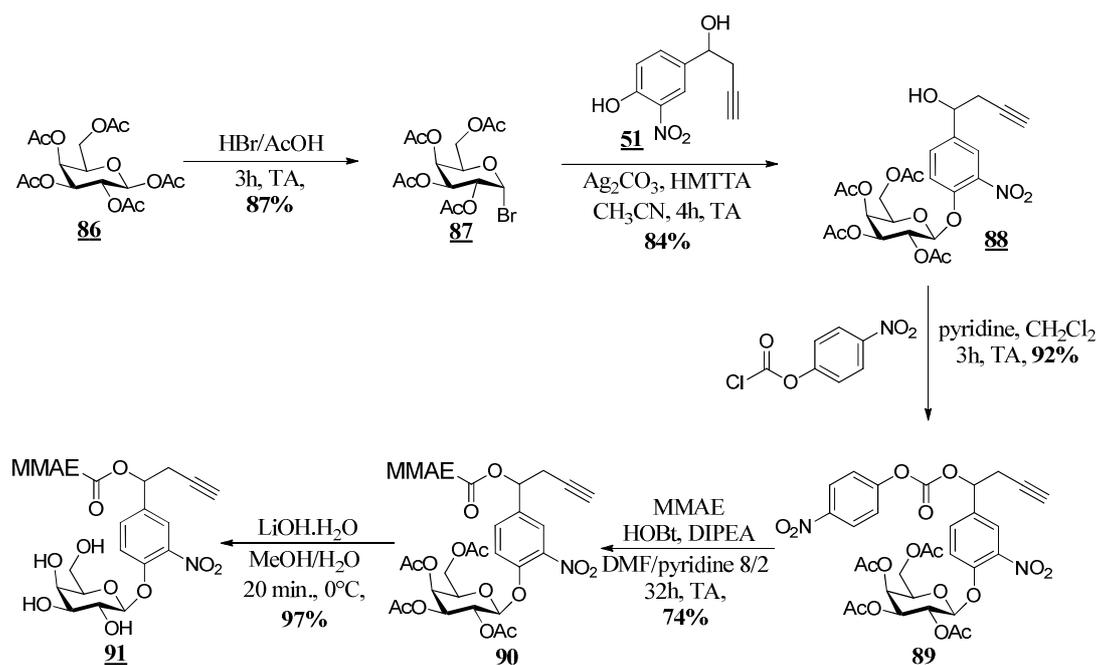


Figure 76 – Synthèse du composé **91**

Une réaction de glycosylation chimiosélective entre le galactoside bromé **87** et le phénol de l'unité centrale **51** menée en présence de carbonate d'argent et de HMTTA dans l'acétonitrile permet d'obtenir le composé **88** avec 84% de rendement. La configuration β du composé **88** a été confirmée par RMN ¹³C avec la présence d'un seul signal pour le carbone anomérique à 100,4 ppm. L'alcool benzylique **88** a ensuite été activé par du chloroformate de

para-nitrophényle et de la pyridine dans le dichlorométhane. Dans ces conditions, le carbonate mixte **89** a été obtenu avec un très bon rendement de 92%.

L'introduction de la MMAE a été réalisée selon la méthode décrite précédemment (**Figure 34**). Le composé **90** a ainsi été obtenu avec un bon rendement de 74% après traitement du carbonate **89** par la MMAE en présence de HOBt et de DIPEA dans un mélange de DMF et de pyridine. Enfin, les acétates du galactoside ont été clivés par de l'hydroxyde de lithium dans un mélange méthanol/eau 1/1 à 0°C. Cette réaction a permis d'obtenir l'intermédiaire **91** avec un très bon rendement de 97%. La déprotection totale du composé **90** a été vérifiée par RMN ¹H et se traduit par la disparition des signaux caractéristiques des acétates compris entre 2,34 et 1,92 ppm.

2.1.3 Synthèse de la chaîne latérale **93** et couplage à l'intermédiaire **91**

La chaîne latérale **93** a été préparée par couplage peptidique entre l'acide folique commercial **92** et la chaîne PEG **72a** selon une procédure étudiée précédemment au laboratoire (**Figure 77**). La présence des deux fonctions acides carboxyliques conduit à un mélange inséparable des régioisomères **93a** et **93b** (respectivement γ et α) avec un *ratio* 7/3 et un rendement de 30% après purification par HPLC semi-préparative.

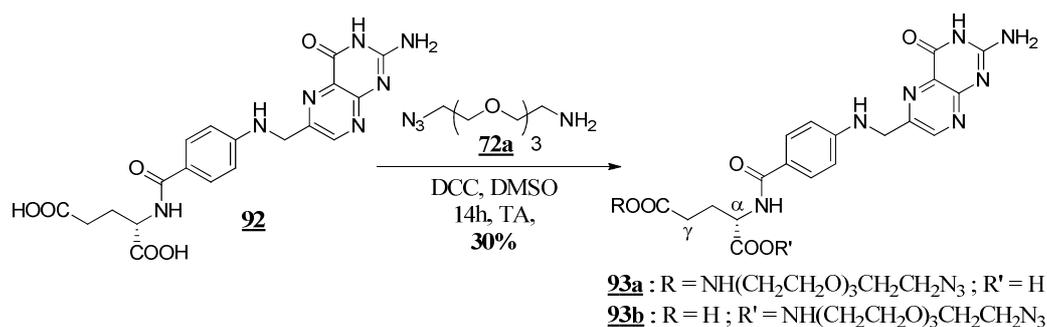


Figure 77 – Synthèse de la chaîne latérale **93**

Plusieurs études réalisées avec des dérivés de l'acide folique ont montré que chacun des régioisomères α et γ présentait une bonne affinité pour le FR.¹⁴⁸ Par conséquent, un mélange de **93a** et **93b** sera utilisé lors de la dernière étape de la synthèse du vecteur **85**. Cette

148 (a) Bettio, A. ; Honer, M. ; Muller, C. ; Bruhlmeier, M.; Muller, U.; Schibli, R.; Groehn, V.; Schubiger, A. P.; Ametamey, S. M. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 1153-1160. **(b)** Ke, C.-Y.; Mathias, C. J.; Green, M. A. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2004**, *56*, 1143-1160. **(c)** Ke, C.-Y.; Mathias, C. J.; Green, M. A. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30*, 811-817. **(d)** Leamon, C. P.; DePrince, R. B.; Hendren, R. W. *J. Drug Target.* **1999**, *7*, 157-169.

étape consiste au couplage de la chaîne latérale **93** à l'alcyne **91** par une réaction de cycloaddition [3+2] en présence de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ et d'ascorbate de sodium dans un mélange DMSO/eau 91/9 (**Figure 78**).

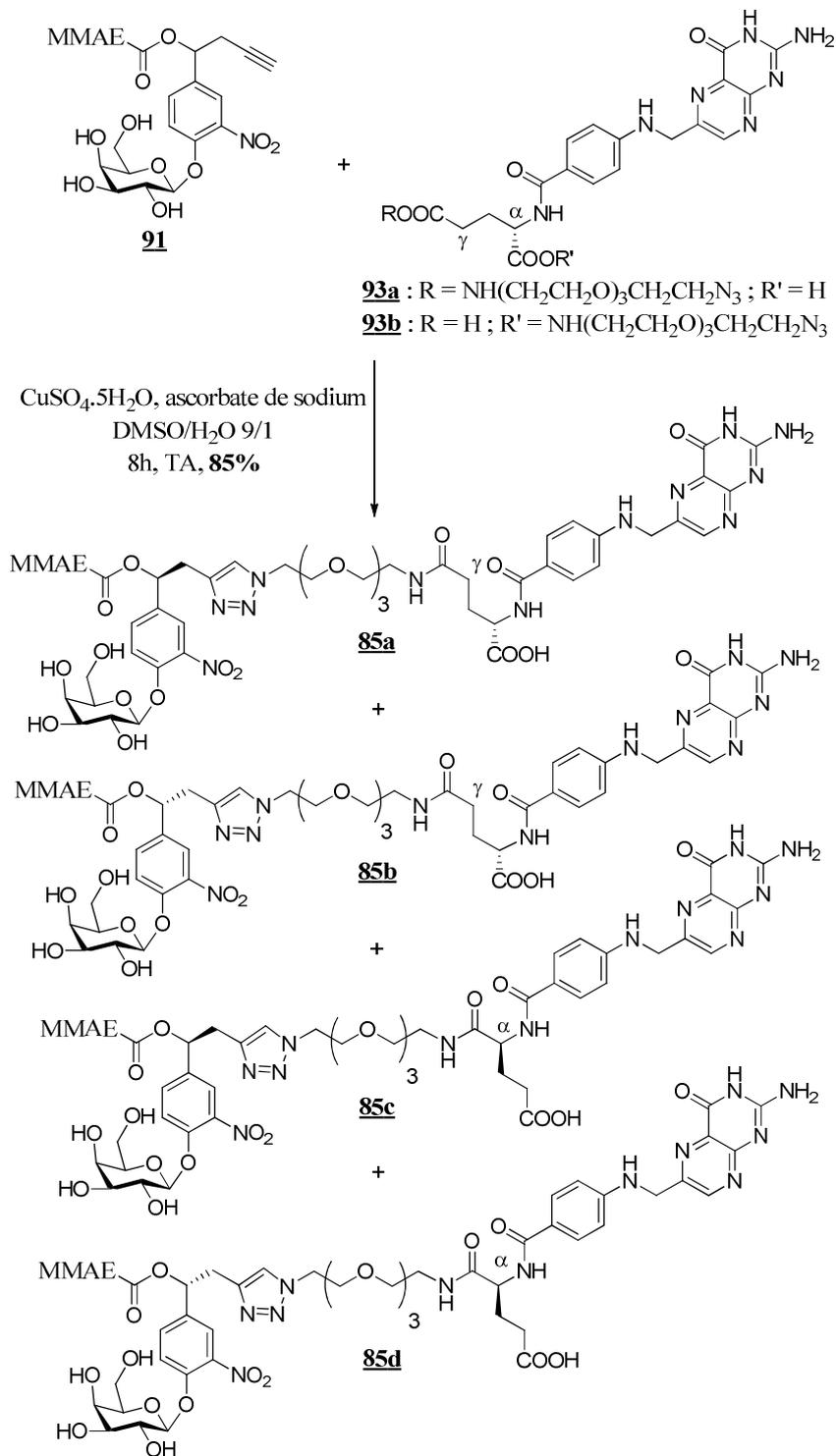


Figure 78 – Synthèse du vecteur **85**

Cette réaction conduit à la formation du vecteur **85** sous la forme de quatre isomères avec un rendement de 85%. Pour réaliser l'évaluation biologique de ce vecteur, 15 mg de mélange des isomères **85a-d** ont été obtenus avec une pureté supérieure à 98% après purification de 35 mg de composé brut par HPLC semi-préparative.

2.2 Evaluation biologique du vecteur **85**

2.2.1 Hydrolyse enzymatique

Afin de vérifier que le vecteur **85** est substrat de l'enzyme, l'hydrolyse enzymatique de ce composé (0,1 mg ; 0,056 μ mol) a été réalisée en présence de β -galactosidase (*Escherichia Coli* ; 40 U/ μ mol) dans du tampon phosphate (0,02 M ; pH 7) contenant 10% de DMSO à 37°C. L'évolution de la composition du mélange a été suivie par HPLC au cours du temps. Dans ces conditions, la disparition du vecteur **85** et la libération totale de la MMAE ont été observées après 35 minutes d'incubation.

2.2.2 Evaluation de l'activité anti-proliférative du vecteur **84**

La sélectivité du vecteur **85** envers les cellules exprimant le FR a tout d'abord été évaluée en mesurant son activité antiproliférative sur des lignées cellulaires de type KB, HeLa et A549 (**Figure 79**).

Lignée cellulaire	Expression du FR	IC ₅₀ MMAE (nM)	IC ₅₀ 85 (nM)
KB	+++	0,240	0,240
HeLa	++	0,630	8,408
A549	-	0,872	195,230

Figure 79 – Evaluation de l'activité antiproliférative du vecteur **85**

Le vecteur **85** est particulièrement actif sur ces deux premières lignées avec des valeurs d'IC₅₀ de 0,240 et 8,408 nM. Ces résultats font du composé **85** le conjugué de l'acide folique le plus cytotoxique conçu à ce jour. Par ailleurs, ces valeurs sont cohérentes avec le niveau d'expression du récepteur de l'acide folique qui est plus important chez les cellules KB que chez les cellules HeLa (**Figure 80**). Les cellules A549 qui n'expriment pas le récepteur de l'acide folique sont peu affectées par le vecteur **85** (IC₅₀ = 195,230 nM) alors que la

MMAE présente une forte action cytotoxique sur cette même lignée ($IC_{50} = 0,872$ nM). Ce dernier résultat peut être expliqué par le fait que l'hydrophilie apportée au vecteur par le galactoside et la chaîne latérale empêche la diffusion passive de **85** à travers la membrane des cellules et donc son activation au sein de celles-ci.

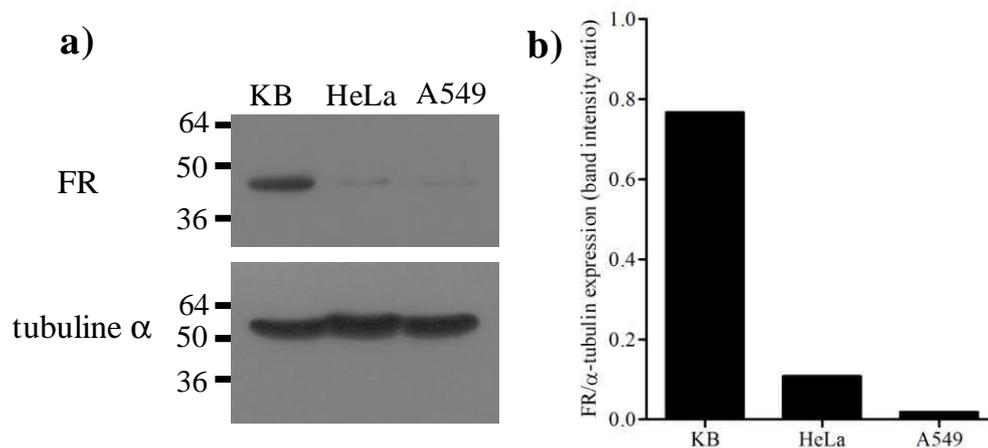


Figure 80 – (a) Mesure de l’expression du FR par western blot en comparaison avec l’expression de la tubuline- α sur les lignées KB, HeLa et A549 (b) Quantification du rapport (intensité de la bande correspondant au FR / intensité de la bande correspondant à la tubuline- α)

L'ensemble de ces données semblent donc indiquer que le vecteur **85** est activé sélectivement par les cellules cancéreuses exprimant à leur surface le récepteur de l'acide folique. Dès lors, cette sélectivité laisse supposer que le vecteur **85** présentera une toxicité moins importante envers les tissus sains que la MMAE lors de son usage *in-vivo*.

Un test d'imagerie par microscopie confocale a été réalisé pour vérifier que la cytotoxicité induite par le vecteur **85** était bien due à la libération de la MMAE après internalisation du vecteur (**Figure 81**). Lors de cette expérience, des cellules de type HeLa ont été incubées en présence de MMAE ou du vecteur **85** à une concentration de 1 nM. Le marquage de l' α -tubuline a permis de détecter la perturbation de la formation des microtubules induite par la MMAE et par le vecteur **85**. Ce résultat indique donc que l'internalisation puis l'activation du conjugué de l'acide folique **85** conduit à la libération d'une molécule active de MMAE pouvant générer son activité cytotoxique dans le cytoplasme.

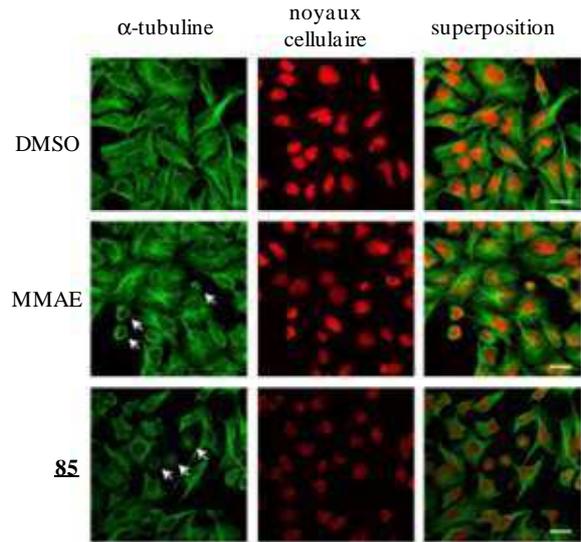


Figure 81 – a) immunodétection de l' α -tubuline par microscopie confocale sur des cellules de type HeLa. Les flèches blanches indiquent les cellules dont la division est bloquée par la MMAE ou **85**

Alors que les tissus cancéreux présentent généralement une grande hétérogénéité, l'éradication d'un seul type de cellule, telles que celles surexprimant un récepteur membranaire spécifique, ne permet généralement pas de détruire totalement et durablement la masse tumorale. Cependant, un processus d'activation intracellulaire extrêmement efficace permettra la libération d'une grande quantité d'agent actif pouvant diffuser à travers les membranes des cellules ciblées vers les cellules cancéreuses voisines ne pouvant pas être atteintes directement par le vecteur (**Figure 82**).

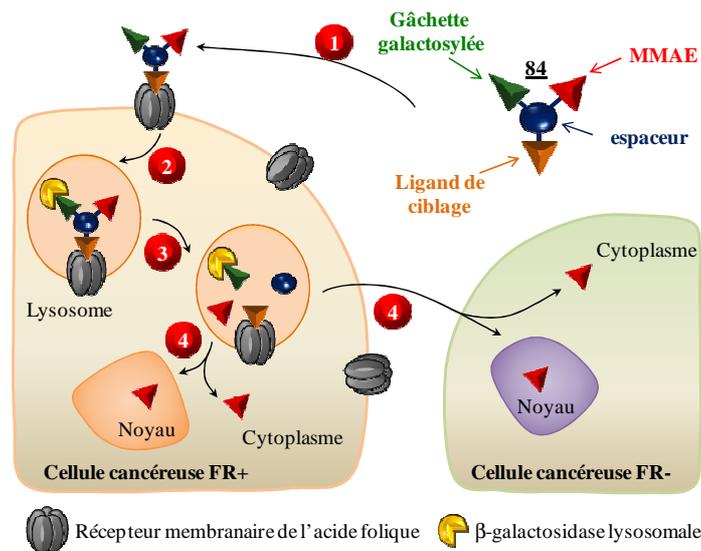


Figure 82 – Principe de l'effet bystander 1 : reconnaissance de la cellule tumorale ; 2 : internalisation du couple vecteur-récepteur ; 3 : dégradation du vecteur dans le lysosome ; 4 : translocation (nucléaire ou cytoplasmique) de l'espèce active ou migration vers une cellule cancéreuse n'exprimant pas le récepteur de l'acide folique.

Pour vérifier cette hypothèse, des cellules KB ont été mises en co-culture avec des cellules A549 dans des chambres de Boyden. Le vecteur **85** a tout d'abord été incubé avec des cellules KB placées dans la chambre supérieure (**Figure 83a**) afin de permettre la libération de la MMAE. Celle-ci pourra alors diffuser à travers les pores (0,4 μm) de la membrane du dispositif de culture et ainsi rejoindre la chambre inférieure contenant les cellules A549. Dans ces conditions, le vecteur **85** possède un effet antiprolifératif sur les cellules A549 comparable à celui mesuré pour la MMAE seule à des doses identiques (5 et 10 nM). La même expérience a ensuite été répétée en remplaçant les cellules KB par des cellules A549 (**Figure 83b**). Dans ce cas, l'incubation du vecteur **85** dans la chambre supérieure n'induit aucune toxicité sur les cellules de la chambre inférieure alors que la MMAE possède une activité antiproliférative dans les mêmes conditions. Ces deux expériences indiquent donc clairement que l'action cytotoxique du vecteur **85** sur les cellules A549 est liée à l'internalisation et à l'activation préalable de ce composé au sein de cellules exprimant le FR.

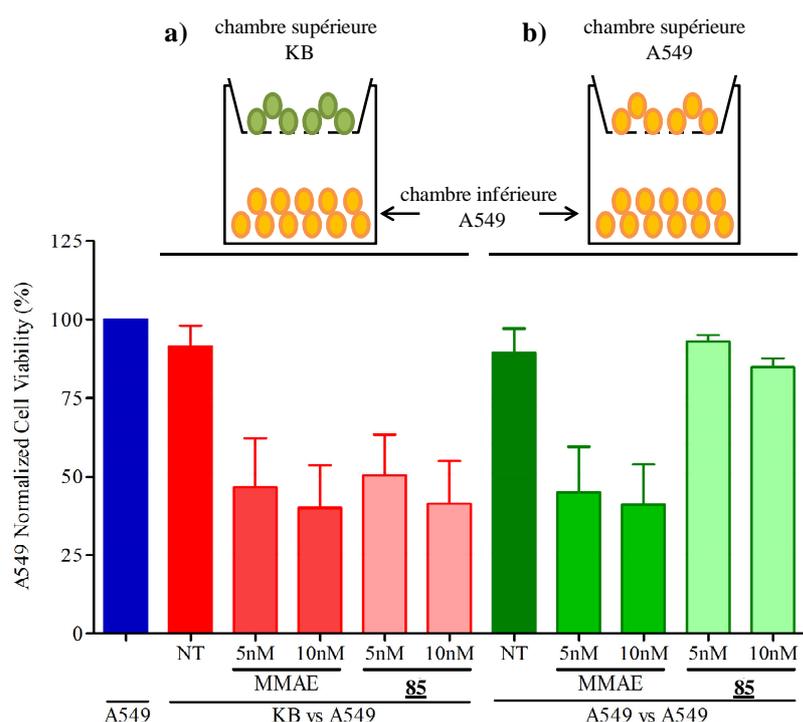


Figure 83 – Viabilité des cellules A549 en chambres de Boyden

Lors de cette étude, il a ainsi été montré pour la première fois que l'activation du vecteur **85** par la β -galactosidase lysosomale présente dans les cellules exprimant FR est un processus efficace qui permet de libérer une quantité de MMAE suffisante pour détruire des cellules cancéreuses avoisinantes ne surexprimant pas ce récepteur.

2.2.3 Etude de l'efficacité thérapeutique du vecteur **85** chez la souris

L'efficacité thérapeutique du vecteur **85** (5 mg/kg) a été évaluée en comparaison avec la MMAE (0,1 mg/kg) sur des xénogreffes de type KB transfectées par le gène de la luciférase chez des souris mâles BALB/c (**Figure 84**). L'évolution de la tumeur a été mesurée de façon non-invasive par bioluminescence.

Le vecteur **85** possède une très bonne efficacité anticancéreuse se traduisant par la disparition totale de la bioluminescence à partir du jour 21, alors que le traitement par la MMAE n'induit, à cette dose, qu'une inhibition modérée de la croissance tumorale. La MMAE a aussi été utilisée à plus forte dose (0,5 mg/kg). Cependant, une seule injection de ce composé entraîne une perte de poids importante chez les souris traitées ne nous permettant pas de poursuivre le traitement.

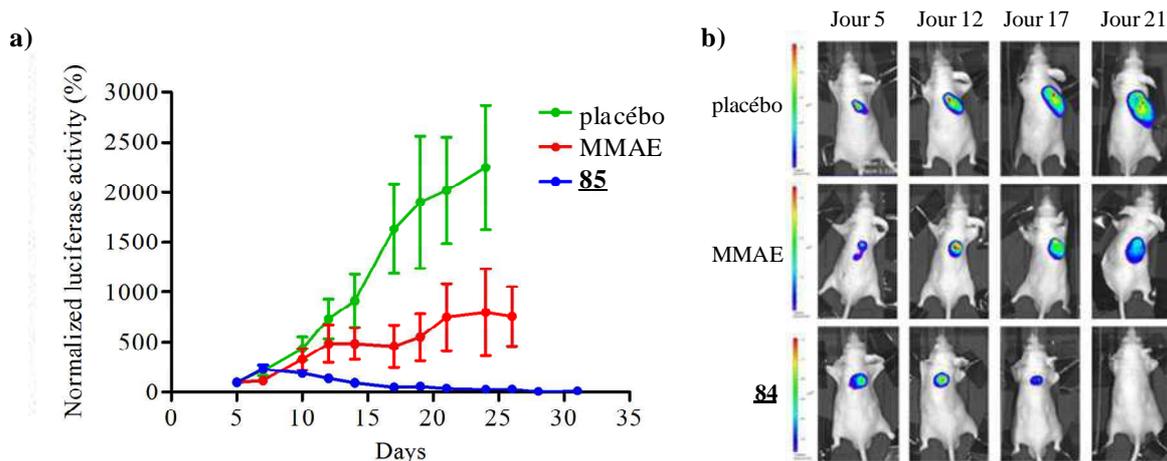


Figure 84 –a) Suivi du volume tumoral au cours du temps lors de l'évaluation de l'efficacité thérapeutique du vecteur **85** (5 mg/kg, administré aux jours 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 21 23 et 26) en comparaison avec la MMAE (0,1 mg/kg, administré aux jours 4, 7, 10, 14, 17) ; b) Clichés de bioluminescence au cours du temps.

Le vecteur **85** a été bien toléré par les souris à cette dose, puisque aucune perte de poids ni de signe de toxicité n'ont été observés (**Figure 85a**). De plus, toutes les souris traitées par le composé **85** sont restées en vie tout au long du protocole (7/7, jour 31) alors que la moitié des souris traitées par la MMAE ont succombé (3/7, jour 31) (**Figure 85b**).

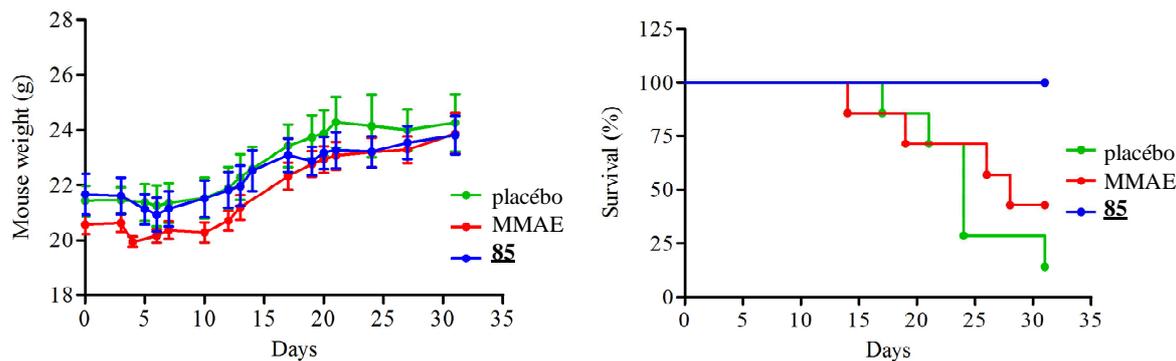


Figure 85 – a) Courbe d'évolution du poids des souris lors du traitement. b) Courbe de survie des souris non traitées, traitées par la MMAE et traitées par le vecteur **85**

2.3 Conclusion

Le but de cette étude était de concevoir un nouveau vecteur galactosylé **85** de la MMAE ciblant le récepteur de l'acide folique surexprimé à la surface de certaines cellules cancéreuses. Après internalisation par endocytose, ce composé pourra être activé par la β -galactosidase lysosomale et ainsi libérer une molécule active de MMAE. Une étude *in-vitro* a montré que ce vecteur était particulièrement efficace sur les cellules KB avec une valeur d' IC_{50} de 240 pM, faisant de lui le vecteur de ce type le plus puissant conçu à ce jour. De plus, peu de toxicité a été observée sur les cellules A549 (IC_{50} : 195 nM). L'activation efficace du vecteur **85** dans les cellules possédant le récepteur de l'acide folique permet la libération d'une grande quantité d'espèce active pouvant migrer à travers la membrane cellulaire et ainsi atteindre des cellules cancéreuses voisines ne pouvant pas internaliser ce vecteur. Ce phénomène est d'une grande importance car le ciblage d'un seul type de cellules tumorales ne permet généralement pas l'éradication complète de la tumeur. Le composé **85** présente une excellente activité anticancéreuse sur des xénogreffes de tumeurs KB implantées chez la souris nude sans provoquer d'effets secondaires. Ce résultat démontre donc la validité de cette approche *in-vivo*.

3. Etude de nouveaux vecteurs ciblant des récepteurs membranaires des cellules cancéreuses

Dans le cadre d'un traitement personnalisé du cancer, il est nécessaire de développer des vecteurs capables de reconnaître différents récepteurs surexprimés à la surface des cellules cancéreuses. Les résultats extrêmement prometteurs obtenus lors de l'étude du vecteur galactosylé **85** nous ont donc conduits à adapter ce concept avec différents ligands de ciblage. Lors de cette étude, trois cibles ont été sélectionnées. Il s'agit du PSMA (cancer de la prostate), du récepteur de l'asialoglycoprotéine (cancer hépatique) et du VEGFR (cellules endothéliales tumorales).

3.1 Le ciblage du VEGFR

3.1.1 Rappels bibliographiques

Lorsque le volume tumoral atteint 2 mm³, les cellules cancéreuses ne peuvent plus s'alimenter en nutriment et en oxygène exclusivement par diffusion. Pour se développer, la tumeur doit alors se vasculariser afin de puiser ces ressources dans le système sanguin.¹⁰ La formation de ces nouveaux vaisseaux est un phénomène appelé angiogénèse tumorale. L'angiogénèse tumorale peut être stimulée par de nombreux facteurs chimiques libérés par les cellules cancéreuses,¹⁴⁹ telles que des enzymes protéolytiques (MMP, uPAs), des intégrines (molécules d'adhésion cellulaires) et des facteurs de croissance. Ces derniers interagissent directement avec les cellules endothéliales pour stimuler leur croissance et leur diffusion.¹⁵⁰

Le VEGF (Vascular endothelial growth factor) est l'un des facteurs de croissance le plus étudié à ce jour.¹⁵¹ Cette famille de dimères de glycoprotéines regroupe plusieurs membres (VEGF-A, B, C, D, E) possédant une masse moléculaire variant de 34 à 45 kDa. Le VEGF-A fut le premier découvert en 1989. Il possède cinq isoformes constituées de 121, 145, 165, 189 et 206 acides aminés. Son isoforme prédominante est le VEGF₁₆₅ qui est le plus

149 (a) Folkman, J. *New Engl. J. Med.* **1971**, 285, 1182-1186. **(b)** Hanahan, D.; Folkman, J. *Cell* **1996**, 86, 353-364.

150 (a) Hillen, F.; Griffioen, A. *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, 26, 489-502. **(b)** Folkman, J.; Merler, E.; Abernathy, C.; Williams, G. *J. Exp. Med.* **1971**, 133, 275-288.

151 (a) Ferrara, N.; Henzel, W. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 161, 851-858. **(b)** Leung, D. W. ; Cachianes, G. ; Kuang, W. J. ; Goeddel, D. V. ; Ferrara, N. *Science*, **1989**, 246, 1306-1309.

puissant en terme de stimulation d'angiogénèse.¹⁵² Toutes ces isoformes présentent une grande affinité pour deux récepteurs à activité tyrosine kinase surexprimés par les cellules endothéliales composant les vaisseaux des tissus tumoraux : le VEGFR-1 et le VEGFR-2.¹⁵³ L'interaction entre le VEGF-A et le VEGFR-2 induit la prolifération cellulaire, la perméabilité vasculaire, la migration et la survie cellulaire.¹⁵⁴

La croissance tumorale et l'angiogénèse sont donc deux phénomènes étroitement liés. Au cours de ces quarante dernières années, de nombreux travaux ont fait de l'angiogénèse tumorale une cible thérapeutique extrêmement prometteuse dans le cadre du traitement du cancer.¹⁵⁵ A ce jour, deux approches ciblant l'angiogénèse ont été étudiées. Il s'agit de l'utilisation d'agents de destruction vasculaire (VDA) et de l'inhibition de la néo angiogénèse tumorale.

Lors de cette première approche, le traitement par des VDA permet de détruire les vaisseaux sanguins irriguant les tissus cancéreux.¹⁵⁶ L'arrêt de l'apport en nutriments entraîne alors l'apparition d'une zone de nécrose au centre de la tumeur et seule une couronne de cellules cancéreuses subsiste en périphérie en s'alimentant par diffusion *via* les cellules saines avoisinantes. Deux familles de VDA ont fait l'objet d'évaluations cliniques : il s'agit d'agents cytotoxiques tubulo-affins (combrestatine et ses analogues,¹⁵⁷ dolastatines,¹⁵⁸ colchicines¹⁵⁹) et de flavonoïdes¹⁶⁰ induisant la synthèse du TNF- α (Tumor Necrosis Factor). Cependant, l'efficacité de ces traitements est généralement limitée par la forte toxicité de ces composés.

La seconde approche concerne l'utilisation d'agents anti-angiogéniques inhibant l'interaction entre le VEGF et son récepteur. Le bevacizumab (Avastin®) est le premier agent

152 Tischer, E. ; Mitchell, R. ; Hartman, T. ; Silva, M. ; Gospodarowicz, D. ; Fiddes, J. C. ; Abraham, J. A. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 11947-11954.

153 (a) De Vries, C.; Escobedo, J. A.; Ueno, H.; Houck, K.; Ferrara, N.; Williams, L. T. *Science*, **1992**, 255, 989-991.

154 Cross, M. J.; Dixelius, J.; Matsumoto, T.; Claesson-Welsh, L.; *Trends Biochem. Sciences* **2003**, 28, 488-494.

155 Folkman, J. *Nature Reviews*, **2007**, 6, 273-286

156 Thorpe, P. E. *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10, 415-427.

157 (a) Iyer, S.; Chaplin, D. J.; Rosenthal, D. S.; Boulares, A. H.; Yi, L.-Y.; Smulson, M. E. *Cancer Res.* **1998**, 58, 4510-4514. **(b)** Dark, G. G.; Hill, S. A.; Prise, V. E.; Tozer, G. M.; Pettit, G. R.; Chaplin, D. J. *Cancer Res.* **1997**, 57, 1829-1834.

158 Chaplin, D. J.; Pettit, G. R.; Parkins, C. S.; Hill, S. A. *Br. J. Cancer* **1996**, 27 (suppl.), S86-S88.

159 Blakey, D. C.; Ashton, S. E.; Westwood, F. R.; Walker, M.; Ryan, A. *J. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* **2002**, 54, 1497-1502.

160 (a) Kerr, D. J.; Maughan, T.; Newlands, E.; Rustin, G.; Bleehen, N. M.; Lewis, C. Kaye, S. B. *Brit. J. Cancer* **1989**, 60, 104-106. **(b)** Zhao, L.; Ching, L. M.; Kestell, P.; Kelland, L. R.; Baguleu, B. C. *Int. J. Cancer* **2005**, 116, 322-326.

anti-angiogénique ayant reçu l'Autorisation de Mise sur le Marché aux Etats-Unis et en Europe pour le traitement de plusieurs tumeurs solides.¹⁶¹ Cet anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF inhibe la formation de nouveaux vaisseaux sanguins mais ne détruit pas les capillaires déjà établis. L'utilisation d'une protéine de fusion comprenant différents domaines extracellulaires du VEGFR1 et 2, appelée VEGF-Trap, a elle aussi abouti à de très bons résultats *in-vivo*.¹⁶² Tout comme le bevacizumab, cette protéine est capable de capturer le VEGF et ainsi de diminuer sa biodisponibilité dans l'organisme. Enfin, plusieurs composés inhibant l'activité tyrosine-kinase du VEGFR ont été conçus. A titre d'exemple, le sunitinib (commercialisé sous le nom Sutent® par Pfizer) a été approuvé en 2007 pour le traitement des cancers gastrointestinaux et du foie.¹⁶³

Bien que les thérapies visant l'angiogénèse tumorale conduisent à de bons résultats, les lourds effets secondaires qu'elles provoquent sont souvent à l'origine de l'arrêt prématuré du traitement. La conception de nouveaux agents moins toxiques et présentant une plus grande sélectivité pour les tissus endothéliaux tumoraux permettrait donc d'obtenir des traitements plus efficaces et mieux supportés par les patients.

Dans ce cadre, l'équipe du Professeur Gérard Déléris a développé un cyclopeptide constitué de 17 acides aminés appelé CBO-P11 présentant une affinité de l'ordre du micromolaire pour les récepteurs du VEGF (**Figure 86**). Ce composé présente des propriétés anti-angiogéniques particulièrement intéressantes. En effet, les premières évaluations biologiques du CBO-P11 ont révélé que ce cyclopeptide inhibe la croissance de diverses tumeurs du glioblastome de type U87 et GL261 implantées chez la souris nude de 70% à 78% par rapport aux tumeurs non traitées.¹⁶⁴

161 Hurwitz, H.; Fehrenbacher, L.; Novotny, W.; Cartwright, T.; Hainsworth, J.; Heim, W.; Berlin, J.; Baron, A.; Griffing, S.; Holmgren, E.; Ferrara, N.; Fyfe, G.; Rogers, B.; Ross, R.; Kabbinavar, F. *New Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2335-2342.

162 Konner, J.; Dupont, J. *Clin. Colorectal Cancer* **2004**, *4*(suppl. 2), S81-S85.

163 Goodman, V. L.; Rock, E. P.; Dagher, R.; Ramchandi, R. P.; Abraham, S.; Gobburu, J. V. S.; Booth, B. P.; Verbois, S. L.; Morse, D. E.; Liang, C. Y.; Chidambaram, N.; Jiang, J. X.; Tang, S.; Mahjoob, K.; Justice, R.; Pazdur, R. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 1367-1373.

164 Zilberberg, L.; Shinkaruk, S.; Lequin, O.; Rousseau, B.; Hagedorn, M.; Costa, F.; Caronzolo, D.; Cannon, X.; Convert, O.; Laiñ, G.; Gionnet, K.; Gonçalves, M.; Bayle, M.; Bello, L.; Chassaing, G.; Deleris, G.; Bikfalvi, A. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35564-35573.

Le CBO-P11 a également été utilisé en tant que ligand de ciblage et a permis l'internalisation sélective au sein de cellules endothéliales d'une sonde fluorescente¹⁶⁵ et de nanoparticules.¹⁶⁶ Cette première étude a montré que la dérivatisation du CBO-P11, notamment par une chaîne poly(éthylène) glycol comprenant une fonction azoture sur la fonction acide carboxylique du résidu glutamate, n'affecte en rien l'affinité de ce ligand pour le VEGFR.

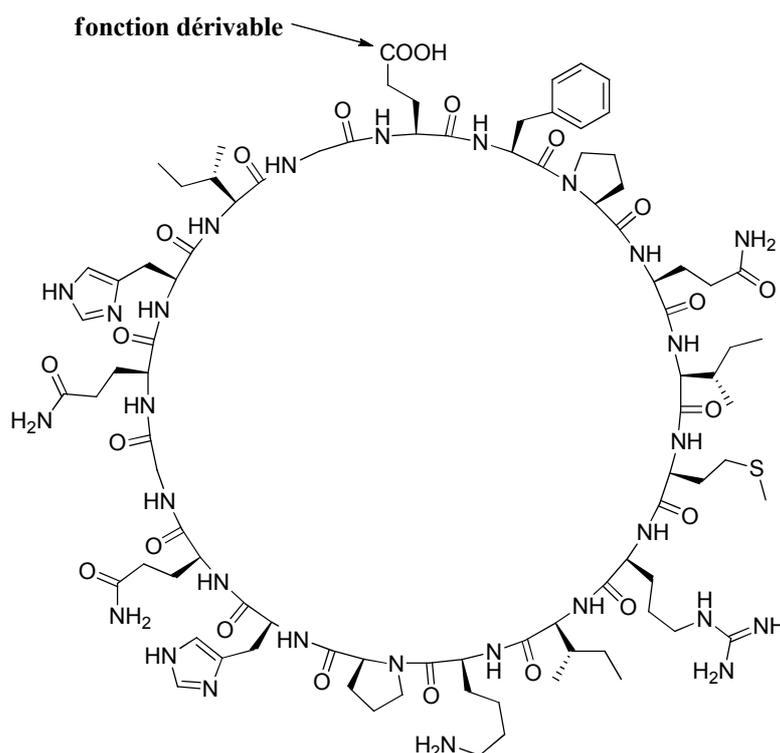


Figure 86 – Structure du cyclopeptide CBO-P11

3.1.2 Synthèse des vecteurs galactosylés **94a** et **94b** incorporant le motif CBO-P11

Afin de détruire sélectivement les cellules endothéliales tumorales, nous avons proposé la synthèse de deux nouveaux vecteurs galactosylés **94a** et **94b** comportant une unité doxorubicine ou MMAE et un motif CBO-P11 permettant le ciblage du VEGFR (**Figure 87**). L'internalisation de ces composés par les cellules endothéliales surexprimant le VEGFR sera suivie de l'activation de ces vecteurs par la β -galactosidase lysosomale et conduira à la libération de l'agent anticancéreux.

¹⁶⁵ Gonçalves, M.; Estieu-Gionnet, K.; Berthelot, T.; Lähn, G.; Bayle, M.; Canron, X.; Betz, N.; Bikfalvi, A.; Délérís, G. *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 1411-1421.

¹⁶⁶ Deshayes, S.; Maurizot, V.; Clochard, M.-C.; Baudin, C.; Berthelot, T.; Esnouf, S.; Lairez, D.; Moenner, M.; Délérís, G. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 1631-1642.

L'utilisation du vecteur **94a**, comportant une unité de doxorubicine naturellement fluorescente, permettra d'évaluer l'internalisation cellulaire de ce type de composé par microscopie confocale. Le vecteur de la MMAE **94b** pourrait, quant à lui, être utilisé *in-vivo* en raison de son importante cytotoxicité.

Ces deux composés pourront être obtenus après couplage par une réaction de cycloaddition [3+2] catalysée par le cuivre I entre le ligand de ciblage **96** et les alcynes **91** et **95**.

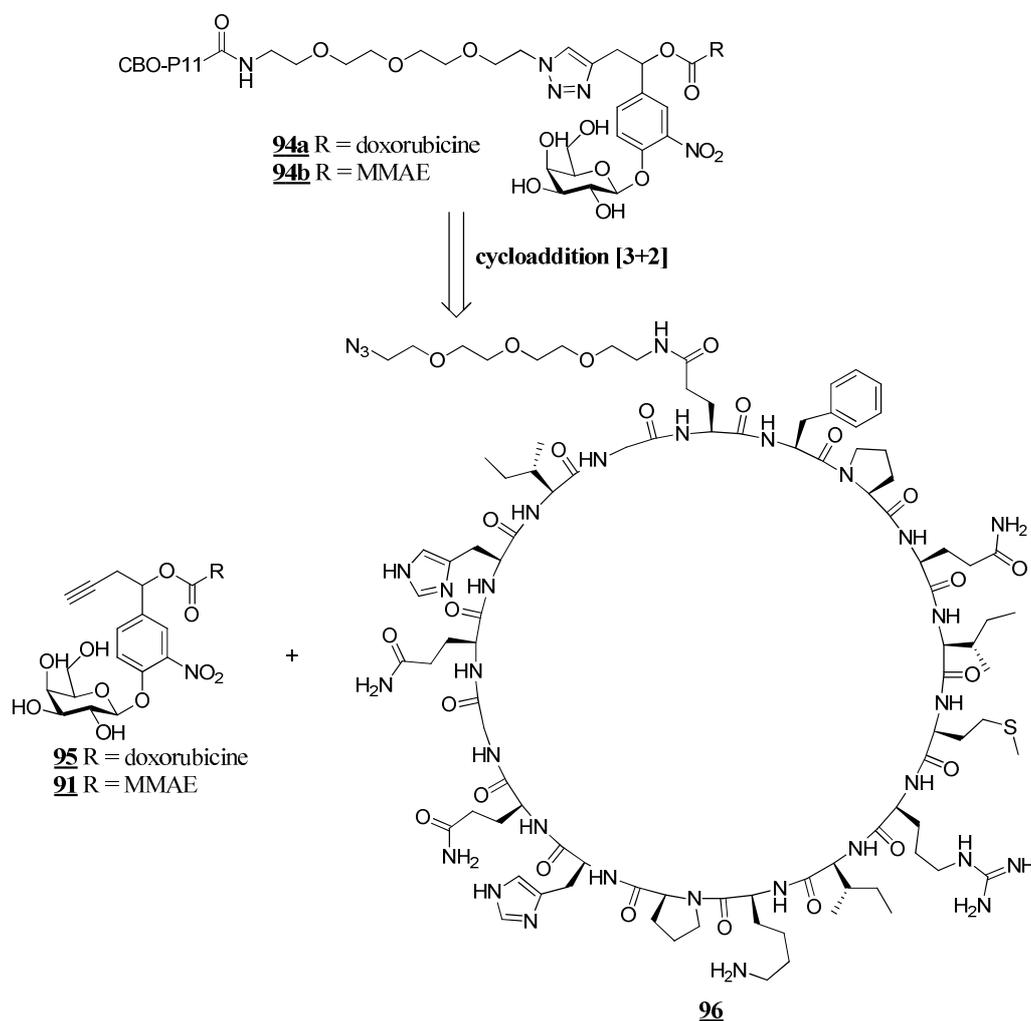


Figure 87 – Structure des vecteurs **94a** et **94b**

La synthèse de l'intermédiaire **95** a été précédemment réalisée au laboratoire⁹⁸ tandis que le dérivé du CBO-P11 **96** nous a gracieusement été fourni par le Professeur Gérard Déléris et son équipe.

Un premier essai de couplage entre l'alcyne **95** et l'azoture **96** a été réalisé en présence de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium dans un mélange eau/*tert*-butanol (**Figure 88**). Après décomplexation du cuivre par une solution d'EDTA disodique dans le tampon phosphate (pH = 7) et purification par HPLC semi-préparative, le vecteur **94a** a été obtenu avec un rendement de 22%. Une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF confirme la formation du composé **94a** avec l'observation d'un ion moléculaire à $m/z = 3136,4$.

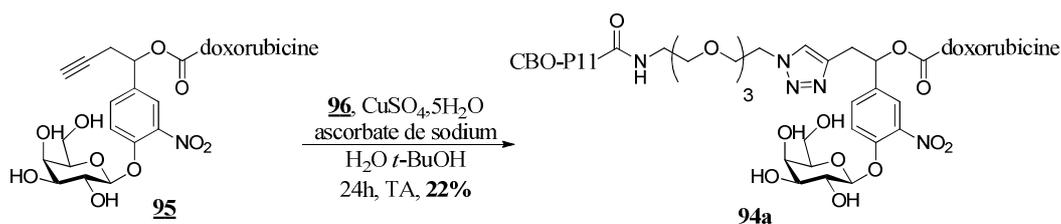


Figure 88 – Synthèse du vecteur galactosylé **94a**

3.1.3 Hydrolyse enzymatique du vecteur 94a

L'hydrolyse enzymatique du vecteur **94a** (0,5 mg/mL) a ensuite été effectuée à 37°C dans du tampon phosphate en présence de β -galactosidase (*E. Coli* ; 12,5 U/mL). La composition du mélange réactionnel a été suivie au cours du temps par HPLC (**Figure 89**).

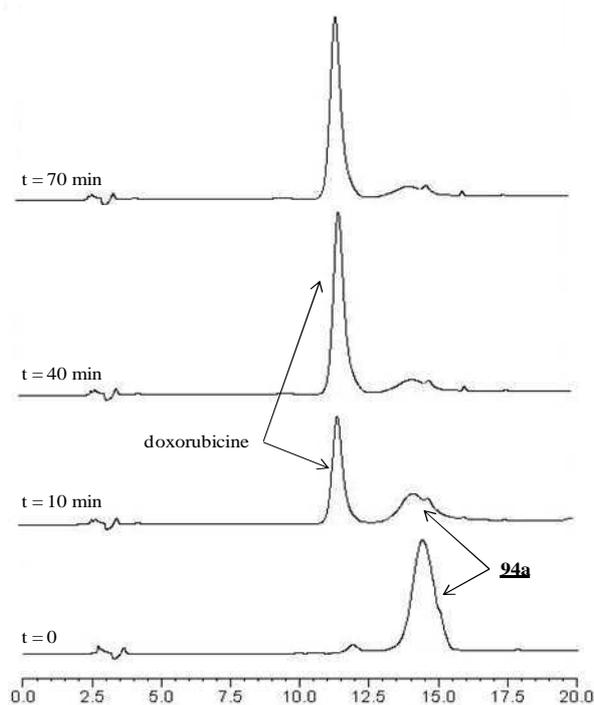


Figure 89 – Hydrolyse enzymatique du vecteur **94a**

Dans ces conditions, le vecteur **94a** est un bon substrat de la β -galactosidase, même en présence de groupements encombrants tels que le CBO-P11. Après 40 minutes d'incubation en présence de l'enzyme, la doxorubicine est totalement libérée dans le milieu.

3.1.4 Conclusion et perspectives

Lors de cette étude, un premier essai de couplage entre le ligand de ciblage **96** et l'alcyne **95** nous a permis de synthétiser le vecteur galactosylé de la doxorubicine **94a** ciblant le VEGFR. Une étude *in-vitro* menée sur des cellules de type HUVEC (cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humain) exprimant le VEGFR nous permettra de confirmer l'internalisation de ce composé par microscopie confocale grâce à la fluorescence de la doxorubicine. La libération de l'agent actif dans ces cellules sera, quant à elle, vérifiée par la mesure de la prolifération cellulaire. Si cette étude aboutit à des résultats encourageants, l'évaluation du vecteur de la MMAE **94b** comportant le motif CBO-P11 sera réalisée sur un modèle *in-vivo*.

3.2 Le ciblage du PSMA

3.2.1 Rappels bibliographiques

En France, le cancer de la prostate est la troisième cause de décès par cancer recensé chez l'homme en 2011 (8700 décès).¹ A ce jour, ce type de cancer est principalement traité par chirurgie, en combinaison avec une radiothérapie, hormonothérapie ou chimiothérapie. Cependant, aucune de ces thérapies ne s'est montrée suffisamment efficace pour traiter avec succès les métastases rencontrées lorsque cette maladie atteint un stade avancé. De plus, les nombreux effets secondaires provoqués par ces traitements limitent bien souvent leur efficacité et dégradent fortement la qualité de vie des patients.

Il paraît donc nécessaire de développer des méthodes de traitements plus sûres et plus efficaces pour traiter ce type de cancer. Dans ce cadre, le développement de nouveaux vecteurs ciblant le PSMA (glutamate carboxypeptidase II) apparaît comme une stratégie très prometteuse. En effet, plusieurs études ont montré que cet antigène était surexprimé à la surface de la majorité des cellules tumorales du cancer de la prostate.¹²⁹ Il est aussi

abondamment présent au niveau des métastases associées à cette pathologie¹⁶⁷ et des cellules endothéliales de nombreuses tumeurs solides¹⁶⁸ alors que son expression au niveau des tissus sains est extrêmement limitée. De plus, il a été montré que l'internalisation de vecteurs par le PSMA est rapidement suivie du recyclage de l'antigène à la surface de la cellule.¹⁶⁹ Ces éléments font du PSMA un candidat idéal pour le ciblage thérapeutique d'agents anticancéreux.

De nombreuses études ont montré qu'il était possible d'internaliser des agents anticancéreux et des sondes pour l'imagerie médicale en ciblant le PSMA au moyen d'anticorps¹⁷⁰ ou de ligands de faibles poids moléculaires.¹⁷¹ Dans ce cadre, l'acide 2-[3-(1,3)-dicarboxylpropyl]ureido]pentanedioïque ou DUPA, un inhibiteur de la glutamate carboxypeptidase II,¹⁷² s'est révélé être un très bon candidat pour le ciblage des cellules tumorales de par son affinité pour le PSMA de l'ordre du nanomolaire (**Figure 90**).

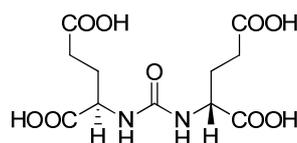


Figure 90 - structure de l'acide 2-[3-(1,3)-dicarboxylpropyl]ureido]pentanedioïque

- 167 (a)** Murphy, G. P.; Barren, R. J.; Erickson, S. J. *Cancer* **1996**, *78*, 809-818. **(b)** Lopes, A. D.; Davis, W. L.; Rosenstraus, M. J.; Uveges, A. J.; Gilman, S. C. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 6423-6429.
- 168** Chang, S. S.; O'Keefe, D. S.; Bacich, D. J.; Reuter, V. E.; Heston, W. D. W.; Gaudin, P. B. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 2674-2681.
- 169** Liu, H.; Rajasekaran, A. K.; Moy, P.; Xia, Y.; Kim, S.; Navarro, V.; Rahmati, R.; Bander, N. H. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 4055-4060.
- 170 (a)** Wang, X.; Ma, D.; Olson, W. C.; Heston, W. D. W. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 1728-1739. **(b)** Ma, D.; Hopf, C. E.; Malewicz, A. D.; Donovan, G. P.; Senter, P. D.; Goeckeler, W. F.; Maddon, P. J.; Olson, W. C. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 2591-2596. **(c)** Sodee, D. B.; Ellis, R. J.; Samuels, M. A.; Spirnak, J. P.; Poole, W. F.; Riester, C.; Martanovic, D. M.; Stonecipher, R.; Bellon, E. M. *Prostate* **1998**, *37*, 140-148. **(d)** Milowsky, M. I.; Nanus, D. M.; Kostakoglu, L.; Sheehan, C. E.; Vallabhajosula, S.; Goldsmith, S. J.; Ross, J. S.; Bander, N. H. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 540-547.
- 171 (a)** Misra, P.; Humblet, V.; Pannier, N.; Maison, W.; Frangioni, J. V. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1379-1389. **(b)** Tang, H.; Brown, M.; Ye, Y.; Huang, G.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Zhai, H.; Chen, X.; Shen, T. Y.; Tenniswood, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *307*, 8-14. **(c)** Liu, T.; Wu, L.; Kazak, M.; Berkman, C. E. *Prostate* **2008**, *68*, 955-964. **(d)** Mease, R. C.; Dusich, C. L.; Foss, C. A.; Ravert, H. T.; Dannals, R. F.; Seidel, J.; Prideaux, A.; Fox, J. J.; Sgouros, G.; Kozikowski, A. P.; Pomper, M. G. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 3036-3043. **(e)** Banerjee, S. R.; Foss, C. A.; Castanares, M.; Mease, R. C.; Byun, Y.; Fox, J. J.; Hilton, J.; Lupold, S. E.; Kozikowski, A. P.; Pomper, M. G. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4504-4517. **(f)** Chen, Y.; Foss, C. A.; Byun, Y.; Nimmagadda, S.; Pullambhatla, M.; Fox, J. J.; Castanares, M.; Lupold, S. E.; Babich, J. W.; Mease, R. C.; Pomper, M. G. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7933-7943. **(g)** Banerjee, S. R.; Pullambhatla, M.; Byun, Y.; Nimmagadda, S.; Green, G.; Fox, J. J.; Horti, A.; Mease, R. C.; Pomper, M. G. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5333-5341.
- 172 (a)** Kozikowski, A. P.; Nan, F.; Conti, P.; Zhang, J.; Ramadan, E.; Bzdega, T.; Wroblewska, B.; Neale, J. H.; Pshenichkin, S.; Wroblewski, J. T. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 298-301. **(b)** Kozikowski, A. P.; Zhang, J.; Nan, F.; Petukhov, P. A.; Grajkowska, E.; Wroblewski, J. T.; Yamamoto, T.; Bzdega, T.; Wroblewska, B.; Neale, J. H. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1729-1738.

L'équipe de P. Low a utilisé ce ligand de ciblage pour la vectorisation d'un radiotracer et d'une sonde fluorescente,¹⁷³ puis a adapté ce concept pour l'utilisation de différents agents anticancéreux (**Figure 91**).¹⁷⁴ A l'image du vecteur EC145 (**Figure 5**), les composés **97a-e** comportent un motif DUPA relié à l'agent anticancéreux par un espaceur peptidique présentant un pont disulfure. Après internalisation des conjugués dans la cellule cancéreuse, la réduction du pont disulfure suivie d'une cyclisation intramoléculaire permet la libération de l'espèce active.

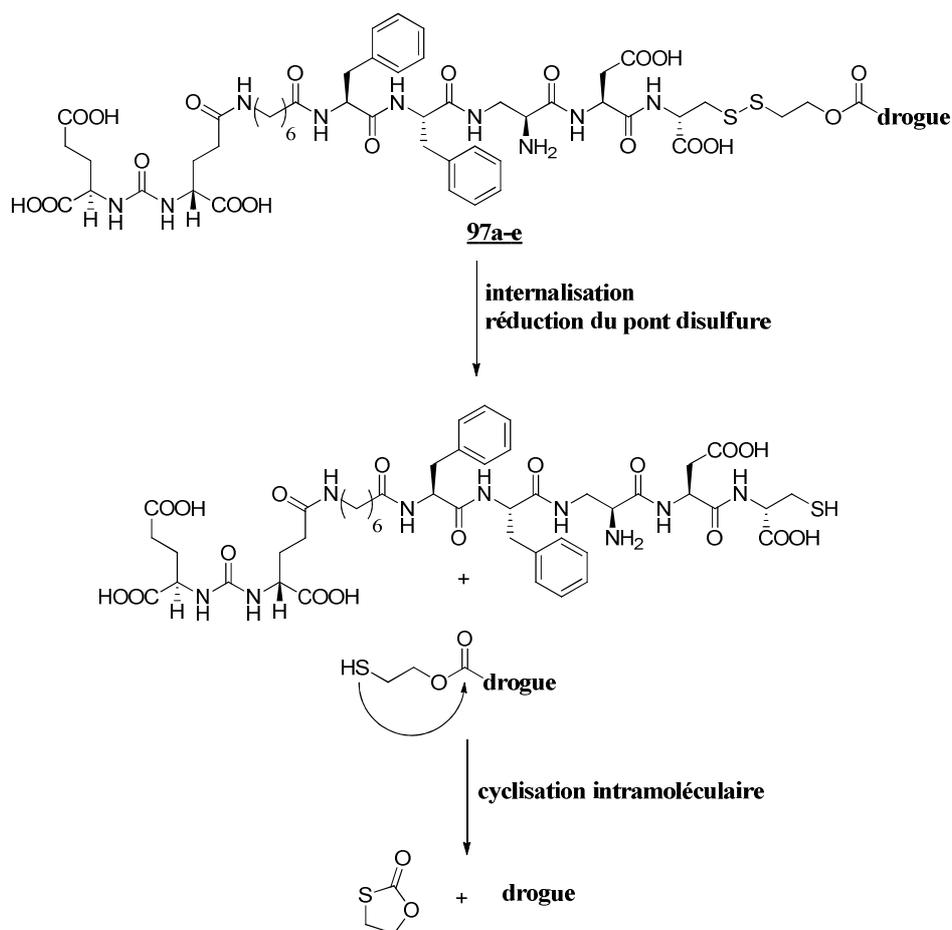


Figure 91 – Structure des vecteurs **97a** : tubulysine B ; **97b** : DAVLBH ; **97c** : camptothécine ; **97d** : verrucarine A ; **97e** : didemnine B.

L'activité antiproliférative des vecteurs **97a-e** a été évaluée sur des cellules tumorales prostatiques humaines LNCaP surexprimant le PSMA. Ces composés se sont montrés particulièrement actifs sur cette lignée cellulaire avec des valeurs d'IC₅₀ comprises entre 6 et

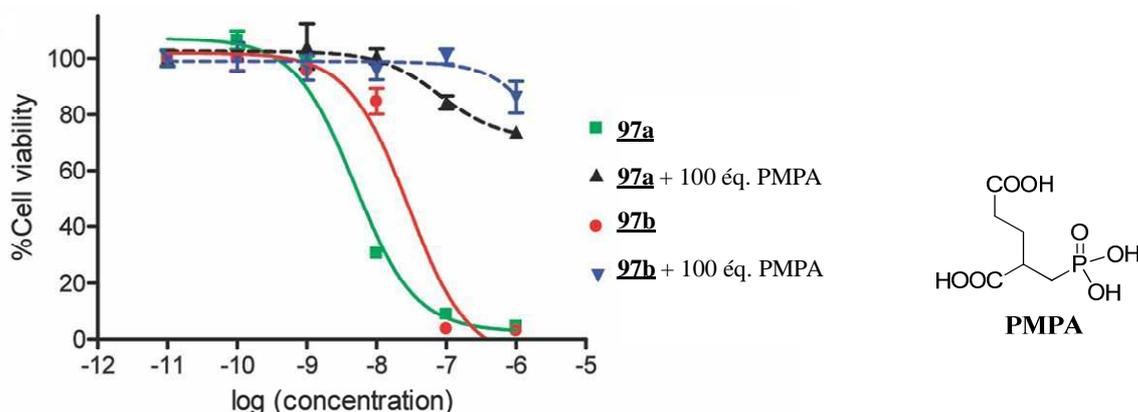
173 (a) Kularatne, S. A.; Wang, K.; Santhapuram, H.-K. R.; Low, P. S. *Mol. pharmaceutics* **2009**, *6*, 780-789.

(b) Kularatne, S. A.; Zhou, Z.; Yang, J.; Post, C. B.; Low, P. S. *Mol. pharmaceutics* **2009**, *6*, 790-800.

174 Kularatne, S. A.; Venkatesh, C.; Santhapuram, H.-K. R.; Wang, K.; Vaitilingam, B.; Henne, W. A.; Low, P. S. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7767-7777.

115 nM. Seul le vecteur de la verrucarine A **97d** est inactif jusqu'à la plus haute dose testée de 1 μ M, alors qu'utilisée sous sa forme libre, cette molécule possède une activité remarquable avec une IC_{50} de 3,3 nM. Pour expliquer ce résultat surprenant, les auteurs ont postulé que l'internalisation du vecteur **97d** est suivie par la dégradation de la verrucarine A par des hydrolases endosomales, alors que la diffusion passive à travers la membrane de la drogue sous sa forme libre lui permet d'atteindre directement sa cible biologique sans dégradation.

Pour vérifier que l'internalisation sélective des vecteurs est initiée par la reconnaissance de l'antigène, la même expérience a été réalisée en saturant préalablement le milieu de culture avec un ligand possédant une haute affinité pour le PSMA, tel que l'acide 2-(phosphonométhyl)pentanedioïque (PMPA) (**Figure 92**). Dans ces conditions, la pénétration des vecteurs **97a** et **97b** dans les cellules LNCaP est considérablement réduite. Ce phénomène se traduit alors par une nette diminution de la cytotoxicité de ces vecteurs. Ce résultat prouve que l'activité antiproliférative de ces composés n'est pas liée à la libération extracellulaire du composé actif puis à la diffusion passive de ce dernier à travers la membrane cellulaire.



3.2.2 Synthèse du vecteur galactosylé **98** incorporant un motif DUPA

Afin d'appliquer notre concept de vecteur galactosylé au ciblage du PSMA, nous avons entrepris la synthèse du vecteur **98** présentant un motif DUPA (**Figure 93**). Comme dans le cas des vecteurs **94a**, **98** pourra être obtenu après couplage par cycloaddition [3+2] entre l'alcyne **91** et le motif DUPA présentant une fonction azoture **108**.

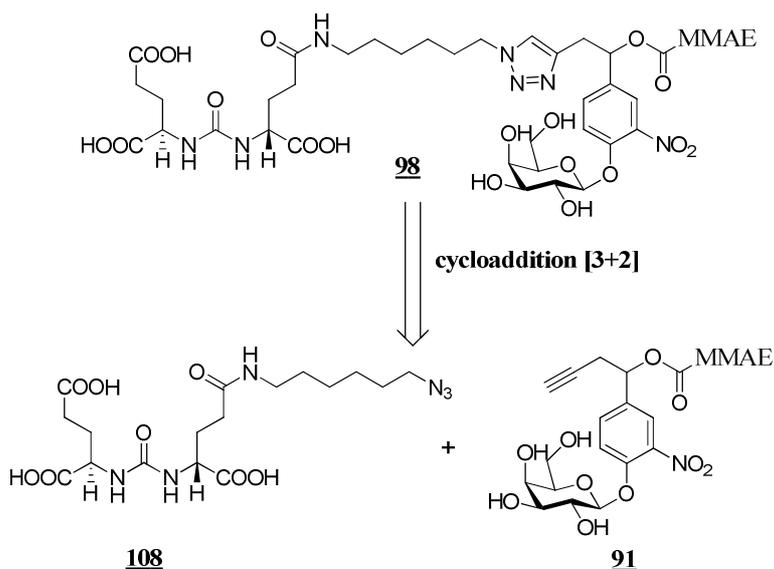


Figure 93 - Structure et stratégie de synthèse du vecteur **98**

3.2.2.1 Synthèse du ligand de ciblage **108**

La préparation du ligand de ciblage présentant un motif DUPA **108** commence tout d'abord par la synthèse de la chaîne latérale présentant une fonction azoture **102** (Figure 94). Ce composé a été préparé en quatre étapes à partir du 6-aminohexan-1-ol commercial. La première étape consiste en la protection de la fonction amine sous forme de carbamate de *tert*-butyle. Le composé **99** a ainsi été obtenu de manière quantitative. L'alcool **99** a ensuite été traité en présence de chlorure de tosyloyle et de triéthylamine pour conduire à l'intermédiaire **100** avec un rendement de 92%. La substitution du tosylate par l'azoture de sodium a été réalisée à 55°C dans le DMF. Dans ces conditions, l'azoture **101** a été isolé avec un rendement de 93%. Enfin, l'amine est déprotégée par le TFA dans le dichlorométhane. Après neutralisation du milieu réactionnel, le composé **102** a été obtenu avec un rendement de 95%.

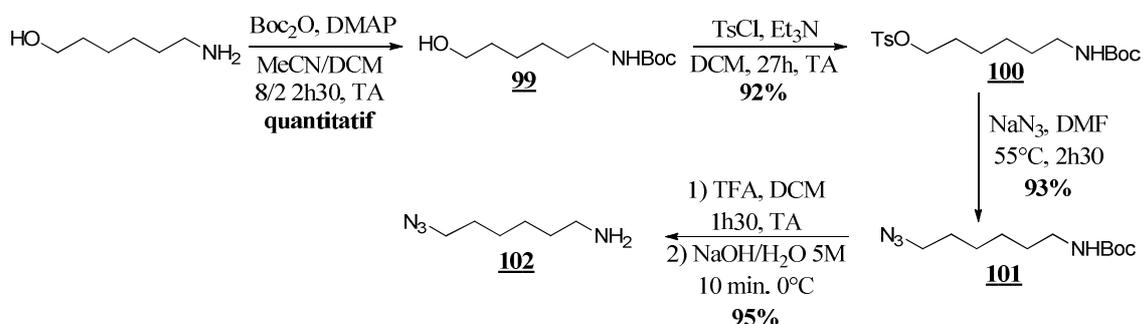


Figure 94 – Synthèse de l'intermédiaire **102**

Le motif DUPA a ensuite été préparé en adaptant la procédure décrite par Low (**Figure 95**).^{152a} La première étape consiste tout d'abord en la préparation de l'isocyanate dérivé de l'acide glutamique protégé **103**. Celui-ci réagit alors avec le dérivé de l'acide glutamique **104** pour former l'urée **105** avec un bon rendement de 83%. La structure de cet intermédiaire a été confirmée par RMN ¹³C avec la présence d'un signal à 156,8 ppm, caractéristique de la fonction urée. L'ester de benzyle **105** a ensuite été déprotégé en présence de palladium sur charbon sous atmosphère d'hydrogène. A l'issu de cette réaction, l'acide carboxylique **106** a été isolé avec un excellent rendement de 97%. La déprotection sélective de cette fonction ester a été confirmée par RMN ¹H avec la disparition des signaux des protons aromatiques. La chaîne latérale **102** a ensuite été introduite sur le motif DUPA par couplage peptidique en présence d'EDC et d'une quantité catalytique de DMAP. L'intermédiaire **107** a ainsi été obtenu avec un rendement de 58%. Enfin les esters de *tert*-butyle ont été clivés en présence de TFA dans le dichlorométhane pour conduire au composé **108** avec un rendement de 97%. La déprotection totale de **107** a été confirmée par RMN ¹H avec la disparition des signaux à 1,48, 1,45 et 1,43 ppm caractéristiques des protons des groupements *tert*-butyle.

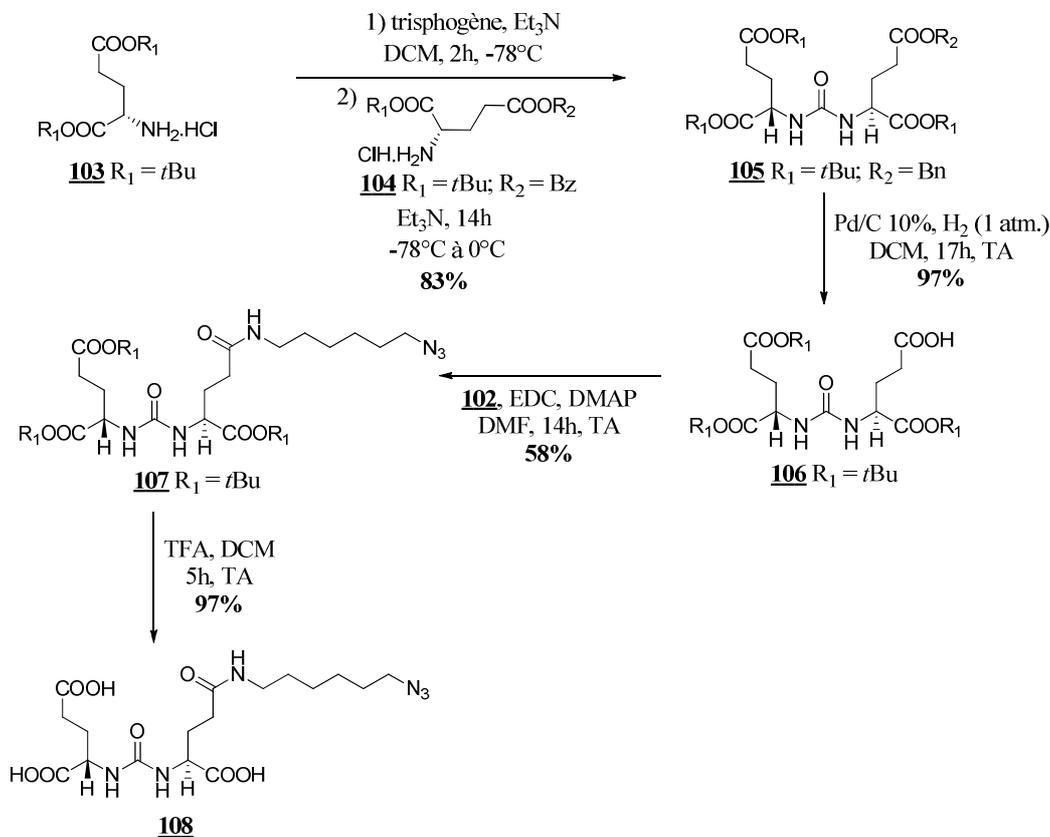


Figure 95 – Synthèse du ligand DUPA **108**

3.2.2.2 Couplage de l'alcyne **91** à l'azoture **108**

Un premier essai de couplage entre l'alcyne **91** et le ligand DUPA **108** a été réalisé en présence de sulfate de cuivre et d'ascorbate de sodium dans un mélange eau/*tert*-butanol (**Figure 96**).

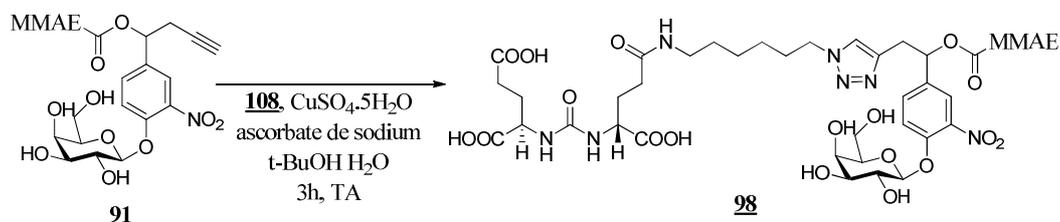


Figure 96 – Synthèse du vecteur galactosylé **98**

Dans ces conditions, le suivi HPLC de la réaction indique une dégradation rapide du brut réactionnel conduisant à la formation de plusieurs composés difficilement séparables par HPLC semi-préparative. Bien que très minoritaire, la présence du composé **98** dans le brut réactionnel a pu être détecté par spectrométrie de masse (**Figure 97**).

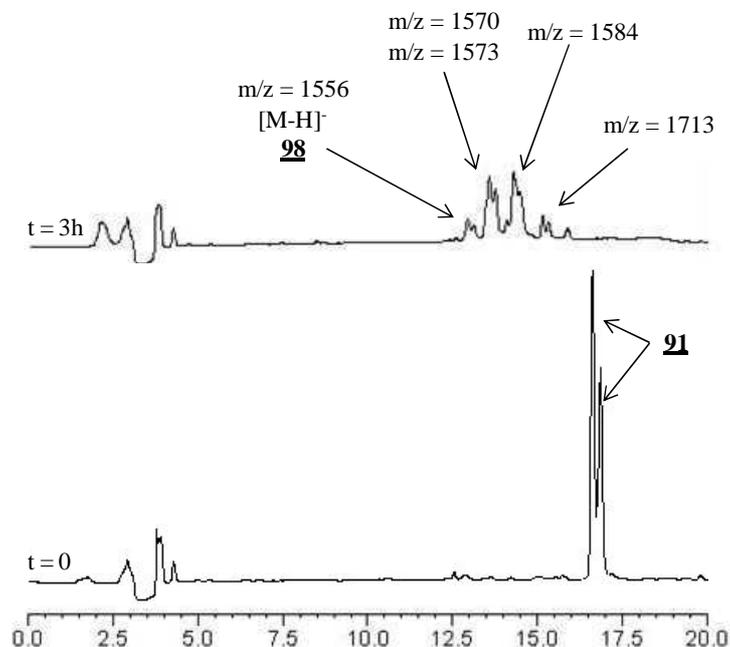


Figure 97 – Suivi de la réaction de couplage entre l'intermédiaire **91** et la chaîne latérale **108**

3.2.3 Conclusion et perspectives

Le but de cette étude était de synthétiser un nouveau vecteur galactosylé **98** ciblant le PSMA surexprimé par les cellules cancéreuses prostatiques. Dans ce cadre, le ligand de ciblage comprenant un motif DUPA **108** a été préparé. Cependant, le couplage de **108** avec l'alcyne **91** a conduit à la formation du composé **98** avec un très faible rendement, accompagné de nombreux produits non identifiés. De nouveaux essais de couplage entre les composés **91** et **108** sont actuellement réalisés au laboratoire pour résoudre ce problème. L'utilisation de différentes sources de cuivre I et de solvants sont actuellement à l'étude.

3.3 Le ciblage du récepteur de l'asialoglycoprotéine (ASGPR)

3.3.1 Rappels bibliographiques

Le carcinome hépatocellulaire est le cancer primitif du foie le plus fréquemment rencontré, touchant chaque année 500 000 personnes dans le monde.¹⁷⁵ A ce jour, l'ablation chirurgicale de la tumeur primaire reste le traitement de choix pour ce type de cancer, bien que l'efficacité de cette technique reste limitée dans le cas de patients atteints de métastases. Alors que le taux de réponse de ces tumeurs à la chimiothérapie est extrêmement faible en raison de la rapide métabolisation des agents anti-cancéreux par le foie,¹⁷⁶ le développement de nouveaux agents anticancéreux plus efficaces et ciblant les cellules hépatiques cancéreuses, en combinaison avec la chirurgie, pourrait permettre d'augmenter de manière significative l'espérance de survie des patients.

A ce titre, le ciblage de L'ASGPR est une stratégie particulièrement attrayante. En effet, ce récepteur membranaire est présent en abondance à la surface des hépatocytes et reconnaît puis internalise par endocytose une grande variété de molécules présentant un motif galactose ou *N*-acétylgalactosamine.¹²⁸ Cette spécificité a tout d'abord été exploitée pour concevoir de nouveaux traitements visant des maladies hépatiques virales telle que l'hépatite B.¹⁷⁷ De nombreux travaux ont aussi montré la validité de cette approche pour le traitement

175 El-Serag, H. B. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 1118-1127.

176 Marin, J. J. G.; Castaño, B.; Martínez-Becerra, P.; Rosales, R.; Monte, M. J. *Cancer Therapy* **2008**, *6*, 711-728.

177 (a) Fiumé, L.; Mattioli, A.; Balboni, P. G.; Tognon, M.; Barbanti-Brodano, G.; De Vries, J.; Wieland, T. *FEBS Lett.* **1979**, *103*, 47-51. (b) Fiumé, L.; Di Stefano, G.; Busi, C.; Mattioli, A.; Bonino, F.; Torrani-Cerenzia,

sélectif du carcinome hépatocellulaire. Ainsi, plusieurs nanoparticules pouvant renfermer des agents anticancéreux et dont la surface a été décorée par des motifs galactose ou N-galactosamine ont donné de très bons résultats *in-vitro* et *in-vivo*.¹⁷⁸

Ce concept peut aussi être adapté à la vectorisation d'agents d'imagerie. A titre d'exemple, l'équipe de Lee a développé un vecteur galactosylé **109** du 4-amino-1,8-naphtalimide (**Figure 98a**).¹⁷⁹ L'internalisation de ce composé au sein des cellules hépatiques surexprimant l'ASGPR est suivie de la réduction du pont disulfure au sein des endosomes/lysosomes. Une réaction de cyclisation intramoléculaire permet ensuite de libérer l'amine hautement fluorescente **110**. L'évaluation *in-vitro* de ce composé sur différentes lignées cellulaires a montré que seules les cellules hépatiques cancéreuses HepG2 surexprimant l'ASGPR sont en mesure d'internaliser le vecteur **109** (**Figure 98b**). A l'inverse, le composé **111** ne possédant pas de ligand de ciblage pénètre passivement et est activé de manière non spécifique dans toutes les lignées cellulaires testées.

Dans le cadre d'une thérapie personnalisée du cancer, le traitement de cellules cancéreuses prélevées chez le patient par ce type de vecteur permettrait de corréler la fluorescence observée avec le degré d'expression du récepteur ciblé. Ces tests pourront alors prédire l'efficacité d'une chimiothérapie ciblée et permettront de définir quelles seront les molécules les plus adaptées pour chaque cas rencontré.

M.; Verme, G.; Rapicetta, M.; Bertini, M.; Gervasi, G. B. *Journal of Hepatology* **1997**, *26*, 253-259. (c) Cerenzia, M. T.; Fiume, L.; De Bernardi Venon, W.; Lavezzo, B.; Brunetto, M. R.; Ponzetto, A.; Di Stefano, G.; Busi, C.; Mattioli, A.; Gervasi, G. B.; Bonino, F.; Verme, G. *Hepatology* **1996**, *23*, 657-661. **178 (a)** Xu, Z.; Chen, L.; Gu, W.; Gao, Y.; Lin, L.; Zhang, Z.; Xi, Y.; Li, Y. *Biomaterials* **2009**, *30*, 226-232. (b) Medina, S. H.; Tekumalla, V.; Chevliakov, M. V.; Shewach, D. S.; Ensminger, W. D.; El-Sayed, M. E. H. *Biomaterials* **2011**, *32*, 4118-4129. (c) Terada, T.; Iwai, M.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; Hashida, M. *J. Controlled Release* **2006**, *111*, 333-342. (d) Managit, C.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; Hashida, M. *Int. J. Pharm.* **2005**, *301*, 255-261. (e) Managit, C.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; Hashida, M. *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 2266-2275. (f) Fiumé, L.; Bolondi, L.; Busi, C.; Chieco, P.; Kratz, F.; Lanza, M.; Mattioli, A.; Di Stefano *of Hepatology* **2005**, *43*, 645-652. **179** Lee, M. H.; Han, J. H.; Kwon, P.-S.; Bhuniya, S.; Kim, J. Y.; Sessler, J. L.; Kang, C.; Kim, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1316-1322.

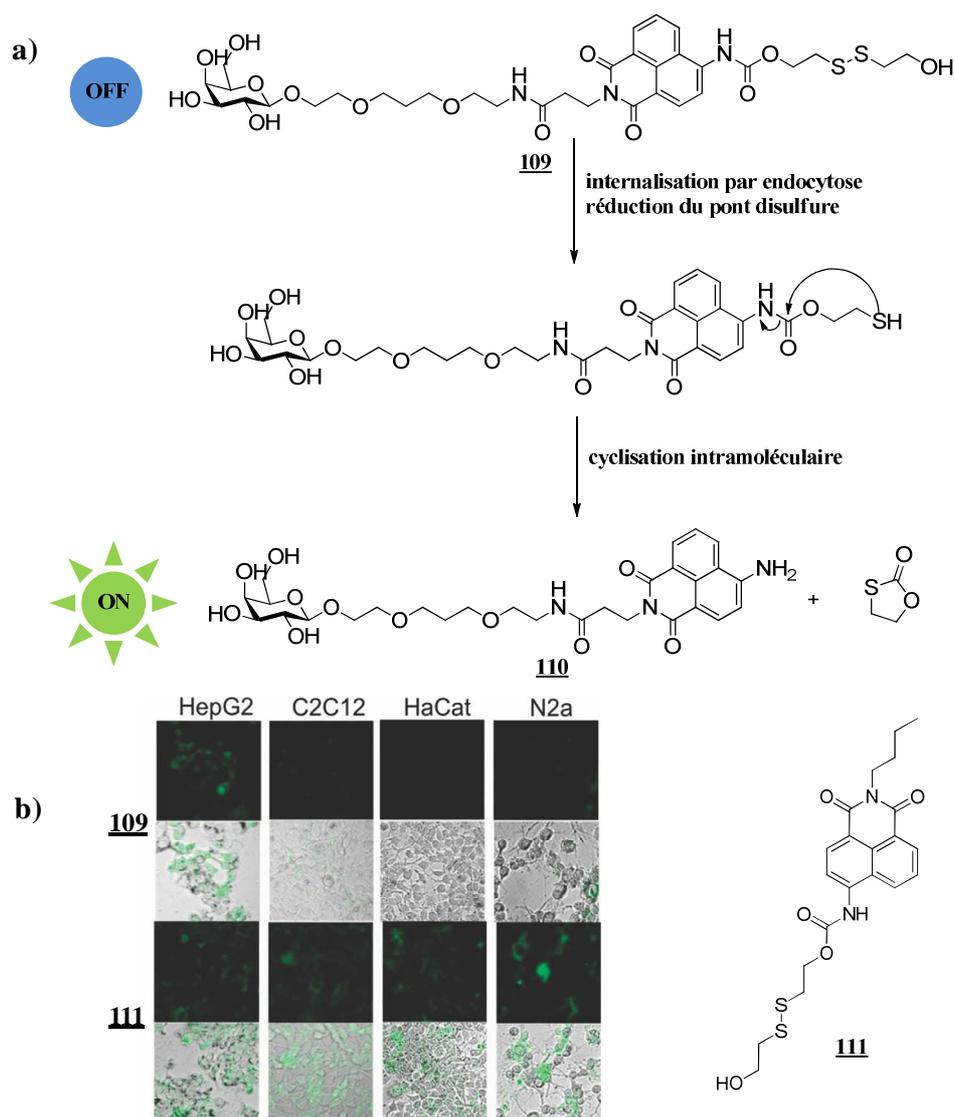


Figure 98 – a) Structure et décomposition du vecteur **109** (b) Tests d'imagerie confocale réalisés sur des cellules de type HepG2 (hépatocarcinome humain), C2C12 (myoblaste de souris), HaCat (kératinocyte humain), N2a (neuroblastome de souris) en présence des composés **109** (10 μ M) et **111** (1 μ M)

3.3.2 Synthèse du vecteur galactosylé **112** incorporant un motif galactose

Afin de cibler sélectivement les hépatocytes, nous avons envisagé la synthèse du vecteur galactosylé de la MMAE **112** comportant un motif galactose (**Figure 99**). Tout comme les vecteurs galactosylés présentés précédemment, ce composé pourra être obtenu par couplage entre l'alcyne **91** et l'azoture **115**.

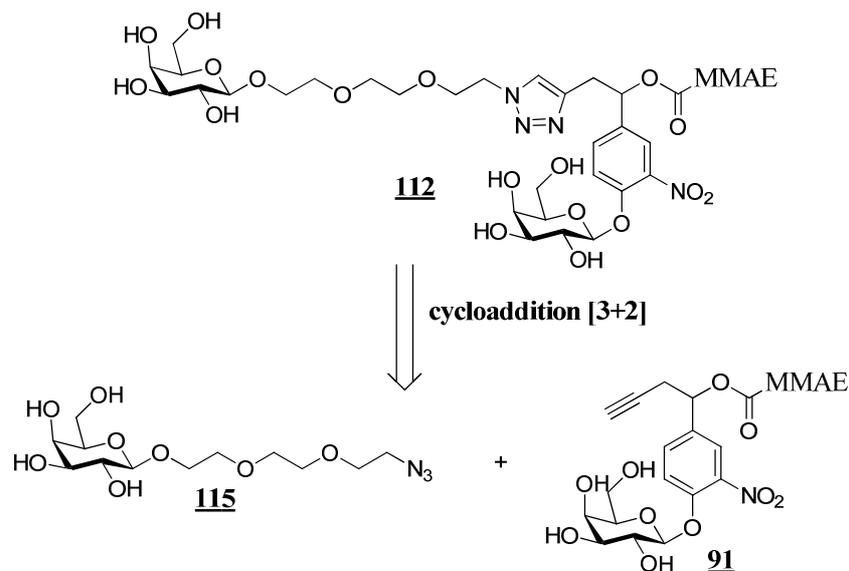


Figure 99 – Structure du vecteur galactosylé **112**

3.3.2.1 Synthèse du ligand de ciblage **115**

Le ligand de ciblage **115** présentant un motif galactose a été préparé selon la stratégie employée lors de la synthèse du composé **62** (Figure 100). Une réaction de glycosylation entre le pentaacétate de D-galactose et le 2-[2-(2-chloroéthoxy)-éthoxy]éthanol, en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ dans le dichlorométhane, permet d'obtenir le galactoside d'anométrie β **113** avec un rendement de 31% après purification du brut réactionnel sur gel de silice. La substitution nucléophile de l'atome de chlore du composé **113** par NaN_3 , en présence de TBAI dans le DMF, conduit ensuite à la formation de l'intermédiaire **114** avec un rendement de 92%. Enfin, le clivage des acétates du galactose par du méthanolate de sodium dans le méthanol nous a permis d'isoler le composé **115** avec un rendement de 91%.

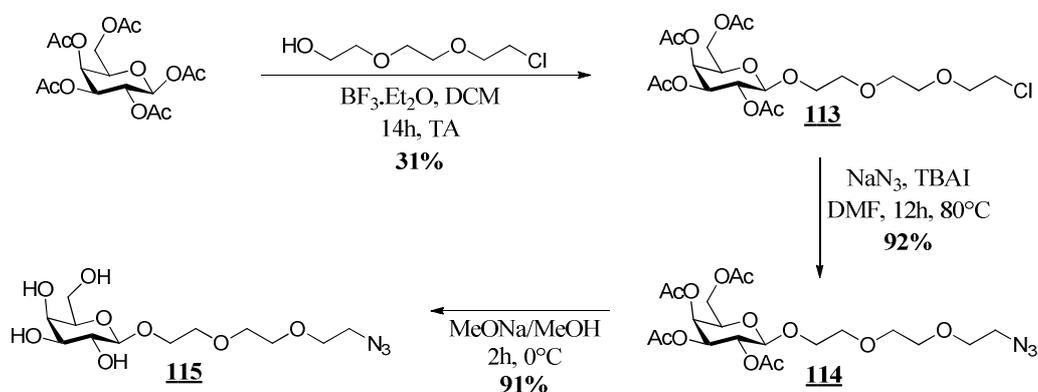


Figure 100 – Synthèse du ligand galactosylé **115**

3.3.2.2 Couplage de l'alcyne **91** et de l'azoture **115**

Un premier de couplage entre l'intermédiaire **91** et le galactose pegylé comportant une fonction azoture **115** a été réalisé dans les conditions standards décrites précédemment (**Figure 101**).

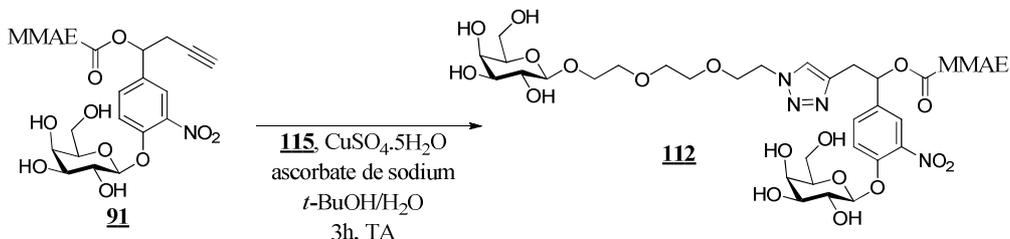


Figure 101 – Synthèse du vecteur galactosylé **112**

Comme dans le cas précédent, le suivi HPLC de la réaction indique que la formation du vecteur **112** s'accompagne de l'apparition d'un composé non identifié à ce jour (**Figure 102**). En raison de la difficulté engendrée par la séparation de ces deux composés par HPLC semi-préparative, de nouveaux essais sont actuellement réalisés pour minimiser la formation de ce sous-produit.

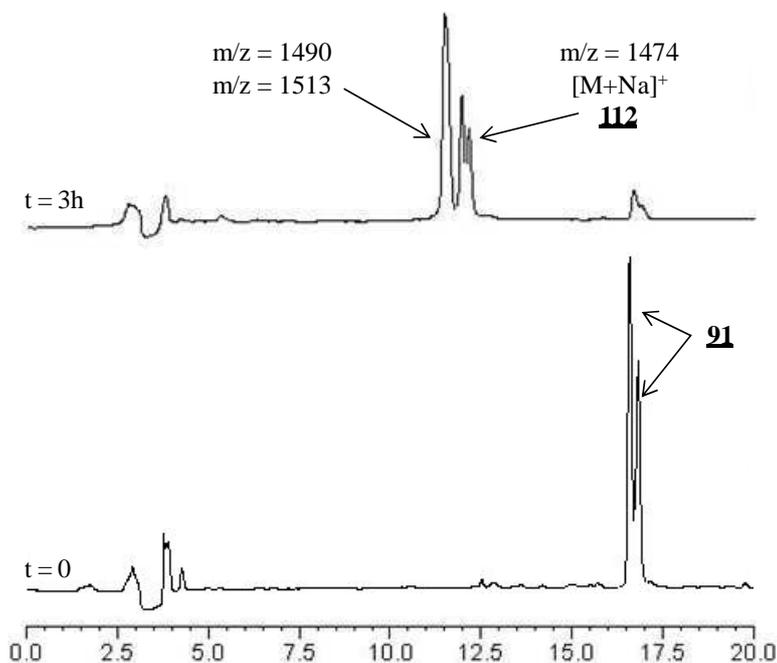


Figure 102 – Synthèse du vecteur galactosylé **112**

3.3.3 Conclusion et perspectives

Lors de cette étude, la synthèse d'un nouveau vecteur galactosylé de la MMAE **112** ciblant l'ASGPR surexprimé par les hépatocytes cancéreux a été proposée. Dans ce cadre, le ligand de ciblage **115** a été préparé puis couplé à l'alcyne **91**. Comme dans le cas du vecteur **98**, les conditions utilisées au cours de cette dernière étape conduisent à la formation du vecteur **112** et d'un sous-produit. La difficulté de séparation de ces deux composés ne nous ont pas permis d'obtenir le composé **112** avec une pureté suffisante pour les tests biologiques. Pour résoudre ce problème, de nouveaux essais de couplage dans les conditions décrites pour le conjugué drogue-acide folique **85** sont actuellement réalisés au laboratoire.

4. Conclusion

Dans le cadre d'un traitement personnalisé du cancer, il est nécessaire de développer des vecteurs capables d'interagir avec une large variété de récepteurs membranaires surexprimés dans différents types de tumeurs. Lors de cette étude, l'utilisation de l'unité centrale **51** nous a permis d'envisager la synthèse de plusieurs vecteurs galactosylés dont l'agent cytotoxique et le ligand de ciblage peuvent être facilement adaptés. A terme, de nouveaux vecteurs dont les propriétés pourront être modulées à la demande seront disponibles.

La validité de l'utilisation de vecteurs galactosylés au cours d'une PMT a été démontrée avec le vecteur de la MMAE conjugué à l'acide folique **85**. Ce composé nous a permis d'obtenir d'excellents résultats *in-vivo* avec l'éradication d'une xénogreffe de tumeur KB chez la souris BALB/c, sans effets secondaires. Un vecteur galactosylé de la doxorubicine conjugué au CBO-P11 **94a** a déjà été obtenu et de nouveaux galactosides associant la MMAE à un motif CBO-P11 (**94b**), DUPA (**98**) et galactoside (**112**) sont actuellement étudiés au laboratoire. La synthèse de ces composés doit cependant être optimisée avant de débiter leurs évaluations biologiques *in-vitro*.

**CHAPITRE 4 : ETUDE D'UN SYSTEME
MOLECULAIRE ENTRELACE CONÇU POUR
LA VECTORISATION D'ALCOOLS ET
D'ACIDES CARBOXYLIQUES**

1. Introduction

Le succès d'un traitement par une chimiothérapie ciblée repose sur plusieurs paramètres. En effet, il est nécessaire que le vecteur utilisé soit suffisamment sélectif envers sa cible et que la libération de l'agent actif au niveau du site d'action soit rapide. De plus, ces composés doivent présenter une bonne stabilité *in-vivo*. Certaines fonctions chimiques instables dans les conditions physiologiques (esters, ponts disulfures, liaisons peptidiques) ne pourront donc pas être incluses dans la structure de l'agent actif ou au niveau du reste du dispositif (espaceur, gâchette ...). A titre d'exemple, de nombreux composés biologiquement actifs tels que les peptides ne peuvent pas atteindre leur cible en raison de leur hydrolyse rapide par des protéases plasmatiques.

Pour résoudre ce problème, notre équipe, en collaboration avec celle du Professeur D. A. Leigh, a proposé en 2009 une solution basée sur l'utilisation de molécules entrelacées enzymo-sensibles.¹⁸⁰ La démonstration de ce concept a été réalisée avec un vecteur galactosylé de la met-enképhaline qui est très stable dans le plasma alors que le peptide seul possède un temps de demi-vie de 20 minutes dans des conditions physiologiques. Dans le cadre de cette thèse, nous avons adapté ce concept pour protéger d'autres fonctions chimiques instables dans l'organisme telles que les esters. Un nouveau système moléculaire entrelacé comportant un macrocycle enzymo-sensible a ainsi été conçu pour vectoriser deux molécules de paclitaxel liées à l'ensemble du dispositif de ciblage par des fonctions esters.

1.1 Rappels sur les molécules entrelacées

Les systèmes moléculaires entrelacés diffèrent des édifices supramoléculaires dans la mesure où la rupture d'une liaison covalente est nécessaire pour dissocier les différents composants de la molécule, alors que l'édifice supramoléculaire est maintenu uniquement par des liaisons non covalentes. A ce jour, deux familles de systèmes moléculaires entrelacés ont été décrites. Il s'agit des rotaxanes et des noeuds moléculaires.

0180 Fernandes, A.; Viterisi, A.; Coutrot, F.; Potok, S.; Leigh, D. A.; Aucagne, V.; Papot, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6443-6447.

Un rotaxane est une molécule constituée d'un ou plusieurs macrocycles entourant au moins un fragment linéaire (appelé couramment le fil) dont les extrémités sont reliées à des groupements suffisamment encombrants (stoppeurs) pour éviter le désentrelacement de la structure.¹⁸¹ A titre d'exemple, le [2]-rotaxane **116** décrit par Stoddart est composé d'un macrocycle de type cyclobis(paraquat-*p*-phénylène) entourant un fil constitué d'un motif dioxynaphtalène substitué par des chaînes poly(éthylène glycol). Les extrémités du fil comportent des groupements *tert*-butyl-diméthylsilyle assurant le rôle de stoppeur (**Figure 103**).¹⁸²

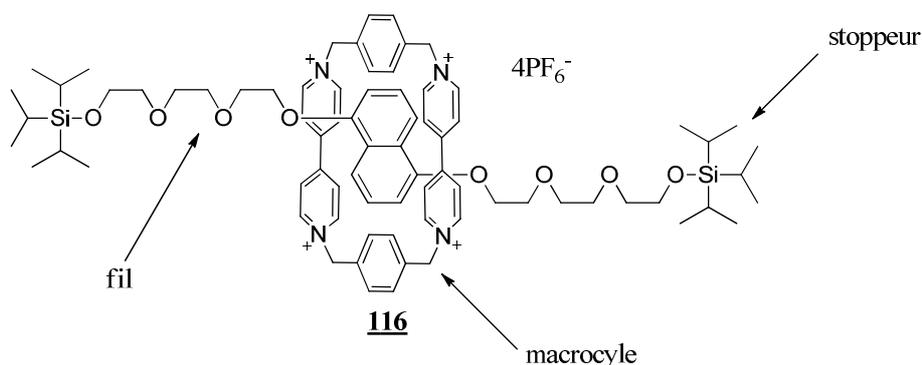


Figure 103 – Exemple d'un [2]-rotaxane décrit par J. F. Stoddart

Les noeuds moléculaires sont des systèmes constitués d'un ou de plusieurs macrocycles et dont la représentation sur le papier comporte au moins un point de croisement.¹⁸³ La préparation de ces composés extrêmement complexes représente encore à ce jour un challenge pour les chimistes organiciens. En effet, bien qu'une infinité de structures puissent être imaginées, seul un nombre restreint de noeuds différents ont pu être synthétisés (**Figure 104**). D. A. Leigh et son équipe ont, par exemple, décrit le nœud de trèfle **117** composé d'un macrocycle comportant trois points de croisements.¹⁸⁴

181 (a) Kay, E. R.; Leigh, D. A.; Zerbetto, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 72-191; **(b)** Crowley, J. D.; Goldup, S. M.; Lee, A. L.; Leigh, D. A.; McBurney, R. T. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1530-1541; **(c)** Hänni, K. D.; Leigh, D. A. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1240-1251; **(d)** Balzani, V.; Credi, A.; Raymo, F. M.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3349-3391.

182 Bravo, J. A.; Raymo, F. M.; Stoddart, J. F.; White, A. J. P.; Williams, D. J. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *11*, 2565-2571.

183 Forgan, R. S.; Sauvage, J.-P.; Stoddart, J. F. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5434-5464.

184 Barran, P. E.; Cole, H. L.; Goldup, S. M.; Leigh, D. A.; McGonigal, P. R.; Symes, M. D.; Wu, J.; Zengerle, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12280-12284.

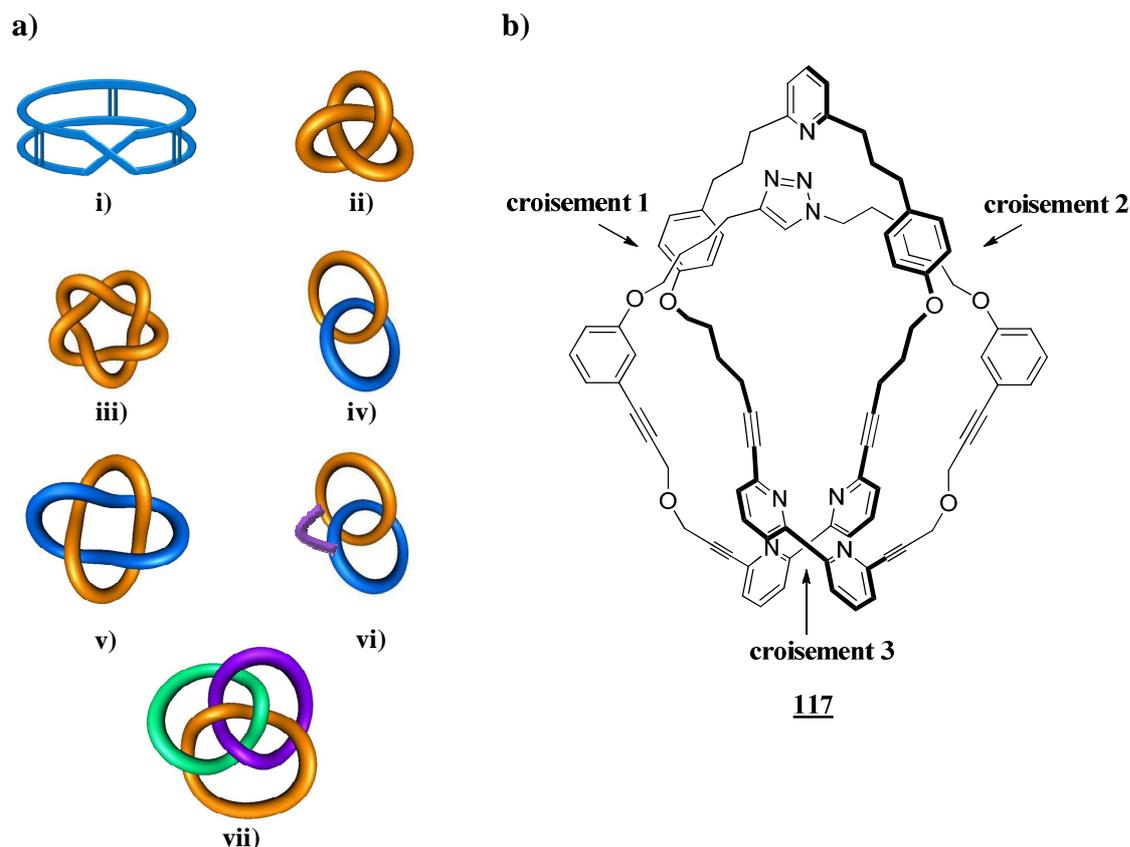


Figure 104 – a) structure des nœuds moléculaires synthétisés à ce jour : i) ruban de Möbius;¹⁸⁵ ii) nœud de trèfle;¹⁸⁶ iii) nœud à cinq croisements (pentafoil knot);¹⁸⁷ iv) caténane; v) nœud de Salomon;¹⁸⁸ vi) pretzelane;¹⁸⁹ vii) anneaux de Borromée.¹⁹⁰ b) exemple d'un nœud de trèfle décrit par D. A. Leigh.

Parmi les différents types de nœuds moléculaires, les caténanes sont, quant à eux, constitués d'au moins deux macrocycles imbriqués les uns dans les autres à la manière de maillons constituant une chaîne. Le [2]-caténane **118** est l'un des tous premiers exemples à

185 (a) Walba, D. M.; Richards, R. M.; Haltiwanger, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3219-3221. **(b)** John, R. P.; Park, M.; Moon, D.; Lee, K.; Hong, S.; Zou, Y.; Hong, C. S.; Lah, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14142-14143.

186 (a) Dietrich-Buchecker, C. O.; Sauvage, J.-P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 189-192. **(b)** Meyer, M.; Albrecht-Gary, A.-M.; Dietrich-Buchecker, C. O.; Sauvage, J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4599-4607. **(c)** Dietrich-Buchecker, C. O.; Rapenne, G.; Sauvage, J.-P. *Chem. Commun.* **1997**, 2053-2054. **(d)** Perret-Aebi, L. E.; von Zelewsky, A.; Dietrich-Buchecker, C. O.; Sauvage, J.-P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4482-4485.

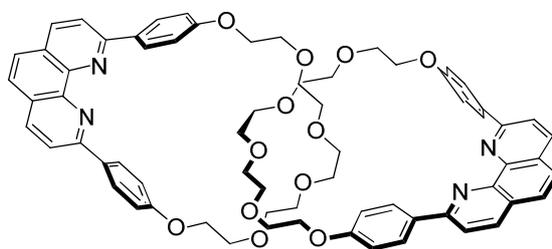
187 Ayme, J.-F.; Beves, J. E.; Leigh, D. A.; McBurney, R. T.; Rissanen, K.; Schultz, D. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 15-20.

188 (a) Peinador, C.; Blanco, V.; Quintela, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 920-921. **(b)** McArdle, C. P.; Vittal, J. J.; Puddephatt, R. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3819-3822. **(c)** Ibukuro, F.; Fujita, M.; Yamaguchi, K.; Sauvage, J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11014-11015. **(d)** Pentecoste, C. D.; Chichak, K. S.; Peters, A. J.; Cave, G. W. V.; Cantrill, S. J.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 218-222.

189 (a) Li, Q. Y.; Vogel, E.; Parham, A. H.; Nieger, M.; Bolte, M.; Fröhlich, R.; Saarenketo, P.; Rissanen, K.; Vögtle, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4041-4049. **(b)** Liu, Y.; Bonvallet, P. A.; Vignon, S. A.; Khan, S. I.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3050-3055. **(c)** Zhao, Y.-L.; Trabolsi, A.; Stoddart, J. F. *Chem. Commun.* **2009**, 4844-4846.

190 (a) Chichak, K. S.; Cantrill, S. J.; Pease, A. R.; Chiu, S.-H.; Cave, G. W. V.; Atwood, J. L.; Stoddart, J. F. *Science* **2004**, *304*, 1308-1312. **(b)** Chichak, K. S.; Peters, A. J.; Cantrill, S. J.; Stoddart, J. F. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7956-7962.

avoir été décrit.¹⁹¹ Cette molécule simple est composée de deux macrocycles identiques présentant un motif 1,10-phénantroline (**Figure 105**). Des caténanes beaucoup plus complexes composés de 5¹⁹² et 7¹⁹³ macrocycles ont depuis été synthétisés avec succès.



118

Figure 105 – Exemple d'un [2]-caténane décrit par J.-P. Sauvage

1.2 Stratégies pour la synthèse de rotaxane

L'étude de systèmes moléculaires entrelacés a débuté en 1967, date à laquelle la première synthèse de rotaxane a été publiée.¹⁹⁴ Cette voie de synthèse repose sur la très faible probabilité qu'une molécule linéaire se trouve à travers un macrocycle pour lequel elle n'a aucune affinité. Il faudra attendre 1983¹⁹¹ et l'émergence de stratégies de synthèses à hauts rendements basées sur l'utilisation de « gabarits » pour que ce domaine de recherche prenne son essor. Ces « gabarits » permettent le pré-assemblage des différents éléments composant le rotaxane ou le caténane au moyen d'interactions non-covalentes (π -stacking, liaisons hydrogènes, complexes métalliques de coordination). La formation d'une ou plusieurs liaisons covalentes sera alors nécessaire pour maintenir la structure entrelacée.

A ce jour, trois approches sont majoritairement utilisées pour la synthèse de rotaxanes et de caténanes (**Figure 106**). La méthode du « capping » repose tout d'abord sur la reconnaissance du fil par le macrocycle. Cet édifice supramoléculaire est maintenu par des liaisons non-covalentes (pseudo-rotaxane) et deux groupements encombrants (stoppeurs) empêchant le désentrelacement de la structure seront introduits à chaque extrémité du fil pour

191 Dietrich, C. O.; Sauvage, J.-P.; Kintzinger, J.-P. *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 5095-5098.

192 Amabilino, D. B.; Ashton, P. R.; Reder, A. S.; Spencer, N.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, 33, 1286-1290.

193 Amabilino, D. B.; Ashton, P. R.; Boyd, S. E.; Lee, J. Y.; Menzer, S.; Stoddart, J. F.; Williams, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, 36, 2070-2072.

194 Harrison, I. T.; Harrison, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 5723-5724.

conduire à la formation du rotaxane.¹⁹⁵ Dans le cas de la synthèse par « clipping », c'est un fil comportant un gabarit et un stoppeur à chacune de ces extrémités qui est utilisé. La macrocyclisation d'un fragment linéaire autour de ce gabarit permettra d'obtenir le rotaxane.¹⁹⁶

Plus récemment, l'équipe du Professeur Leigh a développé une méthode de reconnaissance active basée sur l'utilisation d'un métal chelaté dans la cavité du macrocycle. Le métal joue ici un double rôle : il assure le pré-assemblage des éléments composant le rotaxane et assiste la formation du fil dans la cavité du macrocycle.¹⁹⁷

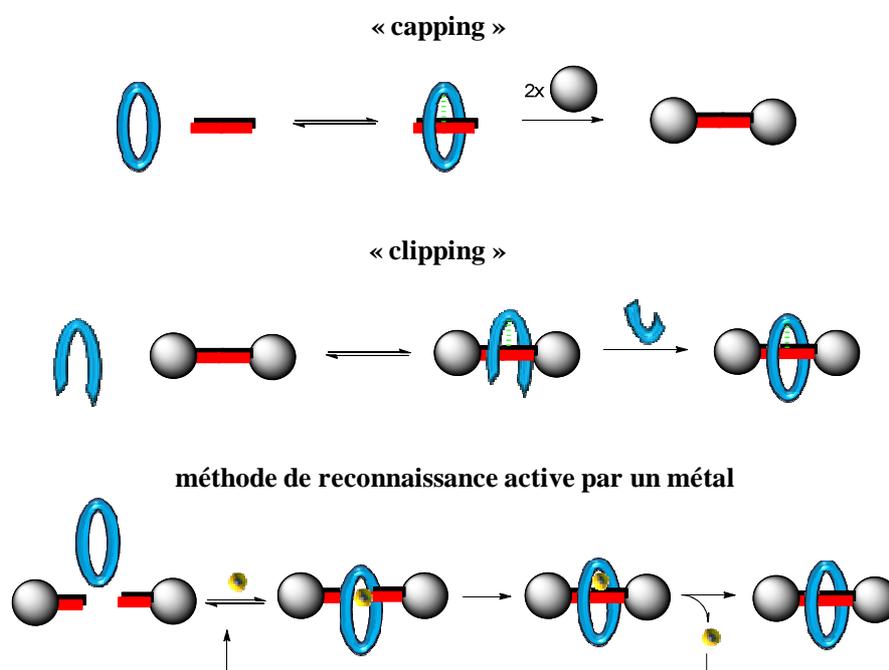


Figure 106 – Stratégies de synthèse de rotaxanes

La stratégie de reconnaissance active par un métal a tout d'abord été développée autour de la réaction de cycloaddition [3+2] alcyne-azoture catalysée par le cuivre (I) (**Figure 107**).¹⁹⁸ A titre d'exemple, la chelation du cation cuivre (I) à l'atome d'azote de la pyridine du

195 Ashton, P. R.; Chrystal, E. J. T.; Glink, P. T.; Menzer, S.; Schiavo, C.; Spencer, N.; Stoddart, J. F.; Tasker, P. A.; White, A. J. P.; Williams, D. J. *Chem.-Eur. J.* **1996**, *2*, 709-728.

196 Ashton, P. R.; Goodnow, T. T.; Kaifer, A. E.; Reddington, M. V.; Slawin, A. M. Z.; Spencer, N.; Stoddart, J. F.; Vicent, C.; Williams, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 1396-1399.

197 Crowley, J. D.; Hänni, K. D.; Lee, A.-L.; Leigh, D. A.; McBurney, R. T. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1530-1541.

198 (a) Aucagne, V.; Berna, J.; Crowley, J. D.; Goldup, S. M.; Hänni, K. D.; Leigh, D. A.; Lusby, P. J.; Ronaldson, V. E.; Slawin, A. M. Z.; Viterisi, A.; Walker, D. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11950-11963. **(b)** Lahlali, H.; Jobe, K.; Watkinson, M.; Goldup, S. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4151-4155. **(c)** Aucagne, V.; Hänni, K. D.; Leigh, D. A.; Lusby, P. J.; Walker, D. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2186-2187.

macrocycle **119** conduit au complexe intermédiaire **120**. L'élément métallique permet alors d'agencer l'alcyne et l'azoture de part et d'autre du macrocycle catalyse la réaction de cycloaddition pour former le triazole **122** à l'intérieur de la cavité du macrocycle. Le rotaxane **123** a ainsi été obtenu avec un excellent rendement de 94% après démétallation du complexe **122** par des ions cyanures. Cette réaction peut aussi être réalisée avec une quantité catalytique de cuivre (20% molaire) mais nécessite toutefois une température plus élevée et l'addition de pyridine pour favoriser le turn-over du catalyseur.

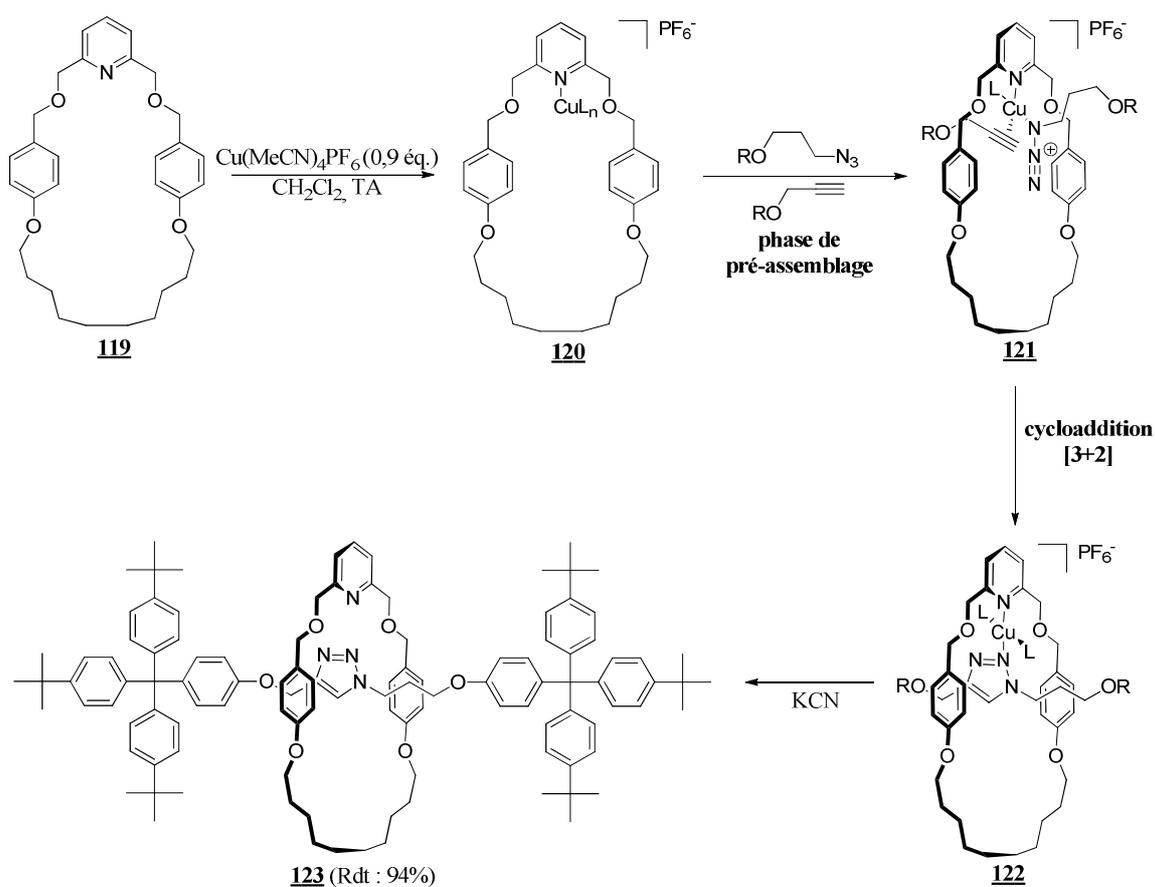


Figure 107 – Exemple de synthèse de rotaxane par la stratégie "Active Metal Template"

La stratégie de reconnaissance active par un métal appliquée à la réaction de cycloaddition [3+2] azoture-alcyne catalysée par le cuivre est une stratégie de choix pour la synthèse de systèmes moléculaires entrelacés. En effet, cette réaction tolère la grande majorité des groupements fonctionnels et peut être réalisée dans des conditions douces prévenant ainsi la dégradation de molécules sensibles. De plus, cette stratégie de synthèse est facilement réalisable et donne accès à une grande variété de rotaxanes avec de très bons rendements.

Cette méthode de préparation des rotaxanes a ensuite été déclinée avec différents métaux catalysant une large variété de réactions de couplage.¹⁹⁹

1.3 Les systèmes moléculaires enzymo-sensibles

A ce jour, seuls deux rotaxanes enzymo-sensibles ont été décrits dans la littérature. Le premier de ces systèmes est dédié à la vectorisation de la met-enképhaline,¹⁸⁰ un pentapeptide de la famille des opioïdes présentant une activité anticancéreuse intéressante.²⁰⁰ Cependant, l'utilisation de ce peptide comme agent antitumoral reste limitée en raison de sa rapide dégradation *in vivo*. L'instabilité plasmatique de la met-enképhaline est principalement liée à l'action de deux peptidases : l'aminopeptidase M qui hydrolyse les liaisons peptidiques tyrosine-glycine et glycine-glycine, et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) qui coupe la liaison glycine-phénylalanine.²⁰¹

Dans ce cadre, le rotaxane enzymo-sensible **124** a été conçu pour pallier le faible temps de demi-vie plasmatique de ce composé (**Figure 108**). En se déplaçant le long de la chaîne peptidique, le macrocycle génère un encombrement stérique important autour des liaisons peptidiques sensibles et se comporte ainsi comme un bouclier moléculaire, protégeant le peptide actif de la dégradation par les protéases lors du cheminement de la molécule dans l'organisme. En revanche, en présence de β -galactosidase, l'hydrolyse de la liaison glycosidique conduit à la formation du phénolate intermédiaire **125**. Celui-ci subit alors une réaction d'élimination 1,6 et une décarboxylation qui permet le désentrelacement du macrocycle **126** et la libération de la met-enképhaline **127**.

199 Beves, J. E.; Blight, B. A.; Campbell, C. J.; Leigh, D. A.; McBurney, R. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9260-9327.

200 (a) Fichna, J.; Janecka, A. *Cancer Metast. Rev.* **2004**, *23*, 351-366; (b) Zagon, I. S.; Rahn, K. A.; McLaughlin, P. J. *Neuropeptides* **2007**, *41*, 441-452; (c) Zagon, I. S.; McLaughlin, P. J. *Neuropeptides* **2005**, *39*, 495-505; (d) Zagon, I. S.; McLaughlin, P. J. *Neuropeptides* **2003**, *37*, 79-88; (e) Cheng, F.; Zagon, I. S.; Verderame, M. F.; McLaughlin, P. J. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 10511-10518.

201 (a) Boarder, M. R.; McArdle, W. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35*, 1043-1047; (b) Marini, M.; Urbani, A.; Trani, E.; Bogiorno, L.; Roda, L. G. *Peptides* **1997**, *18*, 741-748; (c) Marini, M.; Roscetti, G.; Bongiorno, L.; Urbani, A.; Roda, L. G. *Neurochem. Res.* **1990**, *15*, 61-67; (d) Shibanoki, S.; Weinberger, S. B.; Ishikawa, K.; Martinez Jr, J. L. *Regul. Peptides* **1991**, *32*, 267-278; (e) Shibanoki, S.; Weinberger, S. B.; Ishikawa, K.; Martinez Jr, J. L. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1990**, *328*, 253-256; (f) Shibanoki, S.; Weinberger, S. B.; Schulteis, G.; Ishikawa, K.; Martinez Jr, J. L. *Life Sci.* **1992**, *50*, 667-675; (g) Schulteis, G.; Rodriguez, W. A.; Rodriguez, S. B.; Martinez Jr, J. L. *Peptides* **1993**, *14*, 1083-1089.

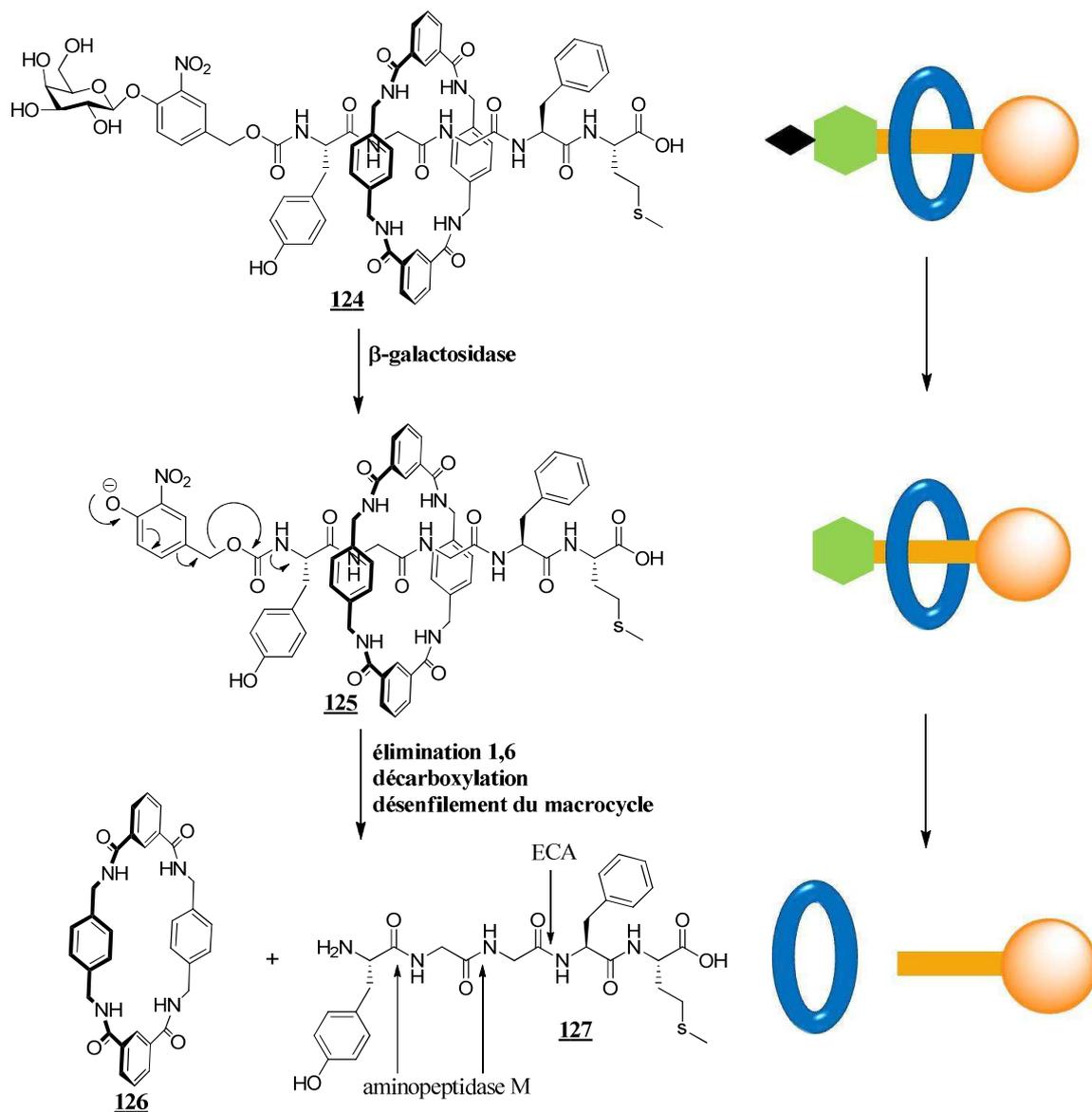


Figure 108 – Mode d'action du rotaxane enzymo-sensible conçu pour la vectorisation de peptides

La stabilité du vecteur **124** dans le plasma humain a été évaluée dans des conditions de température et de pH physiologiques en comparaison avec la met-enképhaline **127** et le vecteur **128** ne comportant pas de macrocycle (**Figure 109**). Ce test a montré que le vecteur **124** présente une très bonne stabilité dans le plasma ($t_{1/2}$ 50 > 120 h), alors que la met-enképhaline **127** et le vecteur **128** se dégradent rapidement dans ces conditions avec des temps de demi-vie respectifs de 20 minutes et 5 heures. Ce résultat montre clairement que la dérivation de peptides sous forme de rotaxane permet de réduire de manière spectaculaire la dégradation enzymatique de ces composés dans le plasma.

1.4 Présentation du projet

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la vectorisation du paclitaxel, dont les dérivés d'esters et de carbonates sont généralement instables dans le plasma. A titre d'exemple, les prodrogues **131** et **132** comportent une unité paclitaxel dont l'alcool en position 2' a été dérivatisé sous forme d'ester (**Figure 111**). Incubés dans du plasma humain ou bovin, ces composés présentent des temps de demi-vie respectifs de 4 heures et 80 minutes, incompatibles avec leur utilisation *in-vivo*.²⁰³

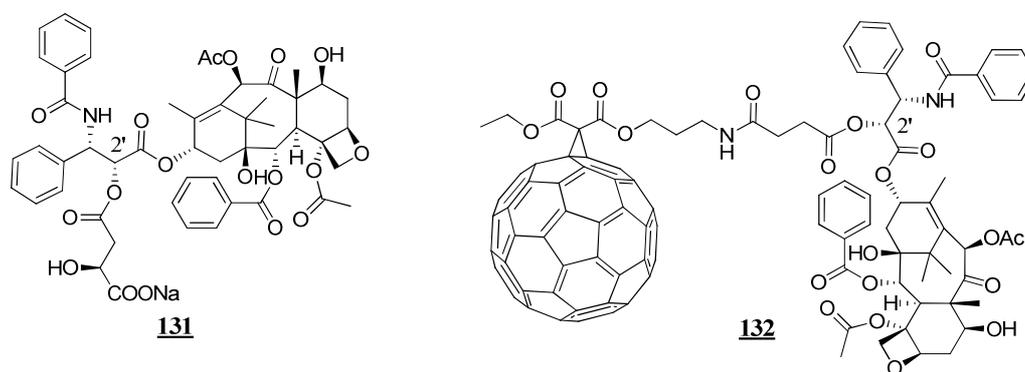


Figure 111 – Structure des prodrogues du paclitaxel **131** et **132**.

Afin d'augmenter la stabilité des esters du paclitaxel dans l'organisme, nous proposons l'étude du rotaxane comportant un macrocycle enzymo-sensible **133** et permettant de véhiculer deux molécules de paclitaxel (**Figure 112**). Comme nous l'avons évoqué précédemment, le déplacement du macrocycle le long du fil devrait permettre de protéger les fonctions esters sensibles de l'action des estérases plasmatiques. L'activation enzymatique du vecteur conduira à la formation d'un phénolate qui subira une élimination 1,6 suivie d'une décarboxylation pour former l'aniline **134**. Une nouvelle réaction d'élimination 1,6 ou 1,4 et une décarboxylation entrainera l'ouverture du macrocycle et la libération du fragment linéaire **136**. Les agents anticancéreux pourront être régénérés après hydrolyse des fonctions esters par les estérases du microenvironnement tumoral ou de manière intracellulaire après diffusion passive du fil **136** à travers la membrane cellulaire.

203 (a) Damen, E. W. P.; Wiegerinck, P. H. G.; Braamer, L.; Sperling, D.; de Vos, D.; Scheeren, H. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 427-432. (b) Zakharian, T. Y.; Seryshev, A.; Sitharaman, B.; Gilbert, B. E.; Knight, V.; Wilson, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12508-12509.

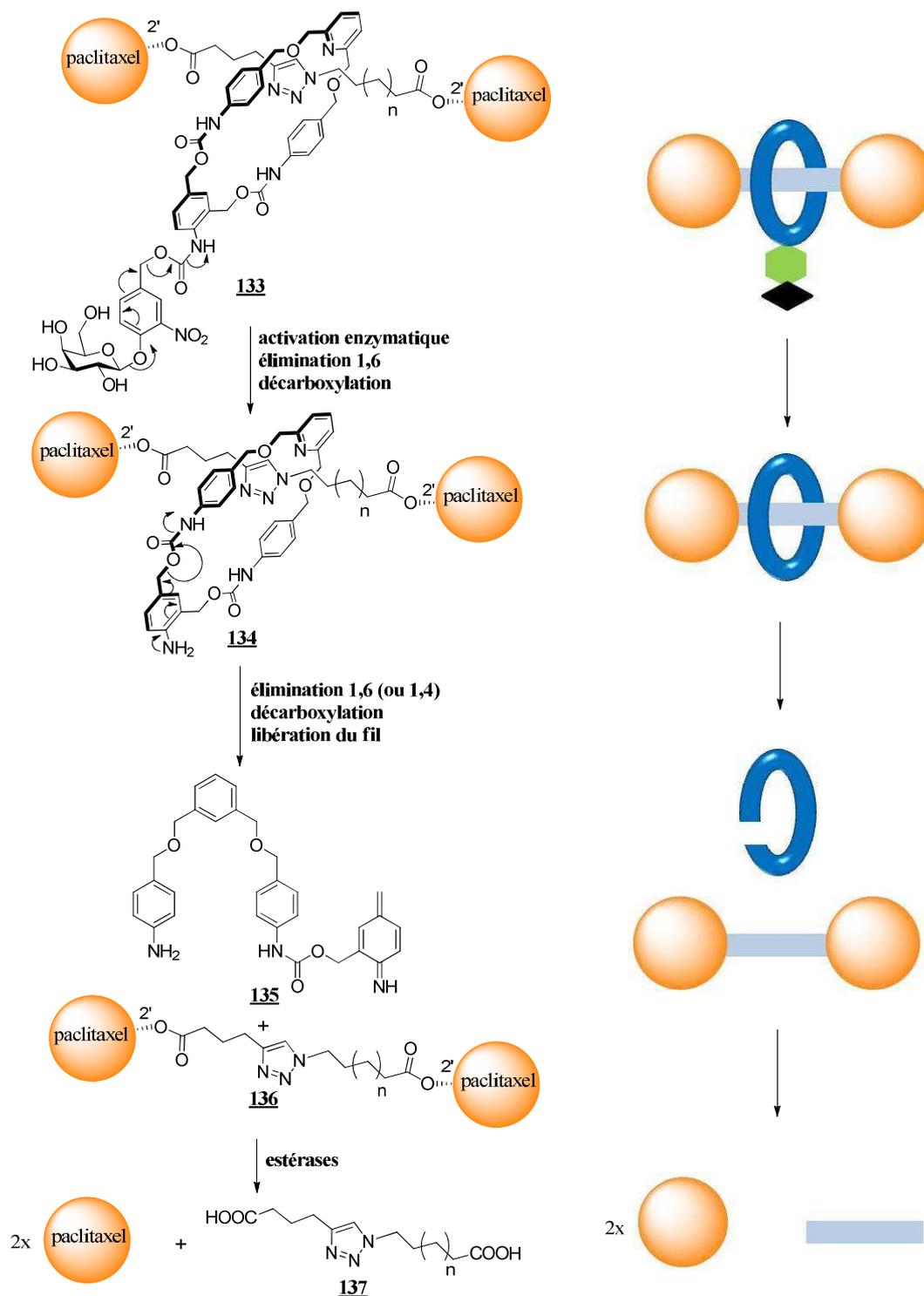


Figure 112 – Structure et décomposition du rotaxane enzymo-sensible **133**

Lors de ces travaux, deux vecteurs du paclitaxel **133a** et **133b** possédant des fils composés respectivement de 14 et 17 chaînons ont été synthétisés. Il sera alors possible d'évaluer l'influence de groupements extrêmement encombrant tel que le paclitaxel sur la réaction de rotaxation.

Des travaux préliminaires réalisés par Romain Barat lors de son stage de Master 2 ont montré le potentiel de cette nouvelle approche à partir du rotaxane modèle **138** (Figure 113). Ce composé comporte un fil entouré d'un macrocycle dont le mécanisme d'ouverture est similaire à celui du rotaxane **133**. Le clivage du carbamate d'allyle du composé **138**, mené en présence de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_3$ et d'aniline dans le dichlorométhane, conduit à l'intermédiaire **139** en moins de 30 minutes. L'aniline **139** subit alors une réaction d'élimination 1,6 (ou 1,4) conduisant à l'ouverture du macrocycle et à la libération quantitative du fil **140** en moins de 24 heures.

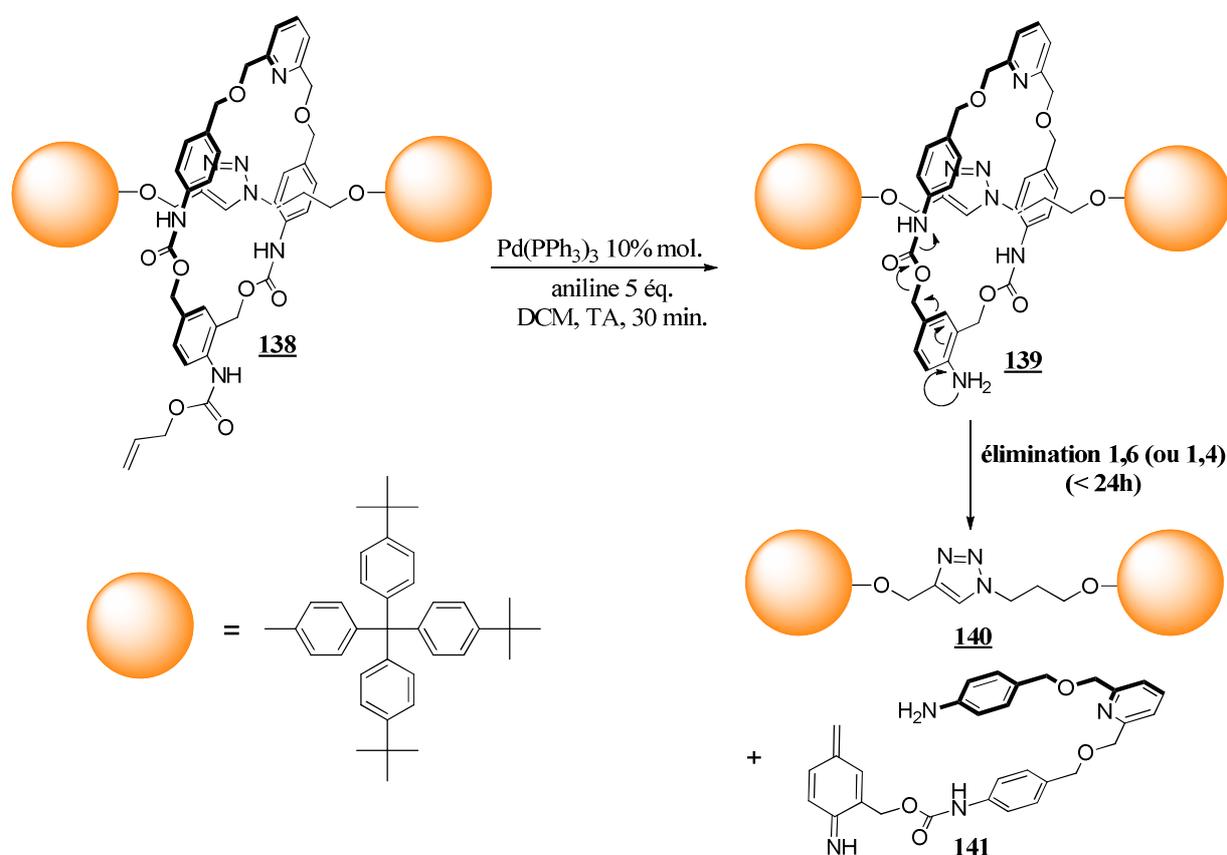


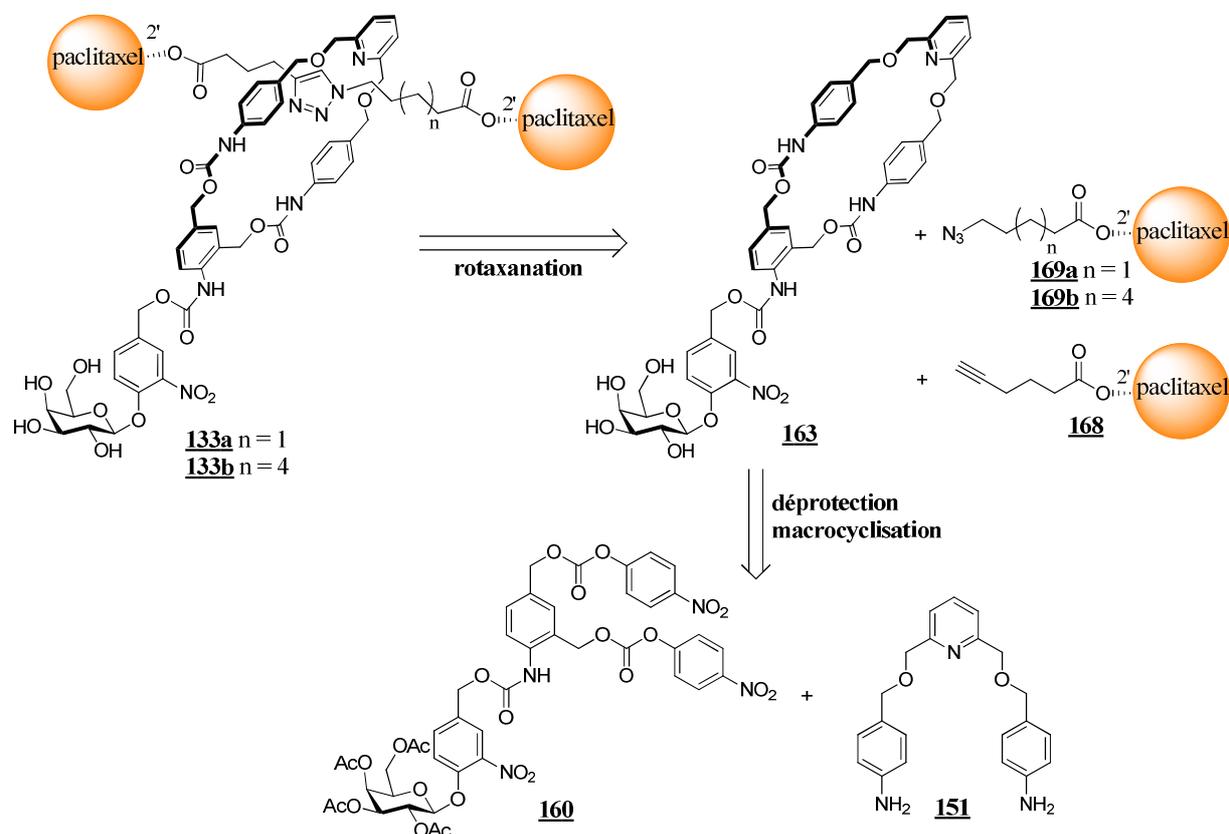
Figure 113 – Structure et décomposition du rotaxane **138**

2. Synthèse du vecteur **133**

2.1 Stratégie de synthèse

La stratégie retenue pour la synthèse des vecteurs **133** comporte deux étapes-clés décrites Figure 114. La première étape-clé consiste en l'assemblage final des rotaxanes **133**

selon la méthode de reconnaissance active par le cuivre (I) à partir des azotures **169a** et **169b**, de l'alcyne **168** et du macrocycle auto-immolable **163**. Tout comme pour la molécule **119**, le composé **163** possède un motif 2,6-pyridinediméthanol permettant de chelater un cation cuivre (I) dans la cavité du macrocycle.



La deuxième étape-clé est la formation du macrocycle **163** à partir du composé diactivé **160** et de la dianiline **151**, selon une nouvelle stratégie développée à partir de l'étude du vecteur glucuronylé hétérodimérique **32** (Figure 26).⁶⁴ Dans le cadre de ces travaux, notre équipe a montré que les deux carbonates mixtes du composé **142** ne présentent pas la même réactivité vis-à-vis de la substitution nucléophile du *para*-nitrophénol par une fonction aniline (Figure 115). En effet, cette réaction, réalisée en présence de différentes anilines et de HOBt à température ambiante, conduit exclusivement au composé mono-substitué **143a**.

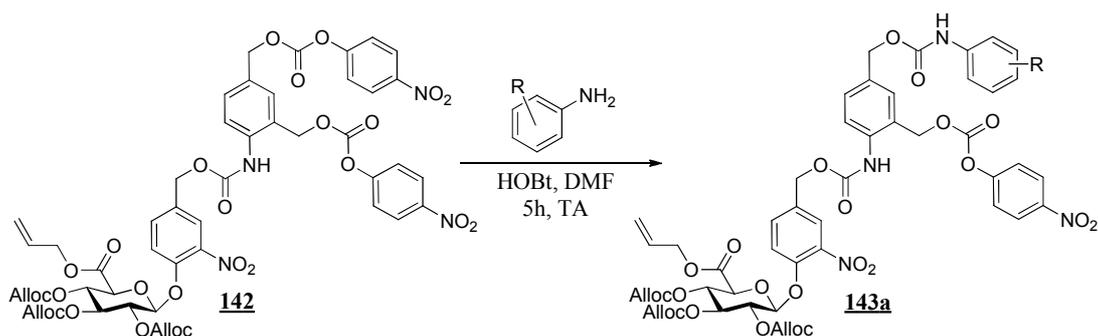


Figure 115 – Synthèse du glucuronide **143a**

La régiosélectivité de cette réaction pourrait être expliquée par un encombrement stérique plus important autour du carbonate en position *ortho*, rendant l'approche du nucléophile plus difficile que dans le cas du carbonate en position *para*. Une seconde explication pourrait être apportée avec la possible présence d'une liaison hydrogène entre le proton du carbamate et l'oxygène du carbonate en *ortho* (**Figure 116**). Celle-ci pourrait alors stabiliser un conformère de géométrie non favorable pour l'attaque nucléophile de l'aniline.

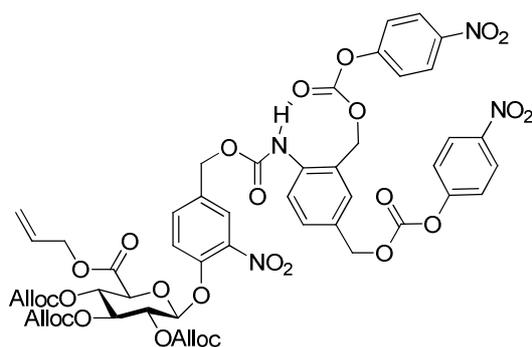


Figure 116 – Possible stabilisation du carbonate en *ortho* par une liaison hydrogène intramoléculaire

Cependant, l'introduction de deux anilines sur le bis-carbonate **142** est possible en chauffant légèrement le milieu réactionnel à une température de 50°C (**Figure 117**). Dans ces conditions le composé dimérique **143b** est obtenu avec de très bons rendements.

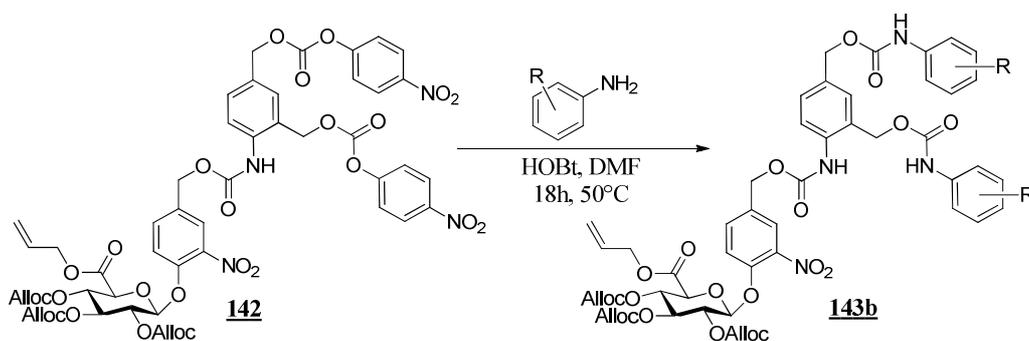
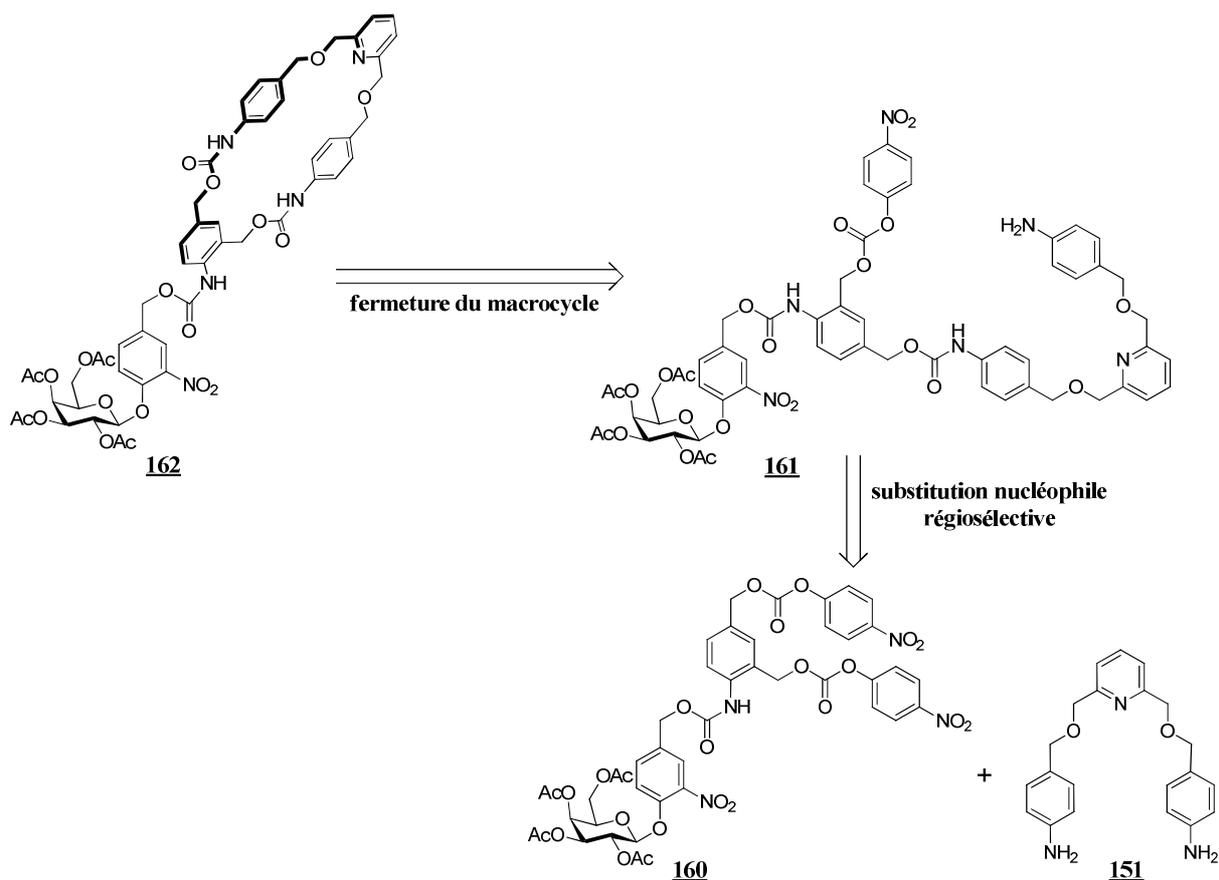


Figure 117 – Préparation du composé **143b**

Nous avons donc envisagé de préparer le macrocycle protégé **162** selon une procédure en deux étapes one pot (**Figure 118**). La bis-aniline **151** sera tout d'abord introduite de manière régiosélective sur le carbonate en position *para* du composé **160** dans les conditions décrites pour la synthèse du composé **143a**. La fermeture du macrocycle sera ensuite réalisée à partir de l'intermédiaire **161** dans des conditions de grande dilution à 30°C pour favoriser l'attaque nucléophile intramoléculaire de la seconde aniline sur le carbonate en position *ortho*.



2.2 Synthèse du macrocycle **163**

2.2.1 Préparation de la dianiline **151**

Nous avons tout d'abord tenté de préparer la dianiline **151** en deux étapes à partir de la 2,6-pyridinediméthanol commerciale **144** (**Figure 119**). Cependant, la réaction de substitution nucléophile entre le composé **144** et le bromure de 4-nitrobenzyle **145** dans des conditions classiques a toujours conduit à des bruts complexes ne nous permettant pas d'isoler le composé **148**. Une étude complémentaire a montré que le composé **145**, en présence de NaH,

se décompose rapidement pour donner un précipité jaune vif après neutralisation du milieu réactionnel. Ce composé n'a pas pu être caractérisé car il est totalement insoluble dans les solvants usuels et dans l'eau.

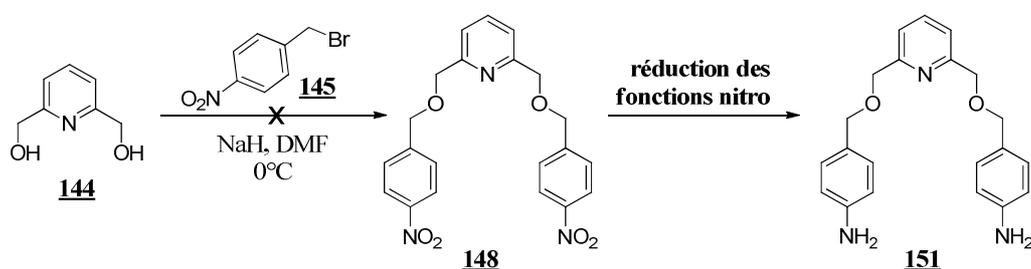


Figure 119 – Première stratégie de synthèse de la dianiline **151**

Une seconde stratégie de synthèse du composé **148** a ensuite été envisagée (Figure 120). La 2,6-pyridinediméthanol **144** a tout d'abord été traitée par du chlorure de tosyloxy dans un mélange dichlorométhane/eau en présence de hydroxyde de potassium pour former le composé di-tosylé **146** avec un rendement de 79%.²⁰⁴ La structure de **146** a été confirmée par RMN ¹H avec l'apparition de deux doublets à 7,80 et 7,33 ppm et d'un singulet à 2,44 ppm caractéristiques des protons aromatiques et du méthyle des groupements tosyloxy.

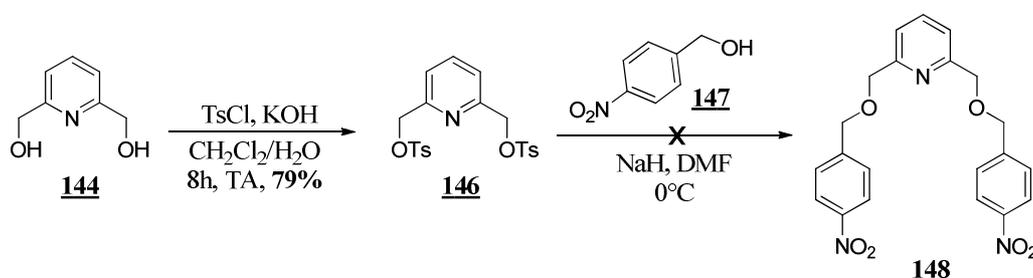


Figure 120 – Deuxième stratégie de synthèse du composé **148**

Malheureusement, la réaction de substitution nucléophile entre le composé **146** et l'alcool 4-nitrobenzylique **147** en présence de NaH dans le DMF a, elle aussi, conduit à la formation de nombreux composés parmi lesquels le composé **148** n'a pas été isolé.

Les problèmes observés dans ces deux derniers cas semblent provenir de la présence du groupement nitro sur les composés **145** et **147**. Nous avons donc envisagé de conserver cette dernière voie de synthèse en remplaçant l'alcool 4-nitrobenzylique **147** par l'alcool 4-

²⁰⁴ Horvarth, G.; Rusa, C.; Kontos, Z.; Gerencser, J.; Huszthy, P. *Synthetic Commun.* **1999**, 29, 3719-3731.

azidobenzilylique **149** (**Figure 121**). Ce dernier a été préparé avec un rendement de 93% à partir de l'alcool 4-bromobenzilylique selon la méthode décrite par Andersen.²⁰⁵ L'échange brome-azoture a été confirmé par RMN ¹H avec l'observation du déplacement du doublet des protons aromatiques en *ortho* du brome. L'introduction de l'alcool benzylique **149** sur la pyridine di-tosylée **146** par une réaction de substitution nucléophile en présence de NaH dans le DMF a, cette fois-ci, conduit à la formation du diazoture **150** avec un excellent rendement de 96%.

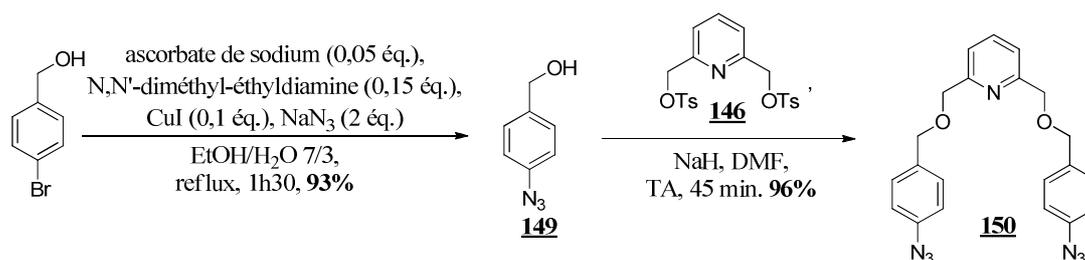


Figure 121 – Synthèse du diazoture **150**

La prochaine étape repose sur la réduction des fonctions azotures du composé **150** pour former la dianiline **151**. Les premiers essais réalisés avec du LiAlH₄ à 0°C dans le THF ont permis d'obtenir le composé **151** avec un rendement de 68% (**Figure 122**).

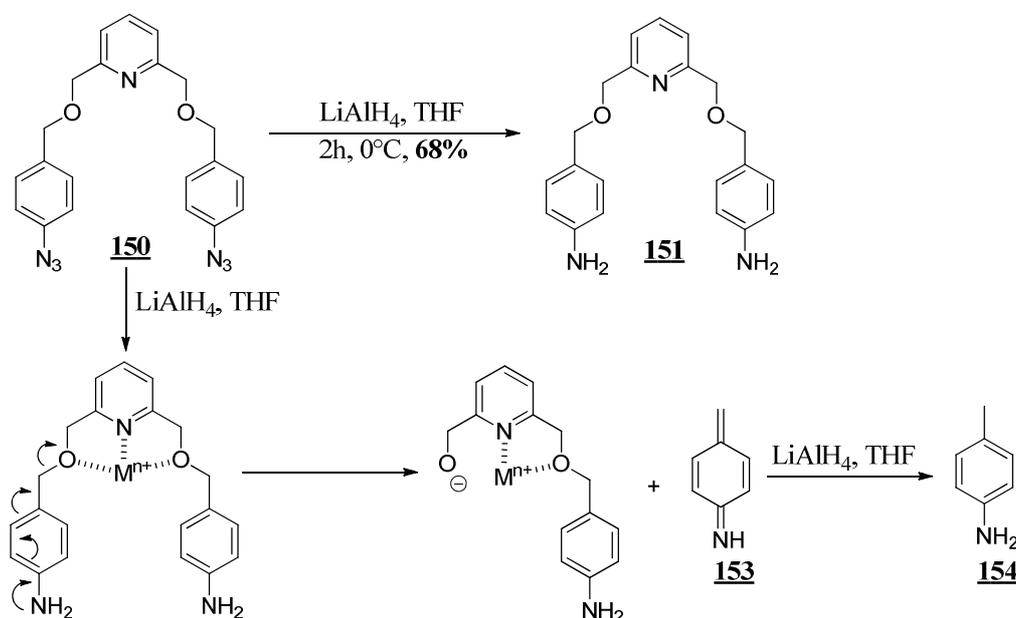


Figure 122 – Synthèse de la dianiline **151**

²⁰⁵ Andersen, J.; Madsen, U.; Björkling, F.; Liang, X. *Synlett* **2005**, 14, 2209-2213.

Cependant cette réaction est peu reproductible et, de manière surprenante, seule la méthylaniline **154** a été isolée, après hydrolyse et extraction du milieu réactionnel, lorsque des quantités de **150** supérieures à un gramme ont été soumises à ces conditions. En effet, la chelation d'un cation métallique (Li^+ , Al^{3+}) au motif pyridine et aux atomes d'oxygènes de **150** pourrait favoriser la réaction d'élimination 1,6 de l'alcool benzylique après réduction de l'azoture en aniline. La méthylène azaquinone **153** ainsi obtenue serait alors réduite par LiAlH_4 pour donner la méthylaniline **154**.

L'emploi d'hydrures métalliques n'étant pas adapté dans ce cas, différentes méthodes de réduction ont été testées pour préparer facilement des quantités de composé **151** de l'ordre de plusieurs grammes. A titre d'exemple, la réaction de Staudinger en présence de triphénylphosphine a permis la réduction rapide des fonctions azotures du composé **150** mais conduit à un mélange de **151** et d'oxyde de triphénylphosphine inséparables par chromatographie sur gel de silice.

La méthode la plus efficace s'est avérée être l'utilisation de 1,3-propanedithiol et de triéthylamine dans un mélange THF/MeOH (**Figure 123**).²⁰⁶ Dans ces conditions, la dianiline **151** a pu facilement être obtenue avec un bon rendement de 78%. La structure de ce composé a été confirmée par RMN ^1H avec l'apparition d'un singulet large d'intégration 4H à 5,07 ppm caractéristique des protons de l'aniline.

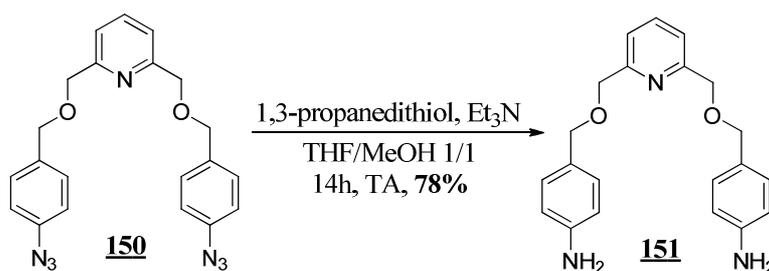


Figure 123 – Synthèse de la dianiline **151**

2.2.2 Synthèse du composé diactivé **160**

Le composé **160** a été préparé en cinq étapes selon une méthode développée au laboratoire (**Figure 124**).⁶³ Tout d'abord, la réaction de glycosylation entre le galactoside

²⁰⁶ Bayley, H.; Standring, D. N.; Knowles, J. R. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3633-3634.

bromé **87** et le phénol **40** en présence de carbonate d'argent permet d'obtenir le β -glycoside **155** avec un très bon rendement de 89%. L'aldéhyde **155** est ensuite réduit par NaBH_4 pour former l'alcool benzylique **156** avec un bon rendement de 84%. Ce dernier est activé par le chloroformiate de *para*-nitrophénol en présence de pyridine dans le dichlorométhane. Après 30 minutes de réaction à température ambiante, le carbonate mixte **157** est isolé avec un rendement de 86%. La formation du carbonate de *para*-nitrophénol est confirmée par analyse RMN ^1H avec la présence de deux doublets à 8,29 et 7,39 ppm caractéristiques des protons situés respectivement en *mé*ta et en *ortho* de la fonction NO_2 .

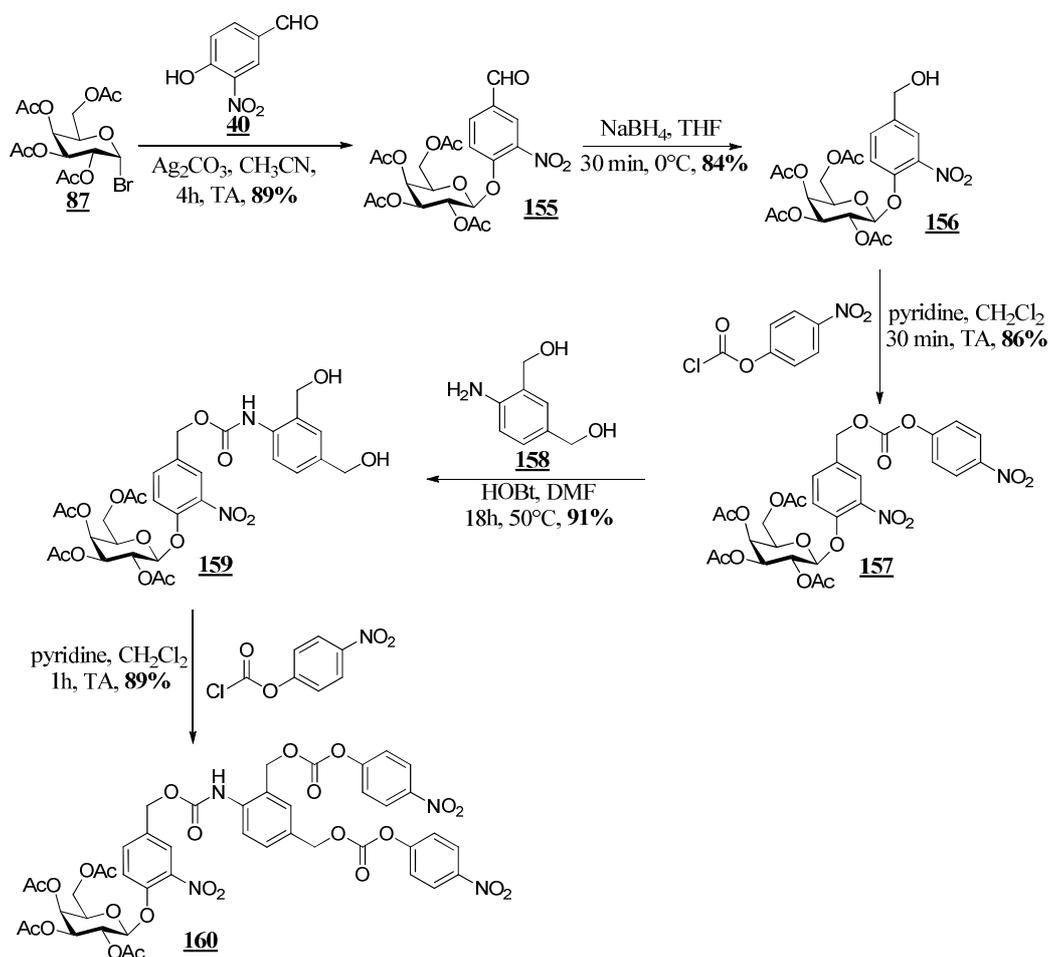


Figure 124 – Synthèse du bis-carbonate activé **160**

L'aniline **158**, dont la synthèse a été décrite par Warnecke et Kratz,²⁰⁷ est ensuite additionnée chimiosélectivement sur le carbonate mixte **157** en présence de HOBt dans le DMF à 50°C. Cette réaction permet d'isoler le carbamate **159** avec un excellent rendement de 91%. Enfin, les alcools benzyliques de **159** sont activés en présence de chloroformiate de

²⁰⁷ Warnecke, A. ; Kratz, F. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 1546-1552.

para-nitrophénol et de pyridine pour conduire au composé **160** avec rendement de 89%. La formation de deux fonctions carbonates est confirmée par RMN ^{13}C avec l'apparition de deux signaux caractéristiques à 155,5 et 155,2 ppm.

2.2.3 Réaction de macrocyclisation

Comme nous l'avons évoqué précédemment, nous avons exploité la différence de réactivité des carbonates du composé **160** pour la préparation du macrocycle **163** (Figure 125).

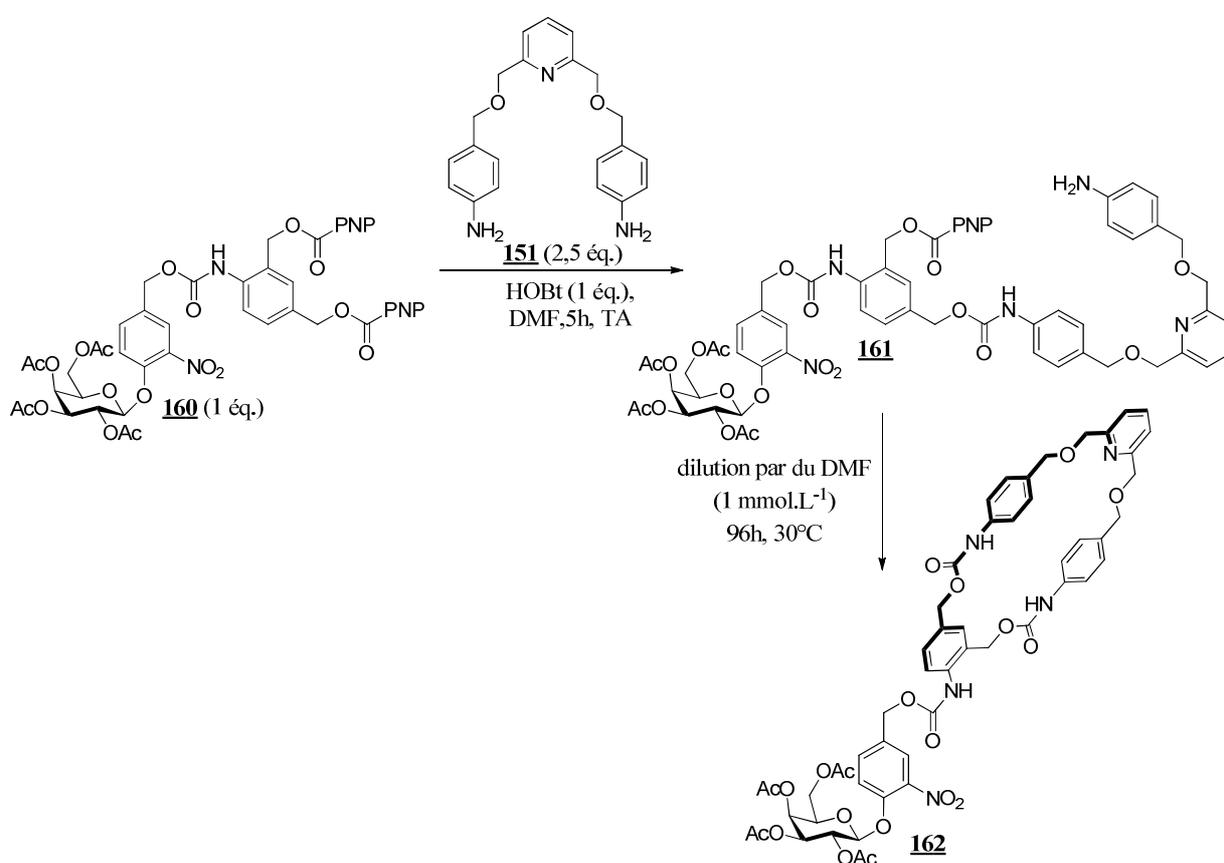


Figure 125 – Stratégie de macrocyclisation en deux étapes one-pot

Une première substitution nucléophile entre le bis-carbonate **160** et la dianiline **151** (2,5 équivalents) en présence de HOBT dans le DMF conduit majoritairement au composé mono-substitué **161** après 5 heures d'agitation à température ambiante. Le milieu réactionnel est alors dilué par du DMF (concentration finale : 1 mmol.L⁻¹) et chauffé à 30°C pendant 96 heures afin de favoriser la substitution nucléophile intramoléculaire du carbonate en *ortho*

conduisant à la fermeture du macrocycle. Cette dernière étape conduit à un mélange de macrocycle protégé **162** et de dianiline **151** inséparables par chromatographie sur gel de silice.

Le mélange des composés **151** et **162** est directement traité par du méthanolate de sodium afin de cliver les groupements acétates protégeant le motif galactoside (**Figure 126**). Le macrocycle déprotégé **163** a été isolé avec un rendement de 28 % sur deux étapes.

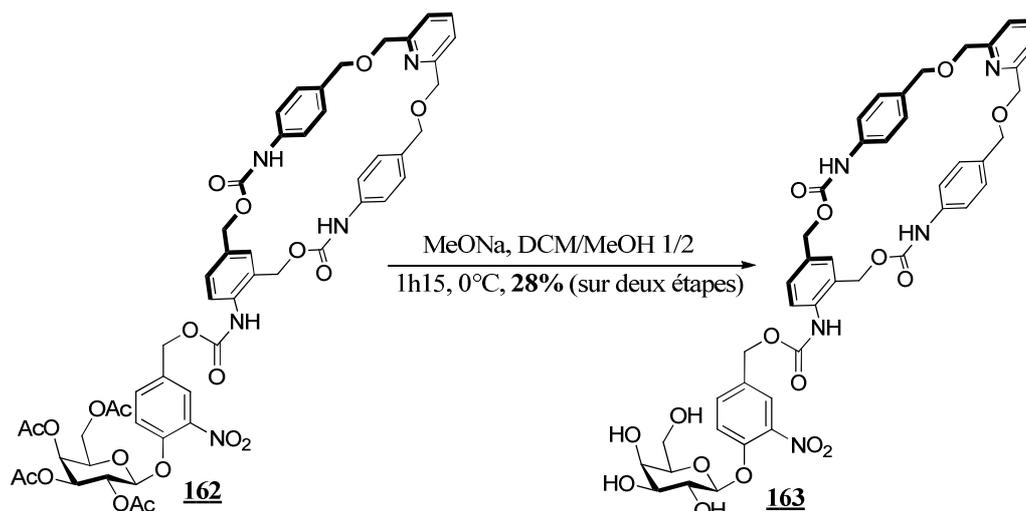


Figure 126 – Déprotection du galactoside **162**

2.3 Préparation des esters de taxol **168**, **169a** et **169b**

Afin de préparer les esters de taxol **169a** et **169b**, deux chaînes latérales **167a** et **167b** présentant une fonction azoture et un acide carboxylique ont tout d'abord été synthétisées (**Figure 127**). Le composé **167a** comportant quatre groupements CH₂ a été obtenu à partir de **164** après échange brome-azoture puis saponification de l'ester d'éthyle. La chaîne latérale **167b** a, quant à elle, était préparée par substitution nucléophile de l'atome de brome du composé commercial **166** en présence de NaN₃ dans le DMF avec un rendement de 88%.

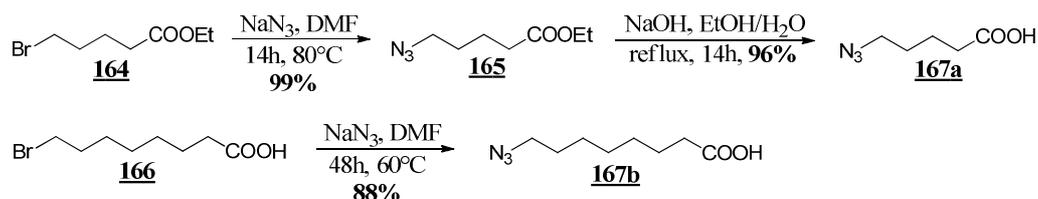


Figure 127 – synthèse des chaînes latérales **167a** et **167b**

Les chaînes latérales **167a**, **167b** et l'acide hexynoïque ont ensuite été couplée régiosélectivement à l'alcool en position 2' en présence de DCC et de DMAP dans le THF (**Figure 128**). Les esters de paclitaxel **168**, **169a** et **169b** ont ainsi été isolés avec des rendements compris entre 67 et 84%.

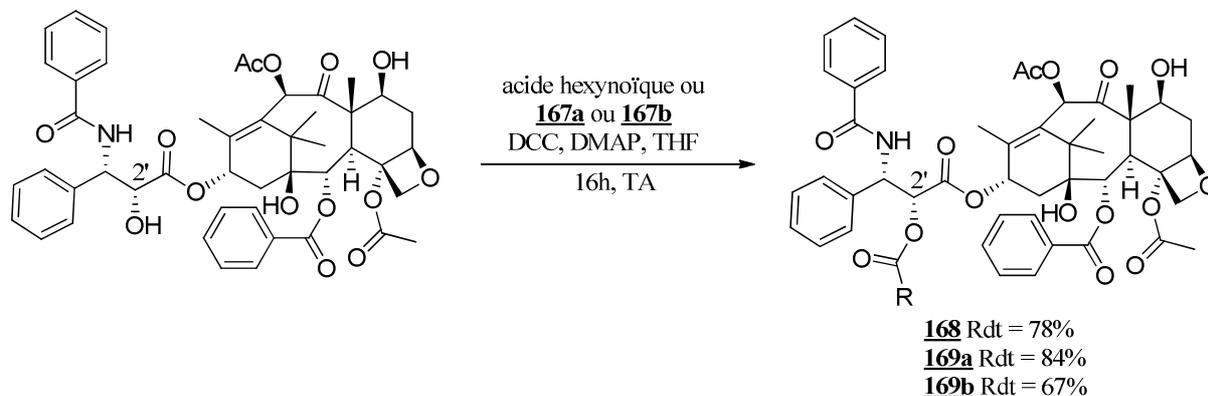


Figure 128 – Préparation des esters de paclitaxel **168**, **169a** et **169b**

2.4 Réaction de rotaxation par reconnaissance active par le cuivre (I)

Les vecteurs du paclitaxel **133a** et **133b** ont été préparés selon la stratégie de reconnaissance active par un métal développée par le Professeur Leigh.¹⁹⁸ Cette étape de rotaxation a été réalisée à partir du macrocycle **163** en présence d'une quantité équimolaire de $\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{PF}_6$ et d'un excès des esters de paclitaxel **168** et **169a-b** (5 équivalents) dans un mélange DCM/MeOH 8/2 (**Figure 129**).

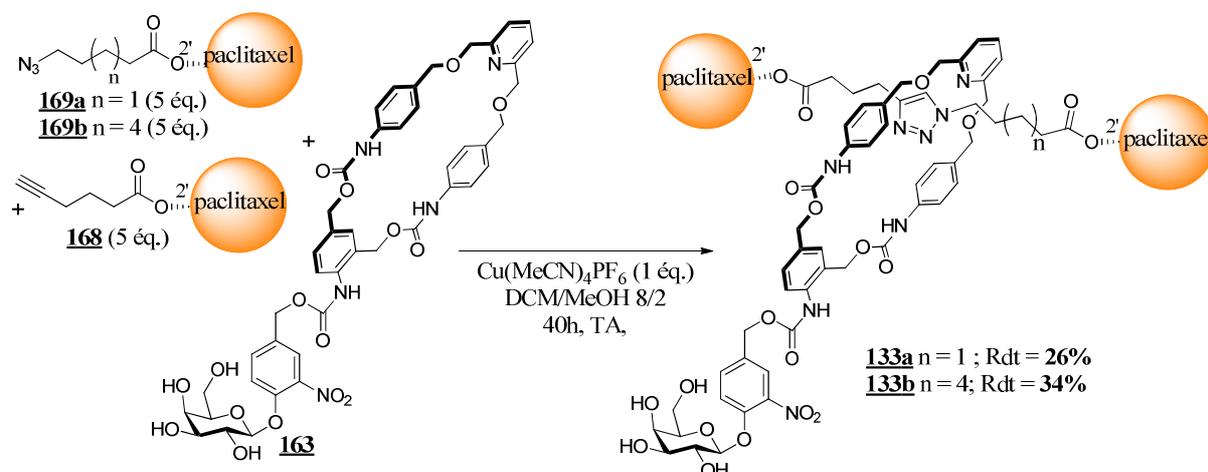


Figure 129 – Réaction de rotaxation par « Active Metal Template »

Le suivi de cette réaction a été effectué par HPLC (**Figure 130**). Dans ces conditions, la formation rapide du rotaxane **133a** et du triazole non entrelacé **136** a été observée. Après 29 heures d'agitation, plus aucun avancement de la réaction n'a été constaté. Ceci pourrait être expliqué par l'oxydation des cations Cu^+ dans le milieu réactionnel conduisant à l'espèce inactive Cu^{2+} . Des résultats similaires ont été obtenus lors de la préparation du vecteur **133b**. Après 40 heures de réaction, les rotaxanes **133a** et **133b** ont été isolés sous la forme de deux diastéréoisomères avec des rendements respectifs de 26% et 34%.

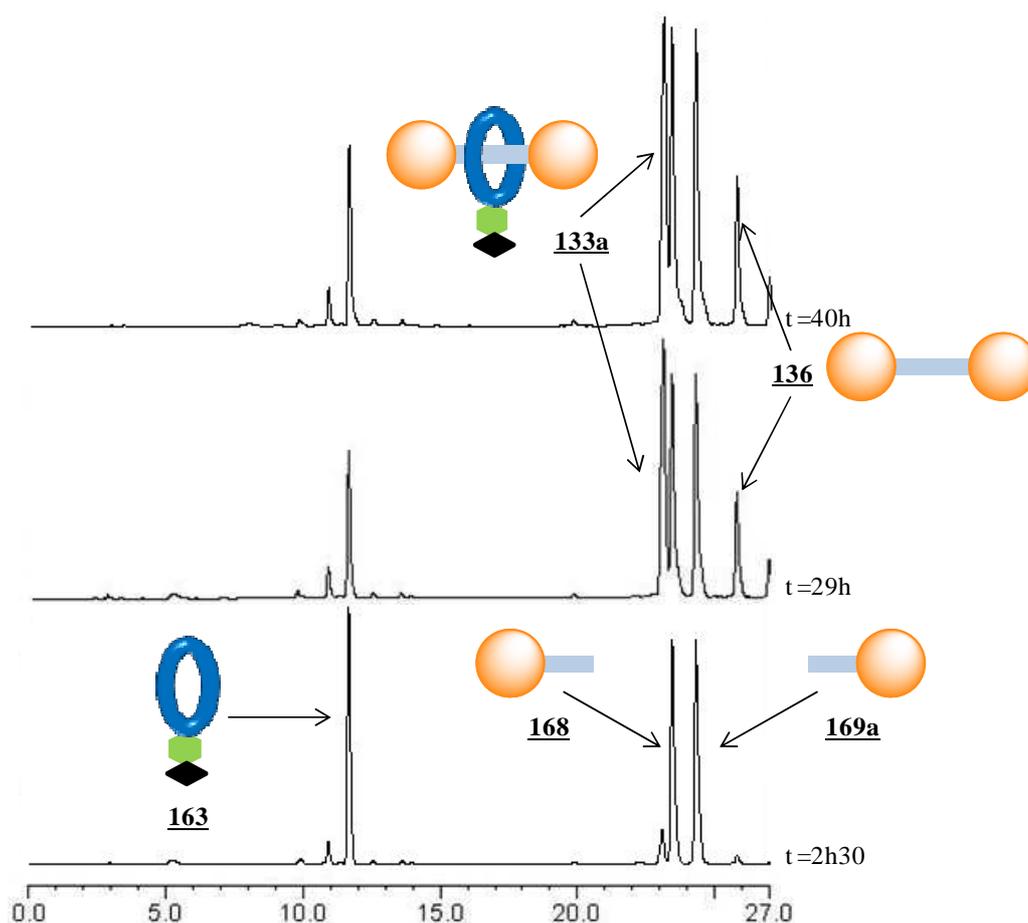


Figure 130 – Suivi par HPLC de la réaction de rotaxanation conduisant au vecteur **133a**

Dans ces conditions, la faible vitesse de la réaction de cycloaddition peut être liée à l'encombrement important des motifs paclitaxels. De plus, l'oxydation du cuivre (I) en cuivre (II) dans le milieu réactionnel pourrait empêcher la réaction de se poursuivre. Cette hypothèse doit cependant être confirmée par de nouveaux essais réalisés en tube scellé sous atmosphère d'argon.

3. Tests d'hydrolyse enzymatique

3.1 Hydrolyse enzymatique du macrocycle **163**

L'hydrolyse enzymatique du composé **163** a tout d'abord été réalisée afin de vérifier que l'activation par la β -galactosidase conduit à l'ouverture du macrocycle dans des conditions de température et de pH physiologiques (**Figure 131**). Le suivi par HPLC de cette réaction indique l'hydrolyse partielle du macrocycle **163** conduisant au phénolate intermédiaire **170**. Cependant plus aucune évolution de la composition du milieu réactionnel n'a été observé après 15 minutes d'incubation.

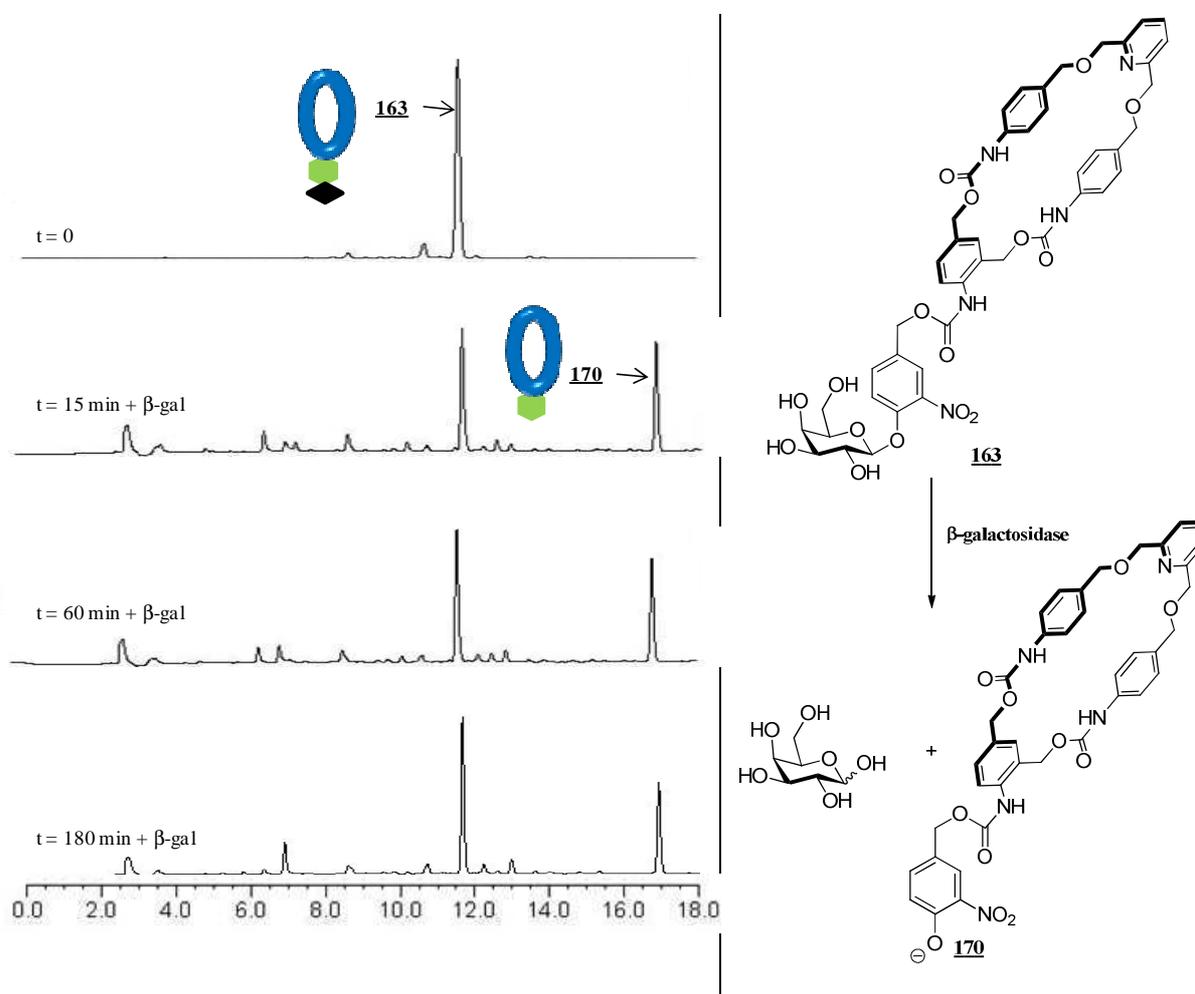


Figure 131 – hydrolyse enzymatique du macrocycle **163**. (Conditions opératoires : **163** : 0,05 mg/mL ; β -galactosidase (*E. Coli*) : 12,5 U/mL ; tampon phosphate 0,02 M (pH = 7,0) + 10% DMSO ; 37°C)

Bien que le macrocycle **163** soit substrat de la β -galactosidase, l'arrêt soudain de la réaction enzymatique pourrait être expliqué par la présence d'un volume important de DMSO (10% volumique) pouvant dénaturer rapidement l'enzyme. En outre, l'aniline **90** se

décompose extrêmement lentement en raison de sa faible hydrosolubilité dans le milieu. Tout comme dans le cas du vecteur de la cycloamine **45**, un nouveau macrocycle galactosylé auto-immolable plus hydrosoluble devra donc être conçu pour que sa vitesse de décomposition soit compatible avec son utilisation *in-vivo*.

3.2 Hydrolyse enzymatique des rotaxanes **133a** et **133b**

Cette expérience a ensuite été répétée avec les rotaxanes galactosylés **133a** et **133b**. Dans ces conditions, ces deux composés ne se sont pas montrés substrats pour l'enzyme et restent parfaitement stables. Aucune trace des fils **136a** et **136b** n'a été observée et ce malgré plusieurs heures d'incubation. Plusieurs facteurs pourraient expliquer ce résultat décevant. Tout d'abord, la faible hydrosolubilité des rotaxanes **133a** et **133b** entraîne l'utilisation de DMSO pouvant dénaturer la β -galactosidase. De plus, l'encombrement stérique généré par la présence des motifs paclitaxel pourrait diminuer l'accessibilité de la gâchette pour l'enzyme.

4. Conclusion

Le but de cette étude était de préparer et d'évaluer un nouveau système moléculaire entrelacé conçu pour prolonger la durée de vie plasmatique d'esters de paclitaxel, puis de libérer de manière sélective ces espèces dans la zone tumorale dans le cadre d'une stratégie ADEPT. Dans ce cadre, deux rotaxanes **133a** et **133b** ont été étudiés. Ces vecteurs sont constitués d'un macrocycle auto-immolable entourant un fil dont les extrémités sont reliées à deux molécules de paclitaxel par des fonctions esters. Le déplacement du macrocycle le long du fil permettra de protéger ces fonctions esters de l'action des estérases plasmatiques. L'activation du macrocycle par la β -galactosidase, devait conduire à l'ouverture de ce dernier puis à la libération sélective du fil reliant les deux molécules anticancéreuses.

La synthèse des composés **133a** et **133b** a été réalisée selon une stratégie linéaire en huit étapes à partir du galactoside bromé **87** avec des rendements globaux respectifs de 3,8 et 5%. Malheureusement, les tests d'hydrolyse enzymatique du macrocycle **163** mené en présence de β -galactosidase ont montré que, dans des conditions physiologiques, l'activation enzymatique de la gâchette ne conduit pas à l'ouverture du macrocycle. Il en a été de même

avec l'hydrolyse enzymatique des rotaxanes **133a** et **133b** puisque la libération du fil **136** n'a pas été observée dans ces conditions. Ces travaux n'ont donc pas permis de montrer la validité de cette nouvelle approche. La synthèse de rotaxanes rendus plus hydrosolubles par l'introduction de groupements PEG est actuellement à l'étude au laboratoire.

CONCLUSION GENERALE

Malgré les progrès réalisés au cours des dernières années en matière de traitement, de détection et de prévention, le cancer est un problème de santé publique majeur en raison du nombre de cas et du nombre de décès qu'il provoque chaque année. Actuellement, plusieurs types de thérapies sont couramment utilisés pour combattre le cancer parmi lesquelles la chirurgie ou la chimiothérapie. Bien que cette dernière reste la méthode de choix pour le traitement d'un grand nombre de tumeurs, le manque de sélectivité des agents anticancéreux utilisés dans ce cadre représente encore à ce jour un problème majeur. En effet, ce traitement provoque généralement de sévères effets secondaires dus à la destruction des tissus sains. Par conséquent, le développement de nouvelles stratégies conçues pour détruire sélectivement les tumeurs sans affecter les organes sains représente un intérêt majeur dans la lutte contre le cancer. Parmi les différents concepts étudiés, l'utilisation de vecteurs capables de reconnaître et d'interagir avec des spécificités propres à la tumeur constitue l'un des aspects les plus prometteurs du ciblage thérapeutique.

Dans ce cadre, l'utilisation de vecteurs glucuronylés représente une stratégie particulièrement intéressante ayant conduit à des résultats chez l'animal très encourageants. Notre équipe de recherche est impliquée depuis plusieurs années dans la conception de nouveaux vecteurs glucuronylés. L'un des objectifs de ces travaux est de vectoriser de nouveaux agents anticancéreux par ce biais. Ainsi, un nouveau vecteur glucuronylé **34** de l'auristatine monométhyle E (MMAE) a été développé. La MMAE est un agent cytotoxique extrêmement puissant appartenant à la famille des dolastatines. Une évaluation préliminaire de l'efficacité thérapeutique du vecteur **34** a été réalisée sur des xénogreffes de tumeur LLC implantées chez la souris. Durant cette étude, il a été montré que ce composé présentait une efficacité thérapeutique comparable à celle de HMR 1826 à une dose 238 fois plus faible que celle administrée lors de l'utilisation du vecteur glucuronylé de la doxorubicine. Le nouveau vecteur de la cyclopamine **47**, un inhibiteur de la voie de signalisation hedgehog actif contre le glioblastome, a lui aussi été synthétisé. L'introduction d'une chaîne latérale hydrophile de type PEG glycosylé sur ce composé a permis d'augmenter d'un facteur 14 la vitesse de libération de l'agent actif en comparaison avec le vecteur de première génération **45**. L'évaluation *in-vitro* du potentiel thérapeutique du vecteur **47** a été réalisée sur des cellules souches initiatrices du glioblastome. Incubé seul, le vecteur ne possède pas d'activité cytotoxique aux plus fortes doses testées, alors qu'en présence de β -glucuronidase, l'activité de **47** est comparable à celle de la cyclopamine.

Malgré le potentiel prometteur des vecteurs glucuronylés, le faible temps de demi-vie plasmatique de ces composés et l'activité réduite de la β -glucuronidase dans le microenvironnement tumoral limitent le développement de cette approche. Pour pallier ces problèmes, nous avons conçus le vecteur glucuronylé de la doxorubicine **68b**. Ce composé comporte un motif maléimide lui permettant de se coupler *in-vivo* à la cystéine 34 de l'albumine plasmatique. Le vecteur macromoléculaire **69** ainsi formé ne sera pas éliminé rapidement par les reins et possèdera un temps de demi-vie plasmatique supérieur à celui de son homologue non conjugué HMR 1826. De plus la rétention accrue de cette macromolécule au niveau de la tumeur par effet EPR permettra de pallier la faible activité de la β -glucuronidase dans le microenvironnement tumoral. L'évaluation *in-vivo* du vecteur **68b** a été réalisée sur un modèle de tumeur LLC chez la souris. **68b** présente une activité anticancéreuse supérieure à celle de HMR 1826 à des doses seulement trois fois supérieures à la dose maximale tolérée pour la doxorubicine. De plus, l'utilisation de **68b** à cette dose ne provoque aucun effet secondaire, alors qu'à efficacité égale, c'est une dose toxique d'HMR 1826 (> 250 mg/kg) qui aurait dû être administrée.

Le ciblage de récepteurs ou d'anticorps surexprimés à la surface des cellules cancéreuses a lui aussi conduit à de très bons résultats lors de l'évaluation de plusieurs composés chez l'homme. Dans ce cadre, nous avons développé un nouveau vecteur galactosylé de la MMAE **85** ciblant les récepteurs de l'acide folique surexprimés dans différents types de tumeurs. Une étude *in-vitro* a montré que le vecteur **85** était particulièrement efficace sur les cellules KB (FR+) avec une valeur d'IC₅₀ de 240 pM, faisant de lui le conjugué de l'acide folique le plus puissant conçu à ce jour. De plus, une toxicité nettement moins importante a été observée sur les cellules A549 (FR- ; IC₅₀ : 195 nM). Lors de cette étude, nous avons aussi mis en évidence que l'activation du vecteur **85** par la β -galactosydase lysosomale est particulièrement efficace. De plus, ce phénomène permet la libération d'une grande quantité d'agent actif, pouvant quitter la cellule et exercer son action cytotoxique sur les cellules cancéreuses avoisinantes. Enfin, le composé **85** présente une excellente activité anticancéreuse sur des xénogreffes de tumeurs KB implantées chez la souris nude sans provoquer d'effets secondaires.

Le dernier chapitre de cette thèse présentait les travaux réalisés dans le cadre de la conception d'un nouveau système moléculaire entrelacé dédié à la vectorisation de drogues

présentant uniquement des fonctions alcools et acides carboxyliques. Nous avons étudié les deux rotaxanes galactosylés auto-immolables **134a** et **134b** véhiculant des esters de paclitaxel. La présence du macrocycle assure la protection des fonctions esters sensibles à l'action des estérases plasmatiques, alors qu'en présence de β -galactosidase, l'ouverture du macrocycle permettra la libération sélective des esters de paclitaxel dans le microenvironnement tumoral. Malheureusement, les premiers tests d'hydrolyse enzymatique réalisés sur ces composés n'ont pas été concluants et nous n'avons pas, pour le moment, réussi à montrer la validité de cette nouvelle approche.

Ces travaux ont permis d'élargir le panel des vecteurs existant en ciblant différentes spécificités tumorales et en vectorisant des agents cytotoxiques possédant différents modes d'actions. En outre, il a été montré qu'à partir d'une même unité centrale, il est possible de moduler aisément les différents éléments du système de ciblage tels que la drogue (MMAE, cyclophosphamide, doxorubicine), la gâchette (galactoside, glucuronide) et la chaîne latérale (chaîne hydrosoluble, ancre pour macromolécules, ligand de ciblage) (**Figure 132**). A l'avenir, il pourra être possible d'assembler à la demande des systèmes moléculaires adaptés au ciblage d'une pathologie donnée.

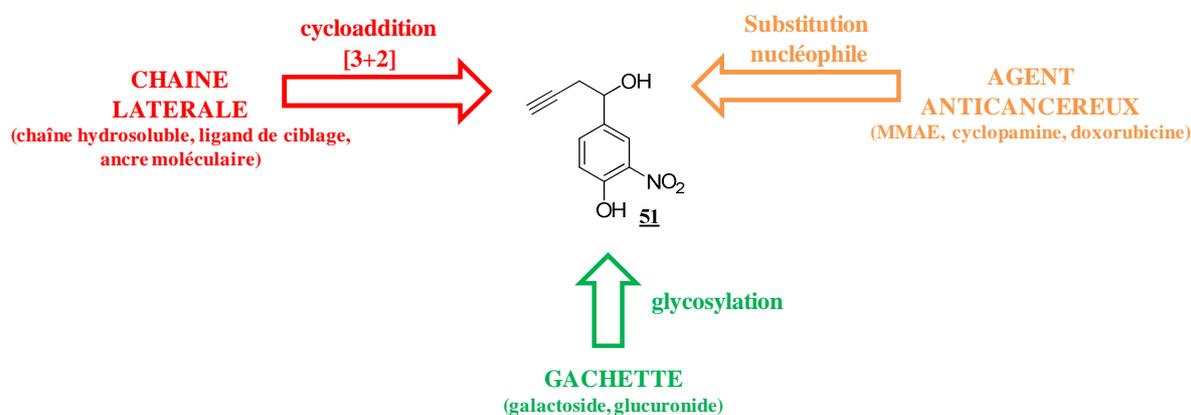


Figure 132 – Modularité de l'unité centrale **51**

A terme, l'association de ces différents vecteurs au cours d'un même traitement pourra être envisagée. La composition de cette polychimiothérapie ciblée pourra être adaptée en fonction des caractéristiques tumorales rencontrées. Il pourrait en découler des traitements plus efficaces et mieux supportés par les patients tirant bénéfice du mode d'action spécifique de chaque vecteur utilisé.

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Généralités

1.1 Réactifs chimiques et solvants

L'ensemble des réactifs provient de chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), Fluka (division de Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), Acros Organics (Halluin, France), Alfa-Aesar (Schitigheim, France) et ont été utilisés sans traitement ni purification spécifique.

Les solvants anhydres, achetés chez Sigma-Aldrich et Fluka, sont stockés sur tamis moléculaire et sous atmosphère d'azote. Le THF est fraîchement distillé sur sodium, en présence de benzophénone, sous atmosphère d'azote.

1.2 Suivi des réactions et purification

L'avancement des réactions et la pureté des produits ont été contrôlés par chromatographie sur couche mince de silice (CCM) déposée sur une plaque d'aluminium (plaques commerciales Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ épaisseur de silice 0,2 mm). Les plaques CCM ont été révélées : par fluorescence dans l'ultra-violet à 254 nm, par pulvérisation d'une solution d'acide phosphomolybdique dans l'éthanol suivie de chauffage ou par pulvérisation d'une solution aqueuse de KMnO₄ suivie de chauffage

La séparation des produits a été effectuée par chromatographie flash sur colonne de gel de silice (MACHEREY-NAGEL 60 (15-40 µm) ou sur plaques préparatives de silice (plaques préparées au laboratoire avec le gel de silice Merck Kieselgel 60 F₂₅₄).

1.3 Analyse des composés synthétisés

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton (¹H) et du carbone (¹³C) ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER 400 AVANCE III Plus à 400 et 100 MHz respectivement. Les déplacements chimiques sont calibrés en prenant le pic résiduel du solvant deutéré (CDCl₃, DMSO-*d*₆, CD₃OD) comme référence. L'attribution des

déplacements chimiques des protons et des carbones a été effectuée à l'aide de séquences mono et bi-dimensionnelles (DEPT 135, COSY H-H, HMQC). Les abréviations suivantes ont été utilisées pour décrire les signaux observés :

s : singulet	l : large
d : doublet	m : massif
t : triplet	dd : doublet dédoublé
q : quadruplet	td : triplet dédoublé

Les points de fusion (Pf) ont été déterminés avec un appareil BÜCHI Melting Point B-545. Les pouvoirs rotatoires $[\alpha]_D^{20}$ ont été mesurés avec un polarimètre SCHMIDT Polartronic HH8 à 20°C.

Les spectres de masse basse résolution (SM) ont été réalisés en infusion directe sur un détecteur de masse WATERS 3100. Les spectres de masse haute résolution (SMHR) ont été réalisés par le Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest (CRMPO) de l'Université de Rennes sur des spectromètres de masse haute résolution WATERS MicrO-Tof-Q et Q-Tof 2.

1.4 Analyse et purification par HPLC

Le suivi de réaction et l'analyse de certains composés ont été réalisés sur un appareil HPLC DIONEX Ultimate 3000 équipé d'un détecteur UV quadruple longueurs d'onde et d'une colonne DIONEX Acclaim® 120 (C18, 5 μm , 120 Å) dans un compartiment thermostaté à 30°C. Les chromatogrammes sont enregistrés à 220 et 254 nm. L'intégration est assurée par le logiciel Chromeleon version 6.80 SP1 Build 2238. Les éluants sont composés de A (H₂O + TFA 0,2%), B (H₂O + acide formique 0,2%) et C (CH₃CN). Les méthodes utilisées sont les suivantes :

- Méthode **A** : Gradient isocratique A/C 60/40

Débit : 1 mL/min

- Méthode **B** : Gradient linéaire A/C 80/20 à 0/100 en 30 minutes

Débit : 1 mL/min

- Méthode **C** : Gradient linéaire B/C 80/20 à 0/100 en 30 minutes
Débit : 1 mL/min.

- Méthode **D** : Gradient isocratique A/C 70/30 pendant 8 minutes puis linéaire jusqu'à A/C 30/70 en 12 minutes
Débit : 1 mL/min

La purification de certains composés a été effectuée par HPLC semi-préparative sur un appareil VWR LaPrep équipé d'un détecteur UV LaPrep P314 et d'un système de pompe LaPrep P110. Les éluants sont composés de A (H₂O), B (H₂O + TFA 0,05%), C (H₂O + TFA 0,02%) et D (CH₃CN). Les méthodes utilisées sont les suivantes :

- Méthode **1** : Colonne ACE 5[®] C18 100×10 mm

Gradient linéaire A/D 80/20 à 20/80 en 25 minutes

Débit : 4 mL/min

- Méthode **2** : Colonne Merck Hibar[®] 125-25 Purospher[®] STAR RP-18e 5 μm

Gradient linéaire A/D 80/20 à 20/80 en 15 minutes

Débit : 30 mL/min

- Méthode **3** : Colonne ACE 5[®] C18 100×10 mm

Gradient linéaire C/D 80/20 à 0/100 en 20 minutes

Débit : 4 mL/min

- Méthode **4** : Colonne Merck Hibar[®] 125-25 Purospher[®] STAR RP-18e 5 μm

Gradient linéaire B/D 90/10 à 70/30 en 12 minutes puis 10/90 en 16 minutes

Débit : 30 mL/min

- Méthode **5** : Colonne Waters SunFire[™] Prep C18 OBD[™] 19x50 mm 5 μm

Gradient linéaire A/D 80/20 v/v à 0/100 en 25 minutes

Débit : 25 mL/min

2. Hydrolyses enzymatiques

Hydrolyse enzymatique du vecteur glucuronylé de la MMAE **34**

Le vecteur **34** a été incubé à 37°C dans du tampon phosphate (0,02M ; pH = 7) à une concentration de 0,1 mg/mL. 133 U/mL de β -glucuronidase (*Escherichia Coli*; Sigma Aldrich; réf. G8162) ont été additionnées et la composition du mélange a été suivie par HPLC (Méthode A).

Méthode A	33	24	MMAE
temps de rétention (min)	20,66	5,12	6,02

Hydrolyse enzymatique du vecteur glucuronylé de la cyclopatamine **47**

Le vecteur **47** a été incubé à 37°C dans du tampon phosphate (0,02M ; pH = 7) à une concentration de 1 μ mol/L. 133 U/mL de β -glucuronidase (*Escherichia Coli*; Sigma Aldrich; réf. G8162) ont été additionnées et la composition du mélange a été suivie par HPLC-MS (Méthode B).

Méthode B	47	cyclopatamine
temps de rétention (min)	13,57-13,83	14,30

Hydrolyse enzymatique du vecteur glucuronylé de la doxorubicine **68b** et de HMR 1826

Le vecteur **68b** et HMR 1826 (0,1 mg/mL) ont été incubés à 37°C pendant 5h dans du tampon phosphate (0,02M ; pH = 7) en présence d'albumine plasmatique humaine (HSA ; 15,9 mg/mL; Sigma Aldrich; réf. A3782). 133 U/mL de β -glucuronidase (*Escherichia Coli*, Sigma Aldrich; réf. G8162) ont été additionnées et la composition du mélange a été suivie par HPLC (Méthode C).

Méthode C	HSA	68b	HMR-1826	doxorubicine
temps de rétention (min)	9,07	13,39-13,79	12,86	8,71

Hydrolyse enzymatique du vecteur galactosylé de la MMAE **85**

Le vecteur **85** a été incubé à 37°C dans du tampon phosphate (0,02M ; pH = 7) à une concentration de 0,5 mg/mL. 4,48 U/mL de β -galactosidase (*Escherichia Coli*; Sigma Aldrich; réf. G4155) ont été additionnées et la composition du mélange a été suivie par HPLC (Méthode **B**).

Méthode B	85	MMAE
temps de rétention (min)	12,29	9,94

Hydrolyse enzymatique du vecteur galactosylé de la doxorubicine **94a**

Le vecteur **94a** a été incubé à 37°C dans du tampon phosphate (0,02M ; pH = 7) à une concentration de 0,5 mg/mL. 12,5 U/mL de β -galactosidase (*Escherichia Coli*; Sigma Aldrich; réf. G4155) ont été additionnées et la composition du mélange a été suivie par HPLC (Méthode **D**).

Méthode D	94a	doxorubicine
temps de rétention (min)	14,4	11,7

Hydrolyse enzymatique du macrocycle galactosylé **163**

Le macrocycle **163** a été incubé à 37°C dans du tampon phosphate (0,02M ; pH = 7) et 10% de DMSO à une concentration de 0,05 mg/mL. 12,5 U/mL de β -galactosidase (*Escherichia Coli*; Sigma Aldrich; réf. G4155) ont été additionnées et la composition du mélange a été suivie par HPLC (Méthode **B**).

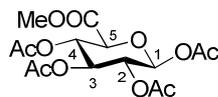
Méthode B	163	170
temps de rétention (min)	11,6	16,7

3. Modes opératoires

Composé	Page
<u>38</u>	183
<u>39</u>	184
<u>41</u>	185
<u>42</u>	186
<u>43</u>	187
<u>44</u>	188
<u>34</u>	190
<u>51</u>	191
<u>52</u>	193
<u>53</u>	194
<u>54</u>	195
<u>55</u>	196
<u>56</u>	197
<u>57</u>	198
<u>58</u>	199
<u>59</u>	200
<u>60</u>	201
<u>61</u>	202
<u>62</u>	203
<u>63</u>	204
<u>47</u>	205
<u>71</u>	206

Composé	Page
<u>75</u>	207
<u>77a</u>	209
<u>77b</u>	211
<u>68a</u>	213
<u>68b</u>	215
<u>87</u>	217
<u>88</u>	218
<u>89</u>	219
<u>90</u>	220
<u>91</u>	221
<u>93</u>	222
<u>85</u>	223
<u>94a</u>	225
<u>99</u>	227
<u>100</u>	228
<u>101</u>	229
<u>102</u>	230
<u>105</u>	231
<u>106</u>	232
<u>107</u>	233
<u>108</u>	234
<u>113</u>	235

Composé	Page
<u>114</u>	236
<u>115</u>	237
<u>146</u>	238
<u>149</u>	239
<u>150</u>	240
<u>151</u>	241
<u>155</u>	242
<u>156</u>	243
<u>157</u>	244
<u>159</u>	245
<u>160</u>	246
<u>163</u>	248
<u>165</u>	250
<u>167a</u>	251
<u>167b</u>	252
<u>168</u>	253
<u>169a</u>	254
<u>169b</u>	256
<u>136</u>	257
<u>133a</u>	258
<u>133b</u>	259

Préparation du 1,2,3,4-tétra-*O*-acétylglucopyranuroate de méthyle **38**

M = 376,31 g.mol⁻¹

Solide blanc

Rendement = 19%

50 g (284 mmol ; 1 éq.) de D-(+)-glucuronolactone sont mis en suspension dans 285 mL de méthanol. 422 mg (7,81 mmol ; 0,0275 éq.) de MeONa sont additionnés et l'agitation est maintenue 2h à température ambiante. Le solvant est évaporé et le brut obtenu est solubilisé dans 200 mL d'anhydride acétique. Le mélange est refroidi à 0°C et une solution de 0,9 mL d'acide perchlorique dans 28 mL d'anhydride acétique est additionnée goutte à goutte. Le mélange est agité 4h à température ambiante puis stocké une nuit au réfrigérateur. Le précipité formé est collecté par filtration puis lavé par 100 mL d'éther diéthylique. 20,07 g (53,3 mmol ; Rdt = 19%) de β-glucuronide **38** sont isolés sous forme d'un solide blanc.

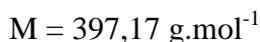
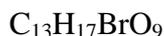
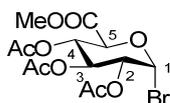
Rf = 0,7 (EP/AcOEt 70/30)

Pf = 176°C

[α]_D²⁰ : +84 (c 1, CHCl₃)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 5,77 (d, 1H, J = 8,0 Hz, H₁) ; 5,30 (m, 3H, H₂, H₃, H₄) ; 4,17 (d, 1H, J = 9,0 Hz, H₅) ; 3,74 (s, 3H, H_{COOMe}) ; 2,12 (s, 3H, H_{CH₃COO}) ; 2,09 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 2,07 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 2,04 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 169,6 - 169,2 - 168,9 - 168,5 (4C_{CO acétate}) ; 166,7 (C_{CO ester}) ; 91,3 (C₁) ; 72,9 - 71,7 - 70,1 - 68,8 (C₂, C₃, C₄, C₅) ; 52,7 (C_{COOCH₃}) ; 20,5 - 20,3 - 20,2 (4C_{CH₃COO}).

Préparation du bromure de (2,3,4-tri-*O*-acétyl- α -D-glucofuranoside) uronate de méthyle **39**

Solide beige

Rendement = 91%

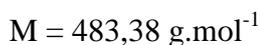
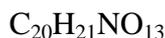
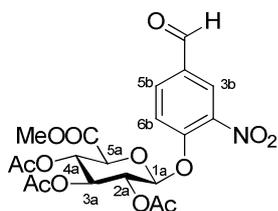
17,9 g (48 mmol ; 1 éq.) de glucuronide peracétylé **38** sont mis en suspension dans 36 mL de HBr à 33% dans l'acide acétique. Après 4h d'agitation, le composé de départ est entièrement consommé. Le milieu réactionnel est alors versé dans un mélange eau et glace et la phase aqueuse obtenue est extraite trois fois par du dichlorométhane. La phase organique est alors neutralisée avec une solution saturée de NaHCO₃, séchée sur MgSO₄, et évaporée. 3 mL d'éthanol absolu sont additionnés au brut puis le mélange est stocké une nuit au réfrigérateur. Le précipité formé est collecté par filtration puis lavé par de l'éther de pétrole. Après séchage sous vide, 17,4 g (43,8 mmol ; Rdt = 91%) de glucuronide bromé **39** sont isolés sous forme d'un solide beige.

Pf = 107°C

[α]_D²⁰ : +197 (c 1, CHCl₃)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 6,64 (d, 1H, *J* = 4,0 Hz, H₁) ; 5,60 (t, 1H, *J* = 10,0 Hz, H₃) ; 5,20 (t, 1H, *J* = 10,0 Hz, H₄) ; 4,90 (dd, 1H, *J* = 10,0 Hz, *J* = 4,0 Hz, H₂) ; 4,60 (d, 1H, *J* = 10,0 Hz, H₅) ; 3,77 (s, 3H, 3H_{COOMe}) ; 2,11 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 2,09 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 2,07 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 169,9 - 169,2 - 169,1 (3C_{CO} acétate) ; 167,1 (C_{CO} ester) ; 96,5 (C₁) ; 72,5 - 72,0 - 70,8 - 69,2 (C₂, C₃, C₄, C₅) ; 52,8 (C_{COOMe}) ; 20,5 - 20,4 (3C_{CH₃COO}).

Préparation du composé **41**

Solide blanc

Rendement = 75%

9,6 g de 4-hydroxy-3-nitrobenzaldéhyde (59,5 mmol ; 1 éq.) et 21,5 g de glucuronide bromé **39** (54,1 mmol ; 0,9 éq.) sont mis en solution dans 80 mL d'acétonitrile anhydre. 29,8 g d' Ag_2CO_3 (108,2 mmol ; 1,8 éq.) sont ajoutés et l'agitation est maintenue pendant 4 heures à l'abri de la lumière. La solution est alors filtrée sur Célite[®] et le solvant est évaporé. Une purification par flash chromatographie (Eluant : EP/AcOEt 60/40) permet d'isoler 19,5 g (40,4 mmol, Rdt = 75%) d'aldéhyde **41** sous forme d'un solide blanc.

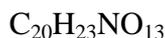
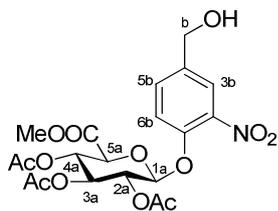
Rf = 0,30 (Eluant : EP/AcOEt 50/50)

Pf = 178°C

 $[\alpha]_D^{20} : +10$ (c 1, CHCl_3)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 10,05 (s, 1H, CHO) ; 8,30 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H_{3b}) ; 8,10 (dd, $J = 9,0$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H_{5b}) ; 7,50 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz, H_{6b}) ; 5,38 (m, 4H, H_{1a} , H_{2a} , H_{3a} , H_{4a}) ; 4,37 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_{5a}) ; 3,72 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{COOCH}_3}$) ; 2,12 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 2,10 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 2,08 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 188,8 (C_{CO} aldéhyde) ; 169,8 - 169,6 - 169,1 (3C_{CO} acétate) ; 166,7 (C_{CO} ester) ; 153,0 (C_{1b}) ; 140,8 (C_{2b}) ; 134,4 (C_{5b}) ; 131,2 (C_{4b}) ; 126,6 (C_{3b}) ; 118,6 (C_{6b}) ; 98,6 (C_{1a}) ; 72,6 - 70,2 - 68,7 - 68,2 (C_{2a} , C_{3a} , C_{4a} , C_{5a}) ; 53,0 ($\text{C}_{\text{COOCH}_3}$) ; 20,6 - 20,5 - 20,4 ($3\text{C}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

Préparation du composé 42

$$M = 485,40 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide blanc

Rendement = quantitatif

2 g (4,14 mmol ; 1 éq.) de benzaldéhyde **41** sont mis en solution dans 30 mL d'un mélange THF/MeOH 1/1. La solution est refroidie à 0°C et 78 mg (2,07 mmol ; 0,5 éq.) de NaBH_4 sont additionnés. L'agitation est maintenue 90 minutes à température ambiante. Le milieu réactionnel est alors hydrolysé par une solution de HCl 0,1 M puis extrait trois fois au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis évaporée. L'alcool benzylique **42** (2,01 g ; 4,14 mmol) est obtenu de manière quantitative sous forme d'un solide blanc.

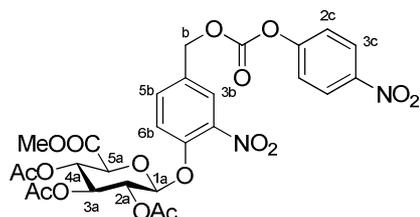
Rf = 0,20 (Eluant : EP/AcOEt 50/50)

Pf = 174°C

$[\alpha]_D^{20}$: +10 (c 1, CHCl_3)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 8,18 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H_{3b}) ; 7,81 (dd, 1H, $J = 9,0$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H_{5b}) ; 7,35 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz, H_{6b}) ; 5,38 – 5,25 (m, 4H, H_{1a} , H_{2a} , H_{3a} , H_{4a}) ; 4,71 (s, 2H, 2H_b) ; 4,21 (d, 1H, $J = 7$ Hz, H_{5a}) ; 3,74 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{COOCH}_3}$) ; 2,95 (sl, 1H, OH) ; 2,10 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 2,08 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 2,06 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 170,0 - 169,6 - 169,3 (3C_{CO} acétate) ; 166,8 (C_{CO} ester) ; 148,2 (C_{1b}) ; 141,5 (C_{2b}) ; 137,5 (C_{4b}) ; 131,9 (C_{3b}) ; 123,2 (C_{5b}) ; 120,4 (C_{6b}) ; 100,0 (C_{1a}) ; 72,7 – 71,3 – 70,0 – 68,9 (C_{2a} , C_{3a} , C_{4a} , C_{5a}) ; 63,5 (C_b) ; 53,0 ($\text{C}_{\text{COOCH}_3}$) ; 20,6 - 20,5 - 20,4 ($3\text{C}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

Préparation du carbonate mixte **43**

$$M = 650,50 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide blanc

Rendement = 86%

4,65 g (9,6 mmol ; 1 éq.) d'alcool benzylique **42** et 5,80 g (28,8 mmol, 3éq.) de chloroformate de *para*-nitrophényle sont solubilisés dans 48 mL de dichlorométhane. La solution est refroidie à 0°C et 2,35 mL (28,5 mmol, 3éq.) de pyridine sont additionnés goutte à goutte. Le mélange est agité 2h à température ambiante puis hydrolysé par une solution saturée de NaHCO₃. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite trois fois avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont séchées sur MgSO₄ puis évaporées. Le brut est purifié par flash chromatographie (Eluant : EP/AcOEt 70/30 ; 50/50). 5,35 g (8,24 mmol ; Rdt = 86%) de carbonate mixte **43** sont isolés sous forme d'un solide blanc.

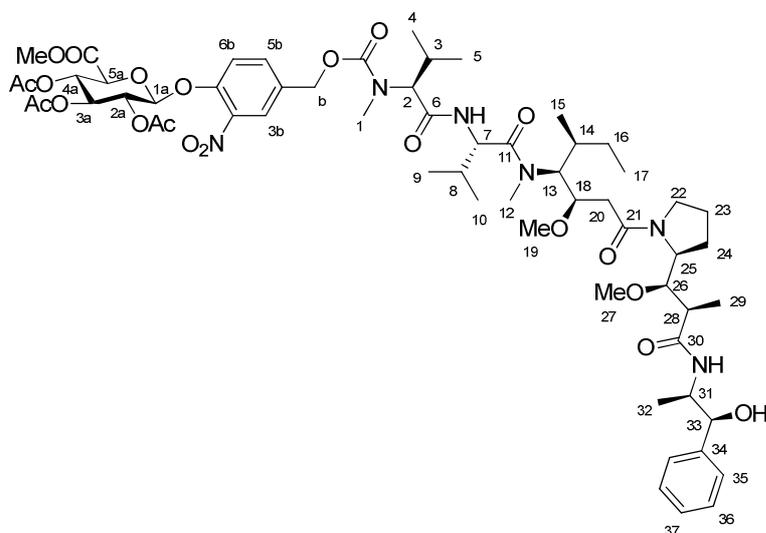
Rf = 0,4 (Eluant : EP/AcOEt 50/50)

Pf = 127°C

[α]_D²⁰ : +12 (c 1, CHCl₃)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 8,19 (m, 3H, H_{3b}, 2H_{3c}) ; 7,81 (dd, 1H, *J* = 9,0 Hz, *J* = 2,0 Hz, H_{5b}) ; 7,35 (d, 1H, *J* = 9,0 Hz, H_{6b}) ; 7,21 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, 2H_{2c}) ; 5,35 - 5,28 (m, 6H, H_{1a}, H_{2a}, H_{3a}, H_{4a}, 2H_b) ; 4,24 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, H_{5a}) ; 3,74 (s, 3H, 3H_{COOCH₃}) ; 2,10 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 2,08 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 2,06 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 169,5 - 169,3 - 168,7 (3C_{CO} acétate) ; 166,8 (C_{CO} ester) ; 155,2 (C_{CO} carbonate) ; 151,8 (C_{1c}) ; 148,2 (C_{1b}) ; 145,2 (C_{4c}) ; 140,0 (C_{2b}) ; 135,4 (C_{5b}) ; 130,3 (C_{4b}) ; 125,4 (2C_{2c}) ; 125,0 (C_{3b}) ; 123,2 (2C_{3c}) ; 116,9 (C_{6b}) ; 99,1 (C_{1a}) ; 72,9 - 71,6 - 70,3 - 69,3 (C_{2a}, C_{3a}, C_{4a}, C_{5a}) ; 66,1 (C_b) ; 53,0 (C_{COOCH₃}) ; 20,6 - 20,5 - 20,3 (3C_{CH₃COO}).

Préparation du composé **44**

$$M = 1229,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide blanc

Rendement = 68%

25 mg (0,0348 mmol ; 1 éq.) de mono-méthyl auristatine E et 23 mg de carbonate activé **43** sont mis en solution dans 1 mL d'un mélange DMF/pyridine 8/2. 4,7 mg (0,0348 mmol ; 1 éq.) de HOBt et 7,3 μL (0,0418 mmol ; 1,2 éq.) de DIPEA sont additionnés. L'agitation est maintenue 16h à température ambiante. Le solvant est éliminé sous vide puis le résidu obtenu est purifié sur plaque de silice préparative (Eluant : DCM/MeOH 97/3). 29 mg (0,0236 mmol ; Rdt = 68%) de composé **44** sont isolés sous forme d'un solide blanc.

Tr = 22,84 min (Méthode C)

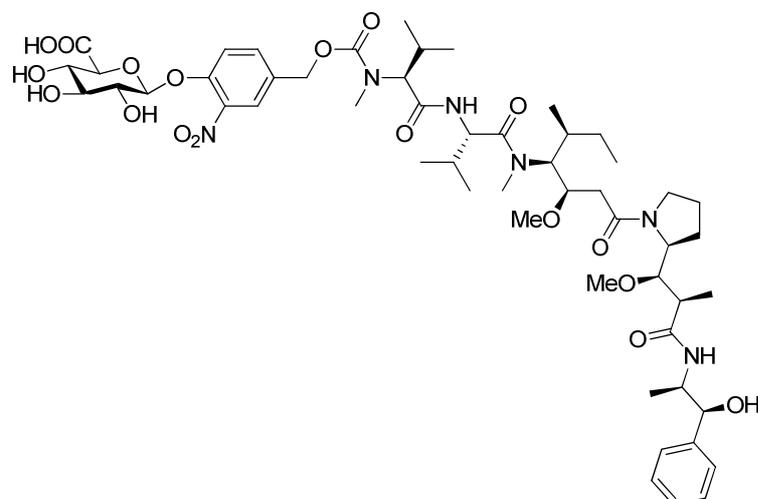
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 7,77 (m, 1H, H_{3b}) ; 7,52 (m, 1H, H_{5b}) ; 7,34 (m, 5H, 2H_{35} , 2H_{36} , H_{37}) ; 7,26 (m, 1H, H_{6b} masqué par le pic de CHCl_3 résiduel) ; 6,58 – 6,44 (m, 1H, H_{NH}) ; 5,35 – 5,11 (m, 6H, 2H_b , H_{1a} , H_{2a} , H_{3a} , H_{4a}) ; 4,94 (m, 1H, H_{33}) ; 4,78 – 4,61 (m, 2H, H_2 , H_{NH}) ; 4,24 – 3,81 (m, 6H, H_{5a} , H_7 , H_{18} , H_{25} , H_{26} , H_{31}) ; 3,73 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{COOCH}_3}$) ; 3,51 (m, 1H, H_{22}) ; 3,41 – 3,30 (m, 7H, H_{13} , 3H_{19} , H_{22} , 3H_{27}) ; 3,10 – 2,74 (m, 6H, 3H_1 , 3H_{12}) ; 2,50 – 2,17 (m, 5H, H_3 , H_8 , 2H_{20} , H_{28}) ; 2,11 – 1,84 (m, 14H, $9\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$, H_{OH} , 2H_{23} , 2H_{24}) ; 1,39 – 1,20 (m, 4H, H_{14} , 3H_{29}) ; 1,02 – 0,73 (m, 23H, 3H_4 , 3H_5 , 3H_9 , 3H_{10} , 3H_{15} , 2H_{16} , 3H_{17} , 3H_{32}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 174,7 (C_{amide}) ; 170,1 - 169,8 - 169,4 (3C_{CO} acétate) ; 166,8 (C_{CO} ester) ; 156,9 (C_{CO} carbamate) ; 148,8 - 141,3 - 133,4 - 133,2 - 128,4 - 128,2 - 127,4 - 126,4 - 124,5 - 120,2 (C_{1b} , C_{2b} , C_{3b} , C_{4b} , C_{5b} , C_{6b} , C_{34} , 2C_{35} , 2C_{36} , C_{37}) ; 99,9 (C_{1a}) ; 82,1 (C_{26}) ; 78,6 (C_{18}) ; 75,9 (C_{33}) ; 72,7 (C_{5a}) ; 71,2 ($\text{C}_{\text{sucré}}$) ; 70,3 (C_b) ; 68,8 - 65,7 ($2\text{C}_{\text{sucré}}$) ; 65,4 (C_7) ; 61,0 (C_{OCH_3}) ; 60,2 (C_{25}) ; 58,1 (C_{OCH_3}) ; 54,0 (C_2) ; 53,6 (C_{13}) ; 53,2 ($\text{C}_{\text{COOCH}_3}$) ; 51,7

(C₃₁) ; 47,9 (C₂₂) ; 45,0 (C₂₈) ; 37,8 (C₂₀) ; 33,5 (C₁₄) ; 32,0 (C_{NCH3}) ; 31,1 (C₁₆) ; 29,5 (C_{NCH3}) ; 26,3 – 25,9 (C₃, C₈) ; 25,1 – 25,0 (C₂₃, C₂₄) ; 20,7 – 20,6 (3C_{CH3COO}) ; 19,4 (C₁₅) ; 18,7 (C₄) ; 17,7 (C₅) ; 16,1 (C₉) ; 14,5 (C₁₀) ; 14,2 – 14,0 (C₂₉, C₃₂) ; 11,0 (C₁₇).

SMHR (ESI) : C₆₀H₈₈N₆O₂₁Na [M+Na]⁺ m/z théorique : 1251,58947 m/z trouvé : 1251,5903 ; C₆₀H₈₈N₆O₂₁K [M+K]⁺ m/z théorique : 1267,56341 m/z trouvé : 1267,5667.

Préparation du vecteur glucuronylé de la MMAE **34**



$C_{53}H_{80}N_6O_{18}$

$M = 1089,23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Solide blanc

Rendement = 78%

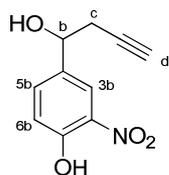
29 mg (0,0236 mmol ; 1 éq.) de composé **44** sont mis en solution dans 1,60 mL de méthanol. Une solution de 8,7 mg (0,2077 mmol ; 8,8 éq.) de $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ dans 1,60 mL d'eau est additionnée lentement à 0°C. Après 15 minutes d'agitation, le milieu est neutralisé par ajout de résine acide IRC50. Le mélange est alors filtré puis évaporé sous vide. Le résidu obtenu est purifié par HPLC semi-préparative (Méthode 1) 20 mg (0,0184 mmol ; Rdt = 78%) de vecteur glucuronylé **34** sont isolés sous forme de solide blanc avec une pureté supérieure à 95%.

Tr = 15,93 min (Méthode C)

RMN ^1H (400 MHz, DMSO, δ ppm) : En cours.

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO, δ ppm) : En cours.

SMHR (ESI) : $C_{53}H_{79}N_6O_{18}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z théorique : 1087,54564 m/z trouvé : 1087,5444.

Préparation du 4-(1-hydroxybut-3-ynyl)-2-nitrophénol **51**

$$M = 207,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Huile jaune

Rendement = 94%

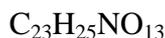
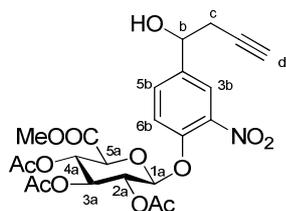
Dans un tricol de 250 mL équipé d'un réfrigérant et d'une ampoule d'addition, 648 mg (24 mmol ; 6,25 éq.) d'aluminium et une quantité catalytique de HgCl_2 sont recouverts par 10 mL de THF anhydre. 2,6 mL (24 mmol ; 6,25 éq.) d'une solution de bromure de propargyle à 80% dans le toluène sont ajoutés goutte à goutte. La réaction démarre lorsqu'un dégagement de chaleur et le noircissement de la solution sont observés. Lorsque l'addition est finie, le mélange est chauffé à reflux pendant 6 heures. La solution est refroidie à 0°C et une solution de 650 mg (3,84 mmol ; 1 éq.) de 4-hydroxy-3-nitro-benzaldéhyde dans 5 mL de THF anhydre est additionnée goutte à goutte. Après 30 minutes d'agitation, l'aldéhyde a totalement disparu et la réaction est hydrolysée avec 10 mL d'une solution de HCl 1N puis extraite trois fois avec de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis évaporée pour conduire à une huile marron qui est purifiée par flash chromatographie (Eluant : EP/AcOEt 70/30). On obtient alors le composé **51** sous forme d'huile jaune contaminé par des traces de produits issus de la réaction de Wurtz. Une extraction basique permet d'éliminer ces impuretés. Pour cela, l'huile est solubilisée dans 30 mL de dichlorométhane. La phase organique est extraite trois fois avec une solution de NaOH 1N. La phase aqueuse obtenue est acidifiée avec une solution de HCl concentrée puis extraite trois fois avec du chloroforme pour conduire, après évaporation, au phénol **51** (754 mg ; 3,6 mmol) sous forme d'huile marron avec un rendement de 94%.

Rf = 0,56 (Eluant : EP/AcOEt 60/40)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 10,48 (sl, 1H, $\text{H}_{\text{phénol}}$) ; 8,07 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, H_{3b}) ; 7,59 (dd, 1H, $J = 8,7$ Hz, $J = 2,2$ Hz, H_{5b}) ; 7,09 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, H_{6b}) ; 4,81 (t, 1H, $J = 6,2$ Hz, H_b) ; 3,25 (sl, 1H, H_{alcool}) ; 2,58 (dd, 2H, $J = 6,3$ Hz, $J = 2,6$ Hz, 2H_c) ; 2,05 (d, 1H, $J = 2,6$ Hz, H_d).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 154,6 (C_{1b}) ; 135,1 (C_{2b}) ; 133,2 (C_{3b}) ; 132,9 (C_{4b}) ; 122,3 - 120,5 (C_{5b} , C_{6b}) ; 79,7 (C_{alcyne}) ; 72,1 (C_d) ; 70,9 (C_b) ; 30,0 (C_c).

SMHR (ESI) : $C_{10}H_9NO_4Na$ $[M+Na]^+$ m/z théorique : 230,04293 m/z trouvé : 230,0433.

Préparation du composé **52**

$$M = 523,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide blanc

Rendement = 66%

33,7 g (122,25 mmol ; 3,7 éq.) de Ag_2CO_3 sont mis en suspension dans 33 mL d'acétonitrile et 6,3 mL (23,12 mmol ; 0,7 éq.) de HMTTA sont additionnés. Le mélange est laissé sous agitation à l'abri de la lumière pendant 2h. 4,56 g (22,03 mmol ; 1 éq.) d'espaceur **51** et 13,10 g (33,04 mmol ; 1,5 éq.) de glucuronide bromé **39** sont additionnés en solution dans 20 mL d'acétonitrile. Le mélange est laissé sous agitation pendant 4h puis de l'eau est ajoutée. Cette phase aqueuse est extraite trois fois à l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée trois fois avec une solution de HCl 1M, séchée sur MgSO_4 et évaporée. Une purification par flash chromatographie du brut réactionnel (Eluant EP/AcOEt 60/40 ; 50/50 ; 40/60) permet d'obtenir 7,62 g (14,56 mmol ; Rdt = 66%) du glucuronide **52** sous forme d'un solide blanc (2 diastéréoisomères).

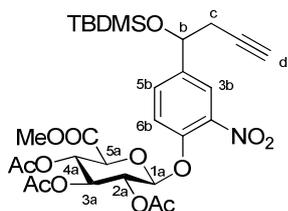
Rf = 0,56 (EP/AcOEt 50/50)

Pf = 67°C

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 7,87 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, H_{3b}) ; 7,60 (m, 1H, H_{5b}) ; 7,34 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H_{6b}) ; 5,32 - 5,25 (m, 4H, H_{1a} , H_{2a} , H_{3a} , H_{4a}) ; 4,92 (m, 1H, H_b) ; 4,28 (d, 1H, $J = 9$ Hz, H_{5a}) ; 3,74 (s, 3H, 3H_{COOMe}) ; 3,38 (sl, 1H, H_{OH}) ; 2,62 (m, 2H, 2H_c) ; 2,10 (s, 4H, H_d , $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 2,04 (s, 6H, $6\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 170,1 - 169,5 (3C_{CO} acétate) ; 166,8 (C_{CO} ester) ; 148,0 (C_{1b}) ; 140,7 (C_{2b}) ; 139,1 (C_{4b}) ; 131,5 (C_{5b}) ; 122,7 (C_{3b}) ; 119,4 (C_{6b}) ; 99,5 (C_{1a}) ; 79,8 (C_{alcyne}) ; 72,3 - 71,8 - 71,1 - 70,6 - 70,1 - 68,7 (C_{2a} , C_{3a} , C_{4a} , C_{5a} , C_b , C_d) ; 53,1 (C_{COOMe}) ; 29,2 (C_c) ; 20,5 ($3\text{C}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

SMHR (ESI) : $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_{13}\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ m/z théorique : 546,1224 m/z trouvé : 546,1228 ; $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_{13}\text{K}$ [$\text{M}+\text{K}$] $^+$ m/z théorique : 562,0963 m/z trouvé : 562,0997.

Préparation du composé **53**

$$\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{NO}_{13}\text{Si}$$

$$M = 637,70 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide beige

Rendement = 91%

2,4 g (35,2 mmol ; 2 éq.) d'imidazole et 5,3 g (35,2 mmol ; 2 éq.) de TBDMSCl sont mis en solution dans 4 mL de DMF. Après 30 minutes d'agitation, une solution de 9,23 g (17,6 mmol ; 1 éq.) de glucuronide **52** dans 14 mL de DMF est ajoutée. Après 20 heures d'agitation à température ambiante, on additionne 100 mL d'eau et le mélange est extrait trois fois avec du dichlorométhane. Les phases organiques résultantes sont séchées sur MgSO_4 puis évaporées. Une flash chromatographie du brut réactionnel (Eluant : DCM/EP 50/50) permet d'isoler 10,32 g (16,2 mmol ; Rdt = 91%) de composé **53** sous forme d'un solide beige (2 diastéréoisomères).

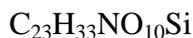
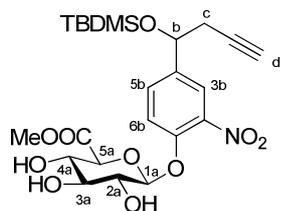
Pf = 59°C

Rf = 0,60 (EP/AcOEt 60/40)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 7,84 (d, 0,5H, $J = 2,1$ Hz, H_{3b}) ; 7,80 (d, 0,5H, $J = 2,1$ Hz, H_{3b}) ; 7,55 (m, 1H, H_{5b}) ; 7,33 (2d, 1H, $J = 8,7$ Hz, H_{6b}) ; 5,34 (m, 3H, H_{2a} , H_{3a} , H_{4a}) ; 5,21 (m, 1H, H_{1a}) ; 4,82 (t, 1H, $J = 7,0$ Hz, H_b) ; 4,22 (m, 1H, H_{5a}) ; 3,74 (s, 3H, 3H_{COOMe}) ; 2,62 - 2,42 (m, 2H, 2H_c) ; 2,13 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 2,06 (s, 6H, $6\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 1,99 (s, 1H, H_d) ; 0,89 (2s, 9H, 9H_{TBDMS}) ; 0,09 (2s, 3H, 3H_{TBDMS}) ; -0,04 (s, 3H, 3H_{TBDMS}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 170,2 - 169,5 - 169,4 (3C_{CO} acétate) ; 166,9 (C_{CO} ester) ; 148,4 (C_{1b}) ; 141,0 (C_{2b}) ; 140,4 et 140,3 (C_{4b}) ; 131,4 et 131,3 (C_{5b}) ; 122,8 (C_{3b}) ; 119,9 et 119,4 (C_{6b}) ; 100,0 et 99,9 (C_{1a}) ; 80,3 (C_{alcyne}) ; 72,7 (C_{5a}) ; 72,2 (C_b) ; 72,1 (C_d) ; 71,3 - 70,3 - 68,9 (C_{2a} , C_{3a} , C_{4a}) ; 53,2 (C_{COOMe}) ; 30,9 (C_c) ; 25,8 (3C_{TBDMS}) ; 20,7 ($3\text{C}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 18,3 (C_{TBDMS}) ; -4,6 (C_{TBDMS}) ; -4,8 (C_{TBDMS}).

SMHR (ESI) : $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{NO}_{13}\text{SiNa}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ m/z théorique : 660,20829 m/z trouvé : 660,2083 ; $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{NO}_{13}\text{SiK}$ [$\text{M}+\text{K}$] $^+$ m/z théorique : 676,18223 m/z trouvé : 676,1819.

Préparation du composé **54**

$$M = 511,59 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide beige

Rendement = 72%

2,6 g (4,08 mmol ; 1 éq.) de glucuronide **53** sont solubilisés dans 144 mL d'un mélange THF/MeOH 1/2. Cette solution est refroidie à 0°C et 220 mg (4,08 mmol ; 1 éq.) de méthanolate de sodium sont ajoutés. Deux ajouts de 110 mg (2,04 mmol ; 0,5 éq.) de méthanolate de sodium sont réalisés après 1h puis 2h d'agitation. Après 3h d'agitation à 0°C, le mélange est hydrolysé par de la résine acide IRC-50, filtré sur coton et évaporé. Le brut obtenu est purifié par flash chromatographie (Eluant : DCM/MeOH 99/1 ; 98/2 ; 97/3) et 1,51 g (2,95 mmol ; Rdt = 72%) de produit **54** sont isolés sous forme d'un solide blanc (2 diastéréoisomères).

Pf = 63°C

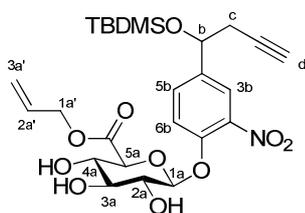
Rf = 0,33 (DCM/MeOH 95/5)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,90 (d, 0,5H, *J* = 2,1 Hz, H_{3b}) ; 7,88 (d, 0,5H, *J* = 2,1 Hz, H_{3b}) ; 7,59 (dd, 1H, *J* = 2,1 Hz, *J* = 8,7 Hz, H_{5b}) ; 7,34 (2d, 1H, *J* = 8,7 Hz, H_{6b}) ; 5,01 (2d, 1H, *J* = 7,3 Hz, H_{1a}) ; 4,81 (2t, 1H, *J* = 6,3 Hz, H_b) ; 4,10 (2d, 1H, *J* = 9,7 Hz, H_{5a}) ; 3,94 (t, 1H, *J* = 9,7 Hz, H_{4a}) ; 3,85 - 3,76 (m, 5H, H_{2a}, H_{3a}, 3H_{COOCH3}) ; 2,62 - 2,42 (m, 2H, 2H_c) ; 1,98 (m, 1H, H_d) ; 0,89 (2s, 9H, 9H_{TBDMS}) ; 0,09 (2s, 3H, 3H_{TBDMS}) ; -0,05 (2s, 3H, 3H_{TBDMS}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 169,1 (C_{CO ester}) ; 149,7 et 149,6 (C_{1b}) ; 140,0 (C_{2b}) ; 139,8 et 139,7 (C_{4b}) ; 132,2 et 132,1 (C_{5b}) ; 123,3 (C_{3b}) ; 118,6 et 118,3 (C_{6b}) ; 102,9 et 102,8 (C_{1a}) ; 80,4 (C_{alcyne}) ; 75,0 (C_{sucre}) ; 74,7 (C_{5a}) ; 73,0 (C_{sucre}) ; 72,2 et 72,1 (C_b) ; 71,3 (C_{sucre}) ; 71,0 (C_d) ; 53,2 (C_{COOMe}) ; 30,8 (C_c) ; 25,8 (3C_{TBDMS}) ; 18,3 (C_{TBDMS}) ; -4,6 (C_{TBDMS}) ; -4,8 (C_{TBDMS}).

SMHR (ESI) : C₂₃H₃₃NO₁₀SiNa [M+Na]⁺ m/z théorique : 534,17659 m/z trouvé : 534,1766 ; C₂₃H₃₃NO₁₀SiK [M+K]⁺ m/z théorique : 550,15053 m/z trouvé : 550,1503.

Préparation du composé 55



$C_{25}H_{35}NO_{10}Si$
 $M = 537,20 \text{ g.mol}^{-1}$
 Solide beige
 Rendement + 97%

390 mg (0,76 mmol ; 1 éq.) de glucuronide **54** sont dissouts dans 12 mL d'alcool allylique. 1,15 mL (0,145 mmol ; 0,2 éq.) d'une solution d'allylate de sodium dans l'alcool allylique ($0,126 \text{ mol.L}^{-1}$) sont additionnés à température ambiante et l'agitation est maintenue 40 minutes jusqu'à disparition complète du produit de départ. Le mélange est neutralisé par de la résine acide IRC-50, filtré sur coton et évaporé. Une purification par flash chromatographie (Eluant : DCM/MeOH 98/2) permet d'isoler 399 mg (0,74 mmol ; Rdt = 97%) du produit de transestérification **55** sous forme d'un solide beige (2 diastéréoisomères).

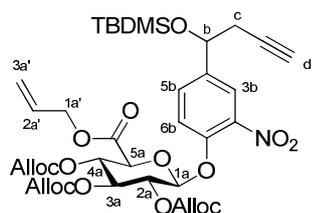
Pf = 56°C

Rf = 0,75 (DCM/MeOH 95/5)

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 7,93 (d, 0,5H, $J = 2,1 \text{ Hz}$, H_{3b}) ; 7,90 (d, 0,5H, $J = 2,1 \text{ Hz}$, H_{3b}) ; 7,60 (m, 1H, H_{5b}) ; 7,38 (2d, 1H, $J = 8,6 \text{ Hz}$, H_{6b}) ; 5,97 (m, 1H ; $H_{2a'}$) ; 5,38 (m, 1H, $H_{3a'}$) ; 5,30 (m, 1H, $H_{3a'}$) ; 4,96 (d, 1H, $J = 6,8 \text{ Hz}$, H_{1a}) ; 4,83 (t, 1H , $J = 6,4 \text{ Hz}$, H_b) ; 4,75 (m, 2H, $2H_{1a}$) ; 4,07 (2d, 1H, $J = 9,6 \text{ Hz}$, H_{5a}) ; 3,95 (m, 1H, H_{4a}) ; 3,81 - 3,50 (m, 2H, H_{2a} , H_{3a}) ; 2,60 - 2,49 (m, 2H, $2H_c$) ; 1,99 (2t, 1H, $J = 2,6 \text{ Hz}$, H_d) ; 0,89 (2s, 9H, $9H_{TBDMS}$) ; 0,10 (2s, 3H, $3H_{TBDMS}$) ; -0,04 (2s, 3H, $3H_{TBDMS}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 168,3 ($C_{CO \text{ ester}}$) ; 149,6 (C_{1b}) ; 140,0 (C_{2b} , C_{4b}) ; 132,1 (C_{5b}) ; 131,0 ($C_{2a'}$) ; 123,3 (C_{3b}) ; 119,5 ($C_{3a'}$) ; 119,0 et 118,8 (C_{6b}) ; 103,2 (C_{1a}) ; 80,3 (C_{alcyne}) ; 74,9 (C_{sucre}) ; 74,6 (C_{5a}) ; 73,0 (C_{sucre}) ; 72,2 (C_b) ; 71,3 (C_{sucre}) ; 70,9 (C_d) ; 66,7 ($C_{1a'}$) ; 30,9 (C_c) ; 25,8 ($3C_{TBDMS}$) ; 18,3 (C_{TBDMS}) ; -4,7 (C_{TBDMS}) ; -4,8 (C_{TBDMS}).

SMHR (ESI) : $C_{25}H_{35}NO_{10}SiNa$ [$M+Na$] $^+$ m/z théorique : 560,19224 m/z trouvé : 560,1922 ; $C_{25}H_{35}NO_{10}SiK$ [$M+K$] $^+$ m/z théorique : 576,16618 m/z trouvé : 576,1664.

Préparation du composé **56**

$$M = 789,85 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Huile jaune pâle

Rendement + 94%

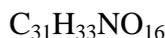
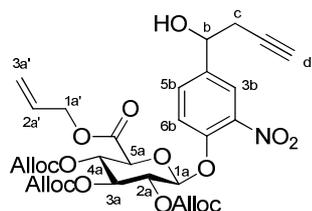
1,3 g (2,42 mmol ; 1 éq) de glucuronide **55** sont mis en solution dans 12 mL de pyridine anhydre. La solution est refroidie à 0°C et 7,7 mL (72,54 mmol ; 30 éq.) de chloroformiate d'allyle sont ajoutés goutte à goutte. L'agitation est maintenue trois jours à température ambiante. 40 mL d'une solution de HCl 1M sont alors ajoutés et le mélange est extrait trois fois par de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont réunies, séchées sur MgSO₄ et évaporées. Une chromatographie flash du brut réactionnel (Eluant : EP/AcOEt 80/20) permet d'obtenir 1,80 g (2,28 mmol ; Rdt = 94%) de produit **56** sous forme d'huile jaune pâle visqueuse (2 diastéréoisomères).

Rf = 0,84 (EP/AcOEt 60/40)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,86 (d, 0,5H, *J* = 2,1 Hz, H_{3b}) ; 7,84 (d, 0,5H, *J* = 2,1 Hz, H_{3b}) ; 7,55 (m, 1H, H_{5b}) ; 7,31 (2d, 1H, *J* = 8,5 Hz, H_{6b}) ; 6,00-5,82 (m, 4H, 4H_{2a'}) ; 5,40-5,24 (m, 12H, H_{1a}, H_{2a}, H_{3a}, H_{4a}, 8H_{3a'}) ; 4,81 (2t, 1H, *J* = 6,5 Hz, H_b) ; 4,73 (m, 2H, 2H_{1a'}) ; 4,70-4,59 (m, 6H, 6H_{1a'}) ; 4,32 (m, 1H, H_{5a}) ; 2,61-2,41 (m, 2H, 2H_c) ; 1,98 (2t, 1H, *J* = 2,6Hz, H_d) ; 0,89 (2s, 9H, 9H_{TBDMS}) ; 0,09 (2s, 3H, 3H_{TBDMS}) ; -0,05 (s, 3H, 3H_{TBDMS}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 165,7 (C_{CO} ester) ; 154,0 - 153,5 (3C_{CO} carbonate) ; 148,5 et 148,4 (C_{1b}) ; 140,7 et 140,6 (C_{2b}) 140,2 et 140,1 (C_{4b}) ; 131,4 (C_{5b}) ; 131,3 - 131,1 - 131,0 - 130,9 (4C_{2a'}) ; 123,0 (C_{3b}) ; 119,4 - 119,3 - 119,1 - 119,0 (4C_{3a'}) ; 118,7 (C_{6b}) ; 99,8 (C_{1a}) ; 80,3 (C_{alcyne}) ; 75,1 - 74,0 - 72,5 (3C_{sucré}) ; 72,3 (C_{5a}) ; 72,1 et 72,0 (C_b) ; 71,2 (C_d) ; 69,6 - 69,3 - 69,2 - 67,0 (4C_{1a'}) ; 30,8 (C_c) ; 25,8 (3C_{TBDMS}) ; 18,2 (C_{TBDMS}) ; -4,7 (C_{TBDMS}) ; -4,8 (C_{TBDMS}).

SMHR (ESI) : C₃₇H₄₇NO₁₆SiNa [M+Na]⁺ m/z théorique : 812,25563 m/z trouvé : 812,2556 ; C₃₇H₄₇NO₁₆SiK [M+K]⁺ m/z théorique : 828,22957 m/z trouvé : 828,2293

Préparation du composé 57

$$M = 675,59 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide blanc

Rendement = 85%

370 mg (0,47 mmol ; 1 éq.) de composé **56** sont mis en solution dans 5,7 mL de THF anhydre et 1,8 mL de HF/pyridine 70% sont ajoutés goutte à goutte. Après une heure d'agitation, le produit de départ a totalement disparu et le milieu réactionnel est doucement versé sur 100 mL d'une solution saturée de NaHCO_3 à 0°C. Le mélange est extrait trois fois par de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont séchées sur MgSO_4 et évaporées. Une flash chromatographie du brut réactionnel (Eluant : EP/AcOEt 70/30) permet d'obtenir 272 mg (0,40 mmol ; Rdt = 85%) de glucuronide **57** sous forme d'un solide blanc.

Pf = 62°C

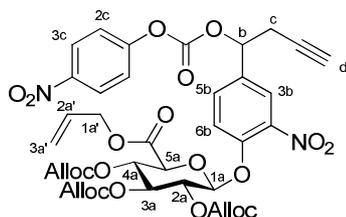
Rf = 0,62 (EP/AcOEt 60/40)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 7,89 (d, 0,5H, $J = 2,1$ Hz, H_{3b}) ; 7,87 (d, 0,5H, $J = 2,1$ Hz, H_{3b}) ; 7,57 (m, 1H, H_{5b}) ; 7,34 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H_{6b}) ; 6,00–5,81 (m, 4H, $4\text{H}_{2a'}$) ; 5,39–5,22 (m, 12H, H_{1a} , H_{2a} , H_{3a} , H_{4a} , $8\text{H}_{3a'}$) ; 4,90 (t, 1H, $J = 6,2$ Hz, H_b) ; 4,72 (m, 2H, $2\text{H}_{1a'}$) ; 4,69–4,59 (m, 6H, $6\text{H}_{1a'}$) ; 4,32 (d, 1H, $J = 9,1$ Hz, H_{5a}) ; 2,63 (m, 2H, 2H_c) ; 2,51 (sl, 1H, H_{OH}) ; 2,10 (t, 1H, $J = 2,6$ Hz, H_d).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 165,7 ($\text{C}_{\text{CO ester}}$) ; 154,1 - 153,6 ($3\text{C}_{\text{CO carbonate}}$) ; 148,7 (C_{1b}) ; 141,0 et 140,9 (C_{2b}) ; 138,8 (C_{4b}) ; 131,4 (C_{5b}) ; 131,3 - 131,2 - 131,1 - 131,0 ($4\text{C}_{2a'}$) ; 123,0 et 122,9 (C_{3b}) ; 119,5 - 119,4 - 119,3 ($4\text{C}_{3a'}$) ; 119,2 (C_{6b}) ; 99,8 (C_{1a}) ; 79,5 (C_{alcyne}) ; 75,0 - 74,0 - 72,5 ($3\text{C}_{\text{sucré}}$) ; 72,4 (C_b) ; 72,1 (C_{5a}) ; 70,8 (C_d) ; 69,7 - 69,4 - 69,3 - 67,0 ($4\text{C}_{1a'}$) ; 29,6 (C_c).

SMHR (ESI) : $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{NO}_{16}\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ m/z théorique : 698,16915 m/z trouvé : 698,1692;

$\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{NO}_{16}\text{K}$ [$\text{M}+\text{K}$] $^+$ m/z théorique : 714,14309 m/z trouvé : 714,1430

Préparation du composé **58**

$$M = 840,69 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide blanc

Rendement = 92%

262 mg (0,38 mmol ; 1 éq.) d'alcool benzylique **57** sont dissouts dans 4 mL de dichlorométhane anhydre. 198 mg (0,77 mmol ; 2 éq.) de chloroformiate de *para*-nitrophénol et 77 μL (0,96 mmol ; 2,5 éq.) de pyridine sont additionnés à température ambiante. Après deux heures d'agitation, le produit de départ est entièrement consommé et le milieu est hydrolysé par ajout d'une solution saturée de NaHCO_3 . Le mélange est extrait trois fois avec du dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO_4 et évaporée. Le brut obtenu est purifié par flash chromatographie (Eluant : EP/AcOEt 70/30) pour donner 293 mg (0,35 mmol ; Rdt = 92%) de carbonate **58** sous forme d'un solide blanc.

Pf = 53°C

Rf = 0,79 (EP/AcOEt 60/40)

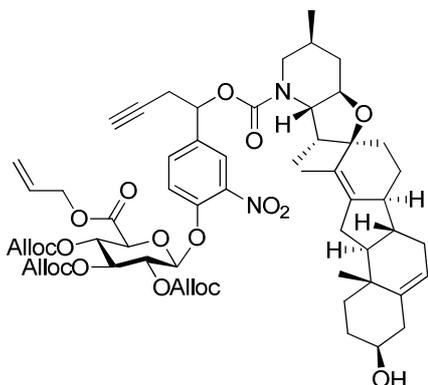
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 8,27 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, 2H_{3c}) ; 7,95 (d, 1H, $J = 2,2$ Hz, H_{3b}) ; 7,63 (dd, 1H, $J = 2,2$ Hz, $J = 8,6$ Hz, H_{5b}) ; 7,38 (m, 3H, H_{6b} , 2H_{2c}) ; 6,00 - 5,83 (m, 4H, $4\text{H}_{2a'}$) ; 5,80 (t, 1H, $J = 6,6$ Hz, H_b) ; 5,39 - 5,24 (m, 12H, H_{1a} , H_{2a} , H_{3a} , H_{4a} , $8\text{H}_{3a'}$) ; 4,72 (d, 2H, $J = 5,8$ Hz, $2\text{H}_{1a'}$) ; 4,69 (m, 6H, $6\text{H}_{1a'}$) ; 4,35 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H_{5a}) ; 2,97 - 2,82 (m, 2H, 2H_c) ; 2,09 (t, 1H, $J = 2,6$ Hz, H_d).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 165,5 ($\text{C}_{\text{CO ester}}$) ; 155,2 - 154,0 - 153,5 ($4\text{C}_{\text{CO carbonate}}$) ; 151,6 (C_{1c}) ; 149,6 (C_{1b}) ; 145,6 (C_{4c}) ; 140,7 (C_{2b}) ; 133,4 (C_{4b}) ; 132,5 (C_{5b}) ; 131,2 - 131,1 - 131,0 - 130,9 ($4\text{C}_{2a'}$) ; 125,4 (2C_{2c}) ; 123,9 (C_{3b}) ; 121,8 (2C_{3c}) ; 119,5 (C_{6b}) ; 119,4 - 119,1 - 119,0 ($4\text{C}_{3a'}$) ; 99,3 (C_{1a}) ; 77,6 (C_{alcyne}) ; 77,2 (C_b) ; 74,9 - 73,9 ($2\text{C}_{\text{sucré}}$) ; 72,5 (C_d) ; 72,3 ($\text{C}_{\text{sucré}}$) ; 72,2 (C_{5a}) ; 69,6 - 69,4 - 69,2 - 67,0 ($4\text{C}_{1a'}$) ; 26,2 (C_c).

SMHR (ESI) : $\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{20}\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ m/z théorique : 863,17536 m/z trouvé : 863,1755 ;

$\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{20}\text{K}$ [$\text{M}+\text{K}$] $^+$ m/z théorique : 879,1493 m/z trouvé : 879,1478

Préparation du composé 59



$C_{59}H_{72}N_2O_{19}$

$M = 1113,20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Solide blanc

Rendement = 85%

410 mg (0,48 mmol ; 1 éq.) de carbonate activé **58** et 200 mg (0,48 mmol ; 1 éq.) de cyclopatamine sont mis en solution dans 5,6 mL de DMF. 60 μL (0,72 mmol ; 1,5 éq.) de pyridine sont additionnés goutte à goutte et l'agitation est maintenue 20 h à température ambiante. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite et une purification par flash chromatographie (Eluant : DCM/MeOH 98/2) permet d'obtenir 460 mg (0,41 mmol ; Rdt = 85%) de glucuronide **59** sous forme d'un solide blanc (2 diastéréoisomères).

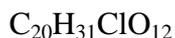
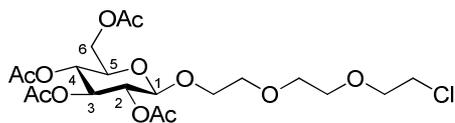
Pf = 121°C

Rf = 0,77 (DCM/MeOH 98/2)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 7,88 (m, 1H) ; 7,56 (m, 1H) ; 7,35 (m, 1H) ; 5,91 (m, 5H) ; 5,37 (m, 14H) ; 4,72 (m, 8H) ; 4,33 (m, 1H) ; 3,57 (m, 2H) ; 3,27 (m, 1H) ; 3,06 (m, 1H) ; 2,89 (m, 1H) ; 2,76 (m, 1H) ; 2,45 - 1,50 (m, 21H) ; 1,45 - 0,95 (m, 14H).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 165,62 ; 165,58 ; 156,3 ; 153,9 ; 153,5 ; 149,1 ; 148,8 ; 143,4 ; 141,6 ; 140,8 ; 135,7 ; 131,2 ; 131,0 ; 130,9 ; 130,8 ; 126,3 ; 123,5 ; 122,6 ; 121,8 ; 119,5 ; 119,4 ; 119,32 ; 119,30 ; 119,2 ; 119,0 ; 99,6 ; 85,1 ; 78,5 ; 74,9 ; 73,8 ; 72,9 ; 72,3 ; 71,9 ; 71,8 ; 69,6 ; 69,5 ; 69,3 ; 69,2 ; 66,9 ; 63,1 ; 60,4 ; 59,6 ; 52,0 ; 49,2 ; 41,9 ; 41,8 ; 41,5 ; 38,3 ; 38,1 ; 37,0 ; 36,5 ; 32,6 ; 31,4 ; 31,1 ; 29,0 ; 26,4 ; 25,3 ; 24,6 ; 21,1 ; 20,6 ; 19,3 ; 18,7 ; 17,5 ; 14,2 ; 13,5 ; 10,5.

SMHR (ESI) : **SMHR (ESI) :** $C_{59}H_{72}N_2O_{19}Na$ $[M+Na]^+$ m/z théorique : 1135,46215 m/z trouvé : 1135,4625.

Préparation du composé **60**

$$M = 498,91 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Huile incolore

Rendement = 56%

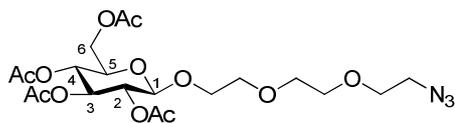
1,67 g (4,28 mmol ; 1 éq.) de pentaacétate de β -D-glucose et 930 μL (6,4 mmol ; 1,5 éq.) de 2-[2-(2-chloroéthoxy)-éthoxy]éthanol sont mis en solution dans 20 mL de dichlorométhane anhydre. 2,7 mL de $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ sont additionnés et la solution est agitée pendant 18h à température ambiante. La réaction est hydrolysée par ajout d'une solution saturée de NaHCO_3 . La phase aqueuse est extraite trois fois avec du dichlorométhane et les phases organiques sont séchées sur MgSO_4 et évaporées. Le brut obtenu est purifié par flash chromatographie (Eluant : EP/AcOEt 50/50 ; 40/60). 1,2 g (2,4 mmol ; 56%) de composé **60** sont isolés sous forme d'une huile incolore.

Rf = 0,35 (EP/AcOEt 50/50)

$[\alpha]_D^{20}$: -8 (c 0,1, MeOH)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 5,21 (t, 1H, $J = 9,4$ Hz, H_3) ; 5,07 (t, 1H, $J = 6,3$ Hz, H_4) ; 4,98 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_2) ; 4,64 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_1) ; 4,27 (dd, 1H, $J = 12,3$ Hz, $J = 4,7$ Hz, H_6) ; 4,13 (dd, 1H, $J = 12,2$ Hz, $J = 2,3$ Hz, H_6) ; 3,95 (td, 1H, $J = 11,0$ Hz, $J = 3,8$ Hz, H_5) ; 3,80 - 3,63 (m, 12H, $12\text{H}_{\text{CH}_2\text{PEG}}$) ; 2,10 - 2,06 - 2,04 - 2,02 (4s, 12H, $12\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 170,6 - 170,1 - 169,5 - 169,4 (C_{CO} acétate) ; 100,7 (C_1) ; 73,0 (C_3) ; 71,7 (C_2) ; 71,2 (C_4 , C_{CH_2}) ; 70,6 (C_{CH_2}) ; 70,4 (C_5) ; 69,0 (C_{CH_2}) ; 68,4 (C_6 , C_{CH_2}) ; 61,9 - 42,8 (2C_{CH_2}) ; 20,6 ($4\text{C}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

Préparation du composé 61

Huile jaune

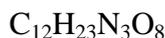
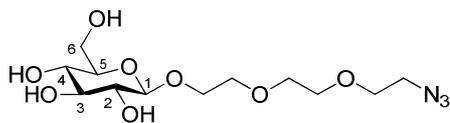
Rendement = quantitatif

1,2 g (2,4 mmol ; 1 éq.) de glycoside **60**, 760 mg (11,7 mmol ; 5 éq.) de NaN_3 et 1,72 g (4,66 mmol ; 2 éq.) de TBAI sont mis en solution dans 7 mL de DMF. La solution est portée à 80°C pendant une nuit puis refroidie à température ambiante et diluée avec 50 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur MgSO_4 et évaporée. Une purification du brut par flash chromatographie (Eluant : EP/AcOEt 50/50 ; 40/60) permet d'isoler 1,2 g (2,4 mmol ; Rdt = quantitatif) d'azoture **61** sous forme d'huile jaune.

$[\alpha]_D^{20}$: -6 (c 0,1, MeOH)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 5,21 (t, 1H, $J = 9,4$ Hz, H_3) ; 5,07 (t, 1H, $J = 6,3$ Hz, H_4) ; 4,98 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_2) ; 4,64 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H_1) ; 4,27 (dd, 1H, $J = 12,3$ Hz, $J = 4,7$ Hz, H_6) ; 4,13 (dd, 1H, $J = 12,2$ Hz, $J = 2,3$ Hz, H_6) ; 3,95 (td, 1H, $J = 11,0$ Hz, $J = 3,8$ Hz, H_5) ; 3,80 - 3,63 (m, 10H, $10\text{H}_{\text{CH}_2 \text{ PEG}}$) ; 3,39 (t, 2H, $J = 6,8$ Hz, $2\text{H}_{\text{CH}_2\text{N}_3}$) 2,08 - 2,04 - 2,01 - 1,99 (4s, 12H, $12\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 170,6 - 170,1 - 169,5 - 169,4 ($4\text{C}_{\text{CO acetate}}$) ; 100,9 (C_1) ; 73,0 (C_3) ; 71,9 (C_2) ; 71,5 (C_4) ; 70,8 - 70,6 - 70,2 - 69,2 (C_5 , 4C_{CH_2}) ; 68,7 (C_6) ; 62,2 - 55,8 (2C_{CH_2}) ; 20,8 ($4\text{C}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

Préparation du composé 62

$$M = 337,33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Huile

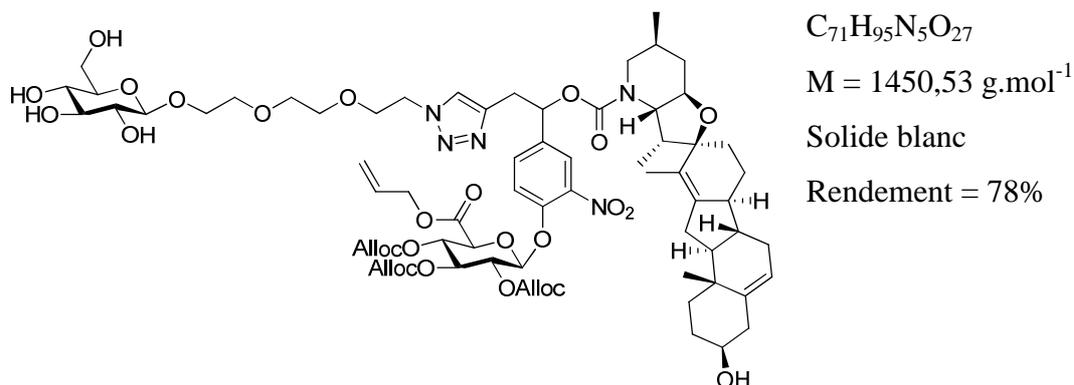
Rendement = quantitatif

730 mg (1,4 mmol ; 1 éq.) de composé **61** sont dissouts dans 14 mL de méthanol. La solution est refroidie à 0°C et on additionne 152 mg (2,8 mmol ; 2 éq.) de MeONa. La solution est agitée pendant 2 heures puis neutralisée avec une résine acide (IRC50) pendant 20 minutes. La solution est filtrée sur coton puis évaporée. Une chromatographie flash du brut réactionnel (Eluant : DCM/MeOH 92/8 ; 90/10 ; 85/15) permet d'isoler 472 mg (1,4 mmol ; Rdt quantitatif) de composé **62** sous forme d'huile incolore.

$[\alpha]_D^{20}$: -18 (c 0,1, MeOH)

RMN ^1H (400 MHz, D_2O , δ ppm) : 4,45 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, H_1) ; 4,03 (m, 1H, $\text{H}_{\text{sucré}}$) ; 3,90 - 3,60 (m, 12H, 10 H_{CH_2} , 2 $\text{H}_{\text{sucré}}$) ; 3,49 - 3,23 (m, 5H, 3 $\text{H}_{\text{sucré}}$, 2 H_{CH_2}).

RMN ^{13}C (100 MHz, D_2O , δ ppm) : 102,6 (C_1) ; 76,3 - 76,0 - 73,5 (3 $\text{C}_{\text{sucré}}$) ; 70,1 (C_{CH_2}) ; 70,0 ($\text{C}_{\text{sucré}}$) ; 69,9 - 69,8 - 69,6 - 69,1 - 61,1 - 50,5 (6 C_{CH_2}).

Préparation du composé **63**

460 mg (0,41 mmol ; 1 éq.) de glucuronide **59** et 140 mg (0,41 mmol ; 1 éq.) d'azoture **62** sont solubilisés dans 14,7 mL de dichlorométhane anhydre. 140 mg (0,41 mmol ; 1 éq.) de $Cu(MeCN)_4PF_6$ sont additionnés et l'agitation est maintenue 20 h à température ambiante. Le solvant est alors éliminé sous pression réduite et le brut est purifié par flash chromatographie (Eluant DCM/MeOH 90/10). 470 mg (0,32 mmol ; Rdt = 78%) de composé **63** sont isolés sous forme d'un solide blanc (2 diastéréoisomères).

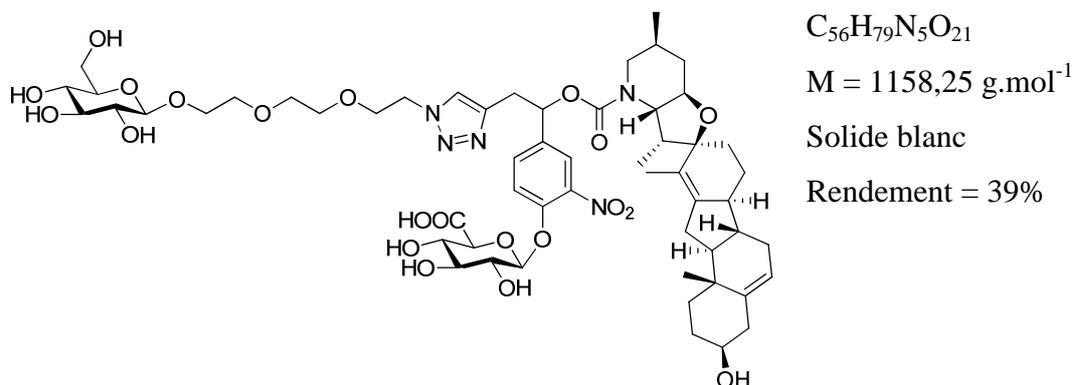
Pf = 133°C

Rf = 0,21 (DCM/MeOH 90/10)

RMN 1H (400 MHz, CD_3OD , δ ppm) : 7,96 (m, 2H) ; 7,77 (m, 1H) ; 7,60 (m, 1H) ; 6,11 (m, 5H) ; 5,50 (m, 12H) ; 4,78 (m, 15H) ; 4,49 (m, 1H) ; 3,40 - 3,10 (m, 24H) ; 2,40 - 1,40 (m, 19H) ; 1,30 - 0,65 (m, 15H).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ ppm) : 167,7 ; 167,3 ; 158,1 ; 155,5 ; 155,3 ; 155,2 ; 155,0 ; 150,8 ; 149,8 ; 148,5 ; 144,5 ; 143,3 ; 143,1 ; 141,8 ; 132,9 ; 132,8 ; 132,73 ; 132,68 ; 127,6 ; 122,7 ; 119,6 ; 119,3 ; 119,0 ; 104,5 ; 100,1 ; 89,8 ; 86,8 ; 78,0 ; 76,8 ; 75,5 ; 75,0 ; 74,0 ; 73,4 ; 72,9 ; 72,7 ; 72,5 ; 71,7 ; 71,4 ; 70,4 ; 70,3 ; 70,1 ; 69,7 ; 68,5 ; 68,1 ; 67,9 ; 64,1 ; 62,8 ; 61,1 ; 53,4 ; 50,6 ; 50,1 ; 49,9 ; 43,4 ; 42,6 ; 39,5 ; 38,1 ; 37,9 ; 37,7 ; 33,4 ; 32,1 ; 30,8 ; 29,9 ; 29,3 ; 28,5 ; 25,7 ; 21,4 ; 21,2 ; 20,6 ; 19,9 ; 19,8 ; 19,1 ; 15,6 ; 14,0 ; 10,9.

SMHR (ESI) : SMHR (ESI) : $C_{71}H_{95}N_5O_{27}Na$ $[M+Na]^+$ m/z théorique : 1472.61066 m/z trouvé : 1472,6115.

Préparation du vecteur glucuronylé de la cycloпамine **47**

210 mg (0,147 mmol ; 1 éq.) de glucuronide **63** sont dissouts dans 5 mL d'un mélange DCM/MeOH 9/1. 17 mg (0,0147 mmol ; 10% mol.) de $Pd(PPh_3)_4$ et 30 μL (0,29 mmol ; 2 éq.) d'aniline sont additionnés et le mélange est laissé sous agitation pendant 24h à température ambiante. Le solvant est éliminé sous pression réduite et le brut est purifié par HPLC semi-préparative (Méthode 2). 67 mg (0,058 mmol ; Rdt = 39%) de vecteur glucuronylé **47** sont obtenus sous forme d'un solide blanc avec une pureté supérieure à 95%.

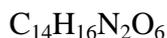
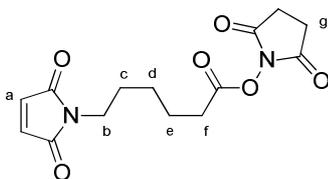
Pf = 149°C

Tr = 13,57 et 13,83 min (Méthode B)

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ ppm) : 7,78 (m, 1H) ; 7,76 (s, 0,5 H) ; 7,70 (s, 0,5H) ; 7,58 (m, 1H) ; 7,50 (m, 1H) ; 6,00 (m, 1H) ; 5,37 (sl, 1H) ; 5,10 (m, 1H) ; 4,51 (sl, 2H) ; 4,30 (dd, 1H, $J = 7,7 \text{ Hz}$, $J = 2,2 \text{ Hz}$) ; 3,99 (m, 1H) ; 3,86 (m, 4H) ; 3,75 - 3,47 (m, 14H) ; 3,36 (m, 1H) ; 3,30 (m, 1H) ; 3,10 (m, 1H) ; 2,70 (m, 1H) ; 2,35 - 2,10 (m, 8H) ; 1,90 - 1,38 (m, 20H) ; 1,38 - 1,13 (m, 8H) ; 1,05 - 0,73 (m, 13H).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ ppm) : 158,2 ; 151,2 ; 144,6 ; 143,2 ; 141,5 ; 133,0 ; 127,6 ; 125,4 ; 122,7 ; 104,4 ; 102,3 ; 86,9 ; 78,0 ; 77,0 ; 76,4 ; 75,1 ; 74,5 ; 73,3 ; 72,5 ; 71,7 ; 71,4 ; 70,4 ; 69,7 ; 62,8 ; 53,4 ; 51,4 ; 43,5 ; 42,8 ; 42,6 ; 39,5 ; 37,7 ; 33,4 ; 32,1 ; 32,0 ; 30,8 ; 29,9 ; 29,3 ; 25,7 ; 21,3 ; 19,0 ; 13,8 ; 10,7 ; 10,6.

SMHR (ESI) : $C_{56}H_{78}N_5O_{21}$ $[M-H]^-$ m/z théorique : 1156,51948 m/z trouvé : 1156,5195.

Préparation du composé 71

$$M = 308,29 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide blanc

Rendement = 63%

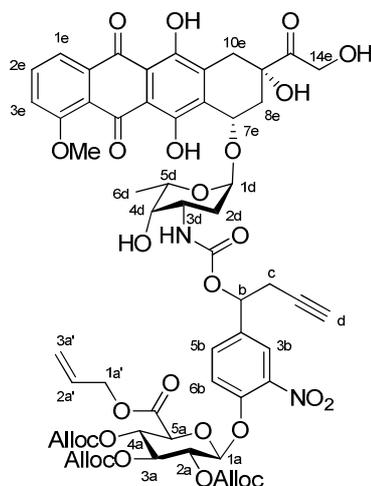
A une solution de 800 mg (8,16 mmol ; 1 éq.) d'anhydride maléique dans 10 mL de DMF sont ajoutés 1,07 g (8,16 mmol ; 1 éq.) d'acide 6-aminohexanoïque. Après deux heures d'agitation à température ambiante, la solution est refroidie à 0°C et on ajoute successivement 563 mg (9,79 mmol ; 1,2 éq.) de N-hydroxysuccinimide et 3,91 g (20,4 mmol ; 2,5 éq.) d'EDC. Le milieu réactionnel est chauffé à 35°C pendant 12h. Après refroidissement et dilution de la solution par du dichlorométhane (200 mL), la phase organique est lavée successivement avec une solution aqueuse de NaHCO₃, avec de l'eau puis avec une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis concentrée. Le brut obtenu est purifié par flash chromatographie (Eluant : AcOEt/EP 60/40) pour conduire au composé **71** (1,53 g ; 5,13 mmol), isolé sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 63%.

R_f : 0,41 (Eluant : AcOEt/EP 60/40)

Pf : 74°C (Litt. 79 - 80°C).¹¹⁸

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 6,67 (s, 2H, 2H_a) ; 3,50 (t, 2H, J = 7,17 Hz, 2H_b) ; 2,81 (sl, 4H, 4H_g) ; 2,58 (t, 2H, J = 7,40 Hz, 2H_f) ; 1,75 (m, 2H, 2H_c) ; 1,61 (m, 2H, 2H_e) ; 1,39 (m, 2H, 2H_d).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 170,8 - 169,1 - 168,3 (5C_{CO}) ; 134,0 (2C_a) ; 37,4 - 30,8 - 28,0 - 25,8 - 25,6 - 24,1 (7C_{CH2}).

Préparation du composé **75**

Solide rouge

Rendement = 83%

207 mg (0,36 mmol ; 1 éq.) de doxorubicine hydrochlorée sont mis en suspension dans 3,8 mL de DMF anhydre. 49 μL (0,36 mmol ; 1 éq.) de triéthylamine sont ajoutés et le mélange est laissé sous agitation 30 minutes. Une solution de 300 mg (0,36 mmol ; 1 éq.) de carbonate activé **58** dans 2,5 mL de DMF anhydre et 48 mg (0,36 mmol ; 1 éq.) de HOBt sont additionnés à la solution de doxorubicine. Après 7 heures d'agitation à température ambiante, le produit de départ a été totalement consommé et le DMF est évaporé sous vide à température ambiante. Le brut obtenu est purifié par flash chromatographie (Eluant : DCM/MeOH 99/1 ; 98/2) pour donner 364 mg (0,30 mmol ; Rdt = 83%) de glucuronide **75** sous forme de solide rouge (2 diastéréoisomères).

Pf = 140 - 150°C (décomposition)

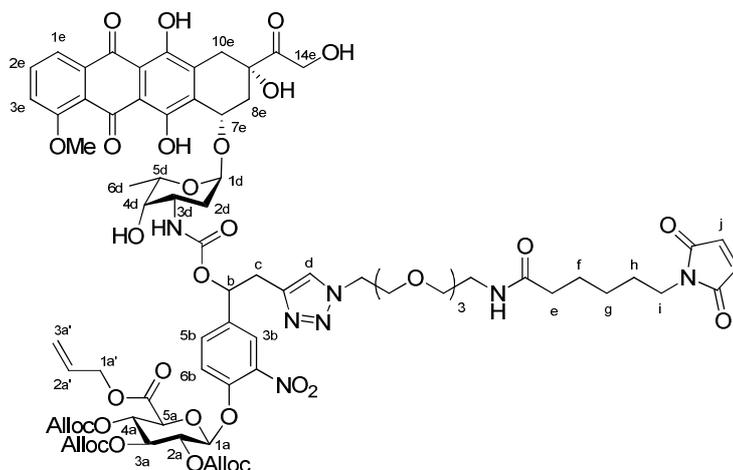
Tr = 24,44 et 24,62 min (Méthode **B**)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 13,91 (2s, 1H, $\text{H}_{\text{phénol}}$) ; 13,15 (2s, 1H, $\text{H}_{\text{phénol}}$) ; 7,98 (m, 1H, H_{3b}) ; 7,77 (m, 2H, H_{1e} , H_{5b}) ; 7,47 (m, 1H, H_{2e}) ; 7,37 (m, 1H, H_{6b}) ; 7,27 (m, 2H, H_{3e} , H_{NH}) ; 5,93 - 5,80 (m, 4H, $4\text{H}_{2a'}$), 5,65 (m, 1H, H_b) ; 5,48 (m, 1H, H_{1d}) ; 5,36 - 5,21 (m, 13H, H_{1a} , H_{2a} , H_{3a} , H_{4a} , H_{7e} , $8\text{H}_{3a'}$) ; 4,72 - 4,56 (m, 10H, $8\text{H}_{1a'}$, 2H_{14e}) ; 4,30 (m, 1H, H_{5a}) ; 4,09 (m, 4H, H_{5d} , 3H_{OMe}) ; 3,81 (m, 1H, H_{3d}) ; 3,67 (s, 0,5H, H_{4d}) ; 3,59 (s, 0,5H, H_{4d}) ; 3,19 (m, 1H, H_{10e}) ; 2,91 (m, 1H, H_{10e}) ; 2,66 (m, 2H, 2H_c) ; 2,51 - 2,09 (m, 4H, 2H_{8e} , 2H_{OH}) ; 1,97 (m, 1H, H_d) ; 1,81 (m, 3H, 2H_{2d} , H_{OH}) ; 1,27 (m, 3H, 3H_{6d}).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 213,9 (C_{CO} cétone) ; 187,1 - 186,7 - 186,6 (2C_{CO} quinone) ; 165,7 et 165,6 (C_{CO} ester) ; 161,1 (C_{4e}) ; 156,2 - 155,6 - 154,3 - 154,0 - 153,6 - 153,5 ($2\text{C}_{\text{phénol}}$)

; 3C_{CO} carbonate ; C_{CO} carbamate) ; 149,0 (C_{1b}) ; 140,8 et 140,6 (C_{2b}) ; 135,9 - 135,5 - 135,4 - 133,7
133,6 – 133,5 (C_{2e}, C_{4b}, C_{5b}, 3C_{quat. dox}) ; 131,3 - 131,1 - 131,0 - 130,9 (4C_{2a'}) ; 123,6 et 123,4
(C_{1e}) ; 120,8 (C_{quat. dox}) ; 119,9 - 119,5 - 119,4 - 119,1 - 118,8 - 118,7 – 118,6 (4C_{3a'} ; C_{3b} ; C_{6b} ;
C_{3e}) ; 111,6 - 111,4 (2C_{quat. dox}) ; 100,8 – 100,7 - 99,6 – 99,4 (C_{1a}, C_{1d}) ; 78,6 (C_{alcyne}) ; 76,7
(C_d) ; 75,1 - 75,0 - 74,0 – 72,6 - 72,5 - 72,4 - 72,3 - 71,9 - 69,8 – 69,7 - 69,6 - 69,5 - 69,4 -
69,3 - 67,4 - 67,0 - 65,6 (C_b, C_{7e}, C_{9e}, C_{2a}, C_{3a}, C_{4a}, 4C_{1a'}, C_{14e}, C_{5a}, C_{5d}, C_{4d}) ; 56,8 (C_{OMe}) ;
47,3 - 47,2 (C_{3d}) ; 35,7 (C_{8e}) ; 34,0 (C_{10e}) ; 30,2 -30,1 (C_{2d}) ; 26,5 - 26,4 (C_c) ; 16,9 (C_{6d}).

SMHR (ESI) : C₅₉H₆₀N₂O₂₈Na [M+Na]⁺ m/z théorique : 1267,32248 m/z trouvé : 1267,3222
; C₅₉H₆₀N₂O₂₈K [M+K]⁺ m/z théorique : 1283,29642 m/z trouvé : 1283,3005 ;
C₅₉H₅₉N₂O₂₈Na₂ [M-H+2Na]⁺ m/z théorique : 1289,30442 m/z trouvé : 1289,3048

Préparation du composé **77a**C₇₇H₈₉N₇O₃₄M = 1656,56 g.mol⁻¹

Solide rouge

Rendement = 58%

75 mg (0,060 mmol ; 1 éq.) d'alcyne **75** et 15 mg (0,067 mmol ; 1,3 éq.) d'azoture **72a** sont mis en solution dans 2,4 mL de dichlorométhane anhydre. 26,5 mg (0,071 mmol ; 1,2 éq.) de Cu(MeCN)₄PF₆ sont additionnés et le mélange est laissé sous agitation 14h à température ambiante. Une solution de 188 mg (0,505 mmol ; 8,4 éq.) d'EDTA disodique dans 2,4 mL de tampon phosphate 0,2 M (pH = 7) est ajoutée et l'agitation est maintenue pendant 4 h. Le mélange est extrait trois fois par du dichlorométhane, les phases organiques sont séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées. Le composé **76a** brut obtenu est alors solubilisé dans 1,2 mL de DMSO et 23 mg (0,078 mmol ; 1,3 éq.) d'ester activé **71** sont additionnés. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le mélange est dilué par du dichlorométhane et la phase organique est lavée trois fois par de l'eau, séchée sur MgSO₄ et évaporée. Une purification par flash chromatographie (Eluant DCM/MeOH 98,5/1,5 ; 97/3) permet d'isoler 58 mg (0,035 mmol ; Rdt = 58%) de vecteur protégé **77a** sous forme de solide rouge (2 diastéréoisomères).

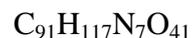
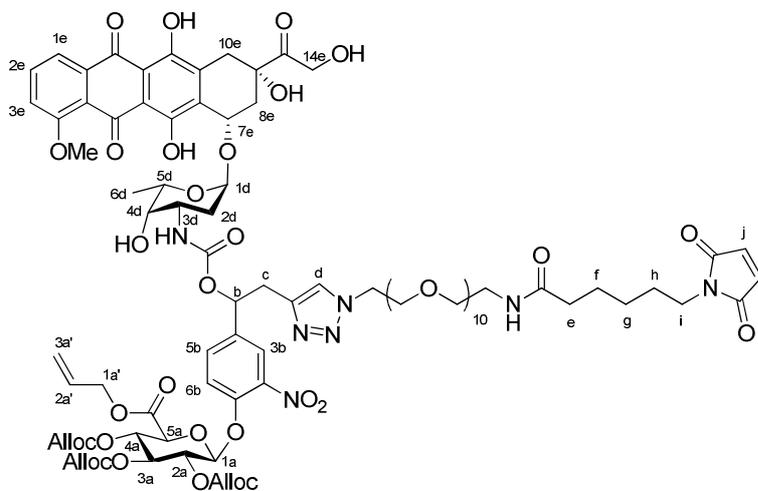
Tr = 22,71 et 23,05 min (Méthode **B**)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 13,96 (2s, 1H, H_{phénol}) ; 13,24 (2s, 1H, H_{phénol}) ; 8,03 (m, 1H, H_{3b}) ; 7,78 (m, 1H, H_{5b}) ; 7,70 (m, 1H, H_{1e}) ; 7,56 (s, 0,5H, H_d) ; 7,52 (s, 0,5 H, H_d) ; 7,40 (m, 2H, H_{6b}, H_{2e}) ; 7,25 (m, 1H, H_{3e}) ; 6,68 (2s, 2H, 2H_j) ; 6,40 – 6,30 (2sl, 1H, H_{NH}) ; 5,96 – 5,78 (m, 5H, 4H_{2a'}, H_b) ; 5,49 (m, 1H, H_{1d}) ; 5,37 – 5,20 (m, 13H, H_{1a}, H_{2a}, H_{3a}, H_{4a}, 8H_{3a'}, H_{7e}) ; 4,74 – 4,56 (m, 10H, 8H_{1a'}, 2H_{14e}) ; 4,46 (m, 2H, 2H_{PEG}) ; 4,37 (d, 0,5H, J = 9,0 Hz, H_{5a}) ; 4,30 (d, 0,5H, J = 9,0 Hz, H_{5a}) ; 4,08 (m, 4H, H_{5d}, 3H_{OMe}) ; 3,84 – 3,71 (m, 2H, H_{3d}, H_{4d}) ; 3,67 – 3,41 (m, 16H, 14H_{PEG}, 2H_i) ; 3,28 – 3,16 (m, 3H, 2H_c, H_{10e}) ; 3,00 (2s, 1H,

H_{10e}) ; 2,33 (d, 1H, $J = 15,3$ Hz, H_{8e}) ; 2,13 (m, 3H, 2H_e, H_{8e}) ; 1,92 – 1,72 (m, 4H, 2H_{2d}, 2H_{OH}) ; 1,58 (m, 5H 2H_f, 2H_h, H_{OH}) 1,26 (m, 5H, 3H_{6d}, 2H_g).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 214,0 (C_{CO} cétone) ; 186,9 - 186,6 (2C_{CO} quinone) ; 173,4 et 173,3 (C_{CO} amide) ; 171,0 (2C_{CO} maléimide) ; 165,7 et 165,6 (C_{CO} ester) ; 161,0 (C_{4e}) ; 156,3 et 156,2 - 155,6 - 154,6 - 154,0 - 153,6 - 153,5 (3C_{CO} carbonate, C_{CO} carbamate, 2C_{phénol}) ; 148,7 (C_{1b}) ; 142,4 et 142,2 (C_{triazole}) ; 140,7 et 140,5 (C_{2b}) ; 136,5 et 136,3 - 135,8 - 135,4 - 134,1 - 133,8 - 133,7 - 133,5 - 132,8 - 132,8 - 132,1 - 131,2 - 131,1 - 130,9 - 130,8 (4C_{2a'}, 2C_j, C_{2e}, C_{4b}, C_{5b}, 3C_{quat. dox}) ; 123,8 et 123,6 - 123,2 et 122,9 (C_{1e}, C_d) ; 120,8 - 119,8 - 119,4 - 119,3 - 119,0 - 118,9 - 118,6 (C_{quat. dox}, 4C_{3a'}, C_{3b} ; C_{6b} ; C_{3e}) ; 111,5 et 111,3 (2C_{quat. dox}) ; 100,9 - 99,3 (C_{1a}, C_{1d}) ; 75,0 - 74,0 - 73,9 - 73,5 - 72,4 - 72,1 - 70,3 - 70,2 - 70,1 - 70,0 - 69,9 - 69,8 - 69,5 - 69,3 - 69,2 - 68,8 - 67,6 - 67,4 - 67,0 - 66,9 - 65,5 (C_b, C_{7e}, C_{9e}, C_{2a}, C_{3a}, C_{4a}, C_{5a}, 4C_{1a'}, C_{14e}, C_{5d}, C_{4d}, 6C_{PEG}) ; 56,7 (C_{OMe}) ; 50,2 (C_{PEG}) ; 47,4 (C_{3d}) ; 39,2 - 37,7 (C_{PEG}, C_i) ; 36,2 (C_e) ; 35,6 (C_{8e}) ; 33,9 (C_{10e}) ; 32,8 (C_c) ; 29,8 (C_{2d}) ; 28,3 - 26,4 - 25,1 (C_f, C_g, C_h) ; 17,0 (C_{6d}).

SMHR (ESI) : SMHR (ESI) : C₇₇H₈₉N₇O₃₄Na [M+Na]⁺ m/z théorique : 1678,53481 m/z trouvé : 1678,5340.

Préparation du composé **77b**

Solide rouge

Rendement = 57%

186 mg (0,149 mmol ; 1 éq.) d'alcyne **75** et 102 mg (0,149 mmol ; 1,3 éq.) d'azoture **72b** sont mis en solution dans 7 mL de dichlorométhane anhydre. 78 mg (0,209 mmol ; 1,1 éq.) de $\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{PF}_6$ sont additionnés et le mélange est laissé sous agitation 3 heures. Une solution de 956 mg (2,568 mmol ; 17 éq.) d'EDTA disodique dans 14 mL de tampon phosphate 0,1 M (pH = 7) est ajoutée et l'agitation est maintenue durant 5 heures. Le mélange est extrait 3 fois par du dichlorométhane, la phase organique est séchée sur MgSO_4 et évaporée. Le composé **76b** brut ainsi obtenu est dissout dans 3 mL de DMSO. 58 mg (0,194 mmol ; 1,3 éq.) d'ester de NHS **71** sont additionnés et le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Le milieu réactionnel est alors dilué dans du dichlorométhane. La phase organique obtenue est lavée 5 fois par de l'eau, séchée sur MgSO_4 et évaporée. Une purification par flash chromatographie (Eluant DCM/MeOH 95/5 ; 92/8) permet d'isoler 166 mg (0,084 mmol ; Rdt = 57%) du composé **77b** sous forme de solide rouge (2 diastéréoisomères).

Pf = 140 - 150°C (décomposition)

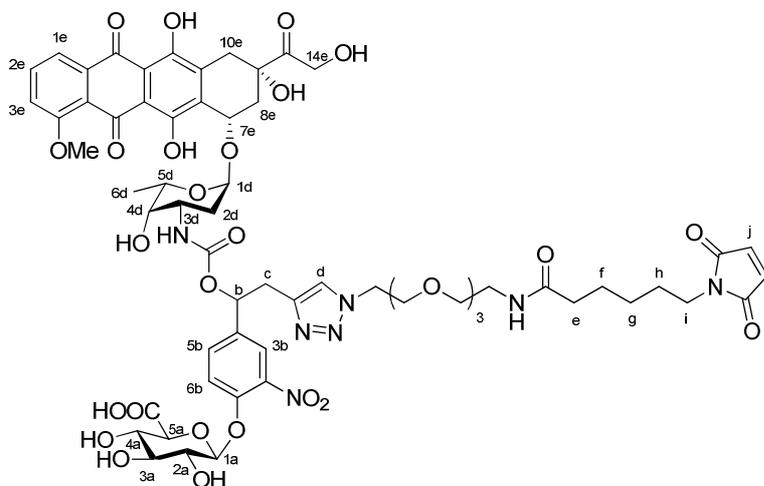
Tr = 22,15 et 22,50 min (Méthode B)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 13,95 (2s, 1H, H_{phénol}) ; 13,22 (2s, 1H, H_{phénol}) ; 8,02 (m, 1H, H_{3b}) ; 7,78 (m, 1H, H_{5b}) ; 7,69 (m, 1H, H_{1e}) ; 7,64 (2s, 1H, H_d) ; 7,41 (m, 2H, H_{6b}, H_{2e}) ; 7,27 (m, 1H, H_{3e}) ; 6,69 (s, 2H, 2H_j) ; 6,26 (sl, 1H, H_{NH}) ; 6,06 - 5,73 (m, 5H, 4H_{2a'}, H_b) ; 5,48 (m, 1H, H_{1d}) ; 5,36 - 5,19 (m, 13H, H_{1a}, H_{2a}, H_{3a}, H_{4a}, 8H_{3a'}, H_{7e}) ; 4,73 - 4,47 (m, 12H, 8H_{1a'}, 2H_{14e}, 2H_{PEG}) ; 4,30 (m, 1H, H_{5a}) ; 4,07 (m, 4H, 3H_{OMe}, H_{5d}) ; 3,82 - 3,44 (m, 46H, H_{3d},

H_{4d}, 42H_{PEG}, 2H_i) ; 3,22 (m, 3H, 2H_c, H_{10e}) ; 2,98 (m, 1H, H_{10e}) ; 2,31 (d, 1H, $J = 14,1$ Hz, H_{8e}) ; 2,15 (m, 3H, 2H_e, H_{8e}) ; 1,90 - 1,54 (m, 6H, 2H_{2d}, 2H_f, 2H_h) ; 1,33 - 1,21 (m, 5H, 3H_{6d}, 2H_g).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 214,0 (C_{CO} cétone) ; 187,2 (2C_{CO} quinone) ; 172,9 (C_{CO} amide) ; 170,9 (2C_{CO} maléimide) ; 165,7 et 165,5 (C_{CO} ester) ; 161,2 (C_{4e}) ; 156,3 - 155,8 - 155,7 - 154,7 - 154,6 - 154,0 - 153,5 (3C_{CO} carbonate, C_{CO} carbamate, 2C_{phénol}) ; 148,7 (C_{1b}) ; 142,4 (C_{triazole}) ; 140,9 et 140,7 (C_{2b}) ; 136,6 - 135,9 - 135,6 - 134,2 - 133,7 - 132,5 - 132,1 - 131,3 - 131,1 - 131,0 - 130,9 (4C_{2a'}, 2C_j, C_{2e}, C_{4b}, C_{5b}, 3C_{quat. dox}) ; 123,9 - 123,2 - 122,9 (C_{1e}, C_d) ; 121,0 - 120,0 - 119,5 - 119,4 - 119,3 - 119,1 - 118,6 (C_{quat. dox}, 4C_{3a'}, C_{3b} ; C_{6b} ; C_{3e}) ; 111,6 - 111,4 (2C_{quat. dox}) ; 100,9 - 99,5 (C_{1a}, C_{1d}) ; 75,1 - 74,0 - 73,9 - 73,6 - 72,4 - 72,2 - 70,6 - 70,5 - 70,4 - 70,3 - 70,0 - 69,7 - 69,5 - 69,4 - 69,3 - 69,2 - 68,6 - 67,7 - 67,4 - 67,0 - 66,9 - 65,6 (C_b, C_{7e}, C_{9e}, C_{2a}, C_{3a}, C_{4a}, C_{5a}, 4C_{1a'}, C_{14e}, C_{5d}, C_{4d}, 19C_{PEG}) ; 56,8 (C_{OMe}) ; 53,5 (C_{PEG}) ; 50,2 (C_{PEG}) ; 47,3 (C_{3d}) ; 39,2 - 37,7 (C_i, C_{PEG}) ; 36,4 (C_e) ; 35,7 (C_{8e}) ; 34,0 (C_{10e}) ; 32,9 (C_c) ; 30,2 et 29,8 - 28,4 - 26,5 - 25,2 (C_{2d}, C_g, C_f, C_h) ; 17,1 et 17,0 (C_{6d}).

SMHR (ESI) : SMHR (ESI) : C₉₁H₁₁₇N₇O₄₁Na [M+Na]⁺ m/z théorique : 1986,71777 m/z trouvé : 1986,7184 ; C₉₁H₁₁₇N₇O₄₁Na₂ [M+2Na]⁺⁺ m/z théorique : 1004,8535 m/z trouvé : 1004,8535.

Préparation du vecteur glucuronylé de la doxorubicine **68a** $C_{62}H_{73}N_7O_{28}$ $M = 1364,27 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Solide rouge

Rendement = 27%

58 mg (0,035 mmol ; 1 éq.) de glucuronide protégé **77a** et 6,3 mg (0,0054 mmol ; 15% mol.) de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ sont mis en solution dans 0,9 mL d'un mélange THF/ H_2O 9/1 préalablement dégazé sous flux de N_2 . 8,2 μL (0,090 mmol ; 2,5 éq.) d'aniline sont additionnés et l'agitation est maintenue 24 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le brut obtenu est purifié par HPLC semi-préparative (Méthode **3**). 13 mg (0,0095 mmol ; Rdt = 27%) de vecteur **68a** sont isolés sous forme de solide rouge (2 diastéréoisomères) avec une pureté supérieure à 95%.

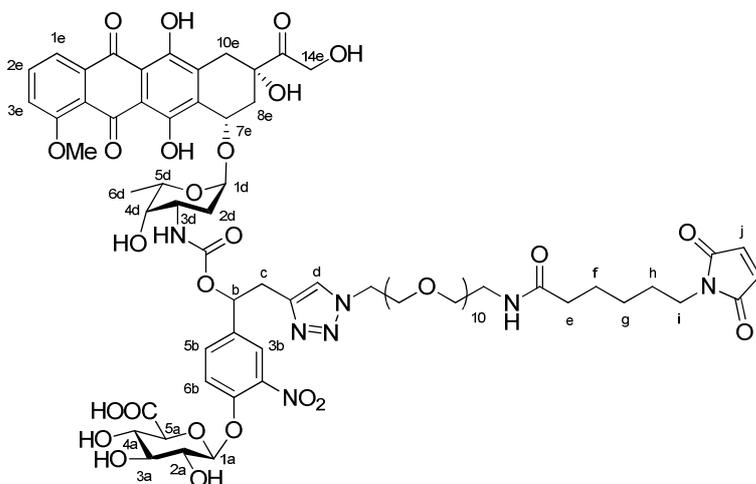
Tr = 12,33 et 12,79 min (Méthode **B**)

RMN ^1H (400 MHz, DMSO, δ ppm) : 14,00 (2s, 1H, $\text{H}_{\text{phénol}}$) ; 13,24 (2s, 1H, $\text{H}_{\text{phénol}}$) ; 7,89 (m, 2H, H_{3b} , H_{5b}) ; 7,83-7,69 (m, 3H, H_d , H_{1e} , H_{6b}) ; 7,64 (m, 1H, $\text{H}_{\text{NH carbamate}}$) ; 7,51 (m, 1H, H_{2e}) ; 7,32 (2d, $J = 9,0 \text{ Hz}$, H_{3e}) ; 6,99 (2s, 2H, 2H_j) ; 5,76 (m, 1H, H_b) ; 5,23 (m, 2H, H_{1a} , H_{1d}) ; 4,91 (m, 1H, H_{7e}) ; 4,56 (s, 2H, 2H_{14e}) ; 4,41 (2t, $J = 5,0 \text{ Hz}$, 2H, 2H_{PEG}) ; 4,13 (m, 1H, H_{5d}) ; 3,99-3,90 (m, 4H, 3H_{OMe} , $\text{H}_{\text{sucrose}}$) ; 3,75 - 3,05 (m, 23H partiellement masqués par le pic de l'eau résiduelle, 14H_{PEG} , $3\text{H}_{\text{sucrose}}$, H_{3d} , H_{4d} , 2H_i , 2H_c) ; 2,92 m, 2H, 2H_{10e}) ; 2,19-1,99 (m, 4H, 2H_e , 2H_{8e}) ; 1,84 (m, 1H, H_{2d}) ; 1,43 (m, 5H, H_{2d} , 2H_f , 2H_h) ; 1,07 (m, 5H, 3H_{6d} , 2H_g).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO, δ ppm) : 213,8 ($\text{C}_{\text{CO cétone}}$) ; 186,6 - 186,5 ($2\text{C}_{\text{CO quinone}}$) ; 172,1 ($\text{C}_{\text{CO amide}}$) ; 169,9 ($2\text{C}_{\text{CO maléimide}}$) ; 160,8 (C_{4e}) ; 156,2 - 156,1 - 154,5 - 154,4 ($\text{C}_{\text{CO acide carboxylique}}$, $\text{C}_{\text{CO carbamate}}$, $2\text{C}_{\text{phénol}}$) ; 148,5 (C_{1b}) ; 142,0 ($\text{C}_{\text{triazole}}$) ; 139,7 - 136,3 - 135,6 - 134,7 - 134,5 - 134,2 - 132,1 - 123,6 - 122,7 - 120,0 - 119,8 - 119,0 - 116,5 - 110,8 - 110,6 (C_{2b} , C_{3b} , C_{4b} , C_{5b} , C_{6b} , 2C_j , $6\text{C}_{\text{quat. dox}}$, C_d , C_{1e} , C_{2e} , C_{3e}) ; 100,1 - 99,9 (C_{1a} , C_{1d}) ; 75,8 - 75,4 - 72,7 -

71,1 - 69,9 - 69,6 - 69,5 - 69,1 - 68,8 - 68,0 - 66,7 - 63,7 (C_b, C_{7e}, C_{9e}, C_{14e}, 3C_{sucré}, C_{4d}, C_{5d}, 7C_{PEG}) ; 56,6 (C_{OMe}) ; 56,1 (C_{sucré}) ; 49,3 (C_{PEG}) ; 47,2 (C_{3d}) ; 38,4 - 37,0 (C_i, C_c) ; 36,7 (C_{8e}) ; 35,1 (C_e) ; 32,1 (C_{10e}) ; 29,8 (C_{2d}) ; 27,8 - 25,8 - 24,8 (C_h, C_f, C_g) ; 17,0 (C_{6d}).

SMHR (ESI) : C₆₂H₇₂N₇O₂₈ [M-H]⁻ m/z théorique : 1362,44308 m/z trouvé : 1362,4433 ;
C₆₂H₇₁N₇O₂₈ [M-2H]²⁻ m/z théorique : 680,7179 m/z trouvé : 680,7148.

Préparation du vecteur glucuronylé de la doxorubicine **68b**
 $C_{76}H_{101}N_7O_{35}$
 $M = 1672,64 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide rouge

Rendement = 40%

166 mg (0,0845 mmol ; 1 éq.) de glucuronide **77b** et 14,6 mg (0,0146 mmol ; 0,15 éq.) de $Pd(PPh_3)_4$ sont mis en solution dans 2 mL d'un mélange THF/H₂O 9/1 préalablement dégazé sous flux de N₂. 19 μ L (0,2112 mmol ; 2,5 éq.) d'aniline sont additionnés et l'agitation est maintenue 4 heures à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le brut obtenu est purifié par HPLC semi-préparative (Méthode **3**). 56 mg (0,0335 mmol ; Rdt = 40%) de vecteur **68b** (2 diastéréoisomères) sont isolés après lyophilisation sous forme de solide rouge avec une pureté supérieure à 95%.

Pf = 140 - 150°C (décomposition)

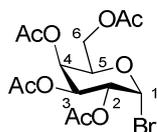
Tr = 13,22 et 13,61 min (Méthode **B**)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO, δ ppm) : 14,05 (2s, 1H, H_{phénol}) ; 13,26 (2s, 1H, H_{phénol}) ; 7,91 (m, 2H, H_{3b}, H_{5b}) ; 7,83-7,66 (m, 3H, H_d, H_{1e}, H_{6b}) ; 7,52 (m, 1H, H_{2e}) ; 7,32 (m, 1H, H_{3e}) ; 7,0 (s, 2H, 2H_j) ; 5,76 (m, 1H, H_b) ; 5,47 - 5,17 (m, 4H, H_{1a}, H_{1d}, 2H_{OH}) ; 4,91 (m, 1H, H_{7e}) ; 4,55 (s, 2H, 2H_{14e}) ; 4,44 - 4,37 (m, 2H, 2H_{PEG}) ; 4,12 (m, 1H, H_{5d}) ; 3,99 - 3,88 (m, 4H, 3H_{OMe}, H_{sucré}) ; 3,75 - 3,14 (m, 51H partiellement masqués par le pic de l'eau résiduelle, 42H_{PEG}, 3H_{sucré}, H_{3d}, H_{4d}, 2H_i, 2H_c) ; 2,94 (m, 2H, 2H_{10e}) ; 2,19 - 2,01 (m, 4H, 2H_e, 2H_{8e}) ; 1,83 (m, 1H, H_{2d}) ; 1,46 (m, 5H, H_{2d}, 2H_f, 2H_h) ; 1,14 (m, 5H, 3H_{6d}, 2H_g).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO, δ ppm) : 213,8 (C_{CO} cétone) ; 186,6 - 186,5 (2C_{CO} quinone) ; 172,0 (C_{CO} amide) ; 171,1 - 170,0 (2C_{CO} maléimide) ; 160,8 (C_{4e}) ; 157,9 - 157,6 - 156,1 - 156,0 - 154,5 - 154,4 (C_{CO} acide carboxylique, C_{CO} carbamate, 2C_{phénol}) ; 148,5 (C_{1b}) ; 141,9 et 141,8 (C_{triazole}) ; 139,7 - 139,5 - 136,3 - 135,5 - 134,7 - 134,4 - 134,1 - 133,8 - 133,7 - 132,0 - 130,3 - 130,2 - 128,9 -

123,6 - 123,5 - 122,7 - 120,0 - 119,8 - 119,0 - 118,8 - 118,6 - 117,7 - 116,8 - 116,5 - 115,8 - 115,7 - 112,0 - 110,8 - 110,7 (C_{2b}, C_{3b}, C_{4b}, C_{5b}, C_{6b}, 2C_j, 6C_{quat. dox}, C_d, C_{1e}, C_{2e}, C_{3e}) ; 100,1 - 99,8 (C_{1a}, C_{1d}) ; 75,8 - 75,3 - 74,9 - 72,7 - 71,1 - 69,9 - 69,6 - 69,2 - 68,8 - 67,9 - 66,7 - 63,7 (C_b, C_{7e}, C_{9e}, C_{14e}, 3C_{sucres}, C_{4d}, C_{5d}, 20C_{PEG}) ; 56,6 (C_{OMe}) ; 54,9 (C_{PEG}) ; 52,3 (C_{sucres}) ; 49,3 (C_{PEG}) ; 47,1 (C_{3d}) ; 38,4 et 38,3 - 37,0 (C_i, C_c) ; 36,6 (C_{8e}) ; 35,1 (C_e) ; 32,1 (C_{10e}) ; 29,8 (C_{2d}) ; 27,8 - 25,8 - 24,8 (C_h, C_f, C_g) ; 17,0 (C_{6d}).

SMHR (ESI) : C₇₆H₁₀₀N₇O₃₅ [M-H]⁻ m/z théorique : 1670,62658 m/z trouvé : 1670,6264.

Préparation du bromure de 2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl-1-bromo- α -D-galactose **87**

$$M = 411,20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide blanc

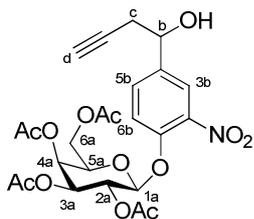
Rendement = 87%

10 g (12,80 mmol ; 1 éq.) de pentaacétyl- β -D-galactose **86** sont mis en solution dans 10 mL d'acide bromhydrique à 33% dans l'acide acétique. La solution est agitée 3h à température ambiante puis additionnée doucement sur un mélange eau et glace. Cette phase aqueuse est extraite trois fois par du dichlorométhane et les phases organiques résultantes sont lavées deux fois par une solution saturée de NaHCO_3 , séchées sur MgSO_4 et évaporées. Quelques millilitres d'éthanol sont additionnés au brut réactionnel et le mélange est placé au congélateur pendant une nuit. Après filtration du précipité obtenu, 9,20 g (11,2 mmol ; Rdt = 87%) de galactoside bromé **87** sont obtenus sous forme d'un solide blanc.

Rf = 0,6 (Eluant : EP/AcOEt 50/50)

Pf = 69°C

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 6,68 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, H_1) ; 5,50 (d, 1H, $J = 3,0$ Hz, H_4) ; 5,40 (dd, 1H, $J = 10,0$ Hz, $J = 3,0$ Hz, H_3) ; 5,02 (dd, 1H, $J = 4,0$ Hz, $J = 10,0$ Hz, H_2) ; 4,44 (t, 1H, $J = 6,6$ Hz, H_5) ; 4,12 (m, 2H, 2H_6) ; 2,12 - 1,97 (4s, 12H, $12\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

Préparation du composé **88**
 $C_{24}H_{27}NO_{13}$
 $M = 537,15 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide blanc

Rendement = 84%

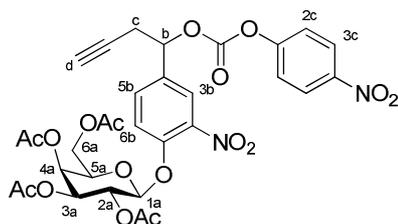
1,00 g (3,70 mmol ; 3,7 éq) de Ag_2CO_3 sont mis en suspension dans 1,5 mL d'acétonitrile anhydre. 190 μ L (0,70 mmol ; 0,7 éq.) de HMTTA sont additionnés et l'agitation est maintenue 2 h à température ambiante. La solution est refroidie à 0°C, 209 mg (1,0 mmol ; 1 éq.) de nitrophénol **51** et 822 mg (2 mmol ; 2 éq.) de galactoside bromé **87** sont additionnés. Le mélange est laissé sous agitation 4h à température ambiante puis filtré sur Célite®. Le filtrat est hydrolysé par une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N et extrait trois fois par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, filtrée et séchée sous vide. Le brut est purifié par flash chromatographie (Eluant : EP/AcOEt 60/40 ; 50/50 ; 40/60) et 453 mg (0,84 mmol ; Rdt = 84%) de galactoside **88** sont obtenus sous forme de solide blanc.

Pf = 71°C

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 7,86 (2d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H_{3b}) ; 7,58 (2dd, 1H, $J = 8,7$ Hz, $J = 2$ Hz, H_{5b}) ; 7,35 (2d, 1H, $J = 8,7$ Hz, H_{6b}), 5,49 (dd, 1H, $J = 8,0$ Hz, $J = 10,5$ Hz, H_{2a}) ; 5,46 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, H_{4a}) ; 5,15 (m, 2H, H_{1a} , H_{3a}) ; 4,92 (2t, 1H, $J = 6,1$ Hz, H_b) ; 4,28 - 4,13 (m, 3H, H_{5a} , $2H_{6a}$) ; 2,63 (dd, 1H, $J = 3,8$ Hz, $J = 6,1$ Hz, H_c) ; 2,20 (s, 3H, $3H_{CH_3COO}$) ; 2,12 (s, 4H, $3H_{CH_3COO}$, H_d) ; 2,07 (s, 3H, $3H_{CH_3COO}$) ; 2,01 (s, 3H, $3H_{CH_3COO}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 170,4 - 170,3 - 170,1 - 169,5 ($4C_{CO}$ acétate) ; 148,5 (C_{1b}) ; 140,8 (C_{2b}) ; 138,9 (C_{4b}) ; 131,3 (C_{5b}) ; 122,6 (C_{3b}) ; 119,1 (C_{6b}) ; 100,4 (C_{1a}) ; 79,8 (C_{alcyne}) ; 71,7 (C_{5a}) ; 71,3 (C_d) ; 70,6 (C_b) ; 70,5 (C_{3a}) ; 67,8 (C_{2a}) ; 66,8 (C_{4a}) ; 61,4 (C_{6a}) ; 29,2 (C_c) ; 20,6 ($4C_{CH_3COO}$).

SMHR (ESI) : $C_{24}H_{27}NO_{13}Na$ $[M+Na]^+$ m/z théorique : 560,1380 m/z trouvé : 560,1381.

Préparation du composé **89**

$$M = 702,57 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide blanc

Rendement = 92%

453 mg (0,84 mmol ; 1 éq.) d'alcool benzylique **88** et 338 mg (1,68 mmol ; 2 éq.) de chloroformiate de *para*-nitrophénol sont mis en solution dans 10 mL de dichlorométhane anhydre. La solution est refroidie à 0°C et 230 µL de pyridine (2,1 mmol ; 2,5 éq.) sont additionnés goutte à goutte. Après 3h d'agitation à température ambiante, le mélange est hydrolysé par ajout d'une solution saturée de NaHCO₃. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite trois fois par du dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Une purification par flash chromatographie (Eluant : EP/AcOEt 60/40 ; 50/50) permet d'isoler 543 mg (0,77 mmol ; Rdt = 92%) de composé activé **89** sous forme de solide blanc.

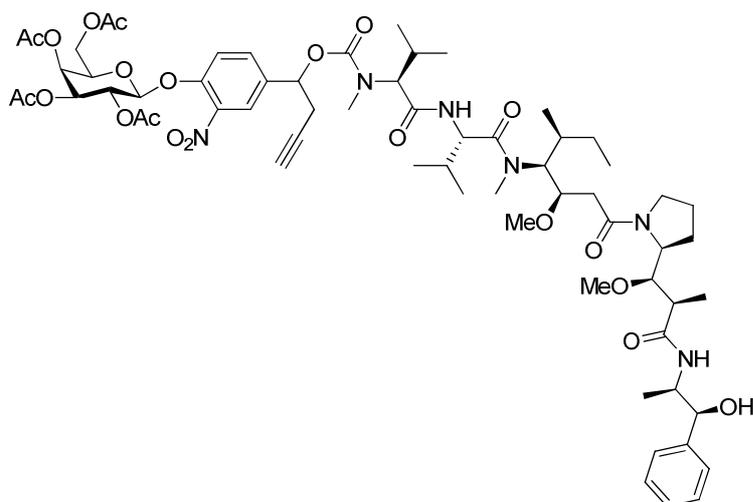
Pf = 94°C

Rf = 0,24 (Eluant : EP/AcOEt 60/40)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 8,22 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz, 2H_{3c}) ; 7,90 (d, 1H, *J* = 2,5 Hz, H_{3b}) ; 7,60 (dd, 1H, *J* = 8,5 Hz, *J* = 2,5 Hz, H_{5b}) ; 7,38 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz, H_{6b}) ; 7,33 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz, 2H_{2c}) ; 5,79 (2t, 1H, *J* = 6,4 Hz, H_b) ; 5,51 (dd, 1H, *J* = 8,0 Hz, *J* = 10,5 Hz, H_{2a}) ; 5,45 (d, 1H, *J* = 3,5 Hz, H_{4a}) ; 5,11 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, H_{1a}) ; 5,09 (dd, 1H, *J* = 3,4 Hz, *J* = 10,5 Hz, H_{3a}) ; 4,25 - 4,08 (m, 3H, H_{5a}, 2H_{6a}) ; 2,88 (m, 2H, 2H_c) ; 2,15 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 2,09 (s, 4H, 3H_{CH₃COO}, H_d) ; 2,03 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 1,98 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 170,3 - 170,2 - 170,1 - 169,3 (4C_{CO} acétate) ; 155,2 (C_{CO} carbonate) ; 151,5 (C_{1c}) ; 149,7 (C_{1b}) ; 145,5 (C_{4c}) ; 141,1 (C_{2b}) ; 133,2 (C_{4b}) ; 132,0 (C_{5b}) ; 125,3 (2C_{3c}) ; 123,6 (C_{3b}) ; 121,7 (2C_{2c}) ; 119,4 (C_{6b}) ; 100,4 (C_{1a}) ; 77,3 (C_b) ; 77,1 (C_{alcyne}) ; 72,5 (C_d) ; 71,5 (C_{5a}) ; 70,5 (C_{3a}) ; 67,8 (C_{2a}) ; 66,7 (C_{4a}) ; 61,4 (C_{6a}) ; 26,2 (C_c) ; 20,6 (4C_{CH₃COO}).

SMHR (ESI) : C₃₁H₃₀N₂O₁₇Na [M+Na]⁺ m/z théorique : 725,1442 m/z trouvé : 725,1449.

Préparation du composé **90**C₆₄H₉₂N₆O₂₁M = 1281,44 g.mol⁻¹

Solide blanc

Rendement = 74%

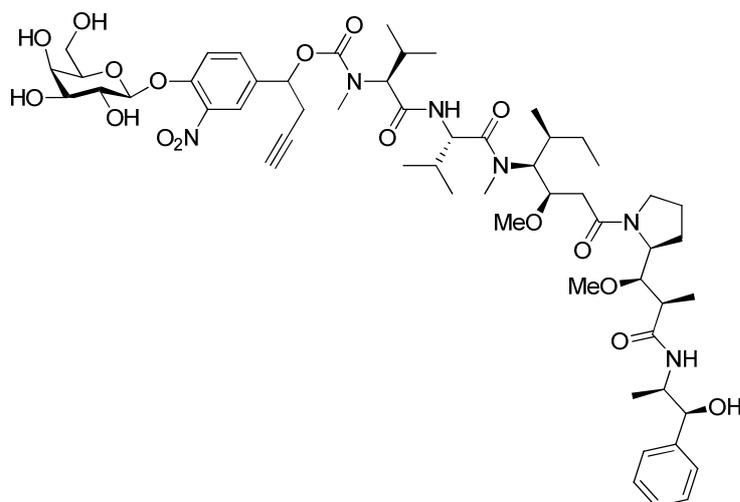
30 mg (0,042 mmol ; 1 éq.) de MMAE et 29,3 mg (0,042 mmol ; 1 éq.) de carbonate activé **89** sont mis en solution dans 1 mL d'un mélange DMF/pyridine 8/2. 5,7 mg (0,042 mmol ; 1 éq.) de HOBt et 8,7 µL (0,050 mmol ; 1,2 éq.) de DIPEA sont additionnés. Le mélange est laissé sous agitation 32h à température ambiante. Le solvant est alors éliminé sous vide. Le brut réactionnel est purifié par flash chromatographie (Eluant : DCM/MeOH 98/2 ; 97/3). 40 mg (0,031 mmol ; Rdt = 74%) de composé **90** sont isolés sous forme de solide blanc.

Tr = 23,44 min (Méthode **B**)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,82-7,79 (2s, 1H) ; 7,51 (2d, *J* = 8,0 Hz, 1H) ; 7,37 - 7,23 (m, 6H) ; 6,52 (m, 1H) ; 5,70 (m, 1H) ; 5,50 (m, 1H) ; 5,45 (m, 1H) ; 5,06 (m, 2H) ; 4,93 (m, 1H) ; 4,70 (m, 1H) ; 4,26-4,03 (m, 7H) ; 3,85 (m, 1H) ; 3,60-3,27 (m, 8H) ; 3,10-2,85 (m, 8H) ; 2,77-2,34 (m, 3H) ; 2,34-1,92 (m, 17H) ; 1,83 (m, 2H) ; 1,77-1,55 (m, 1H) ; 1,30 (m, 1H) ; 1,24 (m, 4H) ; 1,01-0,71 (m, 20H), 0,70-0,54 (m, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 174,7 ; 170,6 ; 170,4 ; 170,3 (2C) ; 170,2 ; 169,7 ; 169,6 ; 169,4 ; 156,0 ; 149,2 ; 141,3 ; 141,1 ; 135,6 ; 135,5 ; 131,8 ; 128,1 ; 127,3 ; 126,4 ; 123,2 ; 119,5 ; 100,7 ; 82,1 ; 78,4 ; 75,9 ; 73,3 ; 71,9 ; 71,5 (2C) ; 70,6 ; 67,9 ; 65,1 ; 61,4 ; 61,0 ; 60,1 ; 58,1 ; 51,7 ; 47,9 ; 45,0 ; 37,7 ; 33,4 ; 29,8 ; 26,7 ; 26,2 ; 25,8 ; 25,1 ; 25,0 ; 20,7 (2C) ; 20,6 ; 19,4 ; 18,6 ; 16,0 ; 14,5 ; 14,0 ; 11,0.

SMHR (ESI) : C₆₄H₉₂N₆O₂₁Na [M+Na]⁺ m/z théorique : 1303,62077 m/z trouvé : 1303,6211.

Préparation du composé 91C₅₆H₈₄N₆O₁₇NaM = 1113,30 g.mol⁻¹

Solide blanc

Rendement = 97%

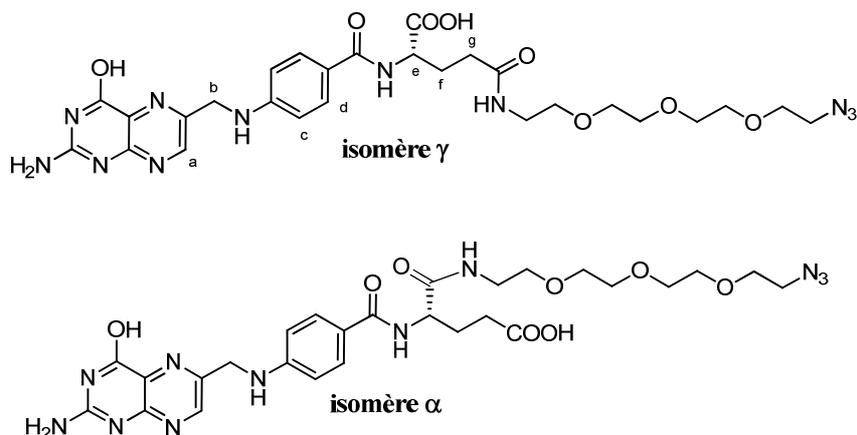
40 mg (0,031 mmol ; 1 éq.) de galactoside protégé **90** sont dissouts dans 2 mL de MeOH. Une solution de 11 mg (0,262 mmol ; 8,8 éq.) de LiOH monohydraté dans 2 mL d'eau est additionnée lentement à 0°C. Après 20 minutes d'agitation le milieu est neutralisé par de la résine acide IRC50, filtré et évaporé. Le brut est purifié par flash chromatographie (Eluant : DCM/MeOH 97/3 ; 95/5 ; 90/10) et 34 mg (0,030 mmol ; Rdt = 97%) de composé **91** sont obtenus sous forme de solide blanc.

Tr = 16,61 et 16,83 min (Méthode **B**)

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD, δ ppm) : 7,86 (m, 1H) ; 7,63 (m, 1H) ; 7,49-7,23 (m, 6H) ; 5,80 (m, 1H) ; 5,01 (m, 1H) ; 4,90 (m, 1H, partiellement masqué par le signal du méthanol résiduel) ; 4,80-4,51 (m, 2H) ; 4,62-4,17 (m, 3H) ; 3,90-3,73 (m, 7H) ; 3,73-3,41 (m, 2H) ; 3,39 (m, 2H) ; 3,38-3,34 (m, 4H) ; 3,30-3,24 (m, 4H) ; 3,12 (m, 1H) ; 3,06-2,94 (m, 3H) ; 2,91 (m, 1H) ; 2,81 (m, 3H) ; 2,50-2,21 (m, 2H) ; 2,49-1,95 (m, 2H) ; 1,95-1,65 (m, 3H) ; 1,65-1,20 (m, 3H) ; 1,25-1,10 (m, 6H) ; 1,01-0,79 (m, 17H) ; 0,61 (m, 1H).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD, δ ppm) : 175,8 ; 175,5 ; 171,8 ; 151,3 ; 144,1 ; 143,8 ; 141,8 ; 135,3 ; 132,9 ; 129,3 ; 128,6 ; 128,4 ; 128,1 ; 127,9 ; 124,0 ; 118,8 ; 103,0 ; 86,7 ; 83,5 ; 79,5 ; 77,4 ; 75,2 ; 74,9 ; 72,5 ; 71,9 ; 70,2 ; 66,0 ; 62,4 ; 62,0 ; 61,6 ; 60,8 ; 60,6 ; 58,6 ; 58,4 ; 51,3 ; 50,8 ; 48,1 ; 45,9 ; 45,5 ; 33,9 ; 33,7 ; 33,1 ; 30,8 ; 30,4 ; 27,0 ; 26,6 ; 25,9 ; 25,6 ; 24,5 ; 19,7 ; 19,4 ; 19,0 ; 18,8 ; 16,9 ; 16,3 ; 16,1 ; 16,0 ; 15,8 ; 15,1 ; 10,9.

SMHR (ESI) : C₅₆H₈₄N₆O₁₇Na [M+Na]⁺ m/z théorique : 1135.57852 m/z trouvé : 1135.5785.

Préparation du composé **93**C₂₇H₃₅N₁₁O₈M = 641,27 g.mol⁻¹

Solide jaune

Rendement = 30%

600 mg (1,26 mmol ; 1 éq.) d'acide folique dihydrate sont solubilisés dans 10 mL de pyridine et 20 mL de DMSO. 300 µL (1,51 mmol ; 1,2 éq.) du composé **72a** et 650 mg (3,15 mmol ; 2,5 éq.) de DCC sont additionnés. Après une nuit d'agitation, le mélange est filtré et le filtrat est additionné goutte à goutte, sous agitation, sur 400 mL d'éther diéthylique à 0°C. Le précipité jaune formé est récupéré par filtration, lavé par de l'éther diéthylique et purifié par HPLC semi-préparative (Méthode **4**). 240 mg (0,373 mmol ; Rdt = 30%) d'azoture **93** sont obtenus sous forme de solide jaune après lyophilisation (2 régioisomères α/γ : 3/7).

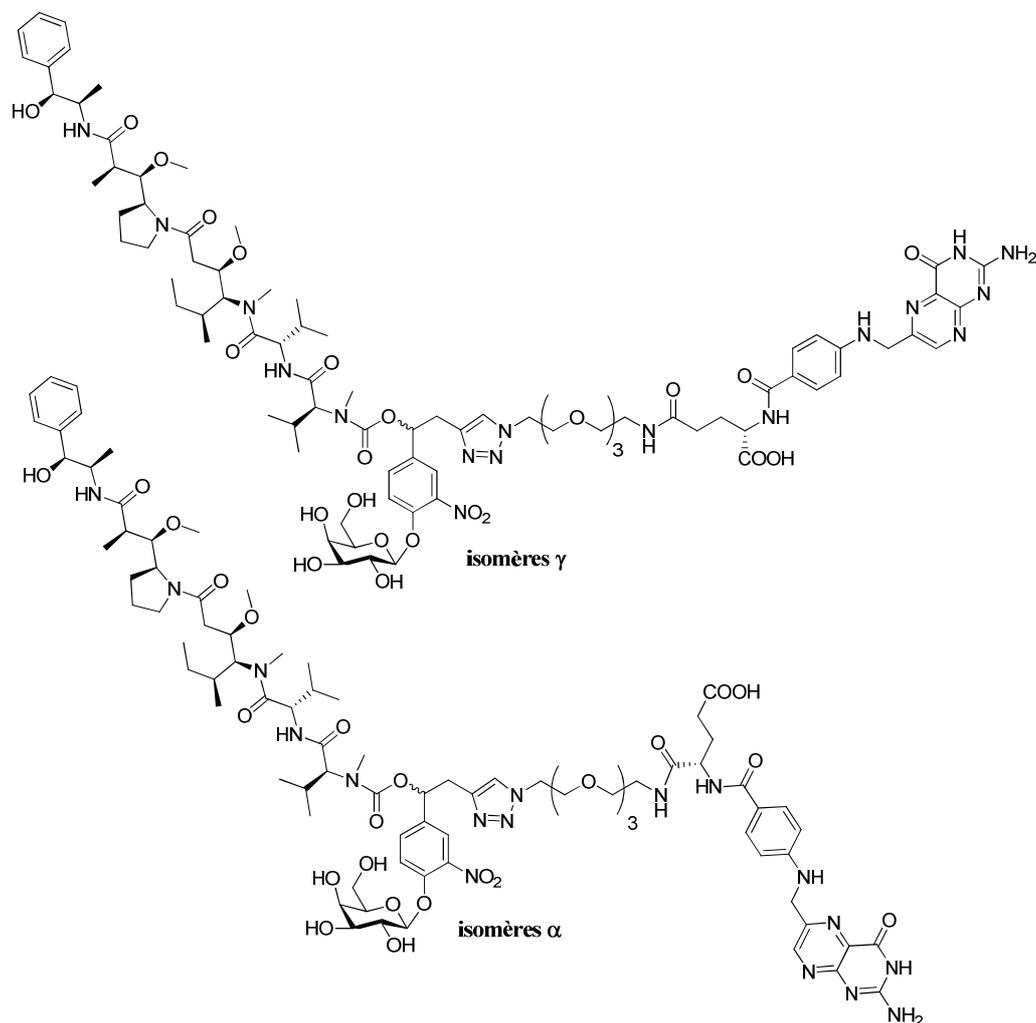
Pf = 205°C (décomposition)

Tr = 8,54 et 8,91 min (Méthode **B**)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) : 8,69 (s, 1H, H_a) ; 7,99 (d, 1H, J = 8,3 Hz, H_{NH}) ; 7,89 (t, 1H, J = 5,6 Hz, H_{NH}) ; 7,68 (d, 2H, J = 9,7 Hz, 2H_d) ; 7,19 (sl, 1H, H_{NH}) ; 6,66 (d, 2H, J = 9,7 Hz, 2H_c) ; 4,53 (s, 2H, 2H_b) ; 4,40 (m, 1H, H_e) ; 3,72 - 3,19 (m, 19H, 16H_{PEG}, 2H_{NH2}, H_{NH}) ; 2,30 - 2,20 (m, 2H, 2H_g) ; 2,11 - 1,82 (m, 2H, 2H_f).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) : 175,0 - 172,7 - 167,2 - 161,6 - 155,8 - 154,4 - 151,6 - 150,1 (7C_{aro quat.} ; 2C_{CO amide} ; C_{CO acide carboxylique}) ; 149,3 (C_a) ; 130,0 (2C_d) ; 129,9 (C_{quat.}) ; 122,3 (C_{quat.}) ; 112,1 (2C_c) ; 70,7 - 70,1 (6C_{PEG}) ; 53,5 (C_e) ; 50,9 (C_{PEG}) ; 46,8 (C_b) ; 39,5 (C_{PEG}) ; 31,4 (C_g) ; 27,9 (C_f).

SMHR (ESI) : C₂₇H₃₄N₁₁O₈ [M-H]⁻ m/z théorique : 640,25973 m/z trouvé : 640,2586.

Préparation du composé **85**

$$\text{C}_{83}\text{H}_{119}\text{N}_{17}\text{O}_{25}$$

$$M = 1754,93 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide blanc

Rendement = 27%

34 mg (0,030 mmol ; 1 éq.) de galactoside **91** et 18 mg (0,028 mmol ; 0,93 éq.) du dérivé de l'acide folique **93** sont solubilisés dans 1,2 mL de DMSO et 0,12 mL d'eau. 5,7 mg (0,023 mmol ; 0,77 éq.) de $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ et 11,9 mg (0,060 mmol ; 2 éq.) d'ascorbate de sodium sont ajoutés et le mélange est laissé sous agitation pendant 20h. Une solution de 30 mg (0,120 mmol ; 4 éq.) d'EDTA disodique dans 1 mL d'eau est ensuite additionnée pour complexer le cuivre. La solution verte ainsi obtenue est diluée par 2 mL de MeOH et transvasée dans un erlenmeyer. L'ajout d'un gros volume d'éther diéthylique permet la précipitation d'un mélange de vecteur, d'EDTA et de cuivre. Le précipité est récupéré par

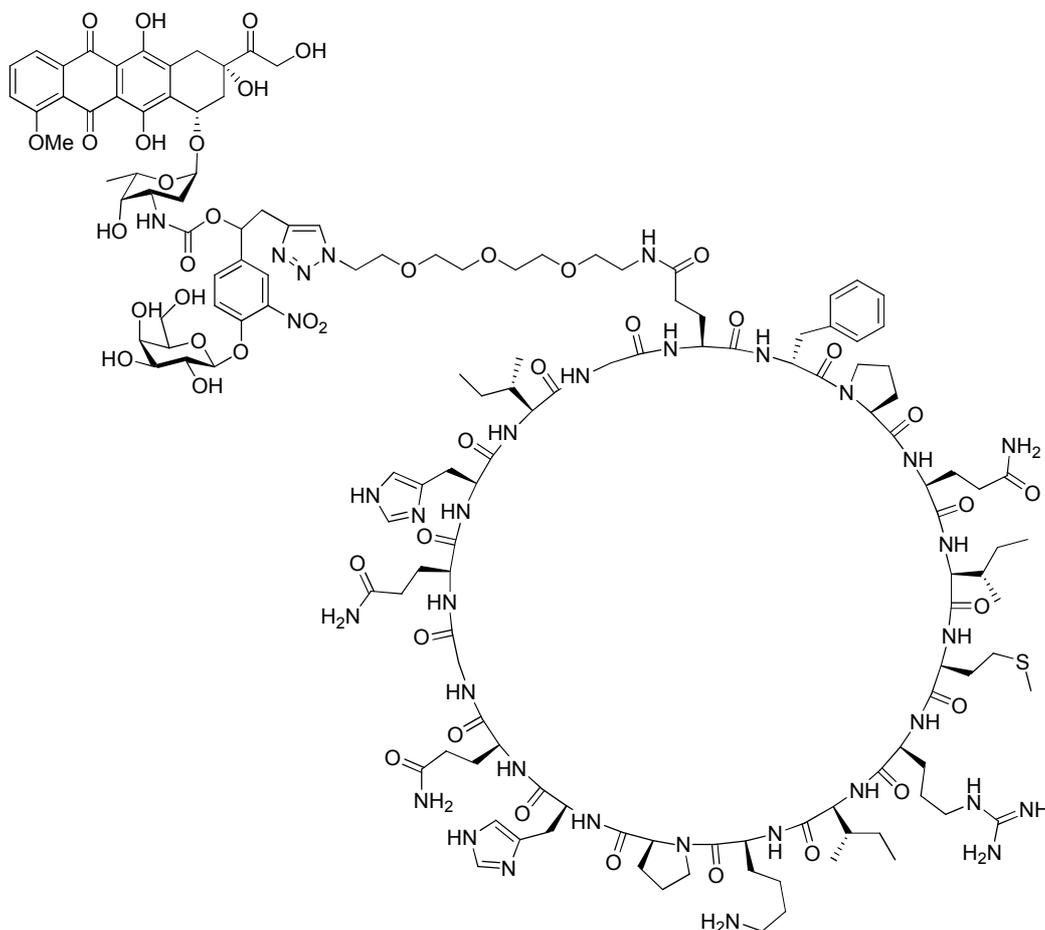
filtration puis lavé par de l'eau pour éliminer le cuivre et l'EDTA. 33 mg (0,019 mmol ; Rdt = 63%) de solide jaune sont récupérés avec une pureté de 93%. Une purification par technique de chromatographie semi-préparative (Méthode **5**) permet d'obtenir le vecteur galactosylé **85** sous la forme de quatre isomères avec une pureté supérieure à 97% (9,1 mg ; 0,0082 mmol ; Rdt = 27%).

Tr = 12,29 min (Méthode **B**)

RMN ¹H (400 MHz, DMSO, δ ppm) : 8,64 (m, 1H) ; 8,16-7,50 (m, 7H) ; 7,50-6,75 (m, 7H) ; 6,63 (m, 1H) ; 6,60-4,89 (m, 4H) ; 4,80-3,90 (m, 11H) ; 3,90-2,60 (m, 46H) ; 2,50-1,65 (m, 14H) ; 1,51 (m, 2H) ; 1,40-0,45 (m, 25H).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO, δ ppm) : 174,1 ; 172,3 ; 171,7 ; 168,7 ; 166,2 ; 150,7 ; 149,1 ; 148,5 ; 143,6 ; 139,7 ; 129,0 ; 128,9 ; 127,7 ; 127,7 ; 126,6 ; 126,3 ; 123,4 ; 121,3 ; 111,1 ; 103,0 ; 101,2 ; 75,6 ; 74,7 ; 73,3 ; 69,9 ; 69,6 ; 69,0 ; 68,9 ; 67,9 ; 62,9 ; 60,9 ; 60,2 ; 60,1 ; 58,6 ; 57,1 ; 52,6 ; 49,7 ; 49,2 ; 45,9 ; 43,1 ; 38,5 ; 32,0 ; 31,5 ; 30,5 ; 27,0 ; 26,7 ; 25,3 ; 24,3 ; 23,1 ; 18,6 ; 18,4 ; 18,3 (2C) ; 15,4 ; 15,3 ; 14,9 ; 10,3.

SMHR (ESI) : C₈₃H₁₁₈N₁₇O₂₅ [M-H]⁻ m/z théorique : 1752.84903 m/z trouvé : 1752.8493.

Préparation du composé **94a**

$$\text{C}_{142}\text{H}_{202}\text{N}_{34}\text{O}_{45}\text{S}$$

$$M = 3137,39 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

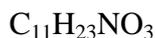
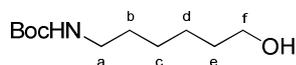
Solide rouge

Rendement = 22%

14,6 mg (6,64 μmol ; 1 éq.) du dérivé de CBO-P11 **96** et 5 mg (5,31 μmol ; 0,8 éq.) d'alcyne **95** sont dissouts dans un mélange comprenant 0,15 mL d'une solution de sulfate de cuivre (4,4 mg/mL ; 2,66 μmol ; 0,4 éq.), 0,15 mL d'une solution d'ascorbate de sodium (17,5 mg/mL ; 13,3 μmol ; 2 éq.) et 0,15 mL de *tert*-butanol. Après 24h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé sous vide. Le résidu obtenu est lavé trois fois par 0,5 mL de THF puis le cuivre est complexé par 0,3 mL d'une solution saturée d'EDTA disodique dans le tampon phosphate (0,2 M ; pH = 7) pendant 2h30. Le solide rouge en suspension est récupéré par filtration puis purifié par HPLC semi-préparative (méthode **3**). 3,6 mg (1,15 μmol ; Rdt = 22%) de vecteur **94a** sont obtenus sous forme de solide rouge après lyophilisation.

Tr = 14,4 min. (méthode **D**)

SM (MALDI-TOF) : $C_{142}H_{203}N_{34}O_{45}S$ $[M+H]^+$ m/z théorique : 3136,4 m/z trouvé : 3137,4.

Préparation du *tert*-butyl-carbamate d'hexan-6-ol **99**

$$M = 217,31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Huile jaune pâle

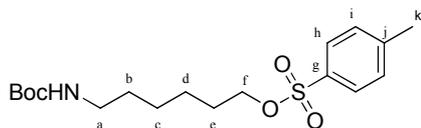
Rendement = quantitatif

1,17 g (10 mmol ; 1 éq.) de 6-aminohexanol et 2,18 g (10 mmol ; 1 éq.) de Boc_2O sont mis en solution dans 33 mL d'acétonitrile et 8 mL de dichlorométhane. Une quantité catalytique de DMAP est alors ajoutée et le mélange est laissé sous agitation 2h30 jusqu'à disparition totale de l'amine de départ. Le mélange est dilué par 50 mL d'eau puis extrait trois fois au dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO_4 et évaporée à pression réduite. L'alcool **99** est obtenu de manière quantitative (2,16 g ; 9,94 mmol) sous forme d'une huile jaune pâle sans purification.

R_f : 0,49 (Eluant : AcOEt/EP 50 / 50).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 4,53 (sl, 1H, H_{NH}) ; 3,61 (t, 2H, $J = 5,90$ Hz, 2H_f) ; 3,10 (m, 2H, 2H_a) ; 1,64 (sl, 1H, H_{OH}) ; 1,55 (q, 2H, $J = 6,78$ Hz, 2H_e) ; 1,46 (2H, m, 2H_b) ; 1,42 (9H, s, $9\text{H}_{t\text{-Bu}}$) ; 1,39 - 1,29 (4H, m, 2H_c , 2H_d).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 156,2 (C_{CO} carbamate) ; 79,2 ($\text{C}_{\text{quat. } t\text{-Bu}}$) ; 62,8 (C_f) ; 40,4 (C_a) ; 32,7 (C_f) ; 30,2 (C_e) ; 28,5 ($3\text{C}_{\text{CH}_3 t\text{-Bu}}$) ; 26,5 (C_c) ; 25,4 (C_d).

Préparation du composé 100

$$M = 371,49 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Huile incolore

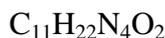
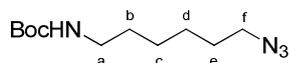
Rendement = 92%

1,93 g (10,12 mmol ; 1,1 éq.) de chlorure de tosylo sont solubilisés dans 65 mL de dichlorométhane. Cette solution est refroidie à 0°C. 1,32 mL (9,20 mmol ; 1 éq.) de triéthylamine et une solution de 2 g (9,20 mmol ; 1 éq.) d'alcool primaire **99** dans 10 mL de dichlorométhane sont ajoutés lentement. Après 24h d'agitation, 1,93 g (10,12 mmol ; 1,1 éq.) de chlorure de tosylo et 1,32 mL (9,20 mmol ; 1 éq.) de triéthylamine sont à nouveau additionnés afin de compléter la réaction. Après 27h d'agitation, la réaction est stoppée par ajout d'eau. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite trois fois par du dichlorométhane. Les phases organiques résultantes sont séchées sur MgSO_4 et évaporées sous pression réduite. Une purification par flash chromatographie du brut réactionnel (Eluant : EP/AcOEt 90/10 ; 75/25) permet d'obtenir 3,14 g (8,45 mmol ; Rdt = 92%) de tosylate **100** sous forme d'huile incolore.

R_f : 0,33 (Eluant : EP/AcOEt 80/20).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,78 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, 2H_h) ; 7,34 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz, 2H_i) ; 4,49 (sl, 1H, H_{NH}) ; 4,00 (t, 2H, $J = 6,46$ Hz, 2H_f) ; 3,06 (m, 2H, 2H_a) ; 2,45 (s, 3H, 3H_k) ; 1,62 (m, 4H, 2H_b, 2H_e) ; 1,43 (s, 9H, 9H_{t-Bu}) ; 1,23 - 1,34 (m, 4H, 2H_c, 2H_d).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 156,3 (C_{CO} carbamate) ; 144,8 (C_j) ; 133,3 (2C_h) ; 130,0 (2C_i) ; 128,0 (C_g) ; 79,2 (C_{quat. t-Bu}) ; 70,6 (C_f) ; 40,5 (C_a) ; 30,0 - 28,9 (2C_{CH2}) ; 28,5 (3C_{CH3 t-Bu}) ; 26,2 - 25,2 (2C_{CH2}) ; 21,8 (C_k).

Préparation du *tert*-butyl-carbamate de 6-azidohexane **101**

$$M = 242,32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Huile incolore

Rendement = 93%

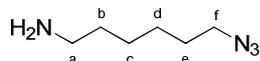
2,80 g (7,53 mmol ; 1 éq.) de tosylate **100** sont mis en solution dans 21 mL de DMF. 5,87 g (90,36 mmol ; 12 éq.) d'azoture de sodium sont additionnés et le mélange est porté à 55°C pendant 2h30 jusqu'à disparition totale du composé de départ. Le milieu réactionnel est alors dilué par 200 mL d'eau puis extrait trois fois par de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont lavées deux fois par de l'eau, une fois par une solution saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ puis évaporées. 1,69 g (6,97 mmol ; Rdt = 93%) d'azoture **101** sont isolés sans purification sous forme d'huile incolore.

R_f : 0,49 (Eluant : AcOEt/EP 90/10).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 4,51 (s, 1H, H_{NH}) ; 3,26 (t, 2H, *J* = 3,3 Hz, 2H_f) ; 3,11 (m, 2H, 2H_a) ; 1,63 - 1,56 (m, 4H, 2H_b, 2H_d) ; 1,50 - 1,31 (m, 13H, 9H_{*t*-Bu}, 2H_c, 2H_e).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 156,1 (C_{CO} carbamate) ; 79,1 (C_{quat. *t*-Bu}) ; 51,4 (C_f) ; 40,5 (C_a) ; 30,0 - 28,8 (2C_{CH₂}) ; 28,4 (3C_{CH₃ *t*-Bu}) ; 26,4 - 26,3 (2C_{CH₂}).

Préparation du 6-azidohexanamine **102**



$$M = 142,20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Huile jaune

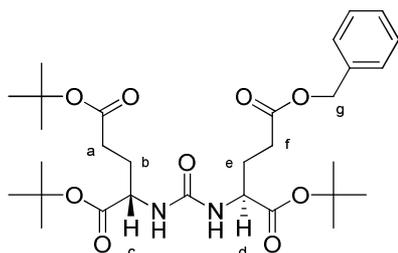
Rendement = 95%

1,5 g (6,19 mmol ; 1 éq.) d'azoture **101** sont mis en solution dans 1,7 mL de dichlorométhane. 3 mL d'acide trifluoroacétique sont alors ajoutés lentement. Après 1h30 d'agitation à température ambiante, l'amine est totalement déprotégée. 25 mL d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 5M sont ajoutés à 0°C puis l'agitation est maintenue 10 minutes. Les deux phases sont alors séparées. Après trois extractions de la phase aqueuse par du dichlorométhane, les phases organiques sont lavées par une solution saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄ et évaporées à pression réduite. 838 mg (5,89 mmol ; Rdt = 95%) de composé **102** sont obtenus sans purification sous forme d'huile jaune.

R_f : 0,28 (Eluant : DCM/MeOH 90/10).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 3,25 (t, 2H, *J* = 6,9 Hz, 2H_f) ; 2,68 (t, 2H, *J* = 6,9 Hz, 2H_a) ; 1,60 (m, 4H, 2H_{NH2}, 2H_{CH2}) ; 1,40 (m, 6H, 6H_{CH2}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 51,4 (C_f) ; 42,0 (C_a) ; 33,5 - 28,8 - 26,6 - 26,4 (4C_{CH2}).

Préparation du composé **105**

$$M = 578,69 \text{ g.mol}^{-1}$$

Huile visqueuse incolore

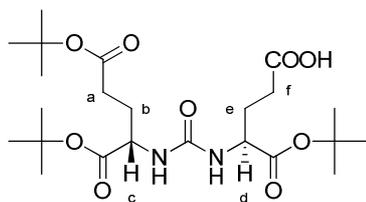
Rendement = 83%

A une solution de 300 mg (1,014 mmol ; 1 éq.) de L-glutamate **103** dans 5 mL de dichlorométhane refroidie à -78°C , sont ajoutées une solution de 99 mg (0,335 mmol ; 0,33 éq.) de trisphosgène dans 2,5 mL de dichlorométhane et 340 μL (2,43 mmol ; 2,4 éq.) de triéthylamine. Après 2h d'agitation à -78°C , une solution de 368 mg (1,115 mmol ; 1,1 éq.) de L-glutamate **104** dans 2 mL de dichlorométhane et 200 μL (1,42 mmol ; 1,4 éq.) de triéthylamine sont additionnées. Le milieu réactionnel est alors porté à température ambiante et laissé sous agitation toute la nuit. Le mélange est hydrolysé par ajout de 10 mL d'une solution aqueuse de HCl 1N. Les phases sont séparées puis la phase organique est lavée deux fois par une solution saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis évaporée sous pression réduite. Une purification par chromatographie flash du brut réactionnel (Eluent : EP/AcOEt 85/15) permet d'isoler 485 mg (0,838 mmol ; Rdt = 83%) du composé **105** sous forme d'une huile incolore extrêmement visqueuse.

R_f : 0,40 (Eluent : EP/AcOEt 80/20).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,33 (m, 5H, 5H_{aromatique}) ; 5,11 (d, 2H, $J = 2,05$ Hz, 2H_g) ; 5,06 (m, 2H, 2H_{NH urée}) ; 4,35 (m, 2H, H_c, H_d) ; 2,53 – 2,02 (m, 6H, 6H_{CH2}) ; 1,89 (m, 2H, 2H_{CH2}) ; 1,45 (s, 9H, 9H_{t-Bu}) ; 1,44 (s, 9H, 9H_{t-Bu}) ; 1,43 (s, 9H, 9H_{t-Bu}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 173,1 - 172,6 - 172,0 - 171,9 (4C_{CO ester}) ; 156,8 (C_{CO urée}) ; 136,0 - 128,7 - 128,4 (6C_{aro.}) ; 82,4 - 82,3 - 80,7 (3C_{quat. tert-butyl}) ; 66,6 (C_g) ; 53,2 - 53,1 (C_c, C_d) ; 31,7 - 30,5 - 28,6 - 28,5 (C_a, C_b, C_e, C_f) ; 28,2 - 28,1 (9C_{CH3 tert-butyl}).

Préparation du composé **106**

$$M = 488,57 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Huile visqueuse incolore

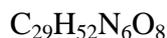
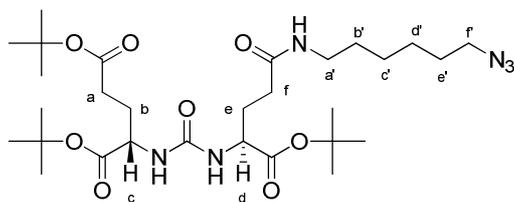
Rendement = 97%

400 mg (0,691 mmol ; 1 éq.) d'ester de benzyle **105** sont mis en solution dans 4,5 mL de dichlorométhane. Une quantité catalytique de Pd/C 10% est ajoutée et le milieu réactionnel est placé sous atmosphère d'hydrogène. Après 17h d'agitation à température ambiante, le mélange est filtré sur Célite[®] et le solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite. 328 mg (0,671 mmol ; Rdt = 97%) de composé déprotégé **106** sont obtenus, sans purification, sous forme d'une huile incolore visqueuse.

R_f : 0,52 (Éluant : DCM/MeOH 90/10).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 5,95 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz, H_{NH} urée) ; 5,48 (d, 1H, *J* = 8,3 Hz, H_{NH} urée) ; 4,45 (m, 1H, H_c ou d) ; 4,31 (m, 1H, H_c ou d) ; 2,43 – 2,24 (m, 4H, 4H_{CH2}) ; 2,12 (m, 2H, 2H_{CH2}) ; 1,86 (m, 2H, 2H_{CH2}) ; 1,48 (s, 9H, 9H_{tert-butyl}) ; 1,45 (s, 9H, 9H_{tert-butyl}) ; 1,43 (s, 9H, 9H_{tert-butyl}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 175,8 - 173,3 - 172,6 - 171,8 (3C_{CO} ester, C_{CO} acide carboxylique) ; 158,1 (C_{CO} urée) ; 82,9 - 82,4 - 80,9 (3C_{quat. tert-butyl}) ; 53,6 - 53,2 (C_c, C_d) ; 31,7 - 30,7 - 28,5 (C_a, C_b, C_e, C_f) ; 28,2 - 28,1 (9C_{tert-butyl}).

Préparation du composé **107**

$$M = 612,76 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Huile incolore visqueuse

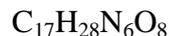
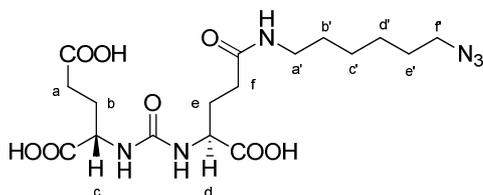
Rendement = 58%

169 mg (0,346 mmol ; 1 éq.) d'acide carboxylique **106** et 59 mg (0,415 mmol ; 1,2 éq.) d'amine **102** sont mis en solution dans 1 mL de DMF. Cette solution est refroidie à 0°C puis 64 mg (0,415 mmol ; 1,2 éq.) de EDC et une quantité catalytique de DMAP sont ajoutés. Après une nuit d'agitation à température ambiante, l'acide carboxylique est entièrement consommé et le DMF est éliminé par évaporation sous pression réduite. Le résidu est dilué par du dichlorométhane et la phase organique est lavée trois fois par de l'eau, une fois par une solution saturée de NaHCO₃, séchée sur MgSO₄ puis évaporée sous pression réduite. Une chromatographie flash du brut (Eluant : EP/AcOEt 50/50) permet d'isoler 123 mg (0,201 mmol ; Rdt = 58%) d'amide **107** sous forme d'une huile incolore extrêmement visqueuse.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : En cours.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : En cours.

SMHR (ESI) : C₂₉H₅₂N₆O₈Na [M+Na]⁺ m/z théorique : 635,37388 m/z trouvé : 635,3740 ;
C₂₉H₅₃N₆O₈ [M+H]⁺ m/z théorique : 613,39194 m/z trouvé : 613,3903 ; C₂₉H₅₂N₆O₈K [M+K]⁺ m/z théorique : 635,34782 m/z trouvé : 635,3486.

Préparation du composé **108**

$$M = 444,44 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Huile visqueuse

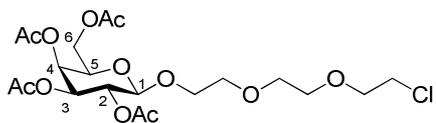
Rendement = 97%

195 mg (0,32 mmol ; 1 éq.) d'amide protégé **107** sont mis en solution dans 5 mL de dichlorométhane. La solution est refroidie à 0°C et 5 mL d'acide trifluoroacétique sont additionnés goutte à goutte. Après 5h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé sous vide et 140 mg (0,31 mmol ; Rdt = 97%) de DUPA déprotégé **108** sont obtenus sans purification.

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) : 12,52 (sl, 3H, H_{COOH}) ; 7,80 (t, 1H, $J = 5,5$ Hz, $\text{H}_{\text{NH amide}}$) ; 6,34 (t, 2H, $J = 8,4$ Hz, $\text{H}_{\text{NH urée}}$) ; 4,08 (m, 2H, H_c, H_d) ; 3,30 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz, 2H_f) ; 3,00 (m, 2H, $2\text{H}_{a'}$) ; 2,24 ; 2,09 ; 1,90 ; 1,70 (4m, 8H, $2\text{H}_a, 2\text{H}_b, 2\text{H}_e, 2\text{H}_f$) ; 1,50 (m, 2H, $2\text{H}_{e'}$) ; 1,39–1,23 (m, 6H, $2\text{H}_{b'}, 2\text{H}_{c'}, 2\text{H}_{d'}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) : 174,2 - 174,1 - 173,7 - 171,0 (3C_{CO} acide carboxylique, $\text{C}_{\text{CO amide}}$) ; 157,3 ($\text{C}_{\text{CO urée}}$) ; 52,1 - 51,6 (C_c, C_d) ; 50,6 (C_f) ; 38,4 ($\text{C}_{a'}$) ; 31,6 - 29,9 - 28,9 - 28,3 - 28,2 - 27,5 - 25,9 - 25,8 (8C_{CH_2}).

HRMS :

Préparation du composé **113**

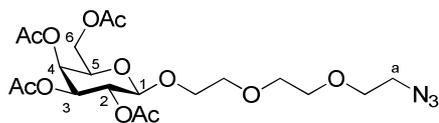
$C_{20}H_{31}ClO_{12}$
 $M = 498,91 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 Huile incolore
 Rendement = 31%

1,67 g (4,28 mmol ; 1 éq.) de pentaacétate de β -D-galactose sont mis en solution dans 20 mL de dichlorométhane anhydre. 930 μL (6,4 mmol ; 1,5 éq.) de 2-[2-(chloroéthoxy)éthoxy]éthanol et 2,7 mL de $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ sont additionnés successivement. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le milieu est hydrolysé par une solution saturée de NaHCO_3 puis extrait trois fois au dichlorométhane. Les phases organiques sont alors séchées sur MgSO_4 puis évaporées. Une chromatographie flash du brut réactionnel (Eluant : EP/AcOEt 50/50) permet d'isoler 661 mg (1,32 mmol ; Rdt = 31%) de galactoside **113** d'anométrie β sous forme d'huile incolore.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 5,31 (dd, 1H, $J = 3,4 \text{ Hz}$, $J = 1,0 \text{ Hz}$, H_4) ; 5,12 (dd, 1H, $J = 10,5 \text{ Hz}$, $7,9 \text{ Hz}$, H_2) ; 4,95 (dd, 1H, $J = 10,5 \text{ Hz}$, $J = 3,4 \text{ Hz}$, H_3) ; 4,51 (d, 1H, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H_1) ; 4,06 (m, 2H, 2H_6) ; 3,88 (m, 2H, H_5 , H_{PEG}) ; 3,69 (m, 3H, 3H_{PEG}) ; 3,58 (m, 8H, 8H_{PEG}) ; 2,08 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 1,99 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 1,97 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 1,91 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 170,3 - 170,2 - 170,1 - 169,4 ($4\text{C}_{\text{CO acétate}}$) ; 101,3 (C_1) ; 71,3 - 70,9 - 70,6 - 70,3 (C_3 , C_5 , 4C_{PEG}) ; 69,0 (C_{PEG}) ; 68,8 (C_2) ; 67,1 (C_4) ; 61,3 (C_6) ; 42,8 (C_{PEG}) ; 20,7 - 20,6 - 20,5 ($4\text{C}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

Préparation du composé **114**



$$M = 505,47 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

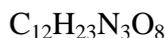
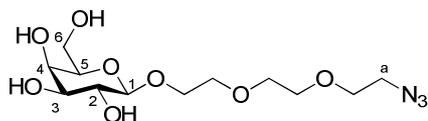
Huile incolore

Rendement = 92%

487 mg (0,98 mmol ; 1 éq.) de galactoside **113**, 317 mg (4,88 mmol ; 5 éq.) de NaN_3 et 724 mg (1,96 mmol ; 2 éq.) de TBAI sont mis en solution dans 3 mL de DMF. Après 12h de chauffage à 80°C , le mélange est dilué par de l'acétate d'éthyle, la phase organique est lavée trois fois par de l'eau, séchée sur MgSO_4 , puis évaporée. Une chromatographie flash du brut (Eluant : EP/AcOEt 40/60) permet d'isoler 455 mg (0,90 mmol ; Rdt = 92%) d'azoture **114** sous forme d'huile incolore.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 5,38 (dd, 1H, $J = 3,4 \text{ Hz}$, $J = 1,0 \text{ Hz}$, H_4) ; 5,21 (dd, 1H, $J = 10,5 \text{ Hz}$, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H_2) ; 5,02 (dd, 1H, $J = 10,5 \text{ Hz}$, $J = 3,4 \text{ Hz}$, H_3) ; 4,57 (d, 1H, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H_1) ; 4,15 (m, 2H, 2H_6) ; 3,94 (m, 2H, 2H_{PEG}) ; 3,75 (m, 1H, H_5) ; 3,65 (m, 8H, 8H_{PEG}) ; 3,40 (t, 2H, $J = 5,1 \text{ Hz}$, 2H_a) ; 2,15 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 2,06 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 2,05 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 1,98 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 170,1 - 170,0 - 169,9 - 169,2 (4C_{CO} acétate) ; 101,1 (C_1) ; 70,7 - 70,5 - 70,4 - 70,1 - 69,8 - 68,8 - 68,6 - 66,8 (C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , 5C_{PEG}) ; 61,1 (C_6) ; 50,4 (C_{PEG}) ; 20,8 - 20,5 - 20,4 - 20,3 ($4\text{C}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

Préparation du composé **115**

$$M = 337,33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Huile incolore

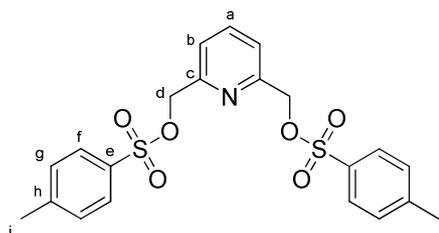
Rendement = 91%

258 mg (0,510 mmol ; 1 éq.) de galactoside acétylé **114** sont mis en solution dans 5,1 mL de méthanol. La solution est refroidie à 0°C et 55 mg (1,021 mmol ; 2 éq.) de MeONa sont additionnés. Après 2h d'agitation à 0°C, le mélange est neutralisé par ajout de résine acide IRC50, filtré puis évaporé. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie flash (Eluant : DCM/MeOH 90/10). 156 mg (0,462 mmol ; Rdt = 91%) de galactoside déprotégé **115** sont obtenus sous forme d'huile incolore.

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD , δ ppm) : 4,28 (d, 1H, $J = 7,3$ Hz, H_1) ; 4,03 (m, 1H, $\text{H}_{\text{sucré}}$) ; 3,85 (m, 1H, $\text{H}_{\text{sucré}}$) ; 3,72 (m, 11H, 10H_{PEG} , $1\text{H}_{\text{sucré}}$) ; 3,52 (m, 3H, $3\text{H}_{\text{sucré}}$) ; 3,42 (t, 2H, $J = 5,0$ Hz, H_a).

RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ ppm) : 103,6 (C_1) ; 74,5 - 73,5 ($2\text{C}_{\text{sucré}}$) ; 71,4 (C_{CH_2}) ; 71,3 ($\text{C}_{\text{sucré}}$) ; 70,6 - 70,4 - 70,0 - 68,8 (4C_{CH_2}) ; 68,1 ($\text{C}_{\text{sucré}}$) ; 61,2 - 50,6 (2C_{CH_2}).

SM (ESI) : $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z théorique : 360,1 m/z trouvé : 360,4.

Préparation du composé **146**

$$M = 447,52 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide blanc

Rendement = 79%

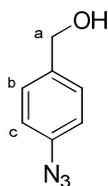
500 mg (3,59 mmol ; 1 éq.) de 2,6-bis(hydroxyméthyl)pyridine sont mis en suspension dans 12 mL de dichlorométhane. 12 mL d'une solution aqueuse de KOH à 40% sont ajoutés à 0°C. Après 20 minutes d'agitation, 2,05 g (10,77 mmol ; 3 éq) de chlorure de tosylo sont additionnés par petites portions. Après 8h d'agitation à température ambiante, le mélange est dilué par de l'eau et du dichlorométhane. La phase aqueuse est extraite trois fois par du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 et évaporées. Le brut réactionnel est purifié par flash chromatographie (Eluant : EP/AcOEt 70/30 ; 50/50). 1,27 g (2,85 mmol ; Rdt = 79%) de composé **146** sont isolés sous forme de solide blanc.

Rf = 0,81 (Eluant : EP/AcOEt 50/50)

Pf = 123°C

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 7,80 (m, 4H, 4H_f) ; 7,69 (t, 1H, $J = 7,82$ Hz, H_a) ; 7,33 (m, 6H, 4H_g, 2H_b) ; 5,05 (s, 4H, 4H_d) ; 2,44 (s, 6H, 6H_i).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 153,7 (2C_c) ; 145,3 (2C_h) ; 138,0 (C_a) ; 132,9 (2C_e) ; 130,1 (4C_g) ; 128,2 (4C_f) ; 121,5 (2C_b) ; 71,4 (2C_d) ; 21,8 (2C_i).

Préparation du composé 149

M = 149,06 g.mol⁻¹

Solide brun

Rendement = 93%

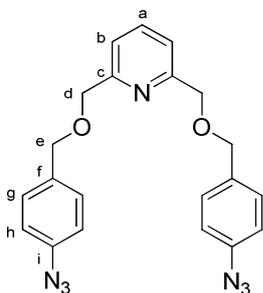
374 mg (2 mmol ; 1 éq.) d'alcool 4-bromobenzyle sont mis en solution dans 4 mL d'un mélange éthanol/eau 7/3. 20 mg (0,1 mmol ; 0,05 éq.) d'ascorbate de sodium, 260 mg (4 mmol ; 2 éq.) d'azoture de sodium et 32 µL (0,3 mmol ; 0,15 éq.) de N,N'-diméthyléthylamine sont additionnés. La solution est dégazée sous flux d'azote pendant 5 minutes puis 38 mg (0,2 mmol ; 0,10 éq.) de CuI sont ajoutés. Le mélange est porté à reflux pendant 1h 30 puis dilué par de l'eau. La phase aqueuse est extraite trois fois par de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont lavées trois fois par de l'eau, séchées sur MgSO₄ et évaporées. 276 mg (1,85 mmol ; Rdt = 93%) d'alcool 4-azidobenzyle **149** sont obtenus sans purification.

Rf = 0,32 (Eluant : EP/AcOEt 80/20)

Pf = 37°C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,35 (d, 2H, J = 8,7 Hz, 2H_b) ; 7,02 (d, 2H, J = 8,7 Hz, 2H_c) ; 4,67 (s, 2H, 2H_a) ; 1,77 (s, 1H, H_{OH}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 139,5 (C_{aromatique quat.}) ; 137,7 (C_{aromatique quat.}) ; 128,7 (2C_b) ; 119,2 (2C_c) ; 64,8 (C_a).

Préparation du composé **150**

$$M = 401,42 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide jaune

Rendement = 96%

721 mg (1,61 mmol ; 1 équ.) de composé **146** et 601 mg (4,03 mmol ; 2,5 équ.) d'azoture **149** sont mis en solution dans 29 mL de DMF anhydre. 173 mg (4,03 mmol ; 2,5 équ.) de NaH (60% massique dans l'huile minérale) sont additionnés par petites fractions à température ambiante et l'agitation est maintenue 45 minutes. Le milieu réactionnel est dilué par de l'eau puis extrait trois fois par de l'AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, lavées trois fois par une solution saturée de NaHCO₃, séchées sur MgSO₄ et évaporées sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié par flash chromatographie (Eluant : EP/AcOEt 90/10 ; 85/15 ; 80/20). 621 mg (1,55 mmol ; Rdt = 96%) de composé **150** sont obtenus sous forme de solide jaune.

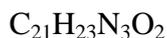
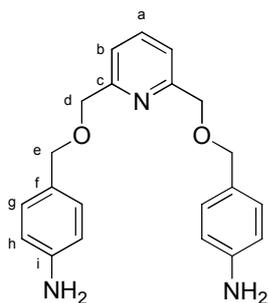
Rf = 0,6 (Eluant : DCM/acétone 90/10)

Pf = 85°C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,73 (t, 1H, *J* = 7,7 Hz, H_a) ; 7,38 (m, 6H, 2H_b, 4H_g) ; 7,02 (d, 4H, *J* = 8,6 Hz, 4H_h) ; 4,66 (s, 4H, 4H_d) ; 4,61 (s, 4H, 4H_e).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 157,8 (2C_c) ; 139,7 (2C_i) ; 138,3 (C_a) ; 134,8 (2C_f) ; 129,5 (4C_g) ; 120,4 (2C_b) ; 119,2 (4C_h) ; 73,0 (2C_d) ; 72,5 (2C_e).

SMHR (ESI) : C₂₁H₁₉N₇O₂Na [M+Na]⁺ *m/z* théorique : 424,1498 *m/z* trouvé : 424,1496 ; C₂₁H₂₀N₇O₂ [M+H]⁺ *m/z* théorique : 402,1678 *m/z* trouvé : 402,1696.

Préparation du composé **151**

$$M = 349,43 \text{ g.mol}^{-1}$$

Solide beige

Rendement = 78%

500 mg (1,245 mmol ; 1 éq.) de di-azoture **150** sont mis en solution dans 4 mL d'un mélange THF/MeOH 1/1. 748 μL (6,416 mmol ; 5,1 éq.) de 1,3-propanedithiol et 894 μL (6,416 mmol ; 5,1 éq.) de triéthylamine sont additionnés. Le mélange est laissé sous agitation pendant 14h puis le solvant est éliminé sous vide. Le résidu est solubilisé dans l'acétate d'éthyle et la phase organique est lavée trois fois à l'eau, séchée sur MgSO_4 et évaporée. Une chromatographie flash du brut (Eluant : DCM/MeOH 90/10) conduit au composé **151** (340 mg ; 0,973 mmol) sous forme de solide jaune avec un rendement de 78%.

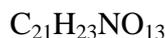
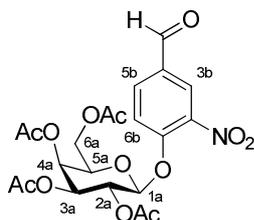
Rf = 0,33 (Eluant : DCM/MeOH 98/2)

Pf = 144°C

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d^6 , δ ppm) : 7,80 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz, H_a) ; 7,32 (d, 2H, $J = 7,7$ Hz, 2H_b) ; 7,02 (d, 4H, $J = 8,3$ Hz, 4H_g) ; 6,53 (d, 4H, $J = 8,3$ Hz, 4H_h) ; 5,07 (sl, 4H, 4H_{NH_2}) ; 4,48 (s, 4H, 4H_d) ; 4,37 (s, 4H, 4H_e).

RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d^6 , δ ppm) : 157,8 (2C_c) ; 148,3 (2C_i) ; 137,3 (C_a) ; 129,4 (4C_g) ; 124,8 (2C_f) ; 119,7 (2C_b) ; 113,5 (4C_h) ; 72,3 (2C_e) ; 71,8 (2C_d).

SMHR (ESI) : $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z théorique : 372,1688 m/z trouvé : 372,1689.

Préparation du composé **155**

$$M = 497,41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide blanc

Rendement = 89%

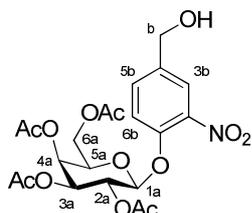
2g (4,86 mmol ; 1 éq.) de galactoside bromé **87** sont mis en solution dans 32 mL d'acétonitrile anhydre. La solution est refroidie à 0°C puis 2,67 g (9,72 mmol ; 2 éq.) de Ag_2CO_3 et une solution de 861 mg (5,34 mmol ; 1,1 éq.) de 4-hydroxy-3-nitrobenzaldéhyde **40** dans 10 mL d'acétonitrile sont additionnés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 4h à température ambiante puis filtré sur Célite[®]. Le filtrat obtenu est évaporé et le brut réactionnel est purifié par flash chromatographie (Eluant : EP/AcOEt 70/30 ; 60/40 ; 50/50). 2,16 g (4,3 mmol ; Rdt = 89%) de galactoside **155** sont obtenus sous forme d'un solide blanc.

Rf = 0,5 (Eluant : EP/AcOEt 50/50)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 9,99 (s, 1H, H_{CHO}) ; 8,31 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H_{3b}) ; 8,08 (dd, 1H, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H_{5b}) ; 7,50 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H_{6b}) ; 5,60 (dd, 1H, $J = 10,0$ Hz, $J = 7,9$ Hz, H_{2a}) ; 5,50 (d, 1H, $J = 3,2$ Hz, H_{4a}) ; 5,23 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, H_{1a}) ; 5,13 (dd, 1H, $J = 10,0$ Hz, $J = 3,2$ Hz, H_{3a}) ; 4,24 (m, 3H, H_{5a}, 2H_{6a}) ; 2,20 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 2,13 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 2,09 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 2,03 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 188,7 (C_{CHO}) ; 170,4 - 170,2 - 169,3 (4C_{CO} acétate) ; 153,6 (C_{1b}) ; 141,3 (C_{2b}) ; 134,1 (C_{5b}) ; 131,6 (C_{4b}) ; 126,9 (C_{3b}) ; 118,9 (C_{6b}) ; 100,1 (C_{1a}) ; 71,9 (C_{5a}) ; 70,5 (C_{3a}) ; 67,7 (C_{2a}) ; 66,7 (C_{4a}) ; 61,5 (C_{6a}) ; 20,8 - 20,7 (4C_{CH₃COO}).

SMHR (ESI) : $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_{13}\text{Na}$ [M+Na]⁺ m/z théorique : 520,10671 m/z trouvé : 520,1066 ; $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_{13}\text{K}$ [M+K]⁺ m/z théorique : 536,08065 m/z trouvé : 536,0814.

Préparation du composé **156** $C_{21}H_{25}NO_{13}$ $M = 499,22 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Solide blanc

Rendement = 84%

2 g (4 mmol ; 1 éq.) d'aldéhyde **155** sont solubilisés dans 30 mL d'un mélange THF/MeOH 1/1. Cette solution est refroidie à 0°C et 177 mg (2 mmol ; 0,5 éq.) de NaBH_4 sont additionnés par petites portions. Après 30 minutes d'agitation à 0°C, le mélange réactionnel est hydrolysé avec une solution de HCl 0,1N. La phase aqueuse est extraite trois fois par du dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée puis évaporée. Le brut réactionnel est purifié par flash chromatographie (Eluant : EP/AcOEt : 25/75). 1,67 g (3,36 mmol ; Rdt = 84%) d'alcool benzylique **156** sont isolés sous forme d'un solide blanc.

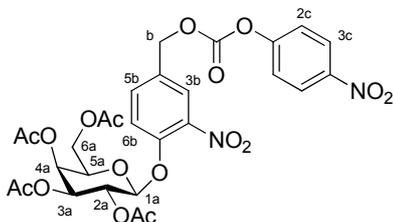
Rf = 0,3 (Eluant : EP/AcOEt 25/75)

Pf = 193°C

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 7,80 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H_{3b}) ; 7,52 (dd, 1H, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H_{5b}) ; 7,35 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H_{6b}) ; 5,51 (dd, 1H, $J = 10,0$ Hz, $J = 7,9$ Hz, H_{2a}) ; 5,47 (d, 1H, $J = 3,3$ Hz, H_{4a}) ; 5,10 (dd, 1H, $J = 10,0$ Hz, $J = 3,3$ Hz, H_{3a}) ; 5,06 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, H_{1a}) ; 4,73 (d, 2H, $J = 5,6$ Hz, H_b) ; 4,17 (m, 3H, H_{5a} , 2H_{6a}) ; 2,31 (t, 1H, $J = 5,6$ Hz, H_{OH}) ; 2,19 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 2,12 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 2,07 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 2,02 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 170,5 - 170,4 - 170,3 - 169,3 (4C_{CO} acétate) ; 148,5 (C_{1b}) ; 141,4 (C_{2b}) ; 137,3 (C_{5b}) ; 131,9 (C_{4b}) ; 123,3 (C_{3b}) ; 120,0 (C_{6b}) ; 100,9 (C_{1a}) ; 71,5 (C_{5a}) ; 70,7 (C_{3a}) ; 67,9 (C_{2a}) ; 66,8 (C_{4a}) ; 63,5 (C_b) ; 61,5 (C_{6a}) ; 20,8 - 20,7 ($4\text{C}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

SMHR (ESI) : $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_{13}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z théorique : 522,12236 m/z trouvé : 522,1224 ; $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_{13}\text{K}$ $[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z théorique : 538,0963 m/z trouvé : 538,0948.

Préparation du composé **157**

$$M = 664,52 \text{ g.mol}^{-1}$$

Solide blanc

Rendement = 86%

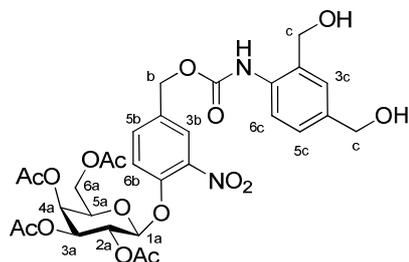
1,47 g (2,94 mmol ; 1 éq.) de galactoside **156** sont mis en solution dans 15 mL de dichlorométhane. La solution est refroidie à 0°C. 1,78 g (8,83 mmol ; 3 éq.) de chloroformiate de *para*-nitrophényle et 714 μL (8,83 mmol ; 3 éq.) de pyridine sont additionnés successivement. Après 30 minutes d'agitation à température ambiante, l'alcool de départ est entièrement consommé. 15 mL d'une solution saturée de NaHCO_3 sont additionnés. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite trois fois par du dichlorométhane. La phase organique résultante est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée. Le brut réactionnel est alors purifié par flash chromatographie (Eluant : EP/AcOEt : 70/30 ; 60/40 ; 50/50). 1,68 g (2,52 mmol ; Rdt = 86%) de carbonate **157** sont obtenus sous forme d'un solide blanc.

Rf = 0,2 (Eluant : EP/AcOEt 50/50)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 8,29 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz, 2H_{3c}) ; 7,92 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H_{3b}) ; 7,65 (dd, 1H, $J = 8,6$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H_{5b}) ; 7,42 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, H_{6b}) ; 7,39 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz, 2H_{2c}) ; 5,56 (dd, 1H, $J = 10,0$ Hz, $J = 7,9$ Hz, H_{2a}) ; 5,50 (d, 1H, $J = 3,3$ Hz, H_{4a}) ; 5,31 (s, 2H, 2H_b) ; 5,16 (d, 1H, $J = 7,9$ Hz, H_{1a}) ; 5,13 (dd, 1H, $J = 10,0$ Hz, $J = 3,3$ Hz, H_{3a}) ; 4,20 (m, 3H, H_{5a} , 3H_{6a}) ; 2,19 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 2,12 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 2,07 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$) ; 2,02 (s, 3H, $3\text{H}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 170,2 - 170,1 - 170,0 - 169,3 (4C_{CO} acétate) ; 155,2 (C_{CO} carbonate) ; 152,2 (C_{1c}) ; 149,6 (C_{1b}) ; 145,4 (C_{4c}) ; 140,9 (C_{2b}) ; 133,9 (C_{5b}) ; 130,1 (C_{4b}) ; 125,3 - 125,2 (C_{3b} , 2C_{3c}) ; 121,7 (2C_{2c}) ; 119,4 (C_{6b}) ; 100,3 (C_{1a}) ; 71,4 (C_{5a}) ; 70,4 (C_{3a}) ; 68,8 (C_b) ; 67,7 (C_{2a}) ; 66,7 (C_{4a}) ; 61,3 (C_{6a}) ; 20,6 - 20,5 - 20,4 ($4\text{C}_{\text{CH}_3\text{COO}}$).

SMHR (ESI) : $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{Na}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ m/z théorique : 687,12857 m/z trouvé : 687,1287 ; $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{17}\text{K}$ [$\text{M}+\text{K}$] $^+$ m/z théorique : 703,10251 m/z trouvé : 703,1040.

Préparation du composé **159**

$$M = 678,59 \text{ g.mol}^{-1}$$

Solide blanc

Rendement = 91%

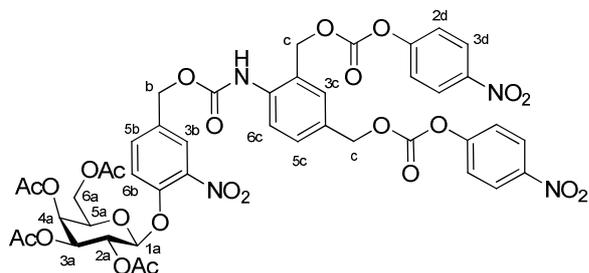
365 mg (0,55 mmol ; 1 éq.) de carbonate activé **157** sont mis en solution dans 4 mL de DMF. 169 mg (1,11 mmol ; 2 éq.) d'aniline **158** et 97 mg (0,71 mmol ; 1,3 éq.) de HOBt sont additionnés. Le milieu réactionnel est chauffé à 50°C pendant 18h. Après évaporation du DMF, le brut est purifié par flash chromatographie (Eluant : EP/AcOEt : 50/50 ; 25/75). 341 mg (0,50 mmol ; Rdt = 91%) du composé **159** sont isolés sous forme de solide blanc.

Rf = 0,4 (Eluant : AcOEt)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 8,15 (sl, 1H, H_{NH} carbamate) ; 7,82 (d, 1H, *J* = 2,0 Hz, H_{3b}) ; 7,77 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H_{6c}) ; 7,54 (dd, 1H, *J* = 8,6 Hz, *J* = 2,0 Hz, H_{5b}) ; 7,33 (d, 1H, *J* = 8,6 Hz, H_{6b}) ; 7,17 (dd, 1H, *J* = 8,4 Hz, *J* = 1,7 Hz, H_{5c}) ; 7,06 (d, 1H, *J* = 1,3 Hz, H_{3c}) ; 5,50 (dd, 1H, *J* = 11 Hz, *J* = 8,0 Hz, H_{2a}) ; 5,43 (d, 1H, *J* = 3,0 Hz, H_{4a}) ; 5,13 (s, 2H, 2H_b) ; 5,10 (dd, 1H, *J* = 11 Hz, *J* = 3,0 Hz, H_{3a}) ; 5,07 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, H_{1a}) ; 4,57 (s, 2H, 2H_c) ; 4,50 (s, 2H, 2H_c) ; 4,20 (m, 3H, H_{5a}, 2H_{6a}) ; 3,34 (sl, 1H, H_{OH}) ; 2,88 (sl, 1H, H_{OH}) ; 2,14 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 2,09 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 2,04 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 1,99 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 170,6 - 170,4 - 170,3 - 169,6 (4C_{CO} acétate) ; 153,6 (C_{CO} carbamate) ; 149,1 (C_{1b}) ; 141,1 (C_{2c}) ; 136,5 (C_{4c}) ; 133,6 (C_{5b}) ; 132,4 (C_{2b}, C_{4b}) ; 129,6 (C_{1c}) ; 127,6 - 127,5 (C_{3c}, C_{5c}) ; 125,0 (C_{3b}) ; 121,0 (C_{6c}) ; 119,7 (C_{6b}) ; 100,6 (C_{1a}) ; 71,5 (C_{5a}) ; 70,6 (C_{3a}) ; 67,9 (C_{2a}) ; 66,9 (C_{4a}) ; 65,2 (C_b) ; 64,4 - 63,9 (2C_c) ; 61,4 (C_{6a}) ; 20,7 - 20,6 (4C_{CH₃COO}).

SMHR (ESI) : C₃₀H₃₄N₂O₁₆Na [M+Na]⁺ m/z théorique : 701,18005 m/z trouvé : 701,1804 ; C₃₀H₃₄N₂O₁₆K [M+K]⁺ m/z théorique : 717,15399 m/z trouvé : 717,1540.

Préparation du composé **160**

$$M = 1008,80 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide blanc

Rendement = 89%

238 mg (1,18 mmol ; 4 éq.) de chloroformiate de *para*-nitrophényle sont mis en solution dans 3 mL de dichlorométhane. La solution est refroidie à 0°C et 96 µL (1,18 mmol ; 4 éq.) de pyridine sont additionnés. Une solution de 201 mg (0,29 mmol ; 1 éq.) de diol **159** dans 4 mL de dichlorométhane est alors additionnée goutte à goutte. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 1 heure à température ambiante. Le brut réactionnel est hydrolysé par ajout d'une solution saturée de NaHCO₃. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite trois fois par du dichlorométhane. Les phases organiques sont séchées sur MgSO₄, filtrées puis évaporées. Une purification du brut par flash chromatographie (Eluant : EP/AcOEt : 70/30 ; 50/50) conduit au bis-carbonate **160** (266 mg ; 0,26 mmol) avec un rendement de 89%.

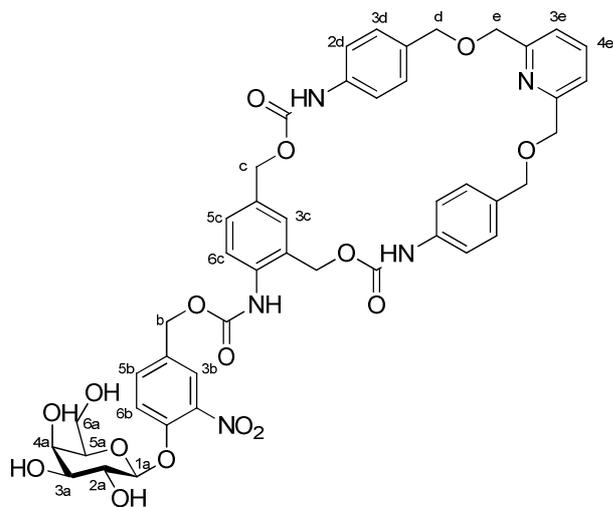
R_f = 0,6 (Eluant : EP/AcOEt 60/40)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 8,27 (m, 4H, 4H_{3d}) ; 7,90 (d, 1H, *J* = 7,7 Hz, H_{6c}) ; 7,87 (d, 1H, *J* = 2,0 Hz, H_{3b}) ; 7,65 (sl, 1H, H_{NH} carbamate) ; 7,58 (dd, 1H, *J* = 8,6 Hz, *J* = 2,0 Hz, H_{5b}) ; 7,51 (m, 2H, H_{5c}, H_{6b}) ; 7,37 (m, 5H, 4H_{2d}, H_{3c}) ; 5,55 (dd, 1H, *J* = 10,5 Hz, *J* = 7,8 Hz, H_{2a}) ; 5,48 (dd, 1H, *J* = 3,4 Hz, *J* = 0,8 Hz, H_{4a}) ; 5,33 (s, 2H, 2H_c) ; 5,28 (s, 2H, 2H_c) ; 5,21 (s, 2H, 2H_b) ; 5,12 (dd, 1H, *J* = 10,5 Hz, *J* = 3,4 Hz, H_{3a}) ; 5,09 (d, 1H, *J* = 7,8 Hz, H_{1a}) ; 4,20 (m, 3H, H_{5a}, 2H_{6a}) ; 2,19 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 2,13 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 2,06 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}) ; 2,02 (s, 3H, 3H_{CH₃COO}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 170,4 - 170,2 - 169,4 (4C_{CO} acétate) ; 155,5 - 155,2 (2C_{CO} carbonate) - 153,5 - 152,9 - 152,4 (C_{1b}, C_{CO} carbamate, 2C_{1d}) ; 149,2 (C_{2c}) ; 145,7 - 145,5 (2C_{4d}) ; 141,3 (C_{4c}) ; 137,4 (C_{2b}) ; 133,6 (C_{5b}) ; 132,1 - 131,9 - 131,1 (C_{4b}, C_{6b}, C_{3c}) - 130,9 (C_{1c}) ; 125,4 - 125,3 (4C_{3d}) ; 125,0 (C_{3b}) ; 123,3 (C_{6c}) ; 121,8 (4C_{2d}) ; 119,7 (C_{5c}) ; 100,7 (C_{1a})

; 71,5 (C_{5a}) ; 70,5 (C_{3a}) ; 70,0 (C_c) ; 67,8 (C_{2a}) ; 67,6 (C_c) ; 66,7 (C_{4a}) ; 65,5 (C_b) ; 61,3 (C_{6a}) ;
20,8 - 20,7 - 20,6 (4C_{CH₃COO}).

SMHR (ESI) : C₄₄H₄₀N₄O₂₄Na [M+Na]⁺ m/z théorique : 1031,19247 m/z trouvé : 1031,1925
; C₄₄H₄₀N₄O₂₄K [M+K]⁺ m/z théorique : 1047,16641 m/z trouvé : 1047,1657.

Préparation du composé **163**
 $C_{45}H_{45}N_5O_{16}$
 $M = 911,86 \text{ g.mol}^{-1}$

Solide blanc

Rendement = 28%

400 mg (0,396 mmol ; 1 éq.) de bis-carbonate **160** et 346 mg (0,991 mmol ; 2,5 éq.) de dianiline **151** sont mis en solution dans 4,8 mL de DMF. 53 mg (0,396 mmol ; 1 éq.) de HOBt sont additionnés et le mélange est laissé sous agitation 5h à température ambiante. Le suivi de réaction par HPLC indique alors que le dicarbonate de départ est entièrement consommé. Le brut est dilué par ajout de 391 mL de DMF. Après 96h d'agitation à 30°C, le DMF est évaporé sous pression réduite. Le résidu est purifié par flash chromatographie (Eluant DCM/MeOH 98,5/1,5 ; 98/2). 348 mg d'un mélange non séparable de macrocycle protégé **162** et de dianiline **151** sont isolés puis engagés directement dans la réaction de déprotection du galactoside. Pour cela, le mélange des composés **151** et **162** est solubilisé dans 10,5 mL d'un mélange DCM/MeOH 1/2. Cette solution est refroidie à 0°C puis 86 mg (1,611 mmol) de méthanolate de sodium sont additionnés. Après 1h15 d'agitation à 0°C, le milieu est neutralisé par ajout de résine acide IRC50, filtré et évaporé. Une purification du brut par flash chromatographie (Eluant : DCM/MeOH 95/5 ; 93/7) permet d'obtenir 100 mg (0,110 mmol ; Rdt = 28%) de macrocycle galactosylé **163** sous forme de solide beige.

Tr = 11,6 min. (méthode **B**)

Pf = 145-147°C

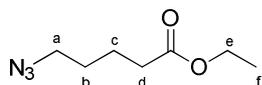
RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) : 9,77 (sl, 1H, H_{NH} carbamate) ; 9,66 (sl, 1H, H_{NH} carbamate) ; 9,27 (sl, 1H, H_{NH} carbamate) ; 7,95 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H_{3b}) ; 7,80 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz, H_{4e}) ; 7,71 (dd, 1H, $J = 8,8$ Hz, $J = 2,0$ Hz, H_{5b}) ; 7,45 (m, 4H, H_{6b} , H_{5c} , H_{6c} , H_{3c}) ; 7,33 (m, 6H, 2 H_{3e} , 4 H_{2d}) ; 7,18 (m, 4H, 4 H_{3d}) ; 5,17 (m, 6H, 2 H_b , 4 H_c) ; 5,06 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, H_{OH}) ; 4,93 (d, 1H, $J = 5,9$ Hz, H_{1a}) ; 4,69 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz, H_{OH}) ; 4,62 (d, 1H, $J = 4,5$ Hz, H_{OH}) ;

4,46 (m, 8H, 4H_d, 4H_e) ; 3,70 (t, 1H, $J = 3,8$ Hz, H_{galactose}) ; 3,64 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz, H_{galactose}) ;
3,58 - 3,35 (m, 5H, 2H_{galactose}, 2H_{6a}, 1H_{OH} partiellement masqués par le pic résiduel de l'eau).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d⁶, δ ppm) : 157,7 (2C_{2e}) ; 154,1 - 153,3 (3C_{carbamate}) ; 149,3 (C_{1b}) ; 139,9 - 138,4 - 138,3 (4C_{aro. quaternaire}) - 137,3 (C_{4e}) - 134,9 (C_{aro. quaternaire}) - 133,8 (C_{5b}) - 132,1 - 131,9 - 130,3 (4C_{aro. quaternaire}) - 128,7 (4C_{3d}) - 128,1 - 127,5 - 124,3 - 121,4 - 118,3 - 117,2 (2C_{3e}, 4C_{2d}, C_{3c}, C_{5c}, C_{6c}, C_{3b}, C_{6b}) ; 101,0 (C_{1a}) ; 75,8 - 73,3 (2C_{galactose}) - 70,9 - 70,5 (2C_d, 2C_e) - 70,0 - 68,0 (2C_{galactose}) - 64,8 - 64,6 - 61,3 (2C_c, C_b) - 60,3 (C_{6a}).

SMHR (ESI) : C₄₅H₄₅N₅O₁₆Na [M+Na]⁺ m/z théorique : 934,27535 m/z trouvé : 934,2754 ;
C₄₅H₄₅N₅O₁₆K [M+K]⁺ m/z théorique : 950,24929 m/z trouvé : 950,2478.

Préparation du composé **165**



$C_7H_{13}N_3O_2$

$M = 171,20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Huile jaune

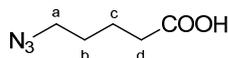
Rendement = 99 %

1,86 g (28,6 mmol ; 1,2 éq.) de NaN_3 sont mis en suspension dans 10 mL de DMF. 5 g (23,8 mmol ; 1 éq.) de 4-bromovalérate d'éthyle sont additionnés et le mélange est chauffé à 80°C pendant une nuit. Le milieu réactionnel est ensuite refroidi à température ambiante puis dilué par 100 mL d'eau. La phase aqueuse est extraite trois fois par du dichlorométhane puis les phases organiques sont lavées cinq fois par de l'eau, séchées sur MgSO_4 et évaporées. 4,85 g d'azoture **165** (28,3 mmol ; Rdt = 99%) sont obtenus sous forme d'huile jaune.

Rf = 0,63 (Eluant : EP/AcOEt 90/10)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 3,87 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, 2H_e) ; 3,03 (t, 2H, $J = 6,6$ Hz, 2H_a) ; 2,07 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz, 2H_d) ; 1,49 - 1,33 (m, 4H, 2H_b , 2H_c) ; 0,99 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, 3H_f).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 173,1 ($\text{C}_{\text{CO ester}}$) ; 60,4 (C_e) ; 51,0 (C_a) ; 33,7 (C_d) ; 28,2 - 22,1 (C_b , C_c) ; 14,2 (C_f).

Préparation du composé **167a**

M = 143,14 g.mol⁻¹

Huile jaune

Rendement = 96%

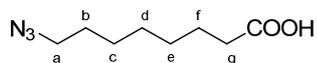
1,5 g (8,76 mmol ; 1 éq.) d'ester d'éthyle **165** sont dissouts dans 20 mL d'éthanol. Une solution de 525 mg (13,14 mmol ; 1,5 mmol) de NaOH dans 4,7 mL d'eau est additionnée et le mélange est porté à reflux pendant 14h. L'éthanol est évaporé, le mélange est dilué par 10 mL d'eau et acidifié à pH = 1 par ajout de HCl 37%. La phase aqueuse est extraite trois fois par de l'éther diéthylique. Les phases organiques résultantes sont séchées sur MgSO₄ et évaporées. 1,21 g (8,45 mmol ; Rdt = 96%) d'acide carboxylique **167a** sont obtenus sans purification sous forme d'huile jaune.

Rf = 0,46 (Eluant : EP/AcOEt 60/40)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 3,32 (t, 2H, J = 6,5 Hz, 2H_a) ; 2,42 (t, 2H, J = 7,1 Hz, 2H_d) ; 1,78 - 1,63 (m, 4H, 2H_b, 2H_c).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 179,4 (C_{CO} acide carboxylique) ; 51,1 (C_a) ; 33,5 (C_d) ; 28,3 - 21,9 (C_b, C_c).

Préparation du composé **167b**



$$M = 185,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

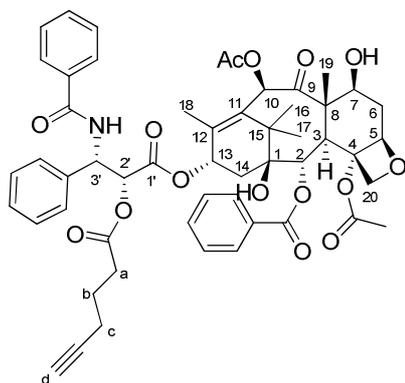
Huile jaune

Rendement = 88%

2 g (8,96 mmol ; 1 éq.) d'acide 8-bromooctanoïque sont mis en solution dans 10 mL de DMF. 699 mg (10,75 mmol ; 1,2 éq.) de NaN₃ sont additionnés et le mélange est chauffé à 60°C pendant 2 jours. Après dilution (100 mL d'eau) et extraction à l'acétate d'éthyle, la phase organique est lavée cinq fois par de l'eau, séchée sur MgSO₄ et évaporée. 1,46 g (7,89 mmol ; Rdt = 88%) d'azoture **167b** sont obtenus sous forme d'huile jaune sans purification.

Rf = 0,73 (Eluant : EP/AcOEt 50/50)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 3,25 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz, 2H_a) ; 2,34 (t, 2H, *J* = 7,5 Hz, 2H_g) ; 1,60 (m, 4H, 2H_b, 2H_f) ; 1,34 (m, 6H, 2H_c, 2H_d, 2H_e).

Préparation du composé **168**C₅₃H₅₇NO₁₅M = 948,02 g.mol⁻¹

Solide blanc

Rendement = 78%

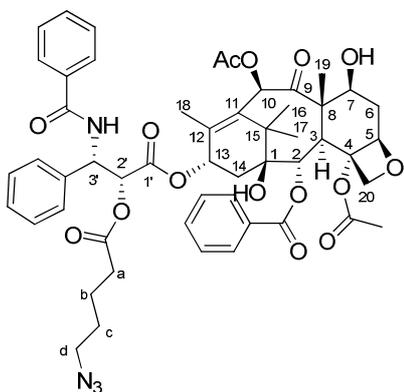
A une solution de 150 mg (0,176 mmol ; 1 équ.) de paclitaxel et 39 μ L (0,352 mmol ; 2 équ.) d'acide 5-hexynoïque dans 10 mL de THF, sont additionnés 109 mg (0,527 mmol ; 3 équ.) de DCC et une quantité catalytique de DMAP. Après 16h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé et le brut obtenu est purifié sur plaques de silice préparatives (Eluant : DCM/MeOH 95/5). 130 mg (0,137 mmol ; Rdt = 78%) d'ester de paclitaxel **168** sont isolés sous forme de solide blanc.

Tr = 23,3 min (méthode **B**)**Pf** = 163°C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 8,14 (d, 2H, J = 7,8 Hz, 2H_{aro ortho}) ; 7,74 (d, 2H, J = 7,8 Hz, 2H_{aro ortho}) ; 7,61 (t, 1H, J = 7,4 Hz, 1H_{aro para}) ; 7,52 (m, 3H, 3H_{aro}) ; 7,44-7,34 (m, 7H, 7H_{aro}) ; 6,90 (d, 1H, J = 9,1 Hz, H_{NH amide}) ; 6,26 (m, 2H, H₁₀, H₁₃) ; 5,96 (dd, 1H, J = 3,1 Hz, J = 9,1 Hz, H_{3'}) ; 5,68 (d, 1H, J = 7,1 Hz, H₂) ; 5,50 (d, 1H, J = 3,1 Hz, H_{2'}) ; 4,97 (d, 1H, J = 8,6 Hz, H₅) ; 4,45 (dd, 1H, J = 6,7 Hz, J = 10,8 Hz, H₇) ; 4,32 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H₂₀) ; 4,20 (d, 1H, J = 8,4 Hz, H₂₀) ; 3,81 (d, 1H, J = 7,0 Hz, H₃) ; 2,66-1,58 (m, 21H, 3H_{4-CH₃COO}, 3H_{10-CH₃COO}, 2H_a, 2H_c, H_d, 2H₆, 2H₁₄, 3H₁₈, 3H₁₉) ; 1,37-1,14 (m, 8H, 2H_b, 3H₁₆, 3H₁₇).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 204,0 (C_{cétone 9}) ; 172,2 - 171,4 - 169,9 - 168,2 (2C_{CO acétate}, 3C_{CO ester}, C_{CO amide}) ; 133,8 - 132,2 - 130,3 - 129,2 - 128,9 - 128,6 - 127,2 - 126,6 (C₁₁, C₁₂, 3C_{aro quaternaire}, 15C_{aro C-H}) ; 84,6 (C₅) ; 83,1 (C_{alcyne}) ; 81,2 (C₄) ; 77,4 (C₁) ; 76,6 (C₂₀) ; 75,7 (C₁₀) ; 75,2 (C₂) ; 74,1 (C_{2'}) ; 72,1 (C₁₃, C₇) ; 69,6 (C_d) ; 58,6 (C₈) ; 52,8 (C_{3'}) ; 45,7 (C₃) ; 43,3 (C₁₅) ; 35,6 (C₆, C₁₄) ; 32,4 (C_a) ; 25,6 (C₁₆) ; 25,0 (C_b) ; 22,8 (C_{4-CH₃COO}) ; 22,3 (C₁₇) ; 20,9 (C_{10-CH₃COO}) ; 17,6 (C_c) ; 14,9 (C₁₈) ; 9,7 (C₁₉).

SM (ESI) : C₅₃H₅₇NO₁₅Na [M+Na]⁺ m/z théorique : 970,36 m/z trouvé : 970,89.

Préparation du composé **169a**

$$M = 979,03 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Solide blanc

Rendement = 84%

A une solution de 150 mg (0,176 mmol ; 1 équ.) de paclitaxel et 50 mg (0,352 mmol ; 2 équ.) de composé **167a** dans 10 mL de THF anhydre, sont additionnés 109 mg (0,527 mmol ; 3 équ.) de DCC et une quantité catalytique de DMAP. Après 16h d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé et le brut est purifié sur plaques de silice préparatives (Eluant : DCM/MeOH 95/5). 145 mg (0,148 mmol ; Rdt = 84%) d'ester de paclitaxel **169a** sont obtenus sous forme de solide blanc.

Tr = 24,2 min (méthode **B**)

Pf = 165°C

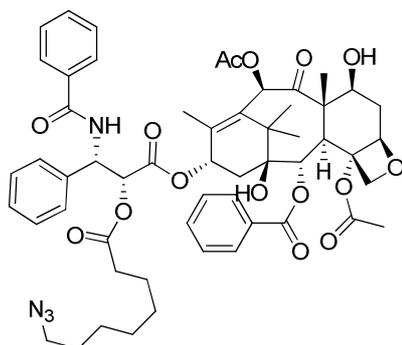
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 8,15 (d, 2H, *J* = 7,7 Hz, 2H_{aro ortho}) ; 7,75 (d, 2H, *J* = 7,8 Hz, 2H_{aro ortho}) ; 7,62 (t, 1H, *J* = 7,4 Hz, 1H_{aro para}) ; 7,52 (m, 3H, 3H_{aro}) ; 7,45-7,34 (m, 7H, 7H_{aro}) ; 6,92 (d, 1H, *J* = 9,1 Hz, H_{NH}) ; 6,27 (m, 2H, H₁₀, H₁₃) ; 5,98 (dd, 1H, *J* = 3,1 Hz, *J* = 9,1 Hz, H_{3'}) ; 5,69 (d, 1H, *J* = 7,1 Hz, H₂) ; 5,52 (d, 1H, *J* = 3,1 Hz, H₂) ; 4,98 (d, 1H, *J* = 8,7 Hz, H₅) ; 4,46 (dd, 1H, *J* = 6,6 Hz, *J* = 10,8 Hz, H₇) ; 4,33 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H₂₀) ; 4,21 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, H₂₀) ; 3,82 (d, 1H, *J* = 7,0 Hz, H₃) ; 3,25 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz, 2H_d) ; 2,63-2,29 (m, 7H, 3H_{4-CH₃COO}, H₆, H₁₄, 2H_{OH}) ; 2,24 - 2,07 (m, 6H, 3H_{10-CH₃COO}, H₁₄, 2H_a) ; 1,90 (m, 4H, 3H₁₈, H₆) ; 1,72-1,49 (m, 5H, 3H₁₉, 2H_c) ; 1,39-1,10 (m, 8H, 3H₁₆, 3H₁₇, 2H_b).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 203,8 (C_{cétone 9}) ; 172,2 - 171,3 - 169,8 - 168,2 - 166,7 (2C_{CO acétate}, 3C_{CO ester}, C_{CO amide}) ; 142,2 (C_{aro quaternaire}) ; 136,7 - 133,7 133,5 - 133,1 - 132,1 - 130,2 - 129,5 - 129,1 - 128,8 - 128,6 - 128,5 - 127,0 - 126,4 (C₁₁, C₁₂, 2C_{aro quaternaire}, 15C_{aro C-H}) ; 84,5 (C₅) ; 81,1 (C₄) 78,4 (C₁) ; 76,5 (C₂₀) ; 75,6 (C₁₀) ; 75,1 (C₂) ; 73,9 (C₂) ; 72,0 (C₁₃, C₇) ; 58,4 (C₈) ; 52,7 (C_{3'}) ; 50,9 (C_d) ; 45,6 (C₃) ; 43,2 (C₁₅) ; 35,6 (C₆, C₁₄) ; 33,1 (C_a) ; 26,7

(C₁₆) ; 24,9 (C_c) ; 22,6 (C_{4-CH₃COO}) ; 22,2 (C₁₇) ; 21,8 (C_b) ; 20,8 (C_{10-CH₃COO}) ; 14,7 (C₁₈) ; 9,7 (C₁₉).

SMHR (ESI) : C₅₂H₅₈N₄O₁₅Na [M+Na]⁺ m/z théorique : 1001,37909 m/z trouvé : 1001,3782 ; C₅₂H₅₈N₄O₁₅K [M+K]⁺ m/z théorique : 1017,35303 m/z trouvé : 1017,3544.

Préparation du composé **169b**



$C_{55}H_{64}N_4O_{15}$

$M = 1021,11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Solide blanc

Rendement = 67%

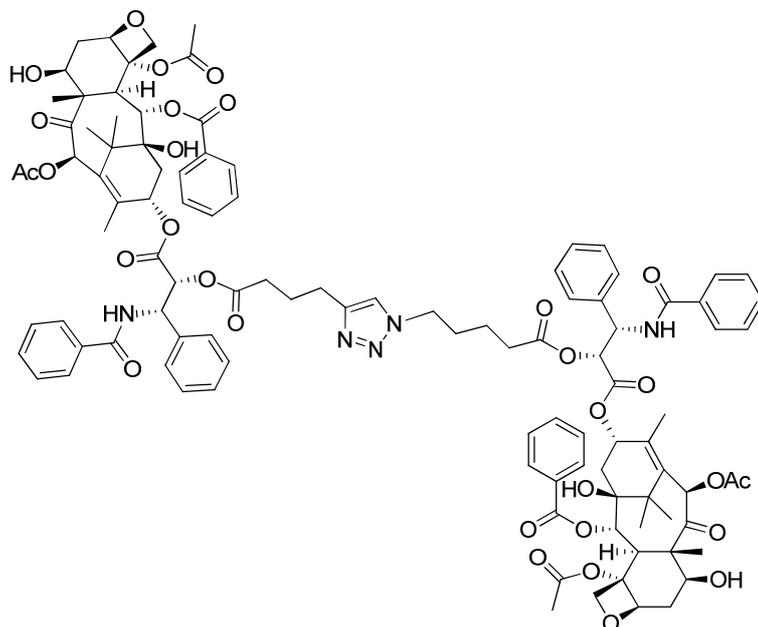
75 mg (0,0878 mmol ; 1 éq.) de paclitaxel et 32 mg (0,1757 mmol ; 2 éq.) d'acide carboxylique **167b** sont mis en solution dans 5 mL de THF anhydre. 54 mg (0,2634 mmol ; 3 éq.) de DCC et une quantité catalytique de DMAP sont additionnés et le mélange est laissé sous agitation pendant 16h puis évaporé. Le brut obtenu est purifié sur plaques de silice préparatives (Eluant : DCM/MeOH 96/4). 60 mg (0,05883 mmol ; Rdt = 67%) d'ester de paclitaxel **169b** ont été isolés sous forme d'un solide blanc.

Tr = 26,95 min (méthode **B**)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : En cours.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : En cours.

SMHR (ESI) : $C_{55}H_{64}N_4O_{15}Na$ $[M+Na]^+$ m/z théorique : 1043,42604 m/z trouvé : 1043,4258 ; $C_{55}H_{65}N_4O_{15}$ $[M+H]^+$ m/z théorique : 1021,44409 m/z trouvé : 1021,4415 ; $C_{55}H_{64}N_4O_{15}K$ $[M+K]^+$ m/z théorique : 1059,3998 m/z trouvé : 1059,4007.

Préparation du composé **136**C₁₀₅H₁₁₅N₅O₃₀M = 1927,05 g.mol⁻¹

Solide blanc

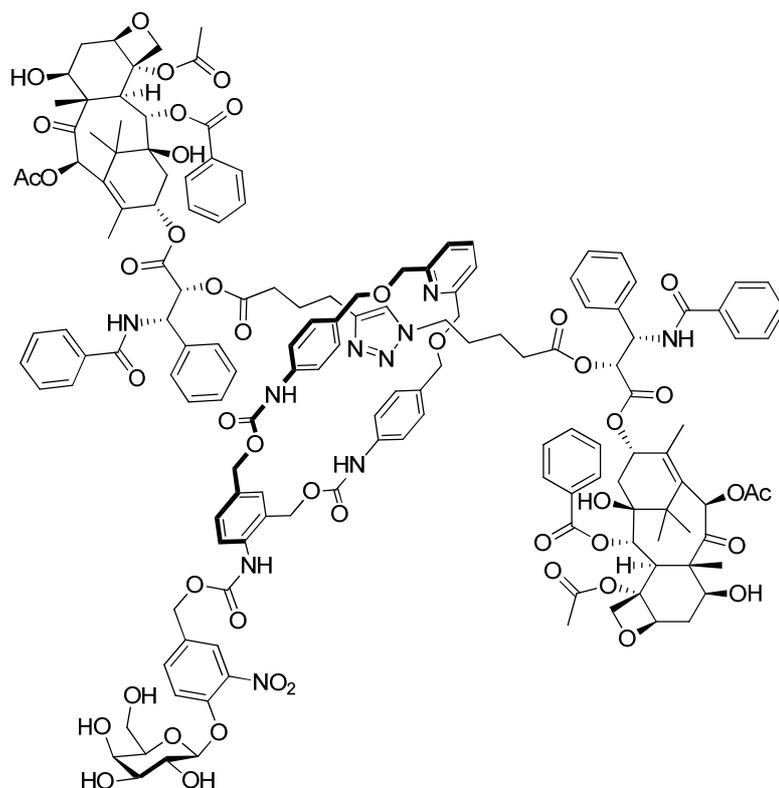
Rendement = 62%

15 mg (0,0158 mmol ; 1 éq.) d'alcyne **168** et 15 mg (0,0158 mmol ; 1 éq.) d'azoture **169a** sont mis en solution dans 500 μ L d'un mélange DCM/MeOH 95/5. 5,9 mg (0,0158 mmol ; 1 éq.) de Cu(MeCN)₄PF₆ sont additionnés et l'agitation est maintenue 16h à température ambiante. Le cuivre est complexé par ajout de 500 μ L d'une solution saturée de EDTA disodique dans du tampon phosphate 0,2 M (pH = 7). Après 30 minutes d'agitation, les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite trois fois par du dichlorométhane. Les phases organiques sont séchées sur MgSO₄ puis évaporées. Le brut est purifié sur plaque de silice préparative (Eluant : DCM/MeOH 93/7). 19 mg (0,0098 mmol ; Rdt = 62%) de triazole **136** sont isolés sous forme de solide blanc.

Tr = 25,7 min (méthode B)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : En cours.RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : En cours.SM (ESI) : C₁₀₅H₁₁₅N₅O₃₀Na [M+Na]⁺ m/z théorique : 1948,75 m/z trouvé : 1949,47.

SMHR (ESI) : en cours.

Préparation du composé **133a**
 $C_{150}H_{160}N_{10}O_{46}$
 $M = 2838,91 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Solide blanc

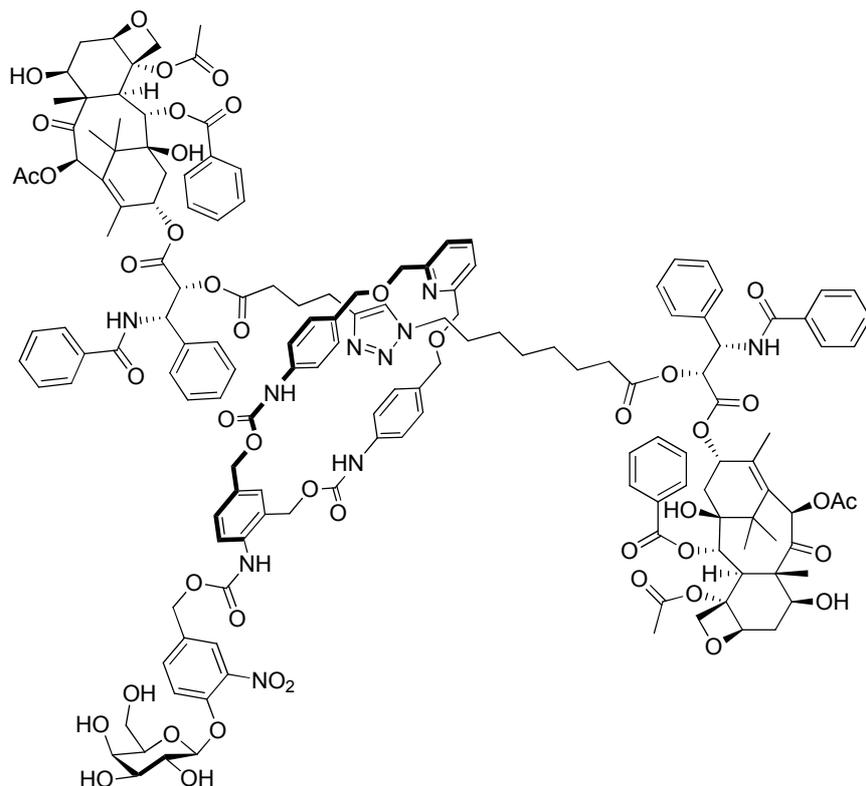
Rendement = 26%

10 mg (10,97 μmol ; 1 eq.) de macrocyle **163** sont mis en solution dans 1,28 mL d'un mélange DCM/MeOH (17% MeOH). 3,9 mg (10,42 μmol ; 0,95 eq.) de $\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{PF}_6$ sont additionnés et le mélange est laissé sous agitation 15 minutes. 54 mg (54,83 μmol ; 5 eq.) d'azoture **169a** et 52 mg (54,83 μmol ; 5 eq.) d'alcyne **168** sont ajoutés et la solution est agitée 40h à température ambiante. Le cuivre est complexé par 1 mL d'une solution saturée en d'EDTA disodique dans le tampon phosphate 0,2M (pH = 7). Après une heure d'agitation, les deux phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite trois fois par de l'AcOEt et les phases organiques résultantes sont séchées sur MgSO_4 , filtrées et évaporées. Le brut est purifié sur plaque de silice préparative (Eluant : DCM/MeOH 93/7). 8 mg (2,82 μmol ; Rdt = 26%) de rotaxane **133a** (2 diastéréoisomères) sont isolés sous forme de solide blanc.

Tr = 22,98 min (méthode **B**)

SM (ESI) : $C_{150}H_{162}N_{10}O_{46}$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ m/z théorique : 1420,46 m/z trouvé : 1420,85.

SMHR (ESI) : En cours.

Préparation du composé **133b**

$$C_{153}H_{166}N_{10}O_{46}$$

$$M = 2880,99 \text{ g.mol}^{-1}$$

Solide blanc

Rendement = 34%

10 mg (10,97 μmol ; 1 eq.) de macrocyle **163** sont mis en solution dans 1,28 mL d'un mélange DCM/MeOH (17% MeOH). 3,9 mg (10,42 μmol ; 0,95 eq.) de $\text{Cu}(\text{MeCN})_4\text{PF}_6$ sont additionnés et le mélange est laissé sous agitation 15 minutes. 56 mg (54,83 μmol ; 5 eq.) d'azoture **169b** et 52 mg (54,83 μmol ; 5 eq.) d'alcyne **168** sont ajoutés. L'agitation est maintenue 48 h à température ambiante. 1 mL d'une solution aqueuse saturée en EDTA disodique est additionnée. Après une heure d'agitation, les deux phases sont séparées. La phase aqueuse est extraite trois fois par de l'AcOEt. Les phases organiques résultantes sont séchées sur MgSO_4 , filtrées et évaporées. Le brut est purifié sur plaque de silice préparative (Eluant : DCM/MeOH 93/7). 10,7 mg (3,73 μmol ; Rdt = 34%) de rotaxane **133b** (2 diastéréoisomères) ont ainsi été isolés sous la forme d'un solide blanc.

Tr = 23,77 et 23,96 min (méthode **B**)

SMHR (ESI) : $C_{153}H_{166}N_{10}O_{46}Na_2$ $[\text{M}+2\text{Na}]^{2+}$ m/z théorique : 1462,53711 m/z trouvé : 1462,5378.

BIBLIOGRAPHIE

- 1** Projection de l'Incidence et de la Mortalité par Cancer en France en 2011 - Synthèse des Résultats, *Institut de Veille Sanitaire*, **2011**, Disponible à partir de l'URL <http://www.invs.sante.fr>
- 2** Bailly, C. *Actual. Chim.* **2003**, 11-12, 118-122.
- 3 (a)** Gerullis, H.; Ecke, T.; Eimer, C.; Wishahi, M.; Otto, T. *Anti-Cancer Drugs* **2011**, 22, 9-17. **(b)** Fahy, J.; Duflos, A.; Ribet, J.-P.; Jacquesy, J.-C.; Berrier, C.; Jouannetaud, M.-P.; Zunino, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8576-8577.
- 4** Kratz, F.; Müller, I. A. ; Ryppa, C; Warnecke A. *ChemMedChem* **2008**, 3, 20-53.
- 5** Casi, G.; Neri, D. *J. Controlled Release* **2012**, 161, 422-428.
- 6 (a)** Doronina, S. O.; Toki, B. E.; Torgov, M. Y.; Mendelsohn, B. A.; Cervený, C. G.; Chace, D. F.; DeBlanc, R. L.; Gearing, R. P.; Bovee, T. D.; Siegall, C. B.; Francisco, J. A.; Wahl, A. F.; Meyer, D. L.; Senter, P. D. *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 778-784. **(b)** Francisco, J. A.; Cervený, C. G.; Meyer, D. L.; Mixan, B. J.; Klussman, K.; Chace, D. F.; Rejniak, S. X.; Gordon, K. A.; DeBlanc, R.; Toki, B. E.; Law, C.-L.; Doronina, S. O.; Siegall, C. B.; Senter, P. D.; Wahl, A. F. *Blood* **2003**, 102, 1458-1465.
- 7** Elnakat, H. ; Ratnam, M. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2004**, 56, 1067 –1084.
- 8 (a)** Weitman, S. D. ; Lark, R. H. ; Coney, L. R. ; Fort, D. W. ; Frasca, V. ; Zurawski, V. R. Jr. ; Kamen, B. A. *Cancer Res.* **1992**, 52, 3396–3401. **(b)** Low, P. S. ; Antony, A. C. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2004**, 56, 1055–1058.
- 9 (a)** Reddy, J. A. ; Dorton, R. ; Westrick, E. ; Dawson, A. ; Smith, T. ; Xu, L.-C. ; Vetzal, M. ; Kleindl, P. ; Vlahov, I. R. ; Leamon, C. P. *Cancer Res.* **2007**, 67, 4434–4442. **(b)** Li, J. ; Sausville, E. A. ; Klein, P. J. ; Morgenstern, D. ; Leamon C. P. ; Messmann, R. A. ; LoRusso, P. *J. Clin. Pharmacol.* **2009**, 49, 1467-1476.
- 10** Bikfalvi, A. B. *Cancer* **2003**, 90, 449-458.
- 11 (a)** Hobbs, S. K. ; Monsky, W. L. ; Yuan F. ; Roberts, W. G. ; Griffith, L. ; Torchilin, V. P. ; Jain, R. K. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 4607-4612. **(b)** Yuan F. ; Dellian, M. ; Fukumura, D. ; Leunig, M. ; Berk, D. A. ; Torchilin, V. P. ; Jain, R. K. *Cancer Res.* **1995**, 55, 3752-3756.
- 12** Jang, S. H. ; Wientjes, M. G. ; Lu, D. ; Au, J. L. S. *Pharmaceut. Res.* **2003**, 20, 1337–1350.
- 13 (a)** Iyer, A. K. ; Khaled, G. ; Fang, J. Maeda, H. *Drug Discov. Today* **2006**, 11, 812-818. **(b)** Maeda, H. ; Greish, K. ; Fang, J. *Adv. Polym. Sci.* **2006**, 193, 103–121. **(c)** Tanaka, T. ; Shiramoto, S. ; Miyashita, M. ; Fujishima, Y. ; Kaneo, Y. *Int. J. Pharm.* **2004**, 277, 39-61.
- 14 (a)** Bildstein, L.; Dubernet, C.; Couvreur P.; *Adv. Drug Discover. Rev.* **2011**, 63, 3-23. **(b)** Haag, R.; Kratz, F. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2006**, 45, 1198-1215.

- 15 (a)** Venturoli, D.; Rippe, B. *Am. J. Physiol. - Renal* **2005**, *288*, 605-613. **(b)** Maeda, H. *Adv. Enzyme Regul.* **2001**, *41*, 189-207.
- 16** Vasey, P. A.; Kaye S. B.; Morrison, R.; Twelves C.; Wilson P.; Duncan, R.; Thomson, A. H.; Murray, L. S.; Hilditch T. E.; Murray, T.; Burtles S.; Fraier, D.; Frigerio, E.; Cassidy, J. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 83-94.
- 17** Warburg, O. *Science* **1956**, *123*, 309-314.
- 18** Brown, J. M.; Wilson, W. R. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 437-447.
- 19** Rooseboom, M.; Commandeur, J. N. M.; Vermeulen, N. P. E. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 53-102.
- 20** Gocheva, V.; Joyce, J. A. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 60-64.
- 2** Egeblad, M.; Werb, Z. *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, *2*, 161-174.
- 22** Bajjuri, K. M. ; Liu, Y. ; Liu, C. ; Sinha, S. C. *ChemMedChem*, **2011**, *6*, 54–59.
- 23** Liu, C. ; Sun, C. ; Huang, H. ; Janda, K. ; Edgington, T. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 2957–2964.
- 24** Silver, D. A. ; Pellicer, I. ; Fair, W. R. ; Heston, W. D. ; Cordon-Cardo, C. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 81-85.
- 25** De Feo-Jones, D. ; Brady S. F. ; Feng, D.-M. ; Wong, B. K. ; Boylar, T. ; Haskell, K. ; Kieffer, D. M. ; Leander, K. ; McAvoy, E. ; Lumma, P. ; Pawluczyk, J. M. ; Wai, J. ; Motzel, S. L. ; Keenan, K. ; Van Zwieten, M. ; Lin, J. H. ; Garsky, V. M. ; Freidinger, R. ; Oliff, A. ; Jones, R. E. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *7*, 451–459.
- 26** Bosslet, K. ; Czech, J. ; Hoffmann, D. *Tumor Target.* **1995**, *1*, 45–50.
- 27 (a)** Bagshawe, K. D.; Sharma, S. K.; Springer, C. J.; Rogers, G. T. *Ann. Oncol.* **1994**, *5*, 879-891. **(b)** Bagshawe, K. D. *Current Drug Targets* **2009**, *10*, 152-157. **(c)** Tietze, L. F.; Krewer, B.; *Chem. Biol. Dru. Des.* **2009**, *74*, 205-211.
- 28** Niculescu-Duvaz, I.; Spooner, R.; Marais, R.; Springer, C. J. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 4-22.
- 29** Robinson, M. A.; Charlton, S. T.; Garnier, P.; Wang, X.-T.; Davis, S. S.; Perkins, A. C.; Frier, M.; Duncan, R.; Savage, T. J.; Wyatt, D. A.; Watson, S. A.; Davis, B. G. *P. Nat. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14527-14532.
- 30 (a)** Napier, M. P.; Sharma, S. K.; Springer, C. J.; Bagshawe, K. D.; Green, A. J.; Martin, J.; Stribbling, S. M.; Cushen, N.; O'Maley, D.; Begent, R. H. J. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 765-772. **(b)** Mayer, A.; Francis, R. J.; Sharma, S. K.; Tolner, B.; Springer, C. J.; Martin, J.; Boxer, G. M.; Bell, J.; Green, A. J.; Hartley, J. A.; Cruickshank C.; Wren, J.; Chester, K. A.; Begent, R. H. J. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 6509-6516.
- 31** Tannock, I. F.; Rotin, D. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4373-4384.

- 32 (a)** Jain, R.; Standley, S. M.; Fréchet, J. M. J. *Macromolecules* **2007**, *40*, 452-457. **(b)** Heffernan, M. J.; Murthy, N. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1340-1342. **(c)** Tomlinson, R.; Heller, J.; Brocchini, S.; Duncan, R. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1096-1106. **(d)** Tomlinson, R.; Klee, M.; Garrett, S.; Heller, J.; Duncan, R.; Brocchini, S. *Macromolecules* **2002**, *35*, 473-480.
- 33** Lee, C. C.; Gillies, E. R.; Fox, M. E.; Guillaudeu, S. J.; Fréchet, J. M.; Dy, E. E.; Szoka, F. *C. P. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 16649.
- 34 (a)** Naylor, M. A.; Thompson, P. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 17-29. **(b)** Denny, W. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 577-595. **(c)** Denny, W. A.; *Aust. J. Chem.* **2004**, *57*, 821-828. **(d)** Denny, W. A. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2005**, *15*, 635-646.
- 35 (a)** Papot, S.; Tranoy, I.; Tillequin, F.; Florent, J.-C.; Gesson, J.-P. *Curr. Med Chem. Anti Canc. Agents* **2002**, *2*, 155-185. **(b)** Tranoy-Opalinsky, I.; Fernandes, A.; Thomas, M.; Gesson, J.-P.; Papot, S. *Anti Canc. Agents Med. Chem.* **2008**, *8*, 618 - 637.
- 36** Fishman, W. H.; Anlyan, A. J. *Science* **1947**, *106*, 66-67.
- 37** Bosslet, K.; Straub, R.; Blumrich, M.; Czech, J.; Sperker, B.; Kroemer, H. K.; Gesson, J.-P.; Koch, M.; Monneret, C. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1195-1201.
- 38** Juan, T.-Y.; Roffler, S. R.; Hou, H.-S.; Huang, S.-M.; Chen, K.-C.; Leu, Y.-L.; Prijovich, Z. M.; Yu, C. P.; Wu, C.-C.; Sun, G.-H.; Cha, T.-L. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 4600-4611.
- 39** Tietze, L. F.; Seele, R.; Leiting, B.; Krash, T. *Carbohydr. Res.* **1988**, *180*, 253-262.
- 40** Leu, Y. L.; Roffler, S. R.; Chern, J. W. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3623 - 3628.
- 4** Prijovich, Z. M.; Chen, B.-M.; Leu, Y.-L.; Chern, J.-W.; Roffler, S. R. *Brit. J. Cancer* **2002**, *86*, 1634 - 1638.
- 42** El Alaoui, A.; Schmidt, F.; Monneret, C.; Florent, J.-C. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9628 - 9636.
- 43** Angenault, S.; Thiro, S.; Schmidt, F.; Monneret, C.; Pfeiffer, B.; Renard, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 947-950.
- 44** Schmidt, F.; Ugureanu, I.; Duval, R.; Poupon, A.; Monneret, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *11*, 2129-2134.
- 45** Papot, S.; Rivault, F.; Tranoy, I.; Gesson, J.-P. *Synlett* **2001**, *1*, 164-166.
- 46** Bouvier, E.; Thiro, S.; Schmidt, F.; Monneret, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 969-977.
- 47** Florent, J.-C.; Dong, X.; Gaudel, G.; Mitaku, S.; Monneret, C.; Gesson, J.-P.; Jacquesy, J.-C.; Mondon, M.; Renoux, B.; Andrianomenjanahary, S.; Michel, S.; Koch, M.; Tillequin, F.; Gerken, M.; Czech, J.; Straub, R.; Bosslet, K. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3572-3581.

- 48** Haisma, H. J.; Boven, E.; Van Muijen, M.; de Jong, J.; van der Vijgh W. J. F.; Pinedo, H. M. *Brit. J. Cancer* **1992**, *66*, 474-478.
- 49** Graaf, M.; Boven, E.; Scheeren, H.W.; Haisma, H.J.; Pinedo, H.M. *Curr. Pharm. Design* **2002**, *15*, 1391-1403.
- 50 (a)** Ho, K.-J. *BBA - Protein Struct. M.* **1985**, *827*, 197-206. **(b)** Zenser, T. V.; Lakshmi, V. M.; Davis, B. B. *Drug Metab. Dispos.* **1999**, *27*, 1064-1067.
- 51** Bosslet, K.; Czech, J.; Hoffmann, D. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 2151 - 2159.
- 52** Bosslet, K.; Czech, J.; Lorenz, P.; Sedlacek, H. H.; Schuermann, M.; Seeman, G. *Brit. J. Cancer* **1992**, *65*, 234-238.
- 53** Biondo, P. D.; Brindley, D. N.; Sawyer, M. B.; Field, C. J. *J. Nutr. Biochem.* **2008**, *19*, 787-796.
- 54 (a)** Colas, S.; Mahéo, K.; Denis, F.; Goupille, C.; Hoinard, C.; Champeroux, P.; Tranquart, F.; Bougnoux, P. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 5879-5886. **(b)** Bougnoux, P.; Hajjaji, N.; Ferrasson, M. N.; Giraudeau, B.; Couet, C.; Le Floch, O. *Brit. J. Cancer* **2009**, *101*, 1978-1985.
- 55** Germain, E.; Chajès, V.; Cognault, S.; Lhuillery, C.; Bougnoux, P. *Int. J. Cancer* **1998**, *75*, 578-583.
- 56** Colas, S.; Germain, E.; Arab, K.; Mahéo, K.; Goupille, C.; Bougnoux, P. *Nutr. Cancer* **2005**, *51*, 178-183.
- 57** Chevalier, S.; Goupille, C.; Mahéo, K.; Domingo, I.; Dussiau, C.; Renoux, B.; Bougnoux, P.; Papot, S. *Clin. Lipidol.* **2010**, *5*, 233-243.
- 58** Markus, B.; Veit, W.; Athanassios, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3186-3216.
- 59 (a)** Marchion, D. C.; Bicaku, E.; Daud, A. I.; Richon, V.; Sullivan, D. M.; Munster, P. N. *J. Cell. Biochem.* **2004**, *92*, 223-237. **(b)** Marchion, D. C.; Bicaku, E.; Daud, A. I.; Sullivan, D. M.; Munster, P. N. *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 1993-2000. **(c)** Marchion, D. C.; Bicaku, E.; Turner, J. G.; Schmitt, M. L.; Morelli, D. R.; Munster, P. N. *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 794-801.
- 60** Thomas, M.; Clarhaut, J.; Tranoy-Opalinski, I.; Gesson, J.-P.; Roche, J.; Papot, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8109-8116.
- 6 (a)** Amir, R. J.; Pessah, N.; Shamis, M.; Shabat, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4494-4499. **(b)** Haba, K.; Popkov, M.; Shamis, M.; Lerner, R. A.; Barbas, C. F., III; Shabat, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 716-720. **(c)** Erez, R.; Segal, E.; Miller, K.; Satchi-Fainaro, R.; Shabat, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 4327-4335. **(d)** Shamis, M.; Lode, H. N.; Shabat, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1726-1731.
- 62** de Groot, F. M. H.; Albrecht, C.; Koekkoek, R.; Beusker, P. H.; Scheeren, H. W. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4490-4494.

- 63** Grinda, M.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Papot, S. *MedChemComm* **2012**, *3*, 68-70.
- 64** Grinda, M.; Clarhaut, J.; Tranoy-Opalinski, I.; Renoux, B.; Monvoisin, A.; Cronier, L.; Papot, S. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 2137-2141.
- 65** Chen, B.-M.; Chan, L.-Y.; Wang, S.-M.; Wu, M.-F.; Chern, J.-W.; Roffler, S. R. *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 392-402.
- 66** Tietze, L. F.; Herzig, T.; Feuerstein, T.; Schuberth, I. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1634-1645.
- 68** Tietze, L. F.; Scuster, H. J.; Schmuck, K.; Schuberth, I., Alves, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 6312-6318.
- 69 (a)** Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Herald, C. L.; Tuinman, A. A.; Boettner, F. E.; Kizu, H.; Schmidt, J. M.; Baczynskyj, L.; Tomer, K. B.; Bontems, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6883-6885. **(b)** Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Hogan, F.; Lloyd-Williams, P.; Herald, D. L.; Burkett, D. D.; Clewlow, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5463-5465.
- 70** Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Dufresne, C.; Cerny, R. L. Herald, C. L.; Schmidt, J. M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 6005-6006.
- 71** Bhattacharyya B.; Wolff, J. *FEBS Letters* **1977**, *75*, 159-162.
- 72** Prokopiou, E. M.; Cooper, P. A.; Pettit, G. R.; Bibby, M. C.; Shnyder, S. D. *Mol. Med. Rep.* **2010**, *3*, 309-313.
- 73** Villalonda-Caléro M.; Degen, D.; Barlozzari, T.; von Hoff, D. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **1995**, *36*, 2349.
- 74 (a)** Kalemkerian, G. P.; Ou, X.; Adil, M. R.; Rosati, R.; Khouliani, M. M.; Madan, S. K.; Pettit, G. R. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1999**, *43*, 507-515. **(b)** Aherne, G. W.; Hardcastle, A.; Valenti, M.; Bryant, A.; Rogers, P.; Pettit, G. R.; Srirangam, J. K.; Kelland, L. R. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1996**, *38*, 225-232. **(c)** Turner, T.; Jackson, W. H.; Pettit, G. R.; Wells, A.; Kraft, A. S. *Prostate* **1998**, *34*, 175-181.
- 75** Madden, T.; Tran, H. T.; Beck, D.; Huie, R.; Newman, R. A.; Pusztai L.; Wright, J. J.; Abbruzzese *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 1293-1301.
- 76** Vaishampayan, U.; Glode, M.; Du, W.; Kraft, A.; Hudes, G.; Wright, J.; Hussain, M. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 4205-4208.
- 77** Pettit, G. R.; Srirangam, J. K.; Barkoczy, J.; Williams, M. D.; Boyd, M. R.; Hamel, E.; Pettit, R. K.; Hogan, F.; Bai, R.; Chapuis, J. C.; McAllister, S. C.; Schmidt, J. M. *Anti-Cancer Drug Des.* **1998**, *13*, 243-277.
- 78** Bollenback, G. N.; Long, J. W.; Benjamin, D. G.; Lindquist, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 3310-3315.
- 79** Koenigs, W.; Knorr, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 957-981.

- 80** Jeffrey, S. C.; Andreyka, J. B.; Bernhardt, S. X.; Kissler, K. M.; Kline, T.; Lenox, J. S.; Moser, R. F.; Nguyen, M. T.; Okeley, N. M.; Stone, I. J.; Zhang, X.; Senter, P. D. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 831-840.
- 83** Demuth, T.; Berens, M. E. *J. Neuro-oncol.* **2004**, *70*, 217-228.
- 84** Kubo, M.; Nakamura, M.; Tasaki, A.; Yamanaka, N.; Nakashima, H.; Nomura, M.; Kuroki, S.; Katano, M. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 6071-6074.
- 85** Karhadkar S. S.; Bova, G. S.; Abdallah, N.; Dhara, S.; Gardner, D.; Maitra, A.; Isaacs, J. T.; Berman, D. M.; Beachy, P. A. *Nature* **2004**, *431*, 707-712.
- 86** Berman, D. M.; Karhadkar S. S.; Maitra, A.; De Oca, R. M.; Gerstenblith, M. R.; Briggs, K.; Parker, A. R.; Shimada, Y.; Eshleman, J. R.; Watkins, D. N.; Beachy, P. A. *Nature* **2003**, *422*, 313-317.
- 87** Shahi, M. H.; Lorente, A.; Castresana, J. S. *Oncol. Rep.* **2008**, *19*, 681-688.
- 88** (a) Mahindroo, N.; Punchihewa, C.; Fujii, N. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3829-3845. (b) Stanton, B. Z.; Peng, L. F. *Mol. BioSyst.* **2010**, *6*, 44-54.
- 89** Cooper, M. K.; Porter, J. A.; Young, K. E.; Beachy, P. A. *Science* **1998**, *280*, 1603-1607.
- 90** (a) Kiselyov, A. S. *Anti Canc. Agents Med. Chem.* **2006**, *6*, 445-449. (b) Kiselov, A. S.; Tkachenko, S. E.; Balakin, K. V.; Ivachtenko, A. V. *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, *11*, 1087-1101. (c) Lauth, M.; Toftgard, *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2007**, *8*, 457-461.
- 91** (a) Bar, E. E.; Chaudhry, A.; Lin, A.; Fan, X.; Schreck, K.; Matsui, W.; Piccirillo, S.; Vescovi, A. L.; DiMeco, F.; Olivi, A.; Eberhart, C. G. *Stem Cells* **2007**, *10*, 2524-2533. (b) Clement, V.; Sanchez, P.; de Tribolet, N.; Radovanovic, I.; Ruiz I Altaba, A. *Curr. Biol.* **2007**, *17*, 165-172. (c) Kolterud, A.; Toftgard R.; *Drug Discov. Today Ther. Strateg.* **2007**, *4*, 229-235.
- 92** Keeler R. F.; Baker, D. C. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1989**, *192*, 153-156.
- 93** Hamon, F.; Renoux, B.; Chadéneau, C.; Muller, J.-M.; Papot, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 1678-1682.
- 94** Nygren, C.; von Holst, H.; Månsson, J. E.; Fredman, P. *Acta Neurochir.* **1997**, *139*, 146-150.
- 95** Renoux, B.; Legigan, T.; Bensalma, S.; Chadéneau, C.; Muller, J.-M.; Papot, S. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8459-8464.
- 96** (a) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599. (b) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- 97** De Mesmaecker, A.; Hoffmann, P.; Ernst, B. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3773-3776.

- 98** Thomas, M.; Clarhaut, J.; Strale P.-O.; Tranoy-Opalinski, I.; Roche, J.; Papot, S. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 1006-1010.
- 99** Stazi, F.; Palmisano, G.; Turconi, M.; Clini, S.; Santagostino, M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1097-1103.
- 100** Bouillon, C.; Meyer, A.; Vidal, S.; Jochum, A.; Chevolot, Y.; Cloarec, J.-P.; Praly, J.-P.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4700-4702.
- 101** Jean, M.; Le Roch, M.; Renault, J.; Uriac, P. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2663-2665.
- 102 (a)** Nagasawa, D. T.; Chow, F.; A. Yew; W. Kim; N. Cremer; I. Yang *Neurosurg. Clin. N. Am.* **2012**, *23*, 307-322. **(b)** Bower, M.; Newlands, E. S.; Bleehen, N. M.; Brada, M.; Begent, R.J.; Calvert, H.; Colquhoun, I.; Lewis, P.; Brampton, M. H. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1997**, *40*, 484-488.
- 103** Miele, E.; Spinelli, G. P.; Miele, E.; Tomao, F.; Tomao, S. *Int. J. Nanomedicine* **2009**, *4*, 99-105.
- 104 (a)** Kratz, F. *J. Control. Release* **2008**, *132*, 171-183. **(b)** Elsadek, B.; Kratz, F. *J. Control. Release* **2012**, *157*, 4-28.
- 105** Kratz, F.; Warnecke, A.; Scheuermann, K.; Stockmar, C.; Schwab, J.; Lazar, P.; Drückes, P.; Esser, N.; Drevs, J.; Rognan, D.; Bissantz, C.; Hinderling, C.; Folkers, G.; Fichtner, I.; Unger, C. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5523-5533.
- 106** Unger, C.; Häring, B.; Medinger, M.; Drevs, J.; Steinbild, S.; Kratz, F.; Mross, K. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4858-4866.
- 107 (a)** Warnecke, A.; Fichtner, I.; Garmann, D.; Jaehde, U.; Kratz, F. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1349-1359. **(b)** Garmann, D.; Warnecke, A.; Kalayda, G. V.; Kratz, F.; Jaehde, U. *J. Control. Release* **2008**, *13*, 100-106
- 108** Warnecke, A.; Kratz, F. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 377-387.
- 109** Kratz, F.; Fichtner, I.; Graeser, R. *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 1743-1749.
- 110** Schmid, B.; Chung, D.-E.; Warnecke, A.; Fichtner, I.; Kratz, F. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 702-716.
- 111** Kratz, F.; Drevs, J.; Bing, G.; Stockmar, C.; Scheuermann, K.; Lazar, P.; Unger, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2001-2006.
- 112 (a)** Elsadek, B.; Graeser, R.; Warnecke, A.; Unger, C.; Saleem, T.; El-Melegy, N.; Madkor, H.; Kratz, F. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 234-238. **(b)** Elsadek, B.; Graeser, R.; Esser, N.; Schäfer-Obodozie, C.; Abu Ajaj, K.; Unger, C.; Warnecke, A.; Saleem, T.; El-Melegy, N.; Madkor, H.; Kratz, F. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 3434-3444. **(c)** Graeser, R.; Chung, D.-E.; Esser, N.; Moor, S.; Schächtele C.; Unger, C.; Kratz, F. *Int. J. Cancer*, **2008**, *122*, 1145-1154.

- 113** Chung, D.-E.; Kratz, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5157-5163.
- 114** Abu Ajaj, K.; Graeser, R.; Fichtner, I.; Kratz, F. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2009**, *64*, 413-418.
- 115** Abu Ajaj, K.; Binossek, M. L.; Kratz, F. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 390-396.
- 116** Butor, C.; Griffiths, G.; Aronson, Jr, N. N.; Varki, A. *J. Cell Sci.* **1995**, *108*, 2213-2219.
- 117** Legigan, T.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Berjeaud, J.-M.; Guilhot, F.; Papot, S. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4516-4520.
- 118** Song, H. Y.; Ngai M. H.; Song, Z. Y.; MacAry, P. A.; Hobley, J.; Lear, M. J.; *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3400-3406.
- 119** (a) Guerin, D. J.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2134-2136. (b) Quayle, J. M.; Slawin, A. M. Z.; Philp, D. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7229-7233. (c) Garner, P.; Sunitha, K.; Shanthilal, T. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3525-3528.
- 120** Garner, P.; Ho, W. B.; Grandhee, S. K.; Youngs, W. J.; Kennedy, V. O. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5893-5903.
- 121** (a) Feng, M.; Yang, Y.; He, P.; Fang, Y. *Spectrochim. Acta A* **2000**, *56*, 581-587. (b) Jung, K.; Reszka, R. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2001**, *49*, 87-105.
- 122** (a) Cakir, S.; Biçer, E.; Coşkun, E.; Cakir, O. *Bioelectrochemistry* **2003**, *60*, 11-19. (b) Beralso, H.; Garnier-Suillerot, A.; Tosi, L.; Lavelle, F. *Biochemistry* **1985**, *24*, 284-289.
- 123** Jeffrey, S. C.; De Brabander, J.; Miyamoto, J.; Senter, P. D. *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 277-280.
- 124** Gomme, P. T.; McCann, K. B.; *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 267-273.
- 125** Kneuer, C.; Ehrhardt, C.; Radomski, M. W.; Bakowsky, U. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 1034-1040.
- 126** Armaout, M. A.; Goodman, S. L.; Xiong, J.-P. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 641-651.
- 127** (a) Smith, T. A. D. *Br. J. Biomed. Sci.* **1999**, *56*, 285. (b) Medina, R. A.; Owen, G. I. *Biol. Res.* **2002**, *35*, 9. (c) Ito, F.; Fukusato, T.; Nemoto, T.; Sekihara, H.; Seyama, Y.; Kubota, S. *J. Natl. Cancer Inst.* **2002**, *94*, 1080-1090.
- 128** Danguy, A.; Camby, I.; Kiss, R. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1572*, 285-293.
- 129** (a) Culty, M.; Nguyen, H. A.; Underhill, C. B. *J. Cell. Biol.* **1992**, *116*, 1055-1062. (b) Weigel, P. H.; Yik, J. H. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1572*, 341-363.

- 130 (a)** Geffen, I.; Spiess, M. *Int. Rev. Cytol.* **1992**, *137B*, 181-219. **(b)** Trerè, D.; Fiume, L.; Badiali De Giorgi, L.; Di Stefano, G.; Migaldi, M.; Derenzini, M. *Br. J. Cancer* **1999**, *81*, 404-408.
- 131 (a)** Silver, D. A.; Pellicer, I.; Fair, W. R. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 81-85. **(b)** Ghosh, A.; Heston, W. D. W. *J. Cell Biochem.* **2004**, *91*, 528-539.
- 132 (a)** Xia, W.; Low, P. S. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6811-6824. **(b)** Leamon, C. P.; Reddy, J. A. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2004**, *56*, 1127-1141. **(c)** D'Alincourt Salazar M.; Ratnam, M. *Cancer Metast. Rev.* **2007**, *26*, 141-152. **(d)** Low, P. S.; Henne, W. A.; Doorneweerd, D. D. *Accounts Chem. Res.* **2008**, *41*, 120-129. **(e)** Vlahov, I. R.; Leamon, C. P. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1357-1369.
- 133** Reddy, J. A.; Westrick, E.; Santhapuram, H. K. R.; Howard, S. J.; Miller, M. L.; Vetzal, M.; Vlahov, I.; Chari, R. V. J.; Goldmacher, V. S. *Cancer Res.* **2007**, *13*, 6376-6382.
- 134** Aronov, O.; Horowitz, A. T.; Gabizon, A.; Gibson, D. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 563-574.
- 135** Vlahov, I. R.; Vite, G. D.; Kleindl, P. J.; Wang, Y.; Santhapuram, H. K. R.; You, F.; Howard, S. J.; Kim, S.-H.; Lee, F. Y.; Leamon, C. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4578 - 4581.
- 136** Reddy, J. A.; Westrick, E.; Vlahov, I.; Howard, S. J.; Santhapuram, H. K.; Leamon, C. P. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *58*, 229-236.
- 137** Lee J. W.; Lu, J. Y.; Low, P. S.; Fuchs, P. L. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2397-2414.
- 138** Bae, Y.; Jang, W.-D.; Nishiyama, N.; Fukushima, S.; Kataoka, K. *Mol. BioSyst.* **2005**, *1*, 242-250.
- 139** Henne W. A.; Doorneweerd, D. D.; Hilgenbrink, A. R.; Kularatne, S. A.; Low, P. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5350-5355.
- 140** Liu, J.; Kolar, C.; Lawson, T. A.; Gmeiner, W. H. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5655-5663.
- 141 (a)** Fischer, C. R.; Müller, C.; Reber, J.; Müller, A.; Krämer, S. D.; Ametamey, S. M.; Schibli, R. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 805-813. **(b)** Ke, C.-Y.; Mathias, C. J.; Green, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7421-7426. **(c)** Leamon, C. P.; Parker, M. A.; Vlahov, I. R.; Xu, L. C.; Reddy, J. A.; Vetzal, M.; Douglas, N. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1200-1210.
- 142** Sega E. I.; Low, P. S. *Cancer Metast. Rev.* **2008**, *27*, 655-664.
- 143** van Dam, G. M.; Themelis, G.; Crane, L. M. A.; Harlaar, N. J.; Pleijhuis, R. G.; Kelder, W.; Sarantopoulos, A.; de Jong, J. S.; Arts, H. J. G.; van der Zee, A. G. J.; Bart, J.; Low, P. S.; Ntziachristos, V. *Nature Medicine* **2011**, *17*, 1315-1320.
- 144** Leamon, C. P.; Parker, M. A.; Vlahov, I. R.; Xu, L.-C.; Reddy, J. A.; Vetzal, M.; Douglas, N. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1200-1210.

145 (a) Ducry, L.; Stump, B. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 5-13 et références citées dans cet article. **(b)** Abu Ajaj, K.; El-Abadla, N.; Welker, P.; Azab, S.; Zeisig, R.; Fichtner, I.; Kratz, F. *Eur. J. Cancer* **2012**, *48*, 2054-2065.

146 Parker, N.; Turk, M. J.; Westrick, E.; Lewis, J. D.; Low, P. S.; Leamon, C. P. *Anal. Biochem.* **2005**, *338*, 284-293.

147 Legigan, T.; Clarhaut, J.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Renoux, B.; Thomas, M.; Le Pape, A.; Lerondel, S.; Papot, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *46*, 11606-11610.

148 (a) Bettio, A. ; Honer, M. ; Muller, C. ; Bruhlmeier, M.; Muller, U.; Schibli, R.; Groehn, V.; Schubiger, A. P.; Ametamey, S. M. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 1153-1160. **(b)** Ke, C.-Y.; Mathias, C. J.; Green, M. A. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2004**, *56*, 1143-1160. **(c)** Ke, C.-Y.; Mathias, C. J.; Green, M. A. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30*, 811-817. **(d)** Leamon, C. P.; DePrince, R. B.; Hendren, R. W. *J. Drug Target.* **1999**, *7*, 157-169.

149 (a) Folkman, J. *New Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182-1186. **(b)** Hanahan, D.; Folkman, J. *Cell* **1996**, *86*, 353-364.

150 (a) Hillen, F.; Griffioen, A. *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, *26*, 489-502. **(b)** Folkman, J.; Merler, E.; Abernathy, C.; Williams, G. *J. Exp. Med.* **1971**, *133*, 275-288.

151 (a) Ferrara, N.; Henzel, W. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *161*, 851-858. **(b)** Leung, D. W. ; Cachianes, G. ; Kuang, W. J. ; Goeddel, D. V. ; Ferrara, N. *Science*, **1989**, *246*, 1306-1309.

152 Tischer, E. ; Mitchell, R. ; Hartman, T. ; Silva, M. ; Gospodarowicz, D. ; Fiddes, J. C. ; Abraham, J. A. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 11947-11954.

153 (a) De Vries, C.; Escobedo, J. A.; Ueno, H.; Houck, K.; Ferrara, N.; Williams, L. T. *Science*, **1992**, *255*, 989-991.

154 Cross, M. J.; Dixelius, J.; Matsumoto, T.; Claesson-Welsh, L.; *Trends Biochem. Sciences* **2003**, *28*, 488-494.

155 Folkman, J. *Nature Reviews*, **2007**, *6*, 273-286

156 Thorpe, P. E. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 415-427.

157 (a) Iyer, S.; Chaplin, D. J.; Rosenthal, D. S.; Boulares, A. H.; Yi, L.-Y.; Smulson, M. E. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 4510-4514. **(b)** Dark, G. G.; Hill, S. A.; Prise, V. E.; Tozer, G. M.; Pettit, G. R.; Chaplin, D. J. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1829-1834.

158 Chaplin, D. J.; Pettit, G. R.; Parkins, C. S.; Hill, S. A. *Br. J. Cancer* **1996**, *27 (suppl.)*, S86-S88.

159 Blakey, D. C.; Ashton, S. E.; Westwood, F. R.; Walker, M.; Ryan, A. *J. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* **2002**, *54*, 1497-1502.

- 160 (a)** Kerr, D. J.; Maughan, T.; Newlands, E.; Rustin, G.; Bleeheh, N. M.; Lewis, C. Kaye, S. B. *Brit. J. Cancer* **1989**, *60*, 104-106. **(b)** Zhao, L.; Ching, L. M.; Kestell, P.; Kelland, L. R.; Baguleu, B. C. *Int. J. Cancer* **2005**, *116*, 322-326.
- 161** Hurwitz, H.; Fehrenbacher, L.; Novotny, W.; Cartwright, T.; Hainsworth, J.; Heim, W.; Berlin, J.; Baron, A.; Griffing, S.; Holmgren, E.; Ferrara, N.; Fyfe, G.; Rogers, B.; Ross, R.; Kabbinavar, F. *New Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2335-2342.
- 162** Konner, J.; Dupont, J. *Clin. Colorectal Cancer* **2004**, *4(suppl. 2)*, S81-S85.
- 163** Goodman, V. L.; Rock, E. P.; Dagher, R.; Ramchandi, R. P.; Abraham, S.; Gobburu, J. V. S.; Booth, B. P.; Verbois, S. L.; Morse, D. E.; Liang, C. Y.; Chidambaram, N.; Jiang, J. X.; Tang, S.; Mahjoob, K.; Justice, R.; Pazdur, R. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 1367-1373.
- 164** Zilberberg, L.; Shinkaruk, S.; Lequin, O.; Rousseau, B.; Hagedorn, M.; Costa, F.; Caronzolo, D.; Canron, X.; Convert, O.; Lain, G.; Gionnet, K.; Gonçalves, M.; Bayle, M.; Bello, L.; Chassaing, G.; Deleris, G.; Bikfalvi, A. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35564-35573.
- 165** Gonçalves, M.; Estieu-Gionnet, K.; Berthelot, T.; Lain, G.; Bayle, M.; Canron, X.; Betz, N.; Bikfalvi, A.; Délérís, G. *Pharm. Res.* **2005**, *22*, 1411-1421.
- 166** Deshayes, S.; Maurizot, V.; Clochard, M.-C.; Baudin, C.; Berthelot, T.; Esnouf, S.; Lairez, D.; Moenner, M.; Délérís, G. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 1631-1642.
- 167 (a)** Murphy, G. P.; Barren, R. J.; Erickson, S. J. *Cancer* **1996**, *78*, 809-818. **(b)** Lopes, A. D.; Davis, W. L.; Rosenstrauss, M. J.; Uveges, A. J.; Gilman, S. C. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 6423-6429.
- 168** Chang, S. S.; O'Keefe, D. S.; Bacich, D. J.; Reuter, V. E.; Heston, W. D. W.; Gaudin, P. B. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 2674-2681.
- 169** Liu, H.; Rajasekaran, A. K.; Moy, P.; Xia, Y.; Kim, S.; Navarro, V.; Rahmati, R.; Bander, N. H. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 4055-4060.
- 170 (a)** Wang, X.; Ma, D.; Olson, W. C.; Heston, W. D. W. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 1728-1739. **(b)** Ma, D.; Hopf, C. E.; Malewicz, A. D.; Donovan, G. P.; Senter, P. D.; Goeckeler, W. F.; Maddon, P. J.; Olson, W. C. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 2591-2596. **(c)** Sodee, D. B.; Ellis, R. J.; Samuels, M. A.; Spirnak, J. P.; Poole, W. F.; Riester, C.; Martanovic, D. M.; Stonecipher, R.; Bellon, E. M. *Prostate* **1998**, *37*, 140-148. **(d)** Milowsky, M. I.; Nanus, D. M.; Kostakoglu, L.; Sheehan, C. E.; Vallabhajosula, S.; Goldsmith, S. J.; Ross, J. S.; Bander, N. H. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 540-547.
- 171 (a)** Misra, P.; Humblet, V.; Pannier, N.; Maison, W.; Frangioni, J. V. *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1379-1389. **(b)** Tang, H.; Brown, M.; Ye, Y.; Huang, G.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Zhai, H.; Chen, X.; Shen, T. Y.; Tenniswood, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *307*, 8-14. **(c)** Liu, T.; Wu, L.; Kazak, M.; Berkman, C. E. *Prostate* **2008**, *68*, 955-964. **(d)** Mease, R. C.; Dusich, C. L.; Foss, C. A.; Ravert, H. T.; Dannals, R. F.; Seidel, J.; Prideaux, A.; Fox, J. J.; Sgouros, G.; Kozikowski, A. P.; Pomper, M. G. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 3036-3043. **(e)** Banerjee, S. R.; Foss, C. A.; Castanares, M.; Mease, R. C.; Byun, Y.; Fox, J. J.; Hilton, J.; Lupold, S. E.; Kozikowski, A. P.; Pomper, M. G. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4504-4517. **(f)**

Chen, Y.; Foss, C. A.; Byun, Y.; Nimmagadda, S.; Pullambhatla, M.; Fox, J. J.; Castanares, M.; Lupold, S. E.; Babich, J. W.; Mease, R. C.; Pomper, M. G. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7933-7943. (g) Banerjee, S. R.; Pullambhatla, M.; Byun, Y.; Nimmagadda, S.; Green, G.; Fox, J. J.; Horti, A.; Mease, R. C.; Pomper, M. G. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5333-5341.

172 (a) Kozikowski, A. P.; Nan, F.; Conti, P.; Zhang, J.; Ramadan, E.; Bzdega, T.; Wroblewska, B.; Neale, J. H.; Pshenichkin, S.; Wroblewski, J. T. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 298-301. (b) Kozikowski, A. P.; Zhang, J.; Nan, F.; Petukhov, P. A.; Grajkowska, E.; Wroblewski, J. T.; Yamamoto, T.; Bzdega, T.; Wroblewska, B.; Neale, J. H. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1729-1738.

173 (a) Kularatne, S. A.; Wang, K.; Santhapuram, H.-K. R.; Low, P. S. *Mol. pharmaceutics* **2009**, *6*, 780-789. (b) Kularatne, S. A.; Zhou, Z.; Yang, J.; Post, C. B.; Low, P. S. *Mol. pharmaceutics* **2009**, *6*, 790-800.

174 Kularatne, S. A.; Venkatesh, C.; Santhapuram, H.-K. R.; Wang, K.; Vaitilingam, B.; Henne, W. A.; Low, P. S. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7767-7777.

175 El-Serag, H. B. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 1118-1127.

176 Marin, J. J. G.; Castaño, B.; Martínez-Becerra, P.; Rosales, R.; Monte, M. *J. Cancer Therapy* **2008**, *6*, 711-728.

177 (a) Fiumé, L.; Mattioli, A.; Balboni, P. G.; Tognon, M.; Barbanti-Brodano, G.; De Vries, J.; Wieland, T. *FEBS Lett.* **1979**, *103*, 47-51. (b) Fiumé, L.; Di Stefano, G.; Busi, C.; Mattioli, A.; Bonino, F.; Torrani-Cerenzia, M.; Verme, G.; Rapicetta, M.; Bertini, M.; Gervasi, G. B. *Journal of Hepatology* **1997**, *26*, 253-259. (c) Cerenzia, M. T.; Fiume, L.; De Bernardi Venon, W.; Lavezzo, B.; Brunetto, M. R.; Ponzetto, A.; Di Stefano, G.; Busi, C.; Mattioli, A.; Gervasi, G. B.; Bonino, F.; Verme, G. *Hepatology* **1996**, *23*, 657-661.

178 (a) Xu, Z.; Chen, L.; Gu, W.; Gao, Y.; Lin, L.; Zhang, Z.; Xi, Y.; Li, Y. *Biomaterials* **2009**, *30*, 226-232. (b) Medina, S. H.; Tekumalla, V.; Chevliakov, M. V.; Shewach, D. S.; Ensminger, W. D.; El-Sayed, M. E. H. *Biomaterials* **2011**, *32*, 4118-4129. (c) Terada, T.; Iwai, M.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; Hashida, M. *J. Controlled Release* **2006**, *111*, 333-342. (d) Managit, C.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; Hashida, M. *Int. J. Pharm.* **2005**, *301*, 255-261. (e) Managit, C.; Kawakami, S.; Yamashita, F.; Hashida, M. *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 2266-2275. (f) Fiumé, L.; Bolondi, L.; Busi, C.; Chieco, P.; Kratz, F.; Lanza, M.; Mattioli, A.; Di Stefano *of Hepatology* **2005**, *43*, 645-652.

179 Lee, M. H.; Han, J. H.; Kwon, P.-S.; Bhuniya, S.; Kim, J. Y.; Sessler, J. L.; Kang, C.; Kim, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1316-1322.

180 Fernandes, A.; Viterisi, A.; Coutrot, F.; Potok, S.; Leigh, D. A.; Aucagne, V.; Papot, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6443-6447.

181 (a) Kay, E. R.; Leigh, D. A.; Zerbetto, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 72-191; (b) Crowley, J. D.; Goldup, S. M.; Lee, A. L.; Leigh, D. A.; McBurney, R. T. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1530-1541; (c) Hänni, K. D.; Leigh, D. A. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1240-1251; (d) Balzani, V.; Credi, A.; Raymo, F. M.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3349-3391.

- 182** Bravo, J. A.; Raymo, F. M.; Stoddart, J. F.; White, A. J. P.; Williams, D. J. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *11*, 2565-2571.
- 183** Forgan, R. S.; Sauvage, J.-P.; Stoddart, J. F. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5434-5464.
- 184** Barran, P. E.; Cole, H. L.; Goldup, S. M.; Leigh, D. A.; McGonigal, P. R.; Symes, M. D.; Wu, J.; Zengerle, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12280-12284.
- 185** (a) Walba, D. M.; Richards, R. M.; Haltiwanger, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3219-3221. (b) John, R. P.; Park, M.; Moon, D.; Lee, K.; Hong, S.; Zou, Y.; Hong, C. S.; Lah, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14142-14143.
- 186** (a) Dietrich-Buchecker, C. O.; Sauvage, J.-P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 189-192. (b) Meyer, M.; Albrecht-Gary, A.-M.; Dietrich-Buchecker, C. O.; Sauvage, J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4599-4607. (c) Dietrich-Buchecker, C. O.; Rapenne, G.; Sauvage, J.-P. *Chem. Commun.* **1997**, 2053-2054. (d) Perret-Aebi, L. E.; von Zelewsky, A.; Dietrich-Buchecker, C. O.; Sauvage, J.-P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4482-4485.
- 187** Ayme, J.-F.; Beves, J. E.; Leigh, D. A.; McBurney, R. T.; Rissanen, K.; Schultz, D. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 15-20.
- 188** (a) Peinador, C.; Blanco, V.; Quintela, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 920-921. (b) McArdle, C. P.; Vittal, J. J.; Puddephatt, R. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3819-3822. (c) Ibukuro, F.; Fujita, M.; Yamaguchi, K.; Sauvage, J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11014-11015. (d) Pentecoste, C. D.; Chichak, K. S.; Peters, A. J.; Cave, G. W. V.; Cantrill, S. J.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 218-222.
- 189** (a) Li, Q. Y.; Vogel, E.; Parham, A. H.; Nieger, M.; Bolte, M.; Fröhlich, R.; Saarenketo, P.; Rissanen, K.; Vögtle, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4041-4049. (b) Liu, Y.; Bonvallet, P. A.; Vignon, S. A.; Khan, S. I.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3050-3055. (c) Zhao, Y.-L.; Trabolsi, A.; Stoddart, J. F. *Chem Commun.* **2009**, 4844-4846.
- 190** (a) Chichak, K. S.; Cantrill, S. J.; Pease, A. R.; Chiu, S.-H.; Cave, G. W. V.; Atwood, J. L.; Stoddart, J. F. *Science* **2004**, *304*, 1308-1312. (b) Chichak, K. S.; Peters, A. J.; Cantrill, S. J.; Stoddart, J. F. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7956-7962.
- 191** Dietrich, C. O.; Sauvage, J.-P.; Kintzinger, J.-P. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5095-5098.
- 192** Amabilino, D. B.; Ashton, P. R.; Reder, A. S.; Spencer, N.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1286-1290.
- 193** Amabilino, D. B.; Ashton, P. R.; Boyd, S.; E.; Lee, J. Y.; Menzer, S.; Stoddart, J. F.; Williams, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 2070-2072.
- 194** Harrison, I. T.; Harrison, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5723-5724.
- 195** Ashton, P. R.; Chrystal, E. J. T.; Glink, P. T.; Menzer, S.; Schiavo, C.; Spencer, N.; Stoddart, J. F.; Tasker, P. A.; White, A. J. P.; Williams, D. J. *Chem.-Eur. J.* **1996**, *2*, 709-728.

- 196** Ashton, P. R. ; Goodnow, T. T.; Kaifer, A. E.; Reddington, M. V.; Slawin, A. M. Z.; Spencer, N.; Stoddart, J. F.; Vicent, C.; Williams, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 1396-1399.
- 197** Crowley, J. D.; Hänni, K. D.; Lee, A.-L.; Leigh, D. A.; McBurney, R. T. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1530-1541.
- 198 (a)** Aucagne, V. ; Berna, J. ; Crowley, J. D. ; Goldup, S. M.; Hänni, K. D.; Leigh, D. A.; Lusby, P. J.; Ronaldson, V. E.; Slawin, A. M. Z.; Viterisi, A.; Walker, D. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11950-11963. **(b)** Lahlali, H.; Jobe, K.; Watkinson, M.; Goldup, S. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4151-4155. **(c)** Aucagne, V.; Hänni, K. D.; Leigh, D. A.; Lusby, P. J.; Walker, D. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2186-2187.
- 199** Beves, J. E.; Blight, B. A.; Campbell, C. J.; Leigh, D. A.; McBurney, R. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9260-9327.
- 200 (a)** Fichna, J.; Janecka, A. *Cancer Metast. Rev.* **2004**, *23*, 351-366; **(b)** Zagon, I. S.; Rahn, K. A.; McLaughlin, P. J. *Neuropeptides* **2007**, *41*, 441-452; **(c)** Zagon, I. S.; McLaughlin, P. J. *Neuropeptides* **2005**, *39*, 495-505; **(d)** Zagon, I. S.; McLaughlin, P. J. *Neuropeptides* **2003**, *37*, 79-88; **(e)** Cheng, F.; Zagon, I. S.; Verderame, M. F.; McLaughlin, P. J. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 10511-10518.
- 201 (a)** Boarder, M. R.; McArdle, W. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35*, 1043-1047; **(b)** Marini, M.; Urbani, A.; Trani, E.; Bogiorno, L.; Roda, L. G. *Peptides* **1997**, *18*, 741-748; **(c)** Marini, M.; Roscetti, G.; Bongiorno, L.; Urbani, A.; Roda, L. G. *Neurochem. Res.* **1990**, *15*, 61-67; **(d)** Shibanoki, S.; Weinberger, S. B.; Ishikawa, K.; Martinez Jr, J. L. *Regul. Peptides* **1991**, *32*, 267-278; **(e)** Shibanoki, S.; Weinberger, S. B.; Ishikawa, K.; Martinez Jr, J. L. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1990**, *328*, 253-256; **(f)** Shibanoki, S.; Weinberger, S. B.; Schulteis, G.; Ishikawa, K.; Martinez Jr, J. L. *Life Sci.* **1992**, *50*, 667-675; **(g)** Schulteis, G.; Rodriguez, W. A.; Rodriguez, S. B.; Martinez Jr, J. L. *Peptides* **1993**, *14*, 1083-1089.
- 202** Fernandes, A.; Viterisi, A.; Aucagne, V.; Leigh, D. A. ; Papot, S. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2083-2085.
- 203 (a)** Damen, E. W. P.; Wiegerinck, P. H. G.; Braamer, L.; Sperling, D.; de Vos, D.; Scheeren, H. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 427-432. **(b)** Zakharian, T. Y. ; Seryshev, A. ; Sitharaman, B.; Gilbert, B. E.; Knight, V.; Wilson, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12508-12509.
- 204** Horvarth, G.; Rusa, C.; Kontos, Z.; Gerencser, J.; Huszthy, P. *Synthetic Commun.* **1999**, *29*, 3719-3731.
- 205** Andersen, J.; Madsen, U.; Björkling, F.; Liang, X. *Synlett* **2005**, *14*, 2209-2213.
- 206** Bayley, H.; Standring, D. N.; Knowles, J. R. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3633-3634.
- 207** Warnecke, A.; Kratz, F. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1546-1552.

PUBLICATIONS ASSOCIÉES À CE MANUSCRIT

1- Renoux, B.; Legigan, T.; Bensalma, S.; Chadéneau, C.; Muller, J.-M.; Papot, S. "A new cycloamine glucuronide prodrug with improved kinetics of drug release" *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8459-8464.

2- Legigan, T.; Clarhaut, J.; Renoux, B.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Berjeaud, J.-M.; Guilhot, F.; Papot, S. "Synthesis and antitumor efficacy of a β -glucuronidase-responsive albumin-binding prodrug of doxorubicin" *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4516-4520.

3- Legigan, T.; Clarhaut, J.; Tranoy-Opalinski, I.; Monvoisin, A.; Renoux, B.; Thomas, M.; Le Pape, A.; Lerondel, S.; Papot, S. "The first generation of b-galactosidase-responsive prodrugs designed for the selective treatment of solids tumors in prodrug monotherapy" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *46*, 11606-11610.

A new cyclopamine glucuronide prodrug with improved kinetics of drug release†

Brigitte Renoux,^a Thibaut Legigan,^a Souheyla Bensalma,^b Corinne Chadéneau,^b Jean-Marc Muller^b and Sébastien Papot*^a

Received 4th July 2011, Accepted 19th September 2011

DOI: 10.1039/c1ob06081c

We prepared a new glucuronide prodrug of cyclopamine designed to target selectively the Hedgehog signalling pathway of cancer cells. This prodrug includes a novel self-immolative linker bearing a hydrophilic side chain that can be easily introduced *via* “click chemistry”. With this design, the prodrug exhibits reduced toxicity compared to the free drug on U87 glioblastoma cells. However, in the presence of β -glucuronidase, the prodrug conducts to the quick release of cyclopamine thereby restoring its antiproliferative activity.

Introduction

Recently, aberrant activation of the Hedgehog (Hh) signalling pathway¹ has been observed in a wide range of malignancies such as breast,² prostate,³ gastric,⁴ lung⁵ and brain⁶ tumours. Ever since then, many efforts have been devoted to the discovery of small-molecule Hh inhibitors for cancer chemotherapy.⁷ Cyclopamine **1** is a natural alkaloid isolated from *Veratrum californicum* which was the first Hh inhibitor to be identified (Fig. 1).⁸ This compound is a potent antagonist of the Hh pathway which inactivates Smoothed (Smo) by binding to its heptahelical bundle.⁹ Cyclopamine already demonstrated antitumor activity in the course of preclinical and clinical evaluations.¹⁰

Although this Hh inhibitor is a promising chemotherapeutic agent, cyclopamine could induce serious damage in normal tissues since somatic stem cells are also Hh-dependent. Moreover, the use of compound **1** *in vivo* is limited by its poor aqueous solubility.¹¹ In order to circumvent these drawbacks, our group¹² and others¹³ have proposed to develop water-soluble prodrugs programmed to deliver cyclopamine selectively in the vicinity of the tumour. Within this framework, we studied the glucuronide prodrug **2a** (Fig. 1, R=H) designed to release cyclopamine in the presence of β -glucuronidase, an enzyme that has been detected at high level in necrotic areas of numerous tumours.¹⁴ This specificity of the tumor microenvironment has been already exploited to activate enzyme-responsive glucuronide prodrugs exclusively in malignant tissues. To date, several glucuronide prodrugs led to

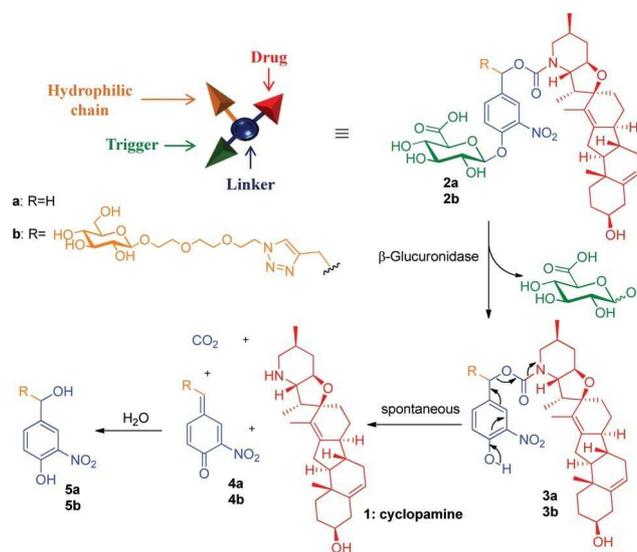


Fig. 1 β -Glucuronidase-catalysed drug release mechanism.

superior therapeutic efficacy compared to standard treatment demonstrating the validity of this targeting strategy.¹⁵

In our previous study, derivatisation of cyclopamine in the form of prodrug **2a** resulted in a non-toxic compound. However, incubation of the glucuronide **2a** with β -glucuronidase triggered the clean release of the drug through the mechanism depicted in Fig. 1 thereby restoring its antiproliferative activity towards U87 human glioblastoma cells. In our design, we included a nitrobenzylphenoxy carbamate linker¹⁶ between the glucuronide and the bulky cyclopamine in order to allow a good recognition of the carbohydrate substrate by the enzyme. As expected, in the presence of β -glucuronidase the glycosidic bond was rapidly cleaved to generate the phenol **3a**. The latter underwent a 1,6-elimination followed by a spontaneous decarboxylation leading to the full expulsion of cyclopamine within 28 h. During this

^aUniversité de Poitiers, UMR-CNRS 6514, 4 rue Michel Brunet, BP 633, 86022, Poitiers, France. E-mail: sebastien.papot@univ-poitiers.fr; Fax: (+33) 549453501

^bUniversité de Poitiers, UMR CNRS 6187, 40 Avenue du Recteur Pineau, 86022, Poitiers, France

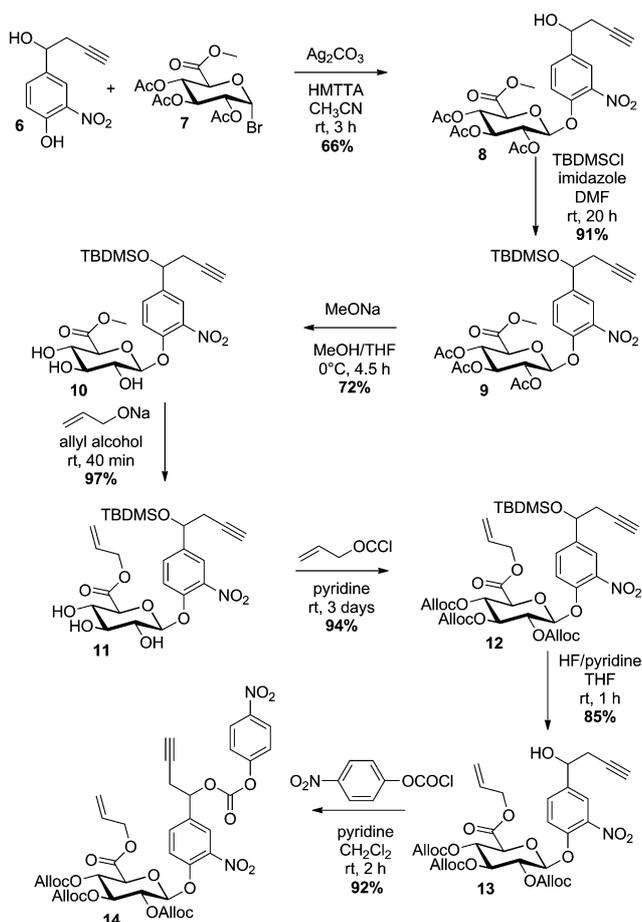
† Electronic supplementary information (ESI) available: See DOI: 10.1039/c1ob06081c

experiment, we observed the precipitation of the linker-drug intermediate **3a** as soon as it was produced by the enzymatic hydrolysis. Therefore, the kinetics of drug release was limited by the gradual solubilisation of **3a** in aqueous media.

The slow release of cyclophamide from the phenol **3a** could be problematic in the course of a tumour-activated prodrug therapy. Indeed, in such an approach it is well admitted that the liberation of the active compound has to occur quickly after the enzymatic activation step in order to avoid the diffusion of the linker-drug intermediate outside of the tumour site.¹⁶ In this context, it seems worthwhile to develop new cyclophamide glucuronide prodrugs with improved kinetics of drug release. Thus, we decided to pursue our investigations by the study of the prodrug **2b** composed of a glucuronide trigger, the potent cyclophamide and a self-immolative linker bearing a glycosylated poly(ethylene glycol) side chain¹⁷ (Fig. 1). With this design, we anticipated that enzymatic hydrolysis of **2b** will yield the phenol **3b** which will be readily water soluble thanks to the presence of the hydrophilic side chain. Under such circumstances, cyclophamide should be eliminated faster from the intermediate **3b** than from its weakly soluble analogue **3a**.

Results and discussion

Prodrug **2b** was prepared in ten steps starting from a racemic mixture of the readily accessible nitrophenol **6**¹⁸ (Scheme 1). First, stereoselective glycosylation of **6** was carried out with the

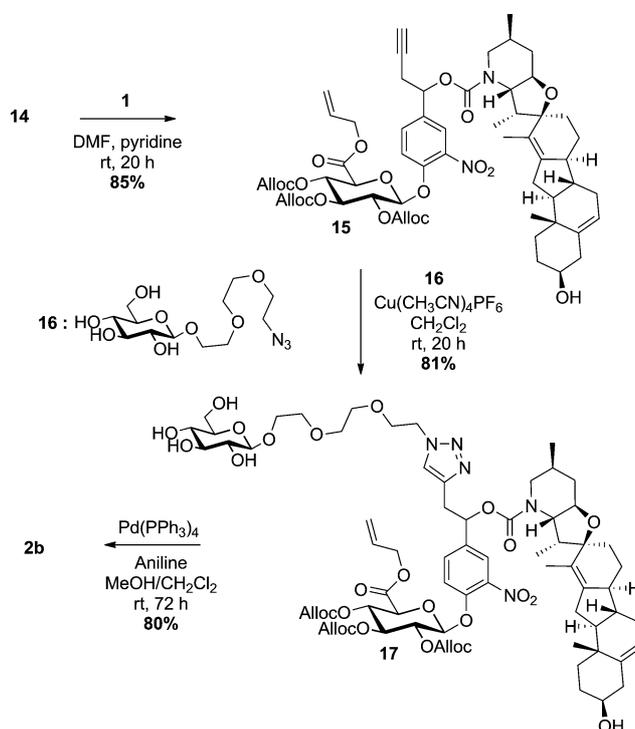


Scheme 1 Synthesis of the carbonate **14**.

bromo-glucuronide **7**¹⁹ under Koenigs-Knorr conditions in the presence of silver carbonate as the catalyst (66%). The resulting β -glucuronide **8** was then treated with *tert*-butyldimethylsilyl chloride and imidazole to produce the silyl ether **9** in 91% yield.

At this stage, the protecting groups of the carbohydrate moiety were modified through a three step strategy to give the fully allyl protected derivative **12**. This choice was motivated by a recent study described by Schmidt and co-workers who demonstrated that both allyl ester and carbonates are compatible with the presence of either alkali- or acid-sensitive anticancer drugs.²⁰ Furthermore, the entire deprotection of the glucuronide can be achieved in a one step procedure under mild conditions at the end of the synthesis. Thus, this synthetic strategy will limit the number of steps after the introduction of the expensive cyclophamide **1** on the linker unit. The *O*-acetyl groups of compound **9** were first removed using catalytic amount of MeONa to afford the hydroxyl free derivative **10** (72%). Transesterification of the methyl ester with sodium allylate produced the allyl ester **11** in 97% yield. The three allyl carbonates were then introduced in the presence of 30 equivalents of allyl chloroformate employing pyridine as solvent. After 3 days under these conditions, the fully allyl protected glucuronide **12** was obtained in an excellent yield of 94%. Cleavage of the silyl ether was undertaken with HF/pyridine to furnish the alcohol **13** which was subsequently activated in the form of the 4-nitrophenyl carbonate **14** (92%).

Coupling between carbonate **14** and cyclophamide **1** gave the clickable derivative **15** in 85% yield (Scheme 2). The “click chemistry” reaction was then carried out at room temperature in the presence of the azide **16**²¹ using $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6$ as a catalyst. Under these conditions, the triazole **17** was prepared in 81% yield after purification by flash column chromatography. The prodrug **2b** was finally obtained as a mixture of two diastereoisomers by the



Scheme 2 Synthesis of prodrug **2b** from carbonate **14**.

cleavage of protecting groups using catalytic amount of Pd(PPh₃)₄ and two equivalents of aniline (80%).

First, the stability of **2b** was examined in phosphate buffer (0.02 M, pH = 7.2) at 37 °C. No decomposition of prodrug **2b** was detected after 24 h under these conditions. Enzymatic hydrolysis was then conducted with *E. coli* β-glucuronidase and monitored by HPLC/MS (Fig. 2).

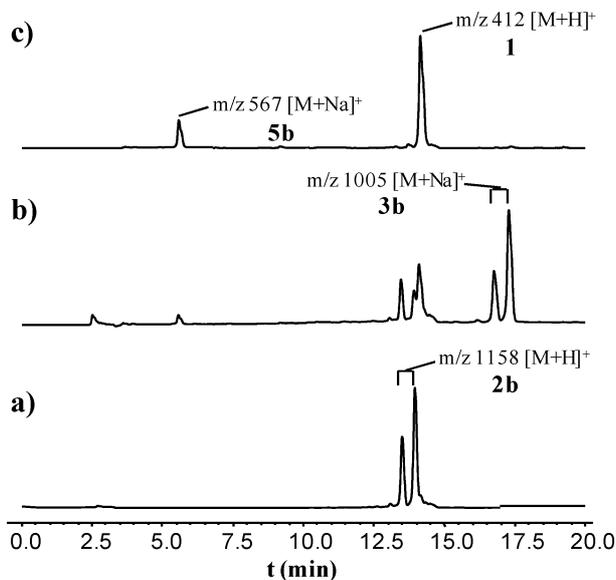


Fig. 2 Enzymatic hydrolysis of the two diastereoisomers of prodrug **2b** with *E. coli* β-glucuronidase in phosphate buffer (0.02 M, pH 7.0) at 37 °C. a) *t* = 0 min; b) *t* = 10 min; c) *t* = 120 min.

The glycosidic bond of prodrug **2b** was rapidly cleaved (within 30 min) showing that the glucuronide trigger is readily accessible by the enzyme, despite the presence of bulky moieties such as cyclopamine and the glycosylated poly(ethylene glycol) side chain attached on the linker unit. Only ten minutes after the addition of β-glucuronidase, cyclopamine **1** and the intermediate **3b** were detected in the medium (Fig. 2b). The latter totally disappeared in less than two hours leading to the clean release of the drug along with the formation of the benzyl alcohol **5b** (Fig. 2c). All together, these results confirmed that the disassembly of prodrug **2b** proceed through the self-immolative mechanism illustrated in Fig. 1. Cyclopamine was expelled significantly faster from prodrug **2b** than from our previous glucuronide **2a** (<2 h *versus* 28 h). In contrast with its analogue **3a**, the phenol **3b** did not precipitate in the reaction mixture. As expected, this intermediate was fairly water soluble thanks to the hydrophilic side chain thereby allowing the quick release of cyclopamine.

Prodrug **2b** was then tested for its anti-proliferative activity on U87 glioblastoma cells after a 5-day treatment (Fig. 3). When incubated alone in the culture medium, prodrug **2b** did not affect viability of cells whereas the free drug was highly toxic with an IC₅₀ value of 16.5 μM. This result indicated that derivatisation of cyclopamine in the form of prodrug **2b** markedly reduced its anti-proliferative activity. On the other hand, addition of β-glucuronidase in the culture medium induced a dramatic anti-proliferative effect with an IC₅₀ value close to that obtained for cyclopamine (IC₅₀ = 24.5 μM). This can be unambiguously attributed to the release of the drug in the culture medium

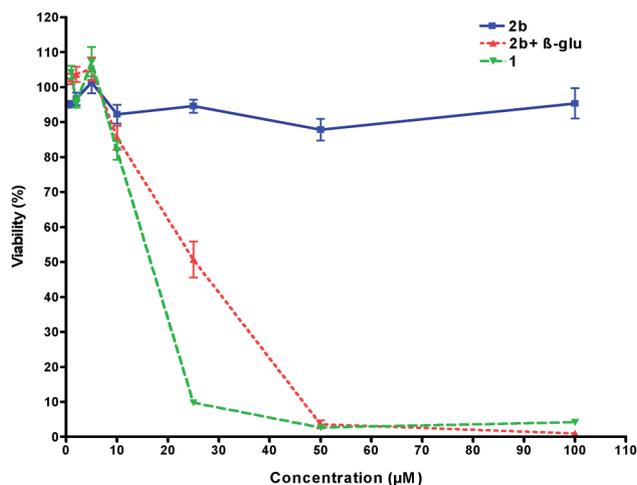


Fig. 3 Viability of U87 cells treated during 5 days with prodrug **2b** in the absence or presence of β-glucuronidase (β-glu, 40 U/mL) or with cyclopamine **1**. Values were obtained from two independent experiments, each performed in hexaplicate and are expressed as mean ± SEM.

as previously observed in the course of enzymatic hydrolysis experiments.

Conclusions

In summary, we prepared a novel non-toxic prodrug of cyclopamine bearing a hydrophilic side chain introduced *via* “click chemistry” on the self-immolative linker. When activated by β-glucuronidase, this prodrug exhibits improved kinetics of drug release compared to its previous analogue which included a less water soluble linker. Furthermore, incubation of the prodrug in the presence of the activating enzyme restores its antiproliferative activity on U87 glioblastoma cells. All these results suggest that this new glucuronide prodrug possesses the necessary prerequisites for further *in vivo* investigation in the course of a tumor targeting strategy.

Experimental

Preparation of compound **8**

A solution of 1,1,4,7,10,10-hexamethyltriethylenetetramine (HMTTA) (6.3 mL, 23.1 mmol) and Ag₂CO₃ (33.7 g, 122.3 mmol) in anhydrous CH₃CN (33 mL) was stirred during 2 h at room temperature. Nitrophenol **6** (4.56 g, 22 mmol) and bromoglucuronide **7** (11.31 g, 33 mmol) were added at 0 °C, and the solution mixture was stirred for 4 h at room temperature. The reaction was quenched with water and extracted with ethyl acetate (3 × 20 mL). The combined organic layers were washed with HCl 1 M, dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting crude material was purified by column chromatography over silica gel (petroleum ether/AcOEt 6/4, 5/5, 4/6) to afford **8** (7.62 g, 0.84 mmol, 66%) as a mixture of two diastereoisomers (pale yellow solid). *R*_f: 0.56 (petroleum ether/AcOEt 50/50). mp = 67.3 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.04 (s, 6H), 2.10 (s, 4H), 2.62 (m, 2H), 3.38 (bs, 1H), 3.74 (s, 3H), 4.28 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 4.92 (m, 1H), 5.25–5.32 (m, 4H), 7.34 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.60 (m, 1H), 7.87 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz);

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.5, 29.2, 53.1, 68.7, 70.1, 70.6, 71.1, 71.8, 72.3, 79.8, 99.5, 119.4, 122.7, 131.5, 139.1, 140.7, 148.0, 166.8, 169.5, 170.1; HRMS (ESI) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 546.1228 (calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_{13}\text{Na}$: 546.1224); $[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 562.0997 (calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_{13}\text{K}$: 562.0963).

Preparation of compound 9

Imidazole (2.4 g, 35.2 mmol) and TBDMSCl (5.3 g, 35.2 mmol) were dissolved in dry DMF (4 mL). The solution was stirred for 0.5 h and a solution of **8** (9.23 g, 17.6 mmol) in DMF (14 mL) was added. After stirring at room temperature for 20 h, water (100 mL) was added; the layers were separated and the aqueous layer was extracted three times with dichloromethane. The combined organic layers were dried with anhydrous MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography over silica gel (CH_2Cl_2 /petroleum ether 50/50; 75/25) to give **9** (10.32 g, 91%) as a mixture of two diastereoisomers (pale yellow solid). R_f 0.60 (petroleum ether/AcOEt 60/40). mp = 59.5 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ -0.04 (s, 3H), 0.09 (2 s, 3H), 0.89 (2 s, 9H), 1.99 (s, 1H), 2.06 (s, 6H), 2.13 (s, 3H), 2.42–2.62 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 4.22 (m, 1H), 4.82 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz), 5.19–5.23 (m, 1H), 5.30–5.37 (m, 3H), 7.33 (2d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.55 (m, 1H), 7.80 (d, 0.5H, $J = 2.1$ Hz), 7.84 (d, 0.5 H, $J = 2.1$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ -4.8, -4.6, 18.3, 20.7, 25.8, 30.9, 53.2, 68.9, 70.3, 71.3, 72.1, 72.2, 72.7, 80.3, 99.9 and 100.0, 119.4 and 119.9, 122.8, 131.3 and 131.4, 140.3 and 140.4, 141.0, 148.4, 166.9, 169.4, 169.5, 170.2; HRMS (ESI) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 660.2083 (calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{NO}_{13}\text{SiNa}$: 660.20829); $[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 676.1819 (calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{NO}_{13}\text{SiK}$: 676.18223).

Preparation of compound 10

9 (2.6 g, 4.08 mmol) was dissolved in THF (48 mL) and methanol (96 mL). The mixture was cooled at 0 °C and sodium methoxyde (220 mg, 4.08 mmol) was added. Sodium methoxide (110 mg, 2.04 mmol) was added twice after 1 h and 2 h of stirring. The mixture was stirred again for 1 h and was hydrolyzed with IRC-50 acidic resin. The mixture was then filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography over silica gel (CH_2Cl_2 , MeOH 99/1; 98/2; 97/3) to give **10** (1.51 g, 72%) as a mixture of two diastereoisomers (white solid). R_f 0.33 (CH_2Cl_2 /MeOH 95/5). mp = 62.9 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ -0.05 (2 s, 3H), 0.09 (2 s, 3H), 0.89 (2 s, 9H), 1.98 (m, 1H), 2.42–2.62 (m, 2H), 3.76–3.85 (m, 5H), 3.94 (t, 1H, $J = 9.7$ Hz), 4.10 (2d, 1H, $J = 9.7$ Hz), 4.81 (2t, 1H, $J = 6.3$ Hz), 5.01 (2d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.34 (2d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.7$ Hz), 7.88 (d, 0.5H, $J = 2.1$ Hz), 7.90 (d, 0.5H, $J = 2.1$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ -4.8, -4.6, 18.3, 25.8, 30.8, 53.2, 71.0, 71.3, 72.1 and 72.2, 73.0, 74.7, 75.0, 80.4, 102.8 and 102.9, 118.3 and 118.6, 123.3, 132.1 and 132.2, 139.7 and 139.8, CD_3OD 140.0, 149.6 and 149.7, 169.1; HRMS (ESI) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 534.1766 (calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{NO}_{10}\text{SiNa}$: 534.17659); $[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 550.1503 (calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{NO}_{10}\text{SiK}$: 550.15053).

Preparation of compound 11

To a solution of **10** (390 mg, 0.76 mmol) in allylic alcohol (12 mL) was added dropwise a solution of sodium allylate 0.125 M (1.15 mL, 0.145 mmol). The mixture was stirred 40 min and was

hydrolyzed with IRC-50 acidic resin, filtrated and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography over silica gel (CH_2Cl_2 /MeOH 98/2) to give **11** (399 mg, 97%) as a mixture of two diastereoisomers (pale yellow solid). R_f 0.75 (CH_2Cl_2 /MeOH 95/5). mp = 55.9 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ -0.04 (2 s, 3H), 0.10 (2 s, 3H), 0.89 (2 s, 9H), 1.99 (2t, 1H, $J = 2.6$ Hz), 2.49–2.60 (m, 2H), 3.50–3.81 (m, 2H), 3.95 (m, 1H), 4.07 (2d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 4.75 (m, 2H), 4.83 (t, 1H, $J = 6.4$ Hz), 4.96 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz), 5.30 (m, 1H), 5.38 (m, 1H), 5.97 (m, 1H), 7.38 (2d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.60 (m, 1H), 7.90 (d, 0.5H, $J = 2.1$ Hz), 7.93 (d, 0.5H, $J = 2.1$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ -4.8, -4.7, 18.3, 25.8, 30.9, 66.7, 70.9, 71.3, 72.2, 73.0, 74.6, 74.9, 80.3, 103.2, 118.8 and 119.0, 119.5, 123.3, 131.0, 132.1, 140.0, 149.6, 168.3; HRMS (ESI) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 560.1922 (calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NO}_{10}\text{SiNa}$: 560.19224); $[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 576.1664 (calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NO}_{10}\text{SiK}$: 576.16618).

Preparation of compound 12

11 (1.3 g, 2.42 mmol) was dissolved in dry pyridine (12 mL). The mixture was cooled at 0 °C and allyl chloroformate (7.07 mL, 72.54 mmol) was added dropwise. The mixture was stirred 72 h at room temperature and was hydrolyzed with aqueous 1 M HCl (40 mL). The mixture was extracted three times with ethyl acetate and the combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography over silica gel (petroleum ether/AcOEt 80/20) to give **12** (1.80 g, 94%) as a mixture of two diastereoisomers (pale yellow solid). R_f 0.84 (petroleum ether/AcOEt 60/40). mp = 53.7 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ -0.05 (s, 3H), 0.09 (2 s, 3H), 0.89 (2 s, 9H), 1.98 (2t, 1H, $J = 2.6$ Hz), 2.41–2.61 (m, 2H), 4.31–4.34 (m, 1H), 4.59–4.70 (m, 6H), 4.74–4.72 (m, 2H), 4.81 (2t, 1H, $J = 6.5$ Hz), 5.24–5.40 (m, 12H), 5.82–6.00 (m, 4H), 7.31 (2d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.55 (2t, 1H, $J = 8.9$ Hz), 7.84 (d, 0.5H, $J = 2.1$ Hz), 7.86 (d, 0.5H, $J = 2.1$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ -4.8, -4.7, 18.2, 25.8, 30.8, 67.0, 69.2, 69.3, 69.6, 71.2, 72.0 and 72.1, 72.3, 72.5, 74.0, 75.1, 80.3, 99.8, 118.7, 119.0, 119.1, 119.3, 119.4, 123.0, 130.9, 131.0, 131.1, 131.3, 131.4, 140.1, 140.2, 140.6, 140.7, 148.4 and 148.5, 153.5, 154.0, 165.7; HRMS (ESI) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 812.2556 (calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{47}\text{NO}_{16}\text{SiNa}$: 812.2556), $[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 828.2930 (calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{47}\text{NO}_{16}\text{SiK}$: 828.2957).

Preparation of compound 13

To a solution of **12** (370 mg, 0.47 mmol) in dry THF (5.7 mL) was added dropwise HF/pyridine 70% (1.8 mL). The mixture was stirred 1 h at room temperature and poured into 100 mL of ice-cold saturated aqueous NaHCO_3 . The mixture was extracted three times with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography over silica gel (petroleum ether/AcOEt 70/30) to afford **13** (272 mg, 85%) as a mixture of two diastereoisomers (white solid). R_f 0.62 (petroleum ether/AcOEt 60/40). mp = 61.8 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 2.10 (t, 1H, $J = 2.6$ Hz), 2.51 (bs, 1H), 2.61–2.64 (m, 2H), 4.32 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz), 4.59–4.69 (m, 6H), 4.72 (m, 2H), 4.90 (t, 1H, $J = 6.2$ Hz), 5.22–5.39 (m, 12H), 5.81–6.00 (m, 4H), 7.34 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.57 (m, 1H), 7.87 (d, 0.5H, $J = 2.1$ Hz), 7.89 (d, 0.5H, $J = 2.1$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 29.6; 67.0, 69.3, 69.4, 69.7,

70.8, 72.1, 72.4, 72.5, 74.0, 75.0, 79.5, 99.8, 119.2, 119.3, 119.4, 119.5, 122.9 and 123.0, 131.0, 131.1, 131.2, 131.3, 131.4, 138.8, 140.9 and 141.0, 148.7, 153.6, 154.1, 165.7; HRMS (ESI) $[M+Na]^+$ m/z 698.1692 (calcd for $C_{31}H_{33}NO_{16}Na$: 698.16915); $[M+K]^+$ m/z 714.1430 (calcd for $C_{31}H_{33}NO_{16}K$: 714.14309).

Preparation of compound 14

To a solution of **13** (262 mg, 0.38 mmol) in dry dichloromethane (4 mL) were added *para*-nitrophenol chloroformate (198 mg, 0.77 mmol) and pyridine (77 μ L, 0.96 mmol). The mixture was stirred 2 h at room temperature and saturated aqueous $NaHCO_3$ was added. The layers were separated and aqueous layer was extracted three times with dichloromethane. The combined organic layers were washed three times with saturated aqueous $NaHCO_3$, dried over $MgSO_4$, filtrated and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by column chromatography over silica gel (petroleum ether/AcOEt 70/30) to afford **14** (293 mg, 92%) as a mixture of two diastereoisomers (white solid). R_f 0.79 (petroleum ether/AcOEt 60/40). mp = 52.6 °C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.09 (t, 1H, $J = 2.6$ Hz), 2.82–2.97 (m, 2H), 4.35 (d, 1H, $J = 8.65$ Hz), 4.68–4.70 (m, 6H), 4.72 (d, 2H, $J = 5.8$ Hz), 5.24–5.39 (m, 12H), 5.80 (t, 1H, $J = 6.6$ Hz), 5.83–6.00 (m, 4H), 7.36–7.40 (m, 3H), 7.63 (dd, 1H, $J = 2.2$ Hz, $J = 8.6$ Hz), 7.95 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz), 8.27 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 26.2, 67.0, 69.2, 69.4, 69.6, 72.2, 72.3, 72.5, 73.9, 74.9, 77.2, 77.6, 99.3, 119.0, 119.1, 119.4, 119.5, 121.8, 123.9, 125.4, 130.9, 131.0, 131.1, 131.2, 132.5, 133.4, 140.7, 145.6, 149.6, 151.6, 153.5, 154.0, 155.2, 165.5; HRMS (ESI) $[M+Na]^+$ m/z 863.1755 (calcd for $C_{38}H_{36}N_2O_{20}Na$: 863.17536), $[M+K]^+$ m/z 879.1478 (calcd for $C_{38}H_{36}N_2O_{20}K$: 879.1493).

Preparation of compound 15

Anhydrous pyridine (0.06 mL, 1.5 eq.) was added dropwise to a solution of **14** (0.41 g, 0.48 mmol) and cyclopamine (0.2 g, 0.48 mmol) in DMF (5.6 mL). The mixture was stirred for 20 h at room temperature and the crude mixture was concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography on silica gel ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98/2) afforded **15** (0.46 g, 85%) as a mixture of two diastereoisomers. R_f 0.77 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98/2). mp = 121.5 °C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.95–1.45 (m, 14H), 1.50–2.45 (m, 21H), 2.76 (m, 1H), 2.89 (m, 1H), 3.06 (m, 1H), 3.27 (m, 1H), 3.57 (m, 2H), 4.33 (m, 1H), 4.72 (m, 8H), 5.37 (m, 14H), 5.91 (m, 5H), 7.35 (m, 1H), 7.56 (m, 1H), 7.88 (m, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 10.54, 13.55, 14.20, 17.46, 18.67, 19.29, 20.64, 21.06, 24.59, 25.35, 26.42, 29.03, 31.07, 31.36, 32.56, 36.54, 36.96, 38.14, 38.31, 41.55, 41.77, 41.9, 49.2, 51.99, 59.65, 60.41, 63.10, 66.93, 69.16, 69.27, 69.52, 69.61, 71.8, 71.92, 72.3, 72.92, 73.85, 74.88, 78.47, 85.14, 99.56, 119.01, 119.24, 119.30, 119.32, 119.41, 119.46, 121.82, 122.63, 123.47, 126.33, 130.84, 130.94, 131.05, 131.16, 135.67, 140.77, 141.58, 143.41, 148.84, 149.07, 153.46, 153.95, 156.35, 165.58, 165.62; HRMS (ESI) $[M+Na]^+$ m/z 1135.4625 (calcd. for $C_{59}H_{72}N_2O_{19}Na$: 1135.46215).

Preparation of compound 17

To a solution of **15** (0.46 g, 0.41 mmol) and **16** (0.14 g, 1 eq.) in anhydrous CH_2Cl_2 (14.7 mL) was added

tetrakis(acetonitrile)copper(I) hexafluorophosphonate (1 eq., 0.14 g). The resulting mixture was stirred at room temperature for 20 h. After removing the volatiles under reduced pressure, the crude material was purified by flash column chromatography on silica gel ($CH_2Cl_2/MeOH$ 90/10) to afford **17** (0.47 g, 70%) as a mixture of two diastereoisomers. R_f 0.21 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 90/10). mp = 133.5 °C. 1H NMR (400 MHz, CD_3OD , 313 K) δ 0.65–1.3 (m, 15H), 1.4–2.4 (m, 19H), 3.1–3.4 (m, 24H), 4.49 (m, 1H), 4.78 (m, 15H), 5.5 (m, 12H), 6.11 (m, 5H), 7.60 (m, 1H), 7.77 (m, 1H), 7.96 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 10.89, 13.99, 15.58, 19.07, 19.76, 19.93, 20.58, 21.21, 21.40, 25.69, 28.51, 29.28, 29.95, 30.77, 32.09, 33.44, 37.74, 37.87, 38.09, 39.49, 42.58, 43.44, 49.93, 50.12, 50.58, 53.39, 61.13, 62.80, 64.12, 67.87, 68.06, 68.48, 69.71, 70.11, 70.30, 70.39, 71.40, 71.67, 72.48, 72.66, 72.86, 73.36, 73.99, 75.03, 75.54, 76.76, 78.0, 86.81, 89.83, 100.06, 104.52, 119.04, 119.31, 119.56, 122.72, 127.58, 132.68, 132.73, 132.82, 132.90, 141.77, 143.15, 143.29, 144.55, 148.53, 149.83, 150.05, 155.01, 155.22, 155.29, 155.47, 158.14, 167.32, 167.67; HRMS (ESI) $[M+Na]^+$ m/z 1472.6115 (calcd. for $C_{71}H_{95}N_5O_{27}Na$: 1472.61066).

Preparation of compound 2b

To a solution of **17** (0.21 g, 0.147 mmol) in $MeOH/CH_2Cl_2$ (10/90, 5 mL) was added tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (17 mg, 0.0147 mmol) and aniline (0.03 mL, 0.29 mmol). Total deprotection was observed after stirring at room temperature for 24 h (HPLC analysis, Method A). Solvents were removed under reduced pressure. The resulting solid was washed three times in CH_2Cl_2 and collected by filtration (0.136 g, 80%), (85% purity HPLC analysis). High degree of purity for compound **2b** was obtained using preparative-reverse phase HPLC (0.067 g, purity > 95%). Retention times for the two diastereoisomers of **2b** are 13.57 and 13.83 min (for HPLC conditions see HPLC analysis). mp = 149.5 °C. 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 0.73–1.05 (m, 13H), 1.13–1.38 (m, 8H), 1.38–1.90 (m, 20H), 2.10–2.35 (m, 8H), 2.70 (m, 1H), 3.1 (m, 1H), 3.3 (m, 1H), 3.36 (m, 1H), 3.47–3.75 (m, 14H), 3.84–3.87 (m, 4H), 3.99 (m, 1H), 4.30 (dd, 1H, $J = 7.7$ Hz, $J = 2.2$ Hz), 4.51 (sl, 2H), 5.10 (m, 1H), 5.37 (sl, 1H), 6 (m, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.58 (m, 1H), 7.70 (s, 0.5H), 7.76 (s, 0.5H), 7.78 (m, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 10.60, 10.72, 13.83, 18.99, 21.27, 25.66, 29.33, 29.89, 30.79, 32.02, 32.08, 33.41, 37.74, 39.46, 42.56, 42.78, 43.47, 51.37, 53.41, 62.80, 69.71, 70.45, 71.44, 71.66, 72.50, 73.29, 74.51, 75.08, 76.39, 77.03, 78.03, 86.86, 102.33, 104.45, 122.69, 125.38, 127.57, 133.04, 141.51, 143.17, 144.58, 151.22, 158.24; HRMS (ESI) $[M - H]^-$ m/z 1156.5195 (calcd. for $C_{56}H_{78}N_5O_{21}$: 1156.51948).

HPLC analysis

Analytical HPLC was carried out using a Dionex Ultimate 3000 System with UV variable wavelength detector. Compounds **17**, **2b**, cyclopamine analysis and enzymatic hydrolysis analysis were performed on a reverse phase column chromatography (Method A: Acclaim® 120, C18, 250 \times 4.6 mm, 5 μ m, 120 Å; Flow 1 mL min^{-1} ; mobile phase $CH_3CN, H_2O + 0.2\%$ TFA, 20/80: 100). Retention time for compounds **17**, **2b** and cyclopamine **1** are 22.88, 13.57–13.83 and 14.3 respectively. Peak area and calibration curves were obtained with Dionex Chromeleon software.

Stability

Compound **2b** (0.1 mg, 0.8 μmol) was incubated in 1 mL of phosphate buffer (0.02 M, pH 7.0) at 37 °C. Stability was monitored by analytical HPLC using Method A. HPLC analysis showed no detectable degradation of compound **2b** during 24 h under these conditions.

Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis was carried out with commercially available β -glucuronidase from *Escherichia coli* (purchased from Sigma Aldrich ref. G8162). Prodrug **2b** (1 μmol) was incubated with *Escherichia coli* (133 U/mL) in phosphate buffer (0.02 M, pH 7) at 37 °C and sample were analyzed by HPLC/MS.

Cell Culture

The U87 human glioblastoma cell line was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with GlutaMAX™ I and sodium pyruvate (Invitrogen), supplemented with 10% fetal calf serum and 100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ streptomycin (Invitrogen). Cells were incubated in a humidified 95% air/5% CO₂ controlled atmosphere at 37 °C.

Cell proliferation

Cell viability was evaluated using the CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). U87 cells were plated in 96-well plates at a density of 400 cells/well in 100 μl medium. After 24 h of incubation, medium was replaced by medium containing the prodrug \pm β -glucuronidase (40 U/mL) or cyclopamine. Control cells were incubated in the presence of DMSO (used for prodrug or cyclopamine solubilization) \pm β -glucuronidase. Cell viability was determined after 5 days of treatment by adding 20 μl of CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent into each well 3 h before measuring the optical density. Metabolically active cells convert 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-ulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) into a coloured formazan product that was measured in a spectrophotometric microplate reader at 490 nm. The OD of control cells was considered as the 100 value.

Notes and references

- J. Taipale and P. A. Beachy, *Nature*, 2001, **411**, 349–354.
- M. Kubo, M. Nakamura, A. Tasaki, N. Yamanaka, H. Nakashima, M. Nomura, S. Kuroki and M. Katano, *Cancer Res.*, 2004, **64**, 6071–6074.
- S. S. Karhadkar, G. S. Bova, N. Abdallah, S. Dhara, D. Gardner, A. Maitra, J. T. Isaacs, D. M. Berman and P. A. Beachy, *Nature*, 2004, **431**, 707–712.
- D. M. Berman, S. S. Karhadkar, A. Maitra, R. M. De Oca, M. R. Gerstenblith, K. Briggs, A. R. Parker, Y. Shimada, J. R. Eshleman, D. N. Watkins and P. A. Beachy, *Nature*, 2003, **425**, 846–851.
- D. N. Watkins, D. M. Berman, S. G. Burkholder, B. Wang, P. A. Beachy and S. B. Baylin, *Nature*, 2003, **422**, 313–317.
- M. H. Shahi, A. Lorente and J. S. Castresana, *Oncol. Rep.*, 2008, **19**, 681–688.
- For reviews see: (a) B. Z. Stanton and L. F. Peng, *Mol. BioSyst.*, 2009, **6**, 44–54; (b) N. Mahindroo, C. PUNCHIHEWA and N. Fujii, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 3829–3845.
- P. Heretsch, L. Tzagkaroulaki and A. Giannis, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 3418–3427.
- J. K. Chen, J. Taipale, M. K. Cooper and P. A. Beachy, *Genes Dev.*, 2002, **16**, 2743–2748.
- A. Kolterud and R. Toftgard, *Drug Discovery Today: Ther. Strategies*, 2007, **4**, 229–235.
- R. F. Keeler and D. C. Baker, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1989, **192**, 153–156.
- F. Hamon, B. Renoux, C. Chadéneau, J. M. Muller and S. Papot, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 1678–1682.
- S. K. Kumar, I. Roy, R. K. Anchoori, S. Fazli, A. Maitra, P. A. Beachy and S. R. Khan, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 2764–2768.
- (a) T. A. Connors and M. E. Whisson, *Nature*, 1966, **210**, 866–867; (b) K. Bosslet, J. Czech and D. Hoffmann, *Tumor Target.*, 1995, **1**, 45–50.
- For reviews see: (a) M. de Graaf, E. Boven, H. W. Scheeren, H. J. Haisma and H. M. Pinedo, *Curr. Pharm. Des.*, 2002, **8**, 1391–1403; (b) X. Chen, B. Wu and P. G. Wang, *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents*, 2003, **3**, 139–150.
- (a) S. Papot, I. Tranoy, F. Tillequin, J.-C. Florent and J.-P. Gesson, *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents*, 2002, **2**, 155–185; (b) I. Tranoy-Opalinski, A. Fernandes, M. Thomas, J.-P. Gesson and S. Papot, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, 2008, **8**, 618–637.
- A. Gopin, N. Pessah, M. Shamis, C. Rader and D. Shabat, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 327–332.
- M. Thomas, J. Clarhaut, P.-O. Strale, I. Tranoy-Opalinski, J. Roche and S. Papot, *ChemMedChem*, 2011, **6**, 1006–1010.
- G. N. Bollenback, J. W. Long, D. G. Benjamin and J. A. Lindquist, *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 3310.
- A. El Alaoui, F. Schmidt, C. Monneret and J.-C. Florent, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 9628–9636.
- C. Bouillon, A. Meyer, S. Vidal, A. Jochum, Y. Chevolot, J. P. Cloarec, J. P. Praly, J. J. Vasseur and F. Morvan, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 4700–4702.

The First Generation of β -Galactosidase-Responsive Prodrugs Designed for the Selective Treatment of Solid Tumors in Prodrug Monotherapy**

Thibaut Legigan, Jonathan Clarhaut, Isabelle Tranoy-Opalinski, Arnaud Monvoisin, Brigitte Renoux, Mikaël Thomas, Alain Le Pape, Stéphanie Lerondel, and Sébastien Papot*

In memory of Gérard Déléris

The selective killing of tumor cells without affecting normal tissues is one of the main challenges of cancer chemotherapy. In recent years, the development of drug carriers designed to deliver potent cytotoxic compounds exclusively inside malignant cells has emerged as a valuable alternative to avoid dose-limiting adverse effects recorded with traditional anticancer agents.^[1] Within this framework, the use of antibody–drug conjugates^[2] targeting specific tumor-associated antigens is by far the best-explored approach. Many of these compounds are currently evaluated in humans, including Brentuximab Vedotin,^[3] which reached the market in 2011 for the treatment of lymphomas. Another promising strategy relies on the use of nontoxic prodrugs that can be activated by an enzyme^[4] previously targeted in cancerous tissues by the mean of a monoclonal antibody in the course of antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT).^[5] In this case, the active compound is released extracellularly in the vicinity of cancer cells that are subsequently killed after drug uptake. Over the past decade, several galactoside prodrugs^[6] have appeared as potential candidates to achieve selective chemotherapy of solid tumors in combination with antibody- β -galactosidase conjugates.^[7] The best illustration of such an enzyme-responsive system is unambiguously the galactoside prodrugs of

duocarmycin analogues developed by Tietze and co-workers^[8] that meet all the main criterions required to be used in ADEPT.^[9] However, the implementation of ADEPT procedures remains complex, costly, and with high risk of immune response linked to the administration of an antibody–enzyme conjugate. This is probably the reason why none of these promising galactoside prodrugs has been assessed for anti-tumor efficacy in animal models to date. Under such circumstances, the development of a simpler approach, allowing the selective activation of galactoside prodrugs by the endogenous β -galactosidase located inside malignant cells, is of great interest.

Herein, we present the first generation of galactoside prodrugs suitable for the treatment of solid tumors in prodrug monotherapy (PMT^[10]), a strategy in which the use of an antibody- β -galactosidase is not needed. For this purpose, we designed the novel drug delivery system **1** composed of a galactoside trigger, a targeting ligand, and a potent cytotoxic compound articulated around a central self-immolative linker (Figure 1).^[11]

[*] T. Legigan, Dr. I. Tranoy-Opalinski, Dr. B. Renoux, Dr. M. Thomas, Dr. S. Papot

Université de Poitiers, UMR-CNRS 7285, Institut de Chimie des Milieux et des Matériaux de Poitiers (IC2MP), Groupe "Systèmes Moléculaires Programmés"

4 rue Michel Brunet, 86022 Poitiers (France)
E-mail: sebastien.papot@univ-poitiers.fr

Dr. J. Clarhaut
INSERM CIC 0802, CHU de Poitiers
2 rue de la Milérierie, 86021 Poitiers (France)

Dr. A. Monvoisin
Université de Poitiers, CNRS-FRE 3511
1 rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers (France)

Dr. A. Le Pape, Dr. S. Lerondel
UPS n°44 TAAM—CIPA, CNRS,
3B rue de la Férollerie, 45071 Orléans (France)

[**] The authors thank the CNRS, La Ligue Nationale contre le Cancer (Comités Charente, Charente-Maritime, Vienne, Deux-Sèvres), Association Cent pour Sang la Vie, and the Cancéropôle Grand Ouest for financial support of this study.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201204935>.

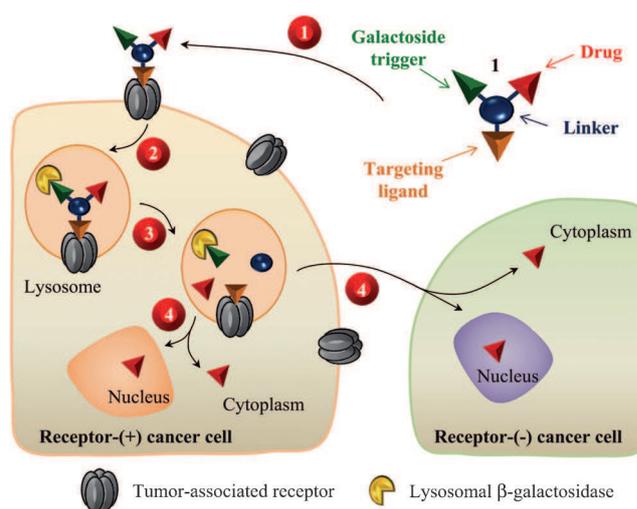
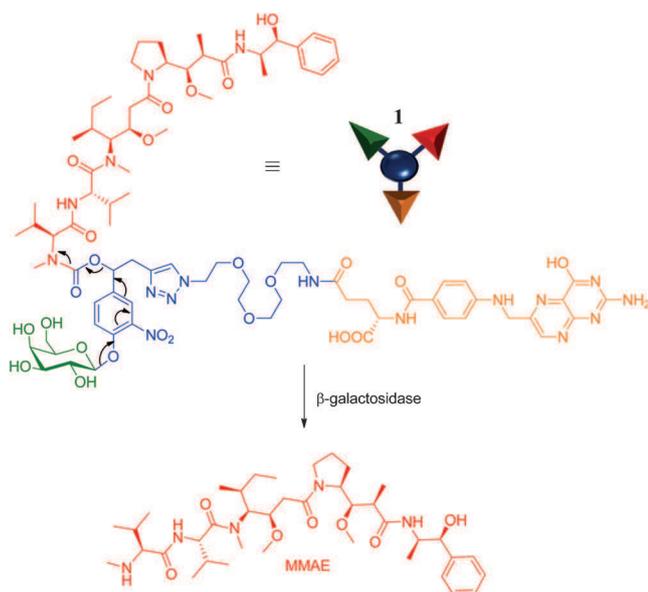


Figure 1. The principle of tumor targeting. Step 1: selective recognition of receptor-positive cancer cells; step 2: receptor-mediated endocytosis; step 3: β -galactosidase-catalyzed drug release; step 4: diffusion of the drug into the nucleus or the cytoplasm of both receptor-positive and receptor-negative cancer cells, leading to the death of each type of cell.

Such a targeting assembly is programmed to be selectively activated by the β -galactosidase present in the lysosomal compartment of cancer cells expressing a specific tumor-associated receptor.^[1] Thus, as shown in Figure 1, recognition of the membrane receptor by the targeting ligand (step 1) will trigger the receptor-mediated endocytosis^[12] of the whole device (step 2) that will be followed by the intracellular enzyme-catalyzed mechanism of drug release (step 3). As β -galactosidase is present in lysosomes of both healthy and malignant cells, this highly specific internalization process will allow the prodrug activation to occur exclusively inside receptor-positive tumor cells, thereby avoiding unselective drug release in non-malignant tissues. However, as the prodrug activation is catalytic, the β -galactosidase confined in the targeted cells will trigger the liberation of sufficient drug quantities to induce the death of both receptor-positive and surrounding receptor-negative tumor cells (step 4). It is worth mentioning that numerous tumor-associated receptors^[1] have already been identified, and consequently this new generation of galactoside prodrugs could be adapted to target a wide variety of malignancies.

As proof of the concept, we developed the pilot prodrug **1** that can be activated selectively inside folate receptor-expressing tumor cells (Scheme 1). The folate receptor

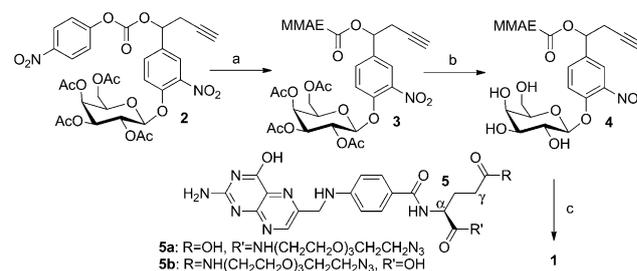


Scheme 1. Structure of prodrug **1**, and the β -galactosidase-catalyzed MMAE release mechanism.

(FR)^[13] is indeed overexpressed in several cancer types^[14] while it is mainly undetectable in most normal tissues. Thus, the FR-expressing cells represent targets of choice to demonstrate the validity of this concept. With our design, the β -galactosidase-catalyzed cleavage of the glycosidic bond will release the potent antimitotic agent monomethyl auristatin E (MMAE)^[15] in a stringently controlled fashion by the self-immolative mechanism depicted in Scheme 1.

The synthesis of prodrug **1** was carried out starting from the galactoside **2**, which is readily accessible as a mixture of

two diastereoisomers through a multistep strategy that has been already described (Scheme 2).^[16] Indeed, as we previously demonstrated with other enzyme-responsive systems,^[17] glycosylated intermediates such as **2** are ideal platforms for



Scheme 2. Synthesis of the galactoside prodrug **1**. a) MMAE, diisopropylethylamine (DIPEA), hydroxybenzotriazole (HOBT), pyridine/DMF, RT, 36 h, 75%; b) LiOH, MeOH, 0°C, 20 min, 98%; c) **5**, CuSO₄, sodium ascorbate, DMSO, RT, 8 h, 85%.

the successive introduction of a cytotoxic compound on the activated carbonate at the benzylic position and a targeting entity on the terminal alkyne of the linker unit. Thus, coupling between **2** and MMAE undertaken by nucleophilic substitution gave the protected galactoside **3** in 75% yield. Full deprotection of the hydroxy groups furnished the clickable derivative **4** in nearly quantitative yield. Finally, introduction of the folate ligand was conducted in the presence of the azide **5**, using the well-known copper(I)-catalyzed azide–alkyne 1,3-cycloaddition to afford the prodrug **1**, which was then purified by preparative chromatography for biological evaluations (85%, as a mixture of four isomers).

We first investigated the ability of the prodrug **1** to target selectively FR-positive tumor cells by measuring its antiproliferative activity against both KB and HeLa cells, which overexpress the FR at various levels, as well as FR-negative A549 cells. As shown in Table 1, our enzyme-responsive

Table 1: IC₅₀ values (nM) of MMAE and prodrug **1** on KB, HeLa, and A549 cell lines correlated with the FR level.^[a]

Cell line	FR level	IC ₅₀ [nM]	
		MMAE	1
KB	+++	0.240	0.240
HeLa	++	0.630	8.408
A549	–	0.872	195.230

[a] Values represent the mean \pm SEM of seven experiments performed in triplicate. KB cells: human mouth epidermal carcinoma; HeLa cells: human cervix adenocarcinoma; A549 cells: human bronchial carcinoma. FR: folate receptor.

system dramatically affected the viability of KB and HeLa cells, with IC₅₀ values of 0.240 and 8.408 nM, respectively. The cytotoxicities recorded in these experiments were consistent with the FR expression level that is higher in KB than in HeLa cells (see the Supporting Information). Interestingly, the antiproliferative activity of the galactoside prodrug **1** in KB cells is similar to that of MMAE (IC₅₀ = 0.240 nM), making this compound the most potent folate–drug conju-

gate^[18] developed to date. On the other hand, A549 cells that present only low level of FR were much less sensitive to the incubation of **1** ($IC_{50} = 195.230$ nM), whereas MMAE was highly toxic ($IC_{50} = 0.872$ nM). As expected, the hydrophilicity imparted by the galactoside trigger prevented passive cellular uptake and further intracellular activation of the prodrug in non-targeted cells. All together, these results indicated that the galactoside **1** can be selectively activated inside FR-positive tumor cells. Thus, as most normal tissues express low level of FR, such outcomes suggest that prodrug **1** should present only reduced toxicity toward safe tissues compared to untargeted MMAE in vivo.

To confirm that this selective toxicity was the consequence of the intracellular activation of prodrug **1** by lysosomal β -galactosidase, we examined the inhibition of tubulin polymerization, the mechanism by which MMAE exerts its antitumor activity (Figure 2). Thus, as shown by confocal

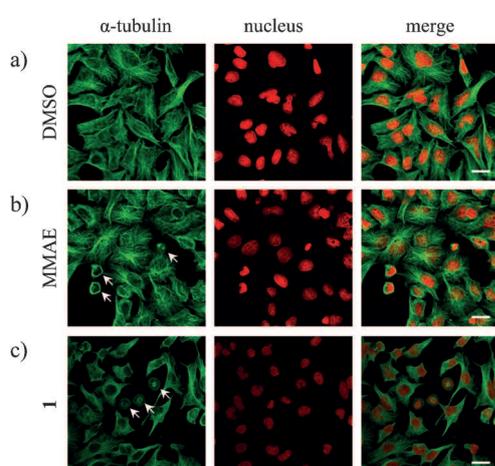


Figure 2. α -Tubulin immunodetection by confocal microscopy in HeLa cells treated for 24 h with a) DMSO, b) MMAE at 1 nM, and c) prodrug **1** at 1 nM. White arrows indicate cells blocked by MMAE or **1**.

microscopy imaging, incubation of the free MMAE with HeLa cells disturbed the microtubule network (Figure 2b), while this was not detected when cells were untreated (Figure 2a). Furthermore, as demonstrated by FACS analysis (see the Supporting Information), galactoside prodrug **1** produced a similar effect on cell division, demonstrating that its selective receptor-mediated endocytosis is followed by the β -galactosidase-catalyzed release of the antimitotic agent MMAE (Figure 2c). The role of lysosomal β -galactosidase in the prodrug activation process was also evidenced by comparing a galactoside conjugate of doxorubicin with its glucuronide analogue (see the Supporting Information).

As cancerous tissues are highly heterogeneous, the selective destruction of a particular population of malignant cells, such as those expressing a membrane receptor, is not sufficient to eradicate the wide diversity of tumor cells. However, an efficient intracellular enzymatic activation of prodrug **1** should release high quantities of MMAE that could then diffuse out of FR-positive cells to kill surrounding FR-negative cancer cells. To verify this hypothesis, we co-cultured

KB FR-positive with A549 FR-negative cells using TransWell Boyden chambers (Figure 3).

Prodrug **1** was incubated with KB cells placed in the top chamber to trigger the release of MMAE, which can

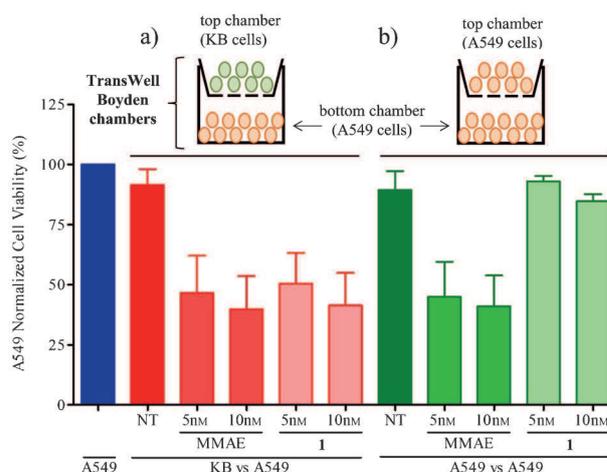


Figure 3. Viability of A549 cells in co-culture assay using TransWell Boyden chambers: a) in red, top chamber contains KB cells and bottom chamber contains A549 cells; b) in green, both top and bottom chambers contain A549; in blue, the viability of A549 cells alone was used as a control.

subsequently diffuse through the $0.4 \mu\text{m}$ filter in the bottom chamber containing A549 cells (Figure 3a). Under these conditions, the targeting system **1** induced a dramatic anti-proliferative effect on A549 cells, which was comparable to that measured with MMAE at identical doses (5 and 10 nM). As a negative control, the same experiments were conducted with A549 cells in the top chamber (Figure 3b). In this case, while the antimitotic drug affected the viability of cells, prodrug **1** did not exhibit any significant toxicity. In accordance with the principle of tumor targeting illustrated in Figure 1, these results demonstrated for the first time that the activation of a galactoside prodrug such as **1** by lysosomal β -galactosidase located inside FR-expressing cells is an efficient catalytic process, enabling the release of suitable quantities of MMAE for the destruction of surrounding cancer cells, whatever their membrane characteristics.

The in vivo efficacy of the galactoside prodrug **1** in the course of PMT was assessed in nude mice bearing luciferase-transfected KB xenografts. The animals received several intravenous injections of 5 mg kg^{-1} of the prodrug starting at day 5 after tumor implantation (for the full therapeutic procedure, see the Supporting information). Tumor progression was monitored by bioluminescence imaging three times per week and compared to that of mice treated with 0.1 mg kg^{-1} of MMAE (Figure 4a).

As illustrated in Figure 4b, prodrug **1** induced a marked antitumor activity with almost total and durable disappearance of the luminescence from day 21, while treatment with MMAE led only to a moderate inhibition of tumor growth. With the aim of increasing the efficacy of the antimitotic agent in this animal model, MMAE was also evaluated at a higher dose of 0.5 mg kg^{-1} . However, in this case the first

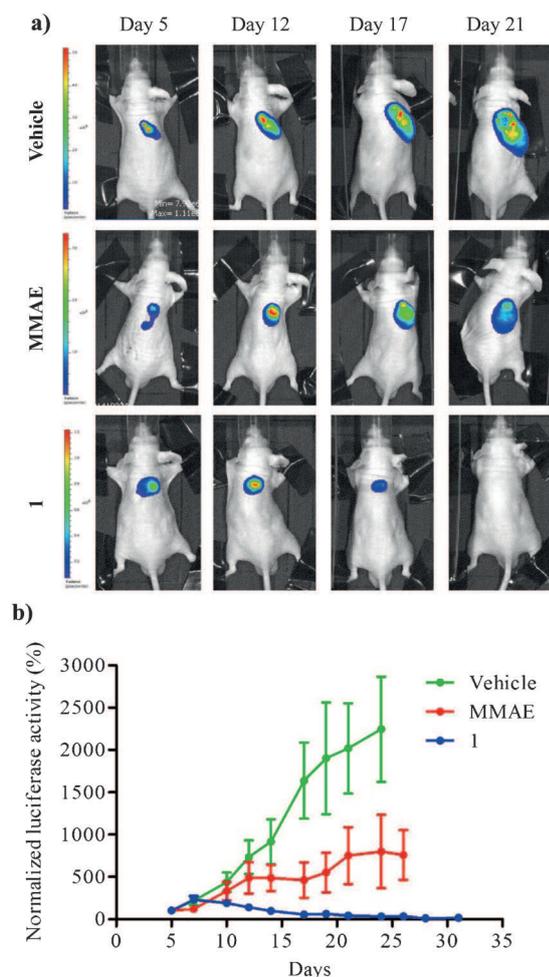


Figure 4. a) Representative bioluminescence imaging of luciferase-transfected KB xenografts at days 5, 12, 17, and 21 post-implantation when treated with vehicle (5% DMSO in PBS buffer), MMAE (intravenous administration at days 4, 7, 10, 14, and 17) or prodrug **1** (intravenous administration at days 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 21, 23, and 26); b) Tumor growth inhibition over the time under therapy with prodrug **1** and MMAE.

administration of the free drug caused a body weight loss that did not permit to pursue the therapeutic procedure. In contrast, prodrug **1** was well tolerated without any sign of overt toxicity at the tested dose. Furthermore, all the mice in the group treated with **1** were still alive at the end of the study (7/7, day 31), whereas 4/7 mice of the MMAE group succumbed (Figure 5). Overall, these in vivo experiments demonstrated that the galactoside prodrug **1** is a promising candidate for selective treatment of solid tumors expressing the FR.

In summary, we developed the first β -galactosidase-responsive drug delivery system suitable for the treatment of solid tumors in PMT. Through the study of galactoside prodrug **1**, we demonstrated that such a targeting system can be selectively activated by lysosomal β -galactosidase located inside malignant cells expressing a specific tumor-associated receptor. This efficient enzymatic process triggers a potent cytotoxic effect, allowing the destruction of both receptor-positive and surrounding receptor-negative tumor cells. The

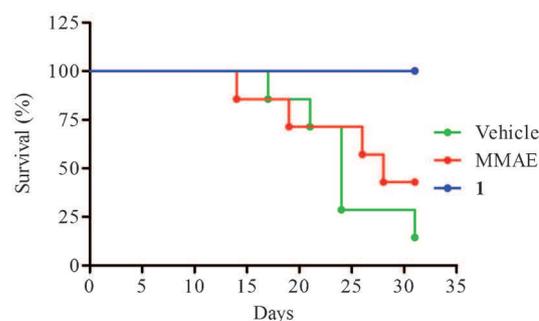


Figure 5. Survival curve representing the percent survival as a function of time in day.

prodrug **1** produces a remarkable antitumor effect when tested against FR-expressing KB xenograft without any detectable toxicity, showing the validity of this concept in vivo. Furthermore, as the synthetic strategy employed for the preparation of **1** allows the custom design of other β -galactosidase-responsive targeting assemblies, this approach could be easily adapted for the treatment of particular malignancies based on their tumor-associated membrane specificities. This new generation of low-molecular-weight galactoside prodrugs may offer a valuable alternative to the use of antibodies (in the form of either antibody-drug or antibody-enzyme conjugates) that exhibit poor tumor penetration. Thus, our finding may open a new door for selective chemotherapy of solid tumors.

Received: June 24, 2012

Revised: July 16, 2012

Published online: September 20, 2012

Keywords: auristatin · cancer · galactoside · prodrugs · self-immolative linkers

- [1] F. Kratz, I. A. Müller, C. Ryppa, A. Warnecke, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 20–53.
- [2] S. C. Alley, N. M. Okeley, P. D. Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 529–537.
- [3] S. O. Doronina, B. E. Toki, M. Y. Torgov, B. A. Mendelsohn, C. G. Cerveny, D. F. Chace, R. L. DeBlanc, R. P. Gearing, T. D. Bovee, C. B. Siegall, J. A. Francisco, A. F. Wahl, D. L. Meyer, P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 778–784.
- [4] a) L. F. Tietze, K. Schmuck, *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 3527–3547; b) M. Rooseboom, J. N. M. Commandeur, N. P. E. Vermeulen, *Pharm. Rev.* **2004**, *56*, 53–102.
- [5] a) K. D. Bagshawe, *Br. J. Cancer* **1987**, *56*, 531–532; b) P. D. Senter, C. J. Springer, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *53*, 247–264; c) K. D. Bagshawe, *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2006**, *6*, 1421–1431.
- [6] a) A. Fernandes, A. Viterisi, F. Coutrot, S. Potok, D. A. Leigh, V. Aucagne, S. Papot, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6565–6569; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6443–6447; b) A. Kamal, V. Tekumalla, A. Krishnan, M. Pal-Bhadra, U. Bhadra, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 794–802; c) M. Thomas, F. Rivault, I. Tranoy-Opalinski, J. Roche, J. P. Gesson, S. Papot, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 983–986; d) E. Bakina, D. Farquhar, *Anti-Cancer Drug Des.* **1999**, *14*, 507–515.

- [7] a) Y. Yu, L. Fang, D. Sun, *Int. J. Pharm.* **2010**, *386*, 208–215; b) L. Fang, R. F. Battisti, H. Cheng, P. Reigan, Y. Xin, J. Shen, D. Ross, K. K. Chan, E. W. Martin, Jr., P. G. Wang, D. Sun, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6290–6297.
- [8] a) T. Wirth, K. Schmuck, L. F. Tietze, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 2928–2931; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2874–2877; b) L. F. Tietze, J. M. von Hof, M. Müller, B. Krewer, I. Schuberth, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7494–7497; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7336–7339; c) L. F. Tietze, B. Krewer, *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 205–211; d) L. F. Tietze, F. Major, I. Schuberth, D. A. Spiegl, B. Krewer, K. Maksimenka, G. Bringmann, J. Magull, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4396–4409; e) L. F. Tietze, F. Major, I. Schuberth, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6724–6727; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6574–6577; f) L. F. Tietze, T. Feuerstein, A. Fecher, F. Hauernt, O. Panknin, U. Borchers, I. Schuberth, F. Alves, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 785–787; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 759–761.
- [9] For the successful application of ADEPT, Tietze proposed the following requirements: 1) the cytotoxic agent derived from the prodrug should achieve an IC₅₀ value of < 10 nM; and 2) the toxicity ratio between the prodrug and the drug should exceed 1000. For more details, see: L. F. Tietze, T. Herzig, T. Feuerstein, I. Schuberth, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1634–1645.
- [10] a) K. Bosslet, J. Czech, D. Hoffmann, *Tumor Target.* **1995**, *1*, 45–50; b) K. Bosslet, R. Straub, M. Blumrich, J. Czech, M. Gerken, B. Sperker, H. K. Kroemer, J. P. Gesson, M. Koch, C. Monneret, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1195–1201.
- [11] a) S. Papot, I. Tranoy, F. Tillequin, J.-C. Florent, J.-P. Gesson, *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2002**, *2*, 155–185; b) I. Tranoy-Opalinski, A. Fernandes, M. Thomas, J.-P. Gesson, S. Papot, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2008**, *8*, 618–637.
- [12] S. D. Conner, S. L. Schmid, *Nature* **2003**, *422*, 37–44.
- [13] H. Elnakat, M. Ratnam, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1067–1084.
- [14] P. S. Low, A. C. Antony, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1055–1058.
- [15] For other examples of enzyme-responsive drug carrier of MMAE, see: a) D. S. Ma, C. E. Hopf, A. D. Malewicz, G. P. Donovan, P. D. Senter, W. F. Goeckeler, P. J. Maddon, W. C. Olson, *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 2591–2596; b) S. C. Jeffrey, J. B. Andreyka, S. X. Bernhardt, K. M. Kissler, T. Kline, J. S. Lenox, R. F. Moser, M. T. Nguyen, N. M. Okeley, I. J. Stone, X. Zhang, P. D. Senter, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 831–840; c) K. M. Bajjuri, Y. Liu, C. Liu, S. C. Sinha, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 54–59.
- [16] M. Thomas, J. Clarhaut, P.-O. Strale, I. Tranoy-Opalinski, J. Roche, S. Papot, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 1006–1010.
- [17] a) B. Renoux, T. Legigan, S. Bensalma, C. Chadeneau, J.-M. Muller, S. Papot, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8459–8464; b) T. Legigan, J. Clarhaut, B. Renoux, I. Tranoy-Opalinski, A. Monvoisin, J.-M. Berjeaud, F. Guilhot, S. Papot, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4516–4520.
- [18] a) G. M. van Dam, G. Themelis, L. M. A. Crane, N. J. Harlaar, R. G. Pleijhuis, W. Kelder, A. Sarantopoulos, J. S. de Jong, H. J. G. Arts, A. G. J. van der Zee, J. Bart, P. S. Low, V. Ntziachristos, *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1315–1320; b) W. Xia, P. S. Low, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6811–6824; c) P. S. Low, S. A. Kularatne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 256–262; d) J. Yang, H. Chen, I. R. Vlahov, J.-X. Cheng, P. S. Low, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *321*, 462–468; e) W. A. Henne, D. D. Doorneweerd, A. R. Hilgenbrink, S. A. Kularatne, P. S. Low, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5350–5355; f) J. Yang, H. Chen, I. R. Vlahov, J.-X. Cheng, P. S. Low, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13872–13877; g) A. R. Hilgenbrink, P. S. Low, *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 2135–2146.