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 25 mai 2016)

École doctorale : Chimie, Écologie, Géosciences et AgroSciences Théodore Monod (Poitiers)
Secteur de recherche : Chimie organique, minérale, industrielle

Présentée par :
Rémi Châtre

Développement de systèmes moléculaires programmés pour le ciblage thérapeutique du microenvironnement tumoral

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

Soutenue le 06 mai 2021 devant le jury

Jury :

Président	**Mélanie Ethève-Quelquejeu**	Professeur, Université Descartes, Paris
Rapporteur	**Frédéric Schmidt**	Directeur de recherche CNRS, Institut Curie, Paris
Rapporteur	**Frédéric Taran**	Chef de service, CEA, Saclay
Membre	**Sébastien Papot**	Professeur, Université de Poitiers
Membre	**Brigitte Renoux**	Chargée de Recherche CNRS, IC2MP, Université de Poitiers

Pour citer cette thèse :
Rémi Châtre. *Développement de systèmes moléculaires programmés pour le ciblage thérapeutique du microenvironnement tumoral* [En ligne]. Thèse Chimie organique, minérale, industrielle. Poitiers : Université de Poitiers, 2021. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté Médecine et Pharmacie)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale : Chimie Ecologie Géosciences Agrosciences « *Théodore Monod* »

Secteur de Recherche : Chimie organique, minérale, industrielle

Présentée par :

Rémi CHÂTRE

****

DÉVELOPPEMENT DE SYSTÈMES MOLÉCULAIRES PROGRAMMÉS POUR LE CIBLAGE THÉRAPEUTIQUE DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL

****

Directeur de Thèse :
Pr. Sébastien PAPOT, Professeur, Université de Poitiers

Co-Directrice de Thèse :
Dr. Brigitte RENOUX, Chargée de Recherche CNRS, Université de Poitiers

****

Soutenue le 6 mai 2021

devant la Commission d'Examen

****

JURY

Dr. F. TARAN	Chef de service, CEA-Saclay	Rapporteur
Dr. F. SCHMIDT	Directeur de Recherche CNRS, Institut Curie, Paris	Rapporteur
Pr. M. ETHEVE-QUELQUEJEU	Professeur, Université Paris Descartes	Examinateur
Pr. S. PAPOT	Professeur, Université de Poitiers	Examinateur
Dr. B. RENOUX	Chargée de Recherche CNRS, Université de Poitiers	Examinateur

J'exprime ma profonde gratitude à mes directeurs de thèse, Monsieur Sébastien Papot, Professeur 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 la confiance qu'ils ont placé en moi, 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.

Merci à Monsieur Frérédric Taran, Chef de service au CAE-Saclay et Monsieur Frédéric Schmidt, Directeur de Recherche à l'Institut Curie à Paris, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse et pour leurs jugements très pertinents sur ce manuscrit.

Je remercie également Madame Ethève-Quelquejeu, Professeur de l'Université de Paris Descartes, pour avoir participé au jury de cette thèse et pour l'intérêt qu'elle a 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'apporter tout au long de ce travail : Jonathan Clarhaut, Ingénieur de Recherche, et Elodie Peraudeau, Ingénieur de Recherche, pour leur travail concernant l'évaluation biologique des molécules synthétisées durant cette thèse et pour avoir répondu à toutes mes questions concernant la biologie cellulaire.

Merci également à tous les doctorants, post-doctorants et ATER avec lesquels j'ai eu plaisir à travailler : Adrien Bessaguet, Yvain Gérard, Alexandra Bordes, Chad Plumet, Maxime Artault, Paul Bourbon.

Mes remerciements s'adressent aussi à tout le personnel du laboratoire : Yves Blériot, Jérôme Désiré, Nicolas Auberger, Frédéric Lecornué, Jérôme Guillard, Sébastien Thibaudeau, Agnès Mingot, Bastien Michelet, Hélène Carreyre, Aschmet Said Mohamad.

Je n'oublie pas Hugo Cruchade, Benoit Metayer et Benoit Guichard pour leur amitié et les bons moments passés durant ces années à Poitiers.

Enfin, je termine par un grand remerciement à mes parents, à mon frère Damien, à Audrey et mon fils Simon pour le soutien qu'ils m'apportent au quotidien, ces personnes sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS **5**

INTRODUCTION **9**

1 Le cancer **9**

1.1 Généralités 9

1.2 Les traitements 9

1.2.1 Chirurgie 10

1.2.2 Radiothérapie 10

1.2.3 Hormonothérapie 10

1.2.4 Immunothérapie 10

1.2.5 Chimiothérapie 10

2 La chimiothérapie vectorisée **10**

2.1 Le ciblage des cellules tumorales 11

2.1.1 Thérapie ciblée 12

2.1.2 Les conjugués médicament-anticorps 13

2.1.3 Les conjugués médicament-ligands 14

2.2 Le ciblage du microenvironnement tumoral 16

2.2.1 Spécificités structurales 17

2.2.2 Spécificités chimiques 18

2.2.3 Spécificités biochimiques 19

3 Les vecteurs glucuronylés **20**

3.1 La β-glucuronidase 20

3.1.1 Description 20

3.1.2 Expression de la β-glucuronidase dans le microenvironnement tumoral 21

3.2 Exemples de vecteurs glucuronylés 22

3.2.1 Vecteur glucuronylé de la 9-amino-camptothécine 23

3.2.2 Vecteur glucuronylé de la doxorubicine 24

3.2.3 Vecteur glucuronylé de la MMAE 25

3.2.4 Vecteurs glucuronylés de la cyclopamine 26

3.2.5 Vecteurs glucuronylés dendritiques 28

3.3 Les limites de cette stratégie de ciblage 29

4 Ciblage du cancer en utilisant l'albumine **29**

4.1 Physiologie de l'albumine 31

4.1.1 Biosynthèse, métabolisme et biodistribution 31

4.1.2 Endocytose de l'albumine 32

4.1.3 Le rôle du FcRn dans la transcytose et le recyclage de l'albumine 34
4.2 Tropisme de l'albumine vers la tumeur 36
4.2.1 Accumulation dans les tumeurs 36
4.2.2 Catabolisme de l'albumine par les cellules cancéreuses 37
4.3 Les composés médicament-albumine 43
4.3.1 Les nanoparticules d'albumine 43
4.3.2 Les conjugués médicament-albumine covalents 44
4.3.3 Les conjugués médicament-albumine formés *in situ* par le ciblage de l'albumine plasmatique 47
4.3.4 Vecteurs non covalents ciblant l'albumine plasmatique 55
5 Présentation du sujet de thèse 57
CHAPITRE 1 : Conception de vecteurs glucuronylés trimériques capables de se lier *in situ* à l'albumine 61
1 Introduction 61
1.1 Etat de l'art 61
1.2 Stratégie envisagée pour la conception d'un vecteur glucuronylé trimérique de la MMAE 65
2 Synthèse du vecteur glucuronylé trimérique de la MMAE 37 66
2.1 Schémas rétrosynthétiques 66
2.2 Synthèse du vecteur trimérique de la MMAE **37** 68
2.2.1 Synthèse de l'espaceur hydrophile **40** 68
2.2.2 Synthèse du glucuronide de la MMAE **59** 70
2.2.3 Synthèse du trimère **39** par cycloaddition [3+2] et insertion du motif maléimide ... 72
3 Evaluation biologique du vecteur trimérique 37 79
3.1 Evaluation préliminaire 79
3.2 Evaluation de l'activité antiprolifératives du vecteur **37** 81
3.2.1 Cytotoxicité sur des cultures cellulaires en 2 dimensions 81
3.2.2 Cytotoxicité sur des cultures cellulaires en trois dimensions 82
3.3 Etudes *in vivo* du vecteur **37** 83
3.3.1 Evaluation de la tolérabilité du vecteur trimérique **37** 83
3.3.2 Pharmacocinétique de **37** chez la souris 86
3.3.3 Evaluation de l'efficacité thérapeutique du vecteur **37** 88
4 Synthèse et évaluation thérapeutique du vecteur trimérique diastéréopur 37-R et de deux analogues 72-R et 73-R 92
4.1 Séparation du mélange racémique 92
4.2 Synthèse des composés diastéréoisomériquement purs **37-R** et **37-S** 94
4.3 Modification de la nature du maléimide 96

4.3.1 Stabilité des maléimides en conditions physiologiques 96
4.3.2 Synthèse des deux analogues **74-R** et **75-R** 98
4.3.3 Evaluations biologiques des vecteurs trimériques **37-R**, **74-R** et **75-R** 100
5 Conclusion 103
CHAPITRE 2 : Développement d'un vecteur de la MMAE substrat de la 107
β-D-*N*-acétylglucosaminidase 107
1 Introduction 107
2 Synthèse du vecteur de la MMAE 80 substrat de la β-D-*N*-acétylglucosaminidase 111
2.1 Schéma rétrosynthétique 111
2.2 Synthèse du vecteur **80** 111
2.3 Evaluation biologique du vecteur **80** 115
2.3.1 Evaluation de l'activité antiproliférative du vecteur **80** 115
2.3.2 Evaluation de l'efficacité thérapeutique de la prodrogue **80** in vivo 115
3 Conclusion 117
CHAPITRE 3 : Vectorisation d'agents anticancéreux non modifiés au moyen d'interactions supramoléculaires 121
1 Introduction 121
1.1 Présentation de la stratégie de ciblage 122
1.2 Les cyclodextrines 123
1.3 Encapsulation d'agents anticancéreux tel que la doxorubicine 124
2 Synthèse du vecteur 89 125
2.1 Schéma rétrosynthétique 125
2.2 Synthèse du vecteur **89** 126
2.2.1 Préparation du trialcyne **95** 126
2.2.2 Préparation de la 6-monoazido-6-monodeoxy-β-cyclodextrine **99** 127
2.2.1 Synthèse du trimère **89** par triple réaction de cycloaddition [3+2] 129
3 Evaluation biologique du vecteur 89 133
3.1 Ligation à l'albumine 133
3.2 Etude par fluorescence de l'encapsulation de la doxorubicine 133
3.3 Evaluation de l'efficacité thérapeutique du vecteur in vivo 134
4 Conclusion 136
CONCLUSION GENERALE 139
PARTIE EXPERIMENTALE 143
1 General information 143

1.1 Reagents and solvents 143
1.2 Reaction monitoring and purification 143
1.3 Analytical part 143
1.3.1 NMR studies 143
1.3.2 HRMS studies 143
1.3.3 HPLC experiments 143
1.3.4 LC-MS experiments 144
2 Experimental procedures 144
BIBLIOGRAPHIE 193

ABREVIATIONS

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

ADC	Antibody Drug Conjugates
ADN	acide désoxyribonucléique
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
DAlbR	Drug to Albumin Ratio
DAR	Drug to Antibody Ratio
DAVLBH	désacétylvinblastine monohydrazone
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	*N*,*N*-diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxide
DMT	dose maximale tolérée
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDC.HCl	chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EP	éther de pétrole
EPR	Enhanced Permeability and Retention
équiv.	Equivalent
Fc	Fragment cristallisable
FcRn	Récepteur Fc néonatal
GLUT	Glucose Uptake Transporters
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HMTTA	1,1,4,7,10,10-hexaméthyltriéthylènetétramine
HOBt	hydroxybenzotriazole
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
IC_{50}	concentration à 50% d'inhibition
IgG	immunoglobuline G
i.v.	intra-veineuse
LC/MS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometry
mAb	anticorps monoclonal
MMAE	auristatine monométhyle E
MMP	métalloprotéase matricielle
MS	Mass spectrometry
NHS	*N*-hydroxysuccinimide

PEG	polyéthylène glycol
ppm	partie par million
PSA	prostate-specific antigene
PSMA	Prostate-Specific Membrane Antigen
Rdt	rendement
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
s.c.	sous-cutané
SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein
TA	température ambiante
TBAI	iodure de tétrabutylammonium
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
TBTA	tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine
THPTA	*tris*-hydroxypropyltriazolylmethylamine
VDA	Vascular Disrupting Agent
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

INTRODUCTION

1 Le cancer

1.1 Généralités

Sous le terme de cancer sont regroupées de nombreuses pathologies possédant un point commun, la prolifération rapide et anarchique d'un groupe de cellules de l'organisme. Contrairement aux cellules saines dont la multiplication et la mort sont régulées par un processus inscrit dans leur matériel génétique, la prolifération des cellules cancéreuses échappe à tout contrôle de l'organisme. Le dérèglement de ce cycle cellulaire provoque donc une croissance anarchique des cellules cancéreuses formant alors une tumeur qui se développera en envahissant puis en détruisant l'organe dont elle est issue. Au cours de l'évolution de la maladie, certaines cellules cancéreuses peuvent se détacher de la tumeur primaire pour migrer dans la circulation sanguine et se fixer sur d'autres organes afin de former de nouvelles tumeurs appelées métastases.

Avec une incidence et une mortalité élevée, le cancer est un problème majeur de santé publique. Dans le monde, le cancer est la seconde cause de mortalité prématurée après les maladies cardiovasculaires. En France, cette hiérarchie s'est inversée depuis 2004, en raison du mode de vie occidental. En 2018 en France, le nombre de nouveaux cas de cancer est estimé à 382 000 avec 204 600 cas détectés chez l'homme et 177 400 chez la femme. Ces chiffres annuels sont en constante augmentation, en raison de la croissance démographique, mais tendent à se stabiliser depuis quelques années. La mortalité est elle aussi très élevée avec 157 400 décès estimés en France en 2018, dont 89 600 hommes et 67 800 femmes. Cependant, en raison de l'amélioration des traitements, des prises en charge ainsi que des techniques de dépistage, le taux de mortalité est en constante baisse.[1]

Le taux de mortalité est très variable en fonction du type de cancer. En 2018 chez l'homme, les cancers les plus meurtriers sont celui du poumon (22 761 décès pour 31 231 cas), suivi du cancer colorectal (9 209 décès pour 23 216) et de celui de la prostate (8 115 décès pour 50 430 cas en 2015). En 2018 chez la femme, il s'agit du cancer du sein (12 146 décès pour 58 459 cas) suivi du cancer du poumon (10 356 décès pour 15 132 cas) et du cancer colorectal (7 908 décès pour 20 120 cas).

1.2 Les traitements

Il existe différents traitements pour combattre le cancer, dont le choix dépend du type de pathologie maligne, sa localisation, sa taille, son agressivité ainsi que l'état général du patient. Bien souvent, les protocoles de prise en charge de la maladie font appel à des combinaisons de ces thérapies.[2]

[1] Estimations nationales de l'incidence et de la mortalite par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 – Synthèse des résultats, *Santé publique France*, **2018**. Disponible à partir de l'URL https://www.santepubliquefrance.fr page consultée le 25/06/2020.

[2] Cancer : les traitements et les soins de support - Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. Disponible à partir de l'URL https://www.fondation-arc.org page consultée le 09/11/2020.

1.2.1 Chirurgie

La chirurgie est utilisée dans environ 80 % des cas et reste la méthode la plus efficace pour lutter contre le cancer. Elle consiste à retirer la tumeur, ainsi qu'une partie des tissus périphériques pour éviter les risques de métastases. Cependant, dans le cadre de tumeurs inopérables, par leur localisation ou bien trop invasives et métastasées, la chirurgie est insuffisante.

1.2.2 Radiothérapie

La radiothérapie consiste à irradier la zone tumorale au moyen de rayons ionisants de haute énergie comme les rayons X ou γ. Cette irradiation induit des dommages irréversibles à l'ADN des cellules atteintes, ne leur permettant plus de se multiplier.

1.2.3 Hormonothérapie

L'hormonothérapie concerne exclusivement les cancers appelés hormonodépendants. C'est le cas de certains cancers du sein, du col de l'utérus ou de la prostate, dont la croissance dépend des hormones sexuelles. Les médicaments d'hormonothérapies agissent en bloquant la synthèse de ces hormones ou bien en empêchant leur fixation sur les récepteurs.

1.2.4 Immunothérapie

L'immunothérapie vise à mobiliser le système immunitaire du patient pour qu'il s'attaque aux cellules tumorales. Des molécules immunomodulatrices sont alors utilisées comme, par exemple, des cytokines afin d'induire une réponse immunitaire.

1.2.5 Chimiothérapie

La chimiothérapie consiste à administrer des molécules cytotoxiques afin de détruire les cellules cancéreuses en agissant sur différents processus de la prolifération cellulaire. Les protocoles chimiothérapeutiques comprennent souvent une combinaison de molécules pour accroître l'efficacité.

Les cellules à division rapide, comme les cellules cancéreuses, sont les plus touchées par ce type de thérapie. Cependant, certaines cellules saines comme celles des follicules pileux, du système digestif ou encore du sang sont également touchées provoquant parfois de lourds effets secondaires induisant l'interruption prématurée des traitements.

La faible sélectivité des molécules utilisées cliniquement constitue le facteur principal du manque d'efficacité des traitements anticancéreux. Le développement de nouvelles stratégies visant la destruction sélective des cellules cancéreuses représente un intérêt majeur dans la lutte contre le cancer. Les recherches menées dans ce domaine suivent deux axes : la découverte de nouvelles molécules plus sélectives ciblant des spécificités tumorales et le développement de systèmes permettant la vectorisation d'agents anticancéreux au sein de la tumeur.

2 La chimiothérapie vectorisée

La chimiothérapie vectorisée a pour but de véhiculer un principe actif vers son site d'action au moyen d'un vecteur non-toxique, puis de régénérer son activité exclusivement au niveau de la zone tumorale (Figure 1). Les avantages de cette stratégie par rapport à la chimiothérapie classique sont : 1) le contrôle de la libération de l'agent cytotoxique sélectivement au sein de la tumeur afin de limiter

les effets secondaires. 2) la possibilité d'administrer une quantité plus importante de principe actif afin d'accroitre l'efficacité du traitement.

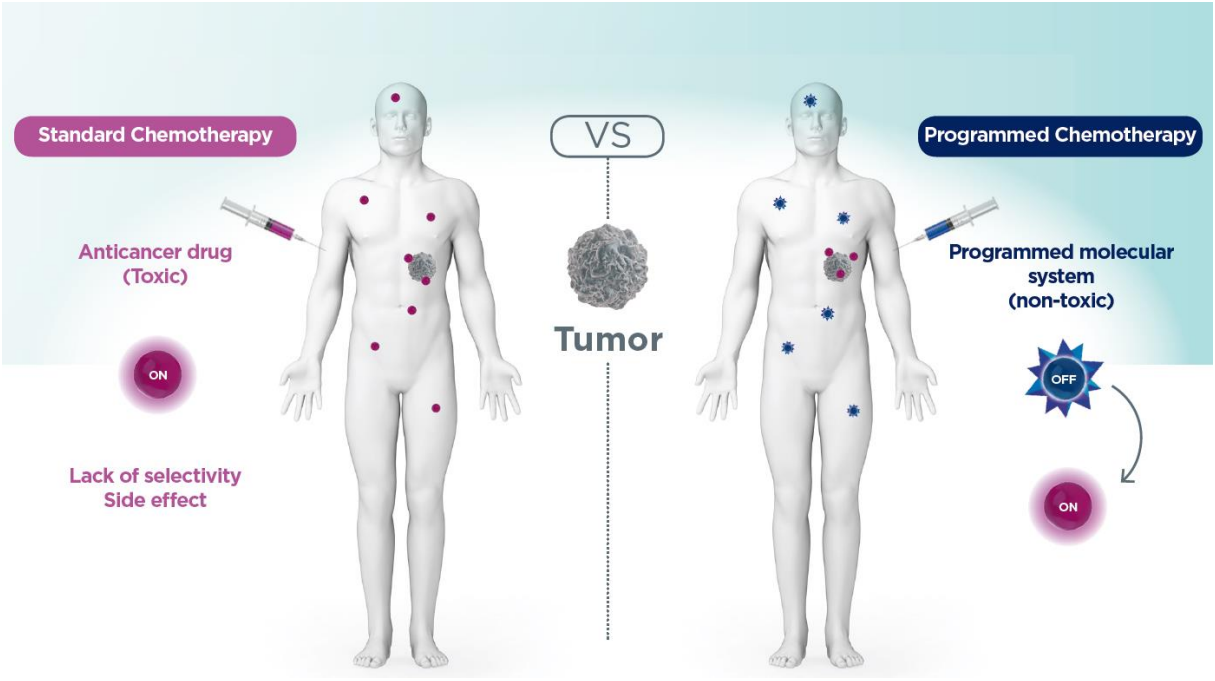


Figure 1 : Principe de la chimiothérapie vectorisée.

Deux facteurs sont alors à prendre en compte pour optimiser l'efficacité de la chimiothérapie vectorisée :

- La reconnaissance sélective de la tumeur est un point crucial pour limiter au maximum les effets secondaires. Le choix de la spécificité tumorale ciblée est important car il permet d'accumuler de manière sélective et efficace le vecteur au niveau de la tumeur. Deux cibles sont exploitées pour permettre la reconnaissance des tumeurs : les marqueurs des cellules cancéreuses et les spécificités du microenvironnement tumoral.
- La libération de l'agent cytotoxique doit s'effectuer exclusivement dans la zone tumorale. La stabilité du vecteur est ici un point important pour éviter la libération anarchique du principe actif dans l'organisme. En outre il doit se décomposer efficacement et rapidement, sous l'action d'un stimulus associé à la malignité, pour permettre l'activation du médicament.

2.1 Le ciblage des cellules tumorales

Les spécificités métaboliques des cellules cancéreuses peuvent se traduire par la présence de marqueurs à leur surface permettant de les différencier des cellules saines (Tableau 1).[3]

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

Tableau 1 : Exemples d'antigènes et des récepteurs surexprimés à la surface des cellules tumorales.

	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 Cancertesis 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	
	Luteinizing-hormone-releasing-hormone receptor	
Receptors for growth factors and vitamins	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)	

Il s'agit de récepteurs ou d'antigènes dont la surexpression a permis le développement de thérapies ciblées notamment par l'utilisation d'anticorps ciblant ces antigènes oncogènes et bloquant leur fonctionnement.

2.1.1 Thérapie ciblée

La thérapie ciblée est une technique innovante utilisant des médicaments qui ciblent les cellules cancéreuses en reconnaissant des structures ou des fonctions spécifiques. A titre d'exemple la croissance tumorale nécessite plus d'énergie que celle des cellules saines. Ainsi la création de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse) y est plus importante.[4] Des médicaments antiangiogéniques, tels que le bévacizumab, anticorps monoclonal bloquant le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ont été développés pour empêcher la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui irriguent la tumeur.[5] D'un autre côté, environ 20 % des cancers du sein surexpriment le récepteur HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) et peuvent être traités par le trastuzumab, un anticorps monoclonal recombinant qui bloque le fonctionnement de ce récepteur empêchant ainsi la multiplication cellulaire.[6, 7]

Cependant, le nombre croissant de cas de cancers développant une résistance à ces thérapies ciblées est un frein à leur utilisation.

[4] A. Bikfalvi, *B. Cancer*, **2003**, 90, 449 - 458.
[5] J. Fayette, J. -C. Soria, J. -P. Armand, *Pathologie Biologie,* **2006**, 54, 199 - 205.
[6] D. J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga, L. Norton, *N. Engl. J. Med*., **2001**, 344, 783 - 792.
[7] I. Smith, M. Procter, R. D. Gelber, S. Guillaume, A. Feyereislova, M. Dowsett, A. Goldhirsch, M. Untch, G. Mariani, J. Baselga, M. Kaufmann, D. Cameron, R. Bell, J. Bergh, R. Coleman, A. Wardley, N. Harbeck, R. I. Lopez, P. Mallmann, K. Gelmon, N. Wilcken, E. Wist, P. Sánchez Rovira, M. J. Piccart-Gebhart, *Lancet*, **2007**, 369, 29 - 36.

2.1.2 Les conjugués médicament-anticorps

Dans le but d'améliorer l'efficacité des anticorps utilisés dans le cadre des thérapies ciblées, une nouvelle stratégie a vu le jour. Elle consiste à associer un anticorps à une ou plusieurs molécules cytotoxiques afin de conjuguer spécificité et cytotoxicité. Cette stratégie de ciblage, basée sur l'utilisation de conjugués médicament-anticorps ou ADC (Antibody Drug Conjugates), semble extrêmement prometteuse compte tenu du grand nombre d'études consacrées à ce sujet. En effet, la nature de cette technique de ciblage présente une grande flexibilité. L'unité de ciblage (anticorps, ligand) et l'agent cytotoxique peuvent être modifiés pour s'adapter au traitement des différents types de cancers. Dans cette approche, l'anticorps permet la reconnaissance de certaines spécificités tumorales provoquant l'internalisation du vecteur par endocytose ce qui entraine la libération intracellulaire du principe actif.[8] Ce processus peut se dérouler de deux manières différentes : l'activation du médicament via la protéolyse de l'anticorps ou par la décomposition d'un espaceur auto-immolable.

Cette stratégie a été validée chez l'Homme avec la commercialisation du trastuzumab emtansine en 2013 pour la thérapie des cancers du sein exprimant le HER2. Ce conjugué médicament-anticorps est constitué du trastuzumab lié de manière covalente à la mertansine par un espaceur, l'acide 4-(maléimidométhyl)cyclohexanoïque.[9] (Figure 2)

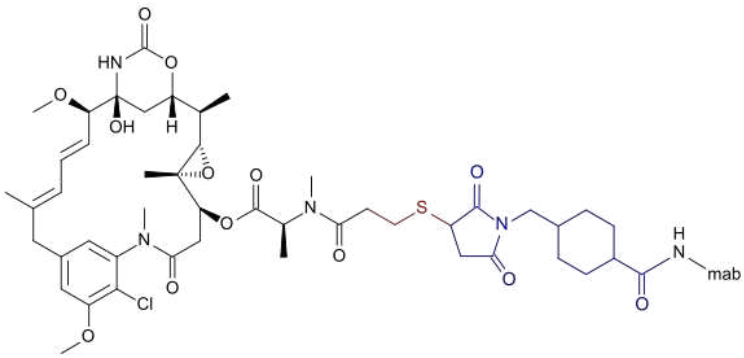


Figure 2 : Structure de trastuzumab emtansine.

L'interaction antigène-anticorps entraine l'internalisation sélective du conjugué par les cellules cancéreuses. L'ADC est alors dégradé dans les lysosomes par protéolyse, où des catabolites contenant la mertansine sont libérés induisant la mort des cellules tumorales.

L'une des limites de cette stratégie réside cependant dans la libération d'une substance moins active que le composé véhiculé, par la présence résiduelle des catabolites de l'anticorps. Pour pallier ce problème, des ADC contenant un espaceur clivable entre le médicament et l'anticorps ont été développés. C'est le cas du conjugué médicament-anticorps Adcetris™ (Bretuximab Vedotin, Seattle Genetics, 2011).[10] Il est constitué d'un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre l'antigène CD30,

[8] G. Casia, D. Neri, *J. Control. Release*, **2012**, 161, 422 - 428.

[9] G. D. L. Phillips, G. Li, D. L. Dugger, L. M. Crocker, K. L. Parsons, E. Mai, W. A. Blättler , J. M. Lambert, R. V. J. Chari, R. J. Lutz, W. L. T. Wong, F. S. Jacobson, H. Koeppen, R. H. Schwall, S. R. Kenkare-Mitra, S. D. Spencer, M. X. Sliwkowski, *Cancer Res.*, **2008**, 68, 9280 - 9290.

[10] 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 - 84.

le brentuximab, lié à l'auristatine monométhyle E (MMAE), un puissant agent antimitotique. Après internalisation dans les cellules tumorales, l'hydrolyse du peptide valine-citrulline en présence de la cathepsine B conduit à la libération de la MMAE via la décomposition de l'espaceur auto-immolable, le carbamate de 4-aminobenzyle (Figure 3). Ce composé est indiqué pour le traitement du lymphome hodgkinien et les lymphomes anaplasiques à grandes cellules.

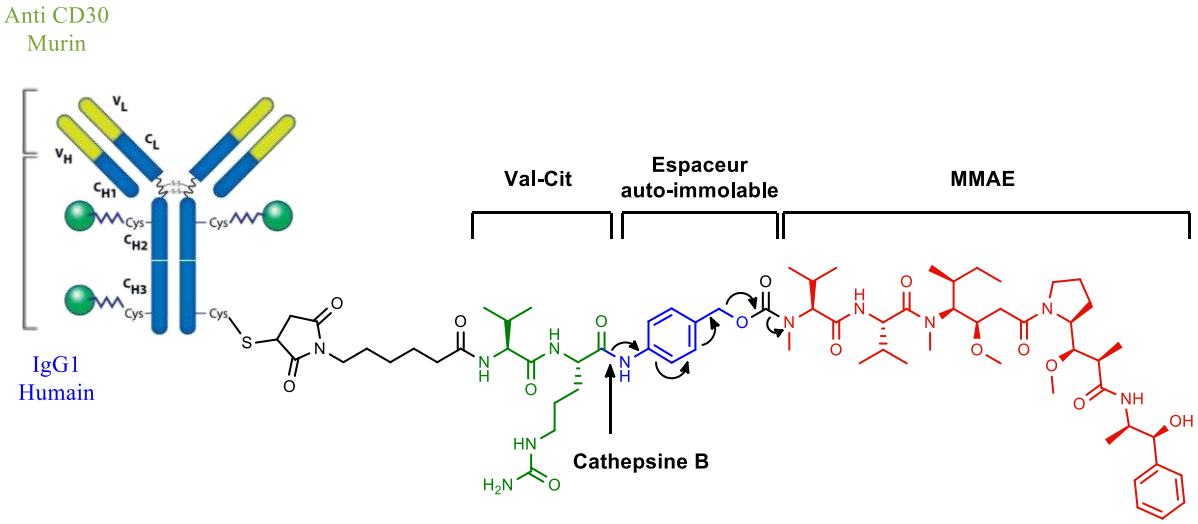


Figure 3 : Structure du conjugué médicament-anticorps Adcetris™ et mécanisme de libération de la MMAE.

Cependant, compte tenu de leur taille importante (150 kDa), les ADC pénètrent difficilement au sein de la masse tumorale, ce qui réduit leur efficacité pour la thérapie des tumeurs solides. De plus, les méthodes de préparation des ADC ne permettent pas le contrôle strict du nombre d'agents cytotoxiques attachés à l'anticorps (DAR : Drug Antibody Ratio). Enfin, le prix de fabrication des ADC est une contrainte supplémentaire à leur utilisation.

2.1.3 Les conjugués médicament-ligands

L'utilisation de petits agents de ciblage a été étudiée afin de s'affranchir du problème de pénétration tumorale. Les ligands utilisés pour le ciblage des cellules tumorales peuvent être classés en deux catégories distinctes : les peptides et les ligands non peptidiques.

2.1.3.1 Les ligands peptidiques

De nombreux peptides ont été étudiés dans le cadre de la vectorisation thérapeutique d'agents anticancéreux. On peut par exemple citer les polyargynines, capables de traverser les membranes cellulaires ou encore le tripeptide arginylglycylaspartique (RGD), constitué des 3 acides aminés Arginine (R) – Glycine (G) – Acide Aspartique (D), motif important dans les processus de reconnaissances et d'adhésions cellulaires.[11] L'utilisation de ces peptides, qualifiés de peptides ciblant les tumeurs, a reçu un fort intérêt pour la vectorisation d'agents cytotoxiques.[12]

[11] S. E. D'Souzaa, M. H. Ginsbergb, E. F. Plow, *TIBS*, **1991**, 16, 246-250.
[12] S. Dissanayake, W. A. Denny, S. Gamage, V. Sarojini, *J. Control. Release*, **2017**, 250, 62 - 76.

2.1.3.2 Les ligands non peptidiques

Les ligands non peptidiques peuvent être des dérivés de sucres tels que le glucose, ou bien des dérivés galactosylés et *N*-acétylglucosaminés qui ciblent respectivement les transporteurs GLUT[13] et les récepteurs de l'asialoglycoprotéine[14] (présents à la surface des cellules hépatiques[15]). Le ciblage des récepteurs des vitamines, tels que le récepteur de l'acide folique (vitamines B_9) a également été étudié. En effet, ce dernier est surexprimé par plusieurs types de tumeur, tels que les cancers du col de l'utérus et de l'ovaire alors qu'il n'est presque pas présent dans les tissus sains.[16, 17] Son exploitation a permis le développement de plusieurs composés associant l'acide folique à différents agents anticancéreux, comme la doxorubicine[18] ou encore la camptothécine[19].

Cette stratégie de ciblage a notamment permis le développement du Vintafolide™. Il s'agit d'un composé d'acide folique lié par un pont disulfure à un analogue de la vinblastine. Cette dernière cible le fuseau mitotique en inhibant la polymérisation des microtubules, ce qui empêche la division cellulaire. Après internalisation de la molécule par la cellule, le pont disulfure est réduit. Le thiol généré effectue une cyclisation intramoléculaire, ce qui libère la désacétylvinblastine monohydrazone (DAVLBH) (Figure 4).[20]

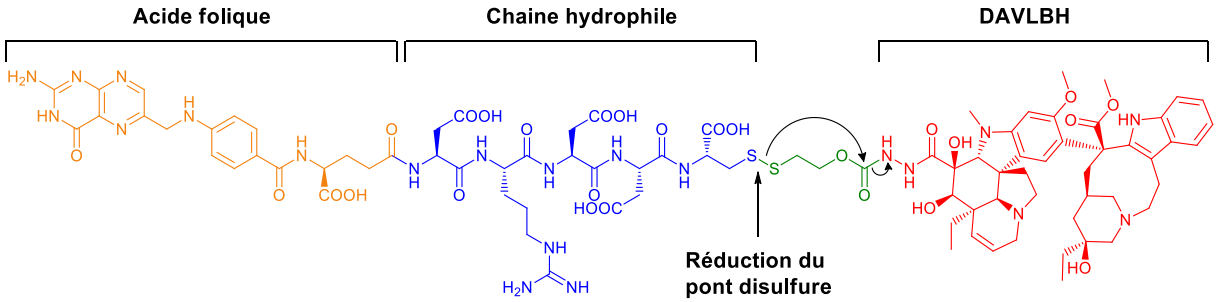


Figure 4 : Structure du Vintafolide™ et mécanisme de libération de DAVLBH.

Le Vintafolide™ est entré en étude clinique de phase III (étude NCT01170650) pour le traitement du cancer de l'ovaire en 2011, ainsi qu'en phase II (étude NCT01002924) pour le traitement du cancer du poumon non à petite cellule en 2013. Cependant, l'étude de phase III a dû être suspendue en 2015 en raison d'un manque d'efficacité et d'une toxicité trop importante.

Pour diminuer la toxicité systémique de ces composés, de nouveaux vecteurs enzymosensibles, plus sélectifs et stables dans le plasma ont été développés. Ces vecteurs mettent à profit la

[13] E. C. Calvaresia, P. J. Hergenrother, *Chem. Sci.*, **2013**, 4, 2319 - 2333.
[14] P. P. Breitfeld, C. F. Simmons, G. J. A. M. Strous, H. J. Geuze, A. L. Schwartz, *International Review of Cytology*, **1985**, 97, 47 - 95.
[15] B. Shi, M. Abrams, L. Sepp-Lorenzino, *J. Histochem. Cytochem.*, **2013**, 61, 901 - 909.
[16] S. D. Weitman, R. H. Lark, L. R. Coney, D. W. Fort, V. Frasca, V. R. Jr. Zurawski, B. A. Kamen, *Cancer Res.*, **1992**, 52, 3396 - 3401.
[17] P. S. Low, A. C. Antony, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2004**, 56, 1055 - 1058.
[18] S. Santra, C. Kaittanis, O. J. Santiesteban, J. M. Perez, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 16680 - 16688.
[19] W. A. Henne, D. D. Doorneweerd, A. R. Hilgenbrink, S. A. Kularatne, P. S. Low, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 5350 - 5355.
[20] J. A. Reddy, R. Dorton, E. Westrick, A. Dawson, T. Smith, L.-C. Xu, M. Vetzel, P. Kleindl, I. R. Vlahov, and C. P. Leamon, *Cancer Res.,* **2007**, 67, 4434 - 4442.

surexpression de certaines enzymes intracellulaires par les cellules cancéreuses comme la β-galactosidase.[21]

A titre d'exemple, des vecteurs galactosylés de la doxorubicine[22] et de la MMAE **1**[23] (Figure 5) ont été synthétisés par notre équipe.

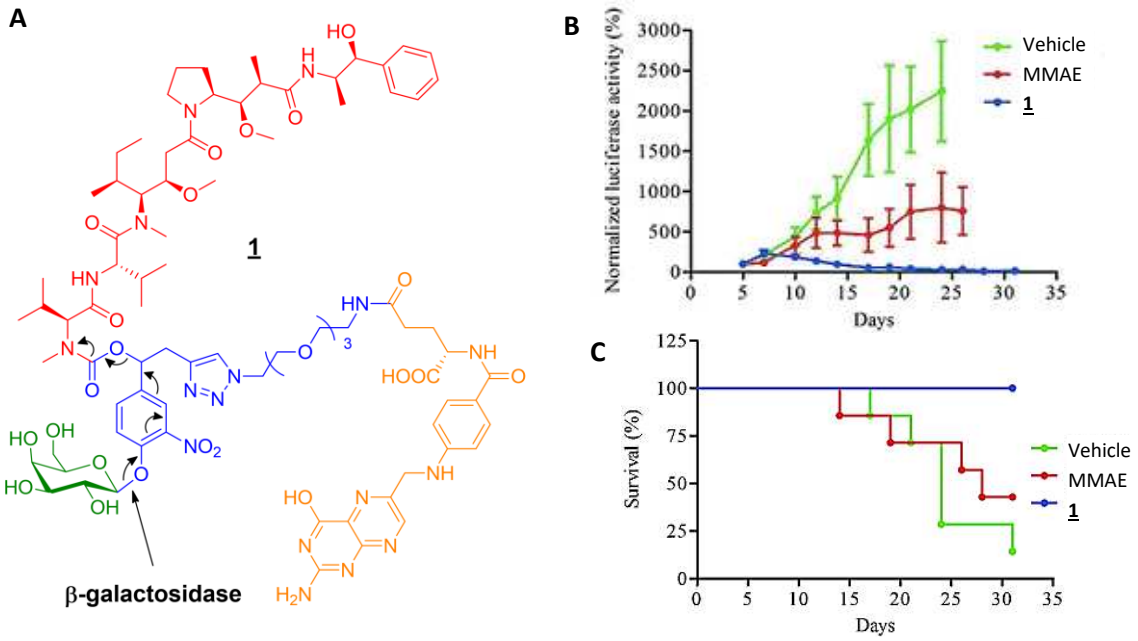


Figure 5 : A) Structure du vecteur galactosylé de la MMAE 1 et mécanisme de libération de la MMAE. B) Efficacité thérapeutique du vecteur 1 (administré à 5 mg.kg^{-1} aux jours 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 21, 23 et 26) comparée à celle de la MMAE (administrée à 0,1 mg.kg^{-1} aux jours 5, 7, 10, 12, 14 et 17) pour le traitement de xénogreffes de cellules KB chez des souris BalB/c. C) Courbe de survie des souris.

Après internalisation du vecteur de la MMAE **1** par les cellules qui surexpriment le récepteur de l'acide folique, la liaison *O*-glycosidique est hydrolysée sélectivement par la β-galactosidase lysosomale. Le phénol ainsi généré subit une élimination 1,6 suivie d'une décarboxylation spontanée libérant ainsi la MMAE. L'efficacité thérapeutique du vecteur **1** a été évaluée *in vivo* chez des souris xénogreffées avec des cellules KB et comparée à celle de la MMAE seule. Alors que les animaux traités par la MMAE seule ont vu leur croissance tumorale légèrement réduite, l'administration du vecteur galactosylé de la MMAE **1** conduit à une régression totale et durable de la tumeur pour toutes les souris traitées sans induire d'effet secondaire.

2.2 Le ciblage du microenvironnement tumoral

En plus de la surexpression des récepteurs ou des antigènes par les cellules cancéreuses, le microenvironnement tumoral possède plusieurs spécificités qui le différencient des tissus sains. Ces caractéristiques, d'ordres structurales, chimiques et biochimiques ont été exploitées pour le ciblage des tissus cancéreux.

---

[21] I.-C. Sun, H. Y. Yoon, D.-K. Lim, K. Kim, *Bioconjugate Chem.*, **2020**, 31, 1012 - 1024.
[22] M. Thomas, J. Clarhaut, P.-O. Strale, I. Tranoy-Opalinski, J. Roche, S. Papot, *ChemMedChem.*, **2011**, 6, 1006 - 1010.
[23] T. Legigan, J. Clarhaut, I. Tranoy-Opalinski, A. Monvoisin, B. Renoux, M. Thomas, A. Le Pape, S. Lerondel, S. Papot, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 11606 - 11610.

2.2.1 Spécificités structurales

Lors de l'évolution de la maladie, la quantité de nutriments nécessaire à la prolifération des cellules cancéreuses s'accroît sans cesse, ce qui induit une vascularisation rapide des tissus cancéreux. Cette angiogenèse massive s'accompagne d'une formation anarchique de nouveaux vaisseaux sanguins présentant de larges cavités dont le diamètre peut varier entre 100 et 1200 nm.[24, 25] Or, dans les tissus sains, les interstices entre les cellules endothéliales ne dépassent pas 2 nm.[26 27] L'endothélium vasculaire des tissus cancéreux est donc beaucoup plus perméable aux macromolécules que celui des tissus sains. De plus, le drainage lymphatique des tissus cancéreux est très faible, réduisant l'élimination des macromolécules hors de la tumeur. La combinaison de ces deux phénomènes rend possible l'accumulation passive de composés macromoléculaires au niveau de la tumeur. Elle est connue sous le terme d'effet de rétention et de perméabilité accrue ou effet EPR (Enhanced Permeability and Retention).[28]

2.2.1.1 Nanoparticules

La perméabilité accrue de l'endothélium tumoral a été exploitée afin d'y accumuler sélectivement des macromolécules, comme des nanoparticules, des polymères, des dendrimères ou bien des liposomes.[29, 30] Les avantages des macromolécules sont multiples, tels que le ciblage passif du microenvironnement tumoral par effet EPR, une meilleure tolérance comparée au principe actif seul due à la différence de biodistribution dans l'organisme ainsi qu'une demi-vie plasmatique accrue. En effet, leur masse moléculaire élevée supérieure à 40 kDa leur permet d'éviter l'élimination rénale augmentant ainsi leur durée de circulation dans l'organisme.[31]

L'efficacité de cette stratégie de vectorisation est illustrée par l'utilisation clinique de nombreux composés dans différents domaines de la médecine.[32] En oncologie, une formulation liposomale de la doxorubicine, nommée Doxil®, a reçu une autorisation de mise sur le marché dès 1995 pour le traitement du cancer de l'ovaire, la maladie de Kaposi, ainsi que du myélome multiple.[33]

Cependant, plusieurs contraintes au développement de nanoparticules existent, tels que la difficulté de synthèse, la caractérisation, la stabilité dans le plasma, leur accumulation hépatique ainsi que le contrôle du processus de libération de l'agent cytotoxique.

---

[24] S. K. Hobbs, W. L. Monsky, F. Yuan, W. G. Roberts, L. Griffith, V. P. Torchilin, R. K. Jain, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 4607 - 4612.
[25] F. Yuan, M. Dellian, D.Fukumura, M.Leunig, D. A. Berk, V. P. Torchilin, R. K. Jain, *Cancer Res*., **1995**, 55, 3752 - 3756.
[26] M. Bundgaard, *Ann. Rev. Physiol*., **1980**, 42, 325 - 336.
[27] S. H. Jang, M. G. Wientjes, D. Lu, J. L.-S. Au, *Pharmaceut. Res*., **2003**, 20, 1337 – 1350.
[28] J. Fang, H. Nakamura, H. Maeda, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2011**, 63, 136 - 151.
[29] L. Bildstein, C. Dubernet, P. Couvreur, *Adv. Drug Discover. Rev*., **2011**, 63, 3 - 23.
[30] R. Haag, F. Kratz, *Angew. Chem. Int. Edit*., **2006**, 45, 1198 - 1215.
[31] D. Venturoli, B. Rippe, *Am. J. Physiol. - Renal*, **2005**, 288, 605 - 613.
[32] S. Bisso, J. -C. Leroux, *Int. J. Pharm.*, **2020**, 578, 119098.
[33] J. Patel, J. *Oncol. Pharm. Pract*., 1996, 2, 201 - 210.

2.2.2 Spécificités chimiques

2.2.2.1 Acidité

Le microenvironnement tumoral est légèrement plus acide (pH 6,5) que le milieu interstitiel des tissus sains (pH 7,4).[34] Ce phénomène est en partie dû à l'effet Warburg lié au métabolisme des cellules cancéreuses.[35] Brièvement, la division cellulaire est tellement importante que les besoins en énergie des cellules sont considérables. De plus l'approvisionnement en oxygène est fortement réduit par la mauvaise vascularisation des tissus cancéreux. De ce fait, la respiration cellulaire est dans une phase dite anaérobique, ce qui favorise la production d'acide lactique. Cette production importante cause une diminution du pH du milieu interstitiel des cellules cancéreuses.

L'acidité du microenvironnement tumoral a été exploitée pour le développement de prodrogues incorporant des groupements fonctionnels sensibles à ces conditions. Ainsi, l'utilisation de déclencheurs tels que les groupements trityles, acétals, hydrazones et imines a été étudiée pour la libération d'agents anticancéreux au niveau de la tumeur.[36, 37, 38, 39] En revanche, cette stratégie d'activation n'est efficace que pour des vecteurs capables de s'accumuler au sein de la tumeur. En effet, la faible différence de pH par rapport aux tissus sains ne permet pas une décomposition sélective des vecteurs afin de confiner l'activité cytotoxique.

En tirant partie de l'effet EPR ainsi que du pH plus acide du microenvironnement tumoral, un vecteur dendritique de la doxorubicine **2** a pu être développé. Il est constitué de 16 molécules de doxorubicine reliées à sa structure par des fonctions hydrazones (Figure 6).[40]

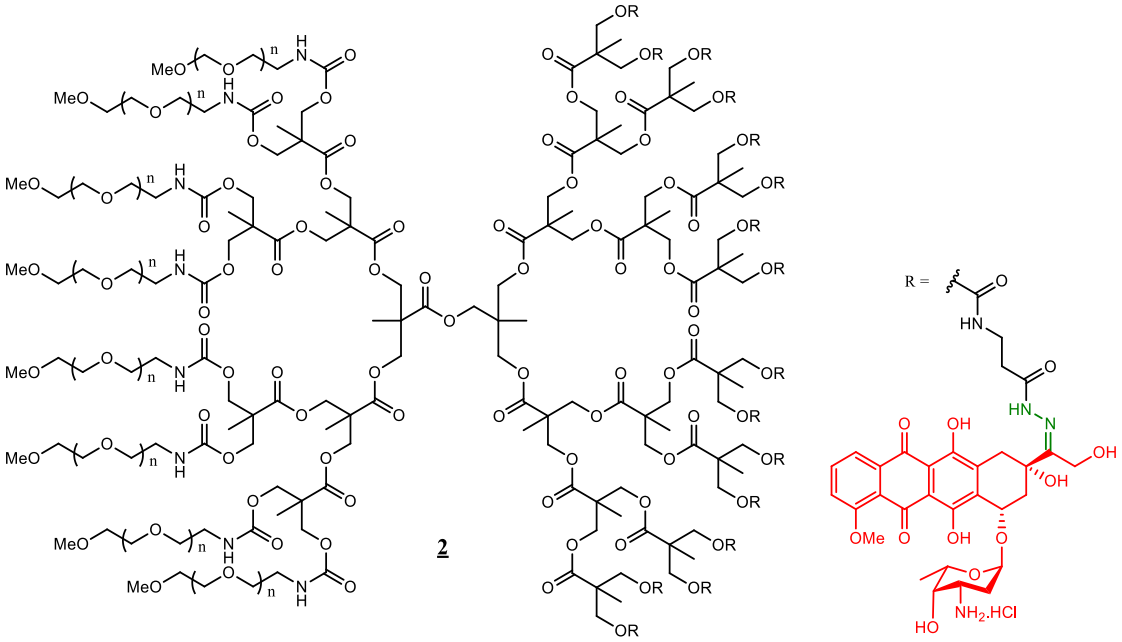


Figure 6 : Structure du vecteur dendritique 2.

[34] I. F. Tannock, D. Rotin, *Cancer Res*., **1989**, 49, 4373 - 4384.
[35] O. Warburg, *Science*, **1956**, 123, 309 - 314.
[36] R. Jain, S. M. Standley, J. M. J. Fréchet, *Macromolecules*, **2007**, 40, 452 - 457.
[37] M. J. Heffernan, N.Murthy, *Bioconjugate Chem*., **2005**, 16, 1340 - 1342.
[38] R. Tomlinson, J. Heller, S. Brocchini, R. Duncan, *Bioconjugate Chem*., **2003**, 14, 1096 - 1106.
[39] R. Tomlinson, M. Klee, S. Garett, J. Heller, R. Duncan, S. Brocchini, *Macromolecules*, **2002**, 35, 473 - 480.
[40] C. C. Lee, *PNAS*, **2006**, 103, 16649 -16654.

Après son administration par voie intraveineuse, il s'accumule passivement dans les tissus cancéreux grâce à sa masse moléculaire élevée. L'acidité du microenvironnement tumoral catalyse ensuite l'hydrolyse des liaisons hydrazones libérant ainsi la doxorubicine.

2.2.2.2 Milieu réducteur

Le microenvironnement tumoral est également caractérisé par son potentiel réducteur plus marqué que celui des tissus sains provenant de l'hypoxie présente au sein de la tumeur.[41] Ce phénomène est le résultat de la faible oxygénation des cellules, causée par la mauvaise vascularisation tumorale.

Cette caractéristique a été utilisée pour le développement de prodrogues réductibles permettant la libération sélective du principe actif au sein de la tumeur. Pour cela, l'utilisation de fonctions telles que des quinones, *N*-oxydes, groupements nitroaromatiques et ponts disulfures a été étudiée.[42, 43, 44, 45]

2.2.3 Spécificités biochimiques

Le microenvironnement tumoral est également caractérisé par une expression importante d'enzymes extracellulaires, particulièrement des protéases et des glycosidases. Le ciblage de ces enzymes a permis le développement de nombreuses stratégies de chimiothérapies vectorisées enzymosensibles capables de libérer sélectivement des agents cytotoxiques au sein du microenvironnement tumoral.[46, 47, 48, 49, 50, 51, 52]

Parmi les protéases surexprimées figurent principalement les cathepsines, le PSMA et les métalloprotéases matricielles (MMP). Ces dernières ont un rôle crucial dans la progression tumorale puisqu'elles régulent le microenvironnement en permettant la dégradation de la matrice extracellulaire ce qui favorise l'invasion des tissus ainsi que la formation de métastases.[53]

La présence de glycosidases extracellulaires a également été démontrée chez des patients atteints de différents cancers. En particulier, une concentration élevée des enzymes β-*N*-acétylglucosaminidase et β-glucuronidase a été observée.[54]

Dans ce cadre, notre équipe de recherche s'intéresse depuis des années au développement de vecteurs glucuronylés pouvant être activés sélectivement dans le microenvironnement tumoral par la

---

[41] J. M. Brown, W. R. Wilson, *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, 4, 437-447.
[42] M. A. Naylor, P. Thomson, *Mini Rev. Med. Chem.*, **2001**, 1, 17 - 29.
[43] W. A. Denny, *Eur. J. Med. Chem*. **2001**, 36, 577 - 595.
[44] W. A. Denny, *Aust. J. Chem*., **2004**, 57, 821 - 828.
[45] W. A. Denny, *Expert Opin. Ther. Pat.,* **2005**, 15, 635 - 646.
[46] M. Rooseboom, J. N. M. Commandeur, N. P. E. Vermeulen, *Pharmacol. Rev*., **2004**, 56, 53 - 102.
[47] Y.-H. Yang, H. Aloysius, D. Inoyama, Y. Chen, L.-Q. Hu, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **2011**, 1, 143 - 159.
[48] M. Shahriari, M. Zahiri, K. Abnous, S. M. Taghdisi, M. Ramezani, M. Alibolandi, *J. Control. Release*, **2019**, 308, 172 - 189.
[49] Q. Yao, L. Kou, Y. Tu, L. Zhu, *Trends in Pharmacological Sciences*, **2018**, 39, 766 - 781.
[50] D. G. Vartak, R. A. Gemeinhart, *J. Drug. Target*., **2007,** 15, 1 - 20.
[51] K. J. Isaacson, M. M. Jensen, N. B. Subrahmanyam, H. Ghandehari, *J. Control. Release*, **2017**, 259, 62 - 75.
[52] M. Poreba, *FEBS J*., **2020**, 287, 1936 - 1969.
[53] K. Kessenbrock, V. Plaks, Z. Werb, *Cell*, **2010**, 141, 52 - 67.
[54] R. J. Bernacki, M. J. Niedbala, W. Korytnyk, *Cancer and Metastasis Reviews*, **1985**, 4, 81 - 102.

β-glucuronidase extracellulaire. Dans la suite de cette introduction, nous présenterons les différentes approches qui ont été étudiées pour cibler cette enzyme.

3 Les vecteurs glucuronylés

3.1 La β-glucuronidase

La β-glucuronidase est la glycosidase la plus exploitée dans le cadre du développement de vecteurs enzymosensibles activables extracellulairement pour la libération d'agents cytotoxiques.

3.1.1 Description

La β-glucuronidase humaine est une enzyme lysosomale non-circulante hydrolysant les liaisons *O*-glycosidiques des glucuronides d'anomérie β. C'est une glycoprotéine tétramérique constituée de 4 sous-unités identiques de 77 kDa.[55] Le pH optimal de la β-glucuronidase est situé autour de 4 et son activité est réduite à moins de 20 % à pH physiologique (7,4).[56, 57, 58] Sa présence dans le lysosome est indispensable puisqu'elle participe à la dégradation des glycosaminoglycanes, qui sont des protéines matricellulaires, incorporées par la cellule. La β-glucuronidase possède un large spectre de substrats, puisque son activité n'est pas particulièrement impactée par la structure de l'aglycone du glucuronide.[59] Le site actif de la protéine est constitué de deux résidus d'acides glutamiques. L'acide glutamique en position 451 permet d'activer la position anomérique par protonation. Puis le glutamate en position 540 effectue la substitution nucléophile de l'aglycone formant alors un intermédiaire covalent de configuration α qui est finalement hydrolysé pour libérer l'acide glucuronique (Figure 7).

[55] F. E. Brot, C. E. Bell, W. S. Sly, *Biochemistry*, **1978**, 17, 385 - 391.
[56] B.F. Miller, T. Aiba, F.P. Keyes, P.W. Curreri, A.W. Branwood, *J. Atheroscler. Res.*, **1966**, 6, 352 - 358.
[57] K. J. Ho, *Biochim. Biophys. Acta*, **1985**, 827, 197 - 206.
[58] T. V. Zenser, V. M. Lakshmi, B. B. Davis, *Drug Metab. Dispos*. **1999**, 27, 1064-1067
[59] M. de Graaf, E. Boven, H. W. Scheeren, H. J. Haisma, H. M. Pinedo, *Current Pharmaceutical Design*, **2002**, 8, 1391 - 1403.

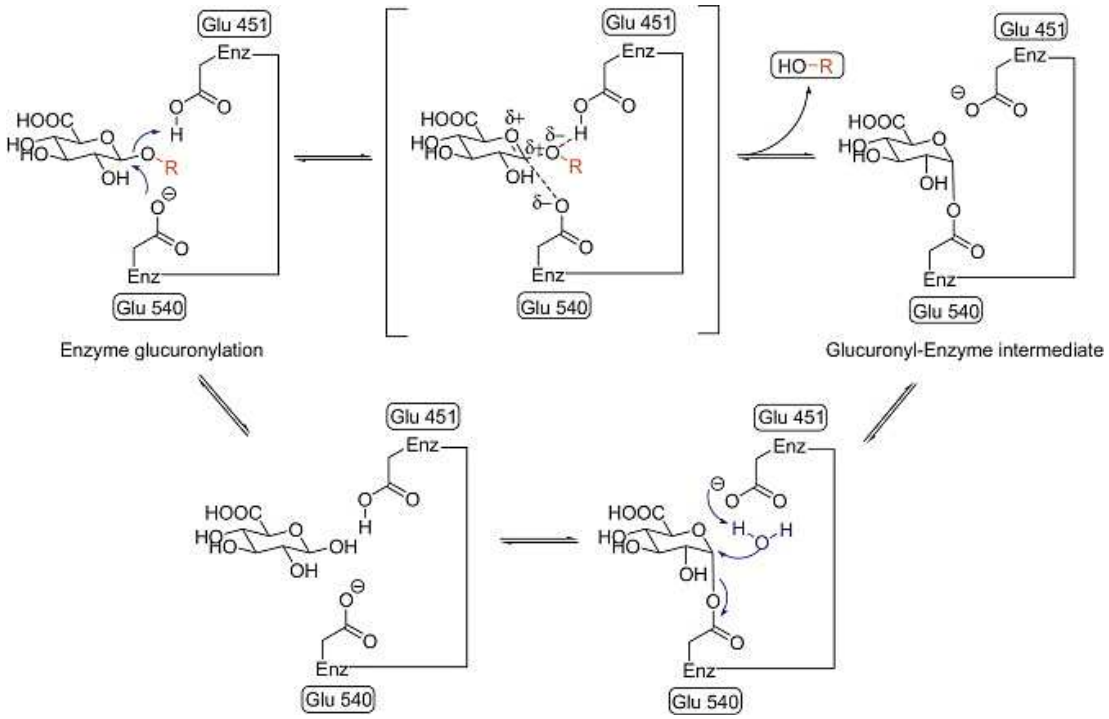


Figure 7 : Cycle catalytique de la β-glucuronidase. (issu de L.-Q. Hu *et al.*, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **2011**, 1, 143 - 159)

3.1.2 Expression de la β-glucuronidase dans le microenvironnement tumoral

La présence d'une concentration élevée de β-glucuronidase dans les tissus cancéreux a été mise en évidence dès 1947.[60] Sa potentielle utilisation pour l'activation de vecteurs glucuronylés a ensuite été proposée lors d'études évaluant l'efficacité de moutardes à l'azote en chimiothérapie anticancéreuse. En effet, une forte corrélation entre l'activité enzymatique de la β-glucuronidase dans des homogénats de cellules cancéreuses et leur sensibilité au traitement à la moutarde à l'azote a été observée.[61] Ainsi, lors du traitement de différents types de tumeurs induites chez la souris, une régression totale a été observée uniquement pour celles surexprimant la β-glucuronidase. L'hypothèse qui avait alors été avancée était que l'hydroxylation hépatique de l'aniline **3** générait la *para*-hydroxyaniline **4** fortement toxique. Ce composé était alors glucuronylé, toujours au niveau du foie, pour permettre son élimination. Le glucuronide **5** retournait alors dans la circulation sanguine et était ensuite clivé sélectivement par la β-glucuronidase surexprimée au niveau du microenvironnement tumoral (Figure 8). Cette hypothèse a été ensuite partiellement confirmée par l'étude du métabolisme des moutardes à l'azote chez la souris.[62] Bien que ce traitement soit efficace chez la souris, son utilisation chez l'Homme lors d'essais cliniques n'a apporté un bénéfice que dans de rares cas. En effet, pour plus de la moitié des patients traités, une progression de la maladie a été observée.[63]

[60] W. H. Fishman, A. J. Anlyan, *Science*, **1947**, 106, 66 - 67.
[61] T. A. Connors, M. E. Whisson, *Nature*, **1965**, 206, 689 - 691.
[62] T. A. Connors. P. B. Farmer, A. B. Foster, A. M. Gilsenan, M. Jarman, M. J. Tisdale, *Biochemical Pharmacology*, **1973**, 22, 1971 - 1980.
[63] C. Young, A. Yagoda, E. S. Bittar, S. W. Smith, H. Grabstald, W. Whitmore, *Cancer*, **1976**, 38, 1887 - 1895.

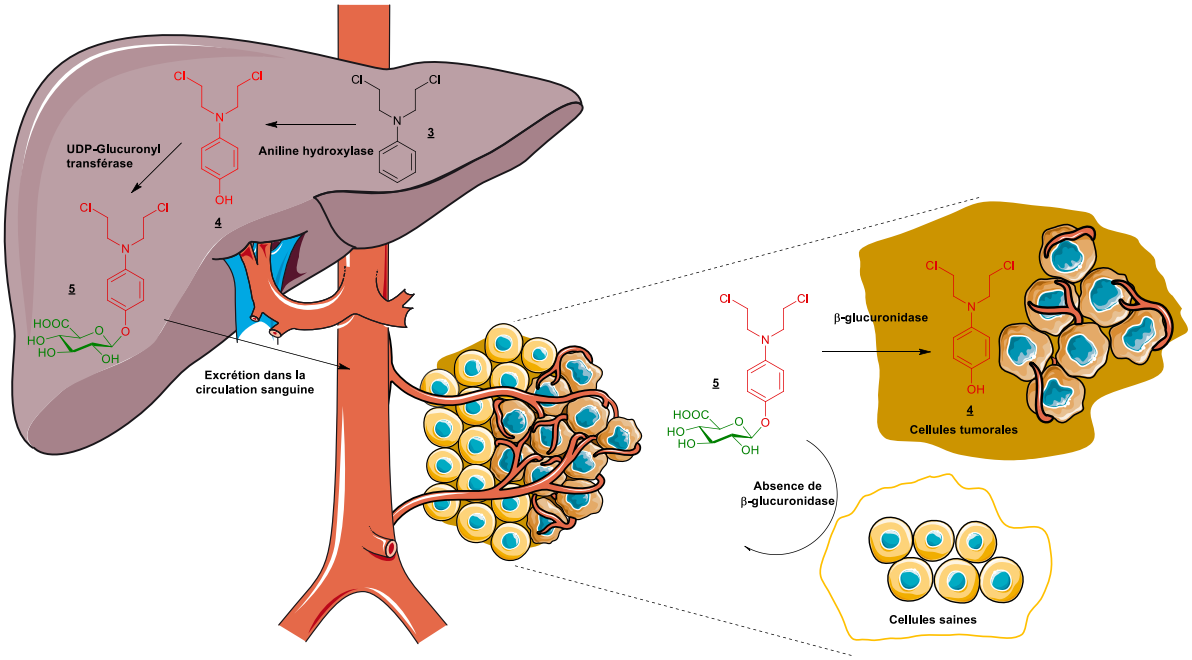


Figure 8 : Mécanisme proposé par Connors et al pour expliquer l'efficacité des moutardes à l'azote.

La surexpression de la β-glucuronidase extracellulaire a alors fait de cette enzyme une cible très intéressante dans le cadre de l'activation de prodrogues glucuronylées dans le microenvironnement tumoral.[64] En plus de leur libération sélective au sein des tumeurs, la dérivatisation des principes actifs sous la forme de glucuronides permet d'augmenter considérablement l'hydrophilie de ces composés. Ils sont donc moins susceptibles de pénétrer passivement dans les cellules saines, ce qui réduit considérablement les effets secondaires observés lors des traitements par chimiothérapie classique.

La localisation plus précise de la β-glucuronidase a ensuite été établie au niveau des zones nécrotiques de la plupart des tumeurs de plus de 2 millimètres de diamètre.[65] Contrairement aux tissus sains où l'activité de cette enzyme est principalement intracellulaire, la β-glucuronidase est présente dans la matrice extracellulaire des tumeurs solides. L'origine de ce phénomène reste encore floue bien qu'il ait été montré une corrélation entre la concentration de cette enzyme dans le microenvironnement tumoral et la présence de neutrophiles et macrophages au niveau des zones nécrotiques et des métastases.[66]

3.2 Exemples de vecteurs glucuronylés

De nombreux vecteurs substrats de la β-glucuronidase ont été synthétisés et cette stratégie de ciblage a été déclinée en utilisant différentes familles d'agents anticancéreux.[67] Ces composés possèdent une architecture commune articulée autour d'un espaceur auto-immolable permettant à la fois la reconnaissance du glucuronide par l'enzyme, ainsi que la libération de l'agent cytotoxique.

---

[64] L. F. Tietze, R. Seele, B. Leiting, T. Krash, *Carbohydr. Res.*, **1988**, 180, 253 - 262.
[65] 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.
[66] T.-Y. Juan, S. R. Roffler, H.-S. Hou, S.-M. Huang, K.-C. Chen, Y.-. Leu, Z. M. Prijovich, C.-P. Yu, C.-C. Wu, G.-H. Sun, T.-L. Cha, *Clin. Cancer Res.*, **2009**, 15, 4600 - 4611.
[67] I. Tranoy-Opalinski, T. Legigan, R. Barata, J. Clarhauta, M. Thomas, B. Renoux, S. Papot, *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, 74, 302 – 313.

3.2.1 Vecteur glucuronylé de la 9-amino-camptothécine

La 9-amino-camptothécine est une puissante molécule inhibitrice de la topoisomérase I.[68] Cette molécule a fait l'objet de nombreux essais cliniques de phase II sur différents cancers, tels que les cancers colorectaux, ovariens et du poumon. Cependant, son utilisation en chimiothérapie a été limitée par sa difficulté de formulation pour une administration systémique, nécessitant l'utilisation d'adjuvant permettant sa solubilisation. De plus, sa faible sélectivité envers les cellules tumorales induit de lourds effets secondaires tels que des neutropénies et des thrombocytopénies.[69]

Afin de diminuer sa toxicité et d'augmenter son hydrosolubilité, le groupe de Roffler a développé le vecteur glucuronylé de la 9-amino-camptothécine **6** (Figure 9).[70] Le glucuronide est relié à la 9-amino-camptothécine au moyen d'un espaceur auto-immolable, le 4-(hydroxyméthyl)phénol, par une fonction carbamate stable dans le plasma. En présence de β-glucuronidase, la liaison glycosidique est hydrolysée, générant le phénolate intermédiaire **7**. Ce dernier effectue une élimination 1,6 suivie d'une décarboxylation spontanée conduisant à la libération de la 9-amino-camptothécine.

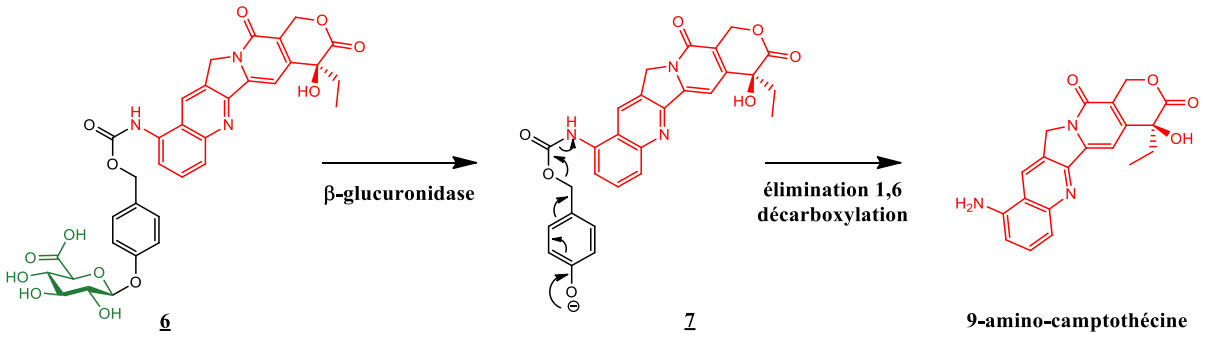


Figure 9 : Structure et décomposition du vecteur 6.

Ce vecteur a été étudié *in vivo* sur des xénogreffes humaines de tumeurs du colon du type LS174T implantées chez la souris (Figure 10).[71] Le vecteur a alors montré une inhibition de la croissance tumorale de l'ordre de 80 % par rapport aux tumeurs non traitées, similaire à celle observée pour le groupe traité par la 9-amino-camptothécine sans provoquer d'effets secondaires, ni avoir recours à l'utilisation de Lipiodol.

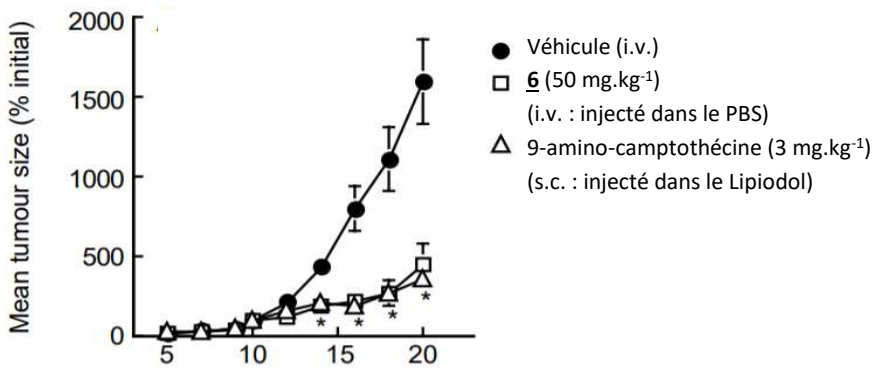


Figure 10 : Efficacité thérapeutique du vecteur 6 en comparaison avec la 9-amino-camptothécine administrés au jour 10.

[68] Y. H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L.F. Liu, *J. Biol. Chem*. **1985,** 260, 4873 - 4878.
[69] C. H. Takimoto, R. Thomas, *Ann. N. Y. Acad. Sci*., **2000**, 922, 224 - 236.
[70] Y. Leu, S. R. Roffler, J. W. Chern, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 3623 - 3628.
[71] Z. M. Prijovich, B.-M. Chen, Y.-L. Leu, J.-W. Chern, S. R. Roffler, *Brit. J. Cancer*, **2002**, 86, 1634 - 1638.

3.2.2 Vecteur glucuronylé de la doxorubicine

Notre groupe a participé au développement d'un vecteur glucuronylé de la doxorubicine, **HMR 1826** (Figure 11).[72] Ce vecteur comporte également 3 unités fonctionnelles : un principe actif relié au glucuronide par un espaceur auto-immolable. En présence de la β-glucuronidase, **HMR 1826** conduit à la libération de la doxorubicine sélectivement au niveau du microenvironnement tumoral.

Cependant, la structure de l'espaceur auto-immolable diffère du vecteur précédent par la présence d'un groupement nitro sur la position *ortho* du glucuronide. En effet, la cinétique de libération des principes actifs dépend fortement de la nature du groupe partant. Sans ce groupement nitro, le phénol intermédiaire ne permet pas la libération de la doxorubicine. L'introduction d'un groupement électroattracteur permet alors d'abaisser le pKa du phénol intermédiaire **8** favorisant la présence du phénolate à pH 7 et donc la réaction d'élimination 1,6 conduisant à la libération de la doxorubicine.

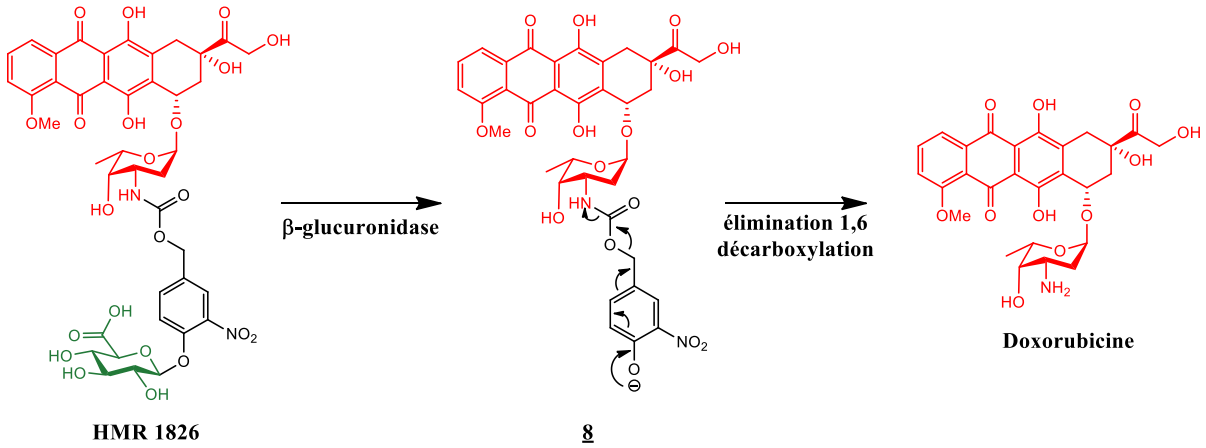


Figure 11 : Structure et décomposition de HMR 1826.

L'efficacité de ce vecteur a été évaluée *in vivo* chez la souris sur plusieurs xénogreffes de tumeurs humaines du sein, de l'ovaire, du poumon et du colon. Le protocole consistait à administrer **HMR 1826** aux jours 1, 4 et 7 à des doses comprises entre 250 et 350 $mg.kg^{-1}$. L'évolution de la croissance tumorale a été comparée à celle observée lors du traitement de ces mêmes tumeurs par 3 doses de doxorubicine à 4,5 $mg.kg^{-1}$ (Figure 12). Les résultats enregistrés ont montré un effet antitumoral pour **HMR 1826** supérieur à celui de la doxorubicine sur tous les types de tumeurs. De plus, **HMR 1826** possède une activité non négligeable sur la tumeur du poumon, alors qu'elle est insensible au traitement par la doxorubicine. Enfin, ce vecteur permet une régression totale et durable d'une tumeur mammaire.

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

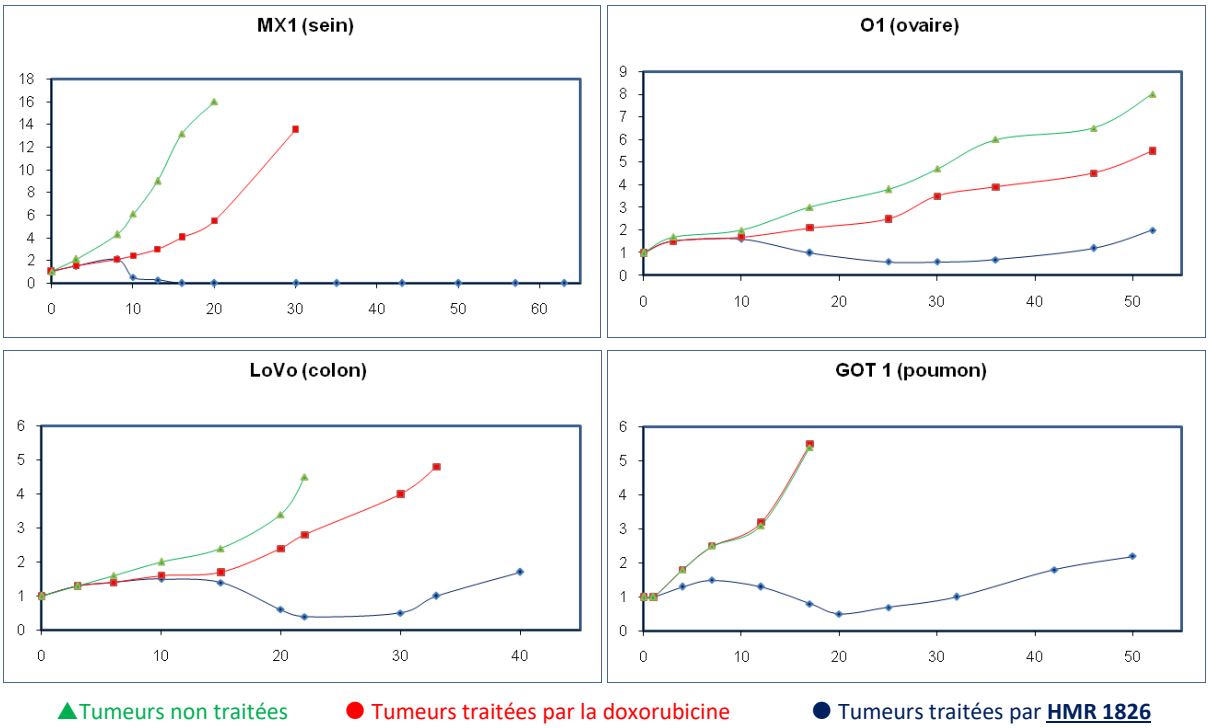


Figure 12 : Efficacité thérapeutique de HMR 1826 comparée à celle de la doxorubicine.

Par la suite, son efficacité thérapeutique a été comparée aux autres traitements utilisés en clinique tel que le Doxil® pour le traitement de souris porteuses de différentes xénogreffes. Ainsi, **HMR 1826** s'est révélé aussi efficace que le Doxil® tout en induisant moins d'effets indésirables chez les animaux.[73]

Cependant, les quantités à administrer pour obtenir une efficacité thérapeutique se sont révélées très importantes de l'ordre de 200 $mg.kg^{-1}$ par rapport à la doxorubicine utilisée 5 $mg.kg^{-1}$. En effet, la forte polarité apportée par le glucuronide favorise son élimination par les voies rénales, ce qui réduit *de facto* sa demi-vie plasmatique. Bien que le vecteur **HMR 1826** soit efficace, sa fenêtre thérapeutique s'est révélée trop étroite pour une utilisation en clinique. En effet, une toxicité importante a été observée chez la souris dès 250 $mg.kg^{-1}$ en leur provoquant des saignements de nez. De plus, l'activité réduite de la β-glucuronidase présente dans le microenvironnement tumoral limite considérablement la quantité de doxorubicine pouvant être libérée.

3.2.3 Vecteur glucuronylé de la MMAE

Afin de s'affranchir des problèmes liés à faible activité de la β-glucuronidase dans le microenvironnement tumoral, notre équipe a entrepris l'étude d'un vecteur glucuronylé de la MMAE **9** (Figure 13).[74] Cette dernière est une molécule analogue des dolastatines, puissants inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline[75] qui provoquent également d'importants dommages au niveau des vaisseaux sanguins (VDA : Vascular Disrupting Agent)[76]. La MMAE est en effet entre 100 et 1000 fois

[73] R. Woessner, Z. An, X. Li, R. M. Hoffman, R. Dix, A. Bitonti, *Anticancer Res.*, **2000**, 20, 2289 - 2296.
[74] T. Legigan, J. Clarhaut, B. Renoux, I. Tranoy-Opalinski, A. Monvoisin, C. Jayle, J. Alsarraf, M. Thomas, S. Papot, *Eur. J. Med. Chem*., **2013**, 67, 75 – 80.
[75] B. Bhattacharyya, J. Wolff, *FEBS Letters*, **1977**, 75, 159 - 162.
[76] E. M. Prokopiou, P. A. Cooper, G. R. Pettit, M. C. Bibby, S. D. Shnyder, *Mol. Med. Rep*., **2010**, 3, 309 - 313.

plus cytotoxique que la doxorubicine. Ainsi, sans modifier l'activité de l'enzyme au sein de la tumeur, la libération de la MMAE devrait conduire à une efficacité thérapeutique plus importante.

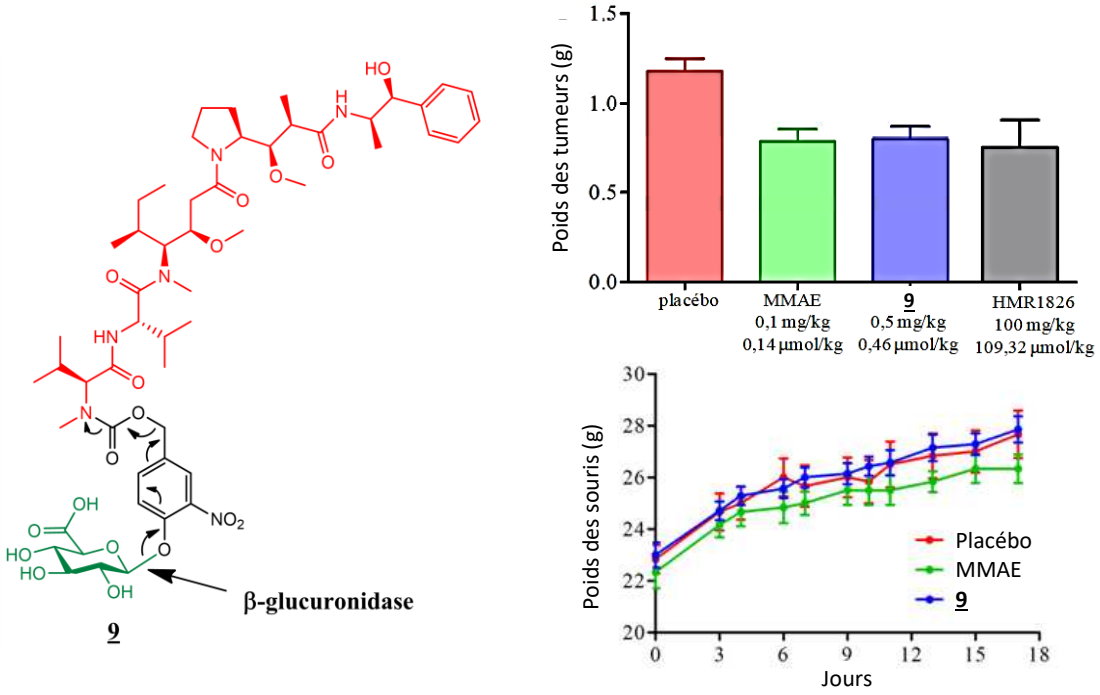


Figure 13 : Structure et efficacité thérapeutique du vecteur 9 comparée à celles de la MMAE et de HMR 1826, administrés par voie i.v. aux jours 7, 11 et 14 pour le traitement de tumeurs murines LLC sous-cutanées.

L'efficacité du vecteur glucuronylé de la MMAE **9** a été étudiée chez la souris pour le traitement de tumeurs pulmonaires murines sous-cutanées de type LLC en comparaison avec la MMAE et **HMR 1826** (Figure 13). Cette étude montre qu'une activité antitumorale égale à celle de **HMR 1826** est obtenue avec le vecteur **9** en utilisant une dose molaire 237 fois moins importante, sans présenter de signes évidents de toxicité.

3.2.4 Vecteurs glucuronylés de la cyclopamine

La cyclopamine est un alcaloïde naturel qui a été étudiée pour le traitement des glioblastomes, insensibles aux traitements conventionnels par chimiothérapie.[77] En effet ces tumeurs sont issues de cellules souches qui sont peu affectées par l'action des agents antimitotiques. La cyclopamine possède une activité inhibitrice de la voie de signalisation Hedghog qui est impliquée dans la différenciation et la prolifération des cellules souches.[78, 79, 80] Le ciblage de cette voie de signalisation par l'utilisation de cyclopamine s'est montré particulièrement efficace pour le traitement de souris atteintes de glioblastomes.[81, 82, 83] Cependant, son utilisation est limitée par sa faible sélectivité envers les cellules cancéreuses en provoquant également de sérieux dommages au niveau des cellules souches des tissus

[77] T. Demuth, M. E. Berens, *J. Neuro-oncol.*, **2004**, 70, 217 - 228.
[78] A. S. Kiselyov, *Anti-Canc. Agents Med. Chem.*, **2006**, 6, 445 - 449.
[79] A. S. Kiselov, S. E. Tkachenko, K. V. Balakin, A. V. Ivachtenko, *Expert Opin. Ther. Targets*, 2007, 11, 1087 - 1101.
[80] M. Lauth, R. Toftgård, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **2007**, 8, 457 - 461.
[81] E. E. Bar, A. Chaudhry, A. Lin, X. Fan, K. Schreck, W. Matsui, S. Piccirillo, A. L. Vescovi, F. DiMeco, A. Olivi, C. G. Eberhart, *Stem Cells*, **2007**, 10, 2524 - 2533.
[82] V. Clement, P. Sanchez, N. de Tribolet, I. Radovanovic, A. Ruiz I Altaba, *Curr. Biol.*, **2007**, 17, 165 - 172.
[83] A. Kolterud, R. Toftgard, *Drug Discov. Today Ther. Strateg.*, **2007**, 4, 229 - 235.

sains. De plus, la cyclopamine est un composé particulièrement hydrophobe, ce qui limite son potentiel thérapeutique.[84]

Afin d'augmenter le potentiel de cet alcaloïde, notre laboratoire a développé le vecteur glucuronylé **10** (Figure 14).[85] Ce dernier comporte le même espaceur auto-immolable que celui employé pour **HMR 1826** et le vecteur glucuronylé de la MMAE **9**. Cependant les essais d'hydrolyses enzymatiques ont montré une libération lente de la cyclopamine (28h). Ce résultat surprenant démontre que la nature du médicament véhiculé influence la cinétique de libération du principe actif. Des études complémentaires ont permis de mettre en évidence la précipitation de l'intermédiaire **11** dans le milieu réactionnel.

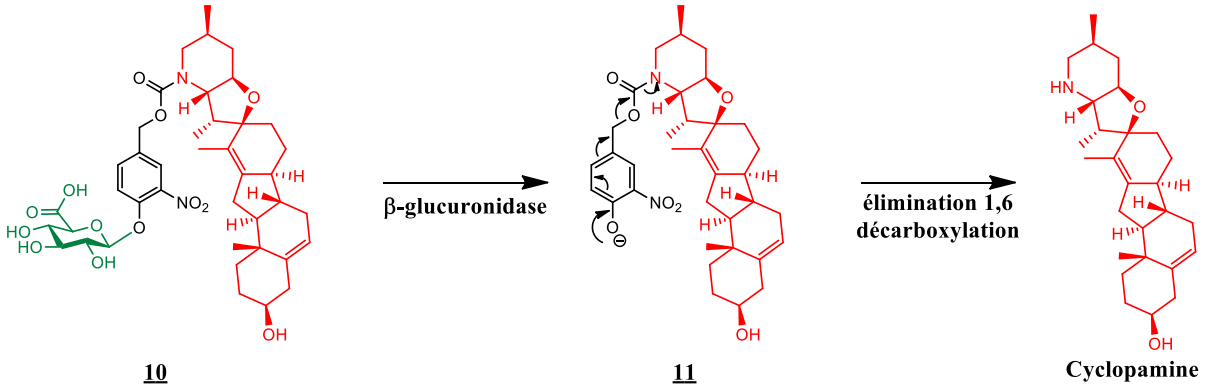


Figure 14 : Structure et décomposition du vecteur 10.

Un second vecteur de la cyclopamine **12**, plus hydrosoluble, a donc ensuite été développé. Cette fois ci, la structure du vecteur a été modifiée pour arborer une chaine latérale hydrophile constituée d'un glucose relié au vecteur en position benzylique par une chaine polyéthylène glycol (Figure 15).[86]

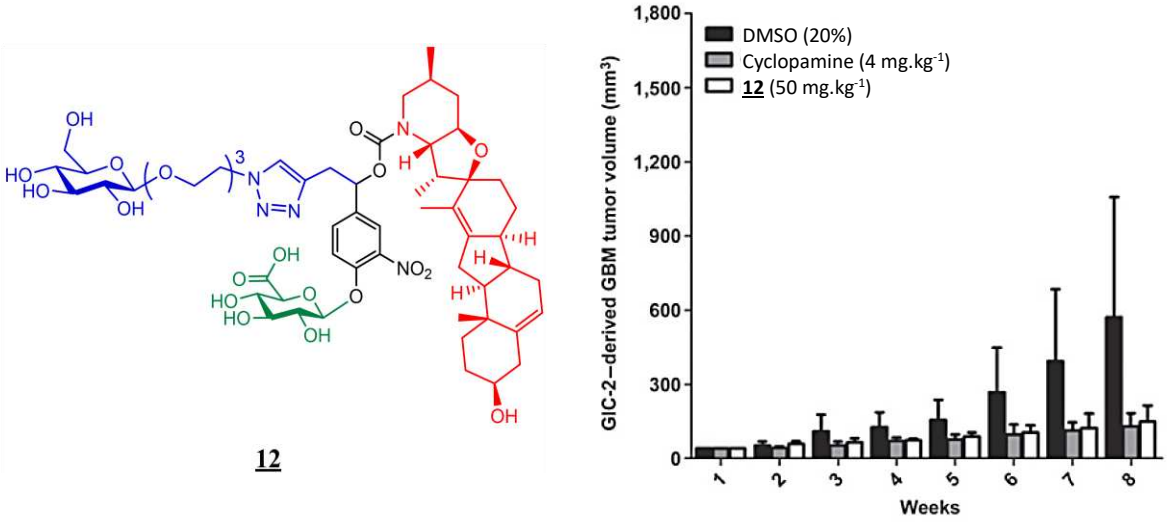


Figure 15 : Structure et efficacité thérapeutique du vecteur 12.

[84] R. F. Keeler, D. C. Baker, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1989**, 192, 153 - 156.
[85] F. Hamonn, B. Renoux, C. Chadéneau, J.-M. Muller, S. Papot, *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, 45, 1678 - 1682.
[86] B. Renoux, T. Legigan, S. Bensalma, C. Chadéneau, J.-M. Muller, S. Papot, *Org. Biomol. Chem.,* **2011**, 9, 8459 - 8464.

Ces modifications structurales ont permis l'amélioration de l'efficacité du vecteur, puisque ce dernier est capable de libérer la cyclopamine *in vitro* en moins de deux heures lors de son incubation avec la β-glucuronidase. Ce vecteur a ensuite été étudié *in vivo* pour le traitement de glioblastomes chez le rat et a montré des résultats prometteurs. En effet, l'administration intraveineuse du vecteur **12** produit une inhibition de la croissance tumorale de 70 %, similaire à celle obtenue avec la cyclopamine. De plus, une diminution de la toxicité intestinale a été observée dans le groupe traité avec le vecteur **12** par rapport au groupe ayant reçu la cyclopamine.[87, 88]

3.2.5 Vecteurs glucuronylés dendritiques

L'augmentation du nombre de molécules actives libérées après une seule activation enzymatique est une approche extrêmement intéressante permettant de pallier la faible activité de la β-glucuronidase dans le microenvironnement tumoral. Ce concept, basé sur l'utilisation de dendrimères auto-immolables, a été développé conjointement par les groupes de Shabat[89, 90, 91, 92] et De Groot[93] dès 2003. Ces dendrimères sont généralement constitués d'une gâchette connectée à une arborescence d'espaceurs auto-immolables au bout desquels se trouvent des principes actifs.

Notre équipe s'est intéressée à la conception de vecteurs dendritiques activables par la β-glucuronidase. Ces études ont mené au développement de vecteurs glucuronylés homodimérique de la doxorubicine **13**[94] et hétérodimérique de la doxorubicine et de MS-275 **14**[95] (Figure 16).

[87] A. Balbous, B. Renoux, U. Cortes, S. Milin, K. Guilloteau, T. Legigan, P. Rivet, O. Boissonnade, S. Martin, C. Tripiana, M. Wager, R. J. Bensadoun, S. Papot, L. Karayan-Tapon, *Mol. Cancer Ther.*, **2014**, 13, 2159 - 2169.
[88] S. Bensalma, C. Chadeneau, T. Legigan, B. Renoux, A. Gaillard, M. de Boisvilliers, C. Pinet-Charvet, S. Papot, J. M. Muller, *J. Mol. Neurosci.*, **2015**, 55, 51 - 61.
[89] R. J. Amir, N. Pessah, M. Shamis, D.Shabat, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 4494 - 4499.
[90] K. Haba, M. Popkov, M. Shamis, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, D. Shabat, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 716 - 720.
[91] R. Erez, E. Segal, K. Miller, R. Satchi-Fainaro, D.Shabat, *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 4327 - 4335.
[92] M. Shamis, H. N. Lode, D. Shabat, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 1726 - 1731.
[93] F. M. H. de Groot, C. Albrecht, R. Koekkoek, P. H. Beusker, H. W. Scheeren, *Ang. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 4490 - 4494.
[94] M. Grinda, J. Clarhaut, B. Renoux, I. Tranoy-Opalinski, S. Papot, *MedChemComm*, **2012**, 3, 68 - 70.
[95] M. Grinda, J. Clarhaut, I. Tranoy-Opalinski, B. Renoux, A. Monvoisin, L. Cronier, S. Papot, *ChemMedChem*, **2011**, 6, 2137 - 2141.

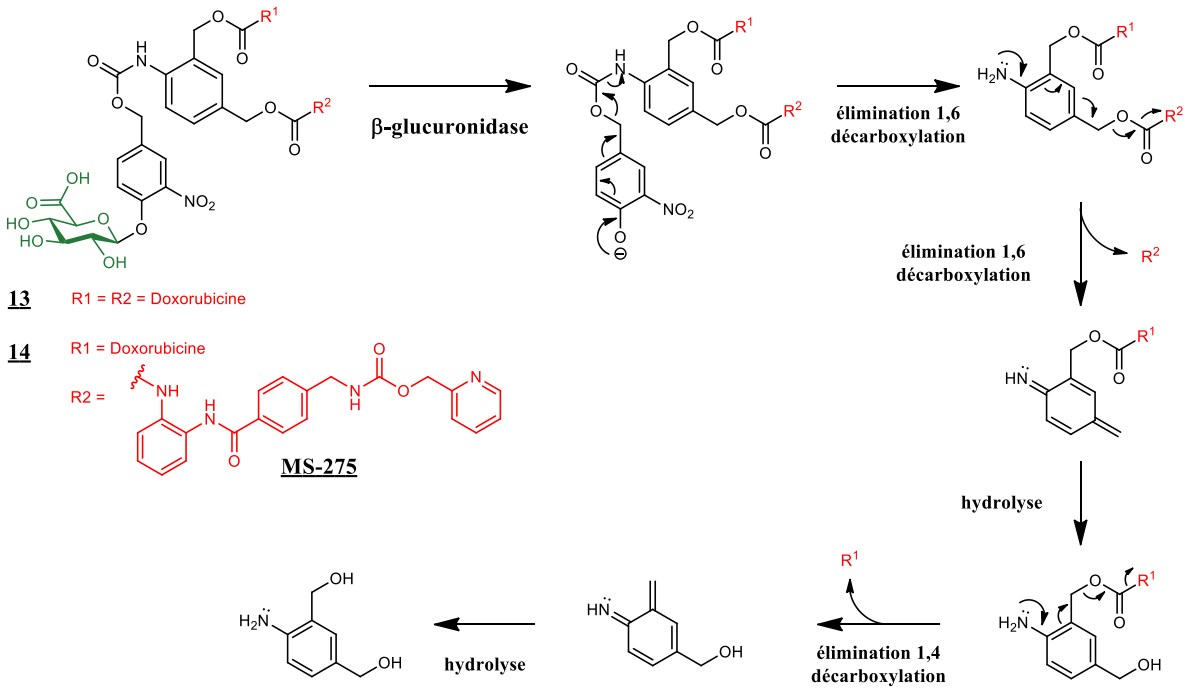


Figure 16 : Structure et décomposition des vecteurs glucuronylés dendritiques 13 et 14.

Le bénéfice de cette approche a pu être démontré lors d'évaluations biologiques. Ainsi les vecteurs glucuronylés dimériques **13** et **14** ont produit des activités supérieures à celles des monomères correspondants. La libération multiple de drogues après une seule hydrolyse enzymatique est donc une stratégie prometteuse pour pallier l'activité réduite de la β-glucuronidase extracellulaire.

3.3 Les limites de cette stratégie de ciblage

La forte polarité des prodrogues glucuronylées donne un avantage certain pour l'administration d'agents cytotoxiques très apolaires. Cependant, elle entraine aussi une élimination rénale très rapide, ce qui réduit fortement l'exposition des vecteurs aux cellules cancéreuses. Pour pallier ce problème, l'administration répétée de grandes quantités de prodrogues est nécessaire pour obtenir un effet antitumoral, limitant la fenêtre thérapeutique.

L'activité réduite de la β-glucuronidase extracellulaire limite également la gamme de principes actifs pouvant être véhiculés par cette approche. En effet, seules des molécules possédant une activité cytotoxique importante, comme la MMAE, sont de bons candidats pour cette stratégie thérapeutique.

4 Ciblage du cancer en utilisant l'albumine

La courte demi-vie plasmatique des molécules de faible poids moléculaire représente une limitation importante pour leur utilisation en tant que médicament. Ainsi de nombreuses stratégies permettant d'augmenter le temps de circulation des principes actifs au sein de l'organisme ont vu le jour. Dans ce cadre, le développement de nanoparticules, de micelles ou de liposomes assurant l'encapsulation des principes actifs a permis de s'affranchir des problèmes causés par leur élimination rapide.

L'interaction des principes actifs avec les protéines circulantes, notamment l'albumine, est un phénomène connu.[96] C'est le cas par exemple de l'ibuprofène,[97, 98] qui interagit avec l'albumine prolongeant ainsi sa demi-vie de circulation plasmatique. Ce phénomène est dû à une interaction non covalente et réversible avec l'albumine, permettant le transport de l'ibuprofène au sein de l'organisme et contournant les systèmes d'éliminations. (Figure 17)

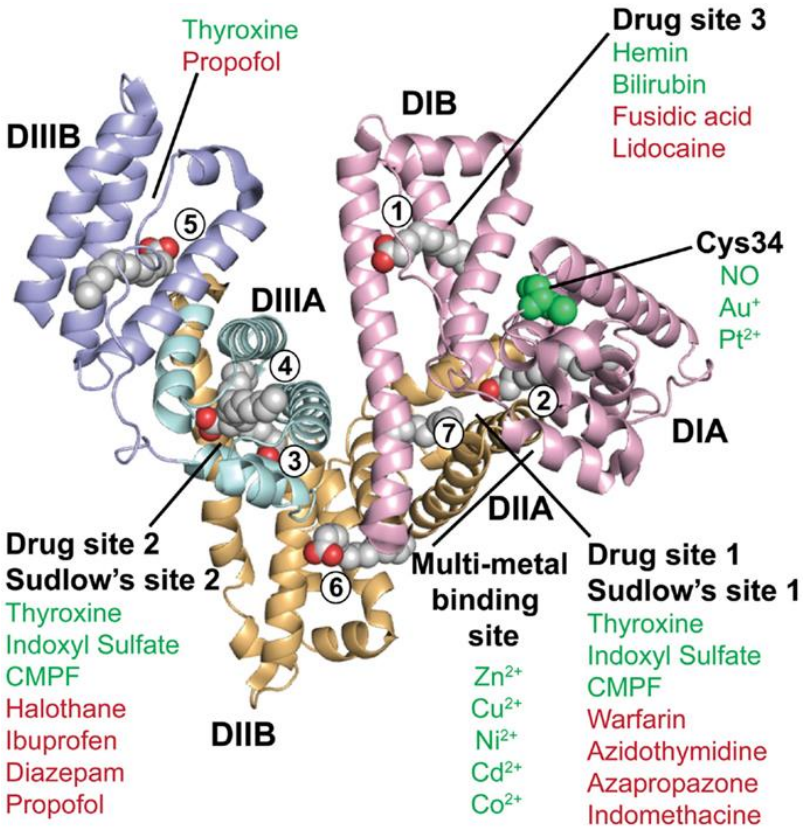


Figure 17 : Structure de l'albumine et localisation des principaux sites de fixation des acides gras (structures grises numérotées de 1 à 7) et des principes actifs. En vert les molécules et ions endogènes. En rouge les molécules exogènes.
(Issue de J. T. Andersen *et al.*, *Front. Immunol.*, **2015**, 5, 682)

Cette approche a été étudiée pour le traitement du diabète afin de prévenir l'élimination de l'insuline administrée aux patients. Plusieurs conjugués covalents albumine-insuline ont alors été étudiés. Ils permettent soit le maintien d'une forte reconnaissance du conjugué par le récepteur transmembranaire de l'insuline[99] soit sa libération progressive dans le sang au moyen d'un espaceur acido-sensible.[100] Cliniquement, le Levemir® (insuline detemir, Novo Nordisk) mis sur le marché en 2004, tire également profit de l'interaction avec l'albumine. C'est un composé analogue de l'insuline conjugué à l'acide myristique, un acide gras qui interagit de manière non covalente et réversible avec

[96] K. Yamasaki, V. Tuan Giam Chuang, T. Maruyama, M. Otagiri, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2013**, 1830, 5435 - 5443.
[97] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, *Molecular Aspects of Medicine*, **2012**, 33, 209 - 290.
[98] M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M Galliano, G Fanali, P Narciso, S. Notari, P. Ascenzi, *IUBMB Life*, **2005**, 57, 787 - 796.
[99] K. Thibaudeau, R. Léger, X. Huang, M. Robitaille, O. Quraishi, C. Soucy, N. Bousquet-Gagnon, P. van Wyk, V. Paradis, J.-P. Castaigne, D. Bridon, *Bioconjugate Chem*. **2005**, 16, 1000 - 1008.
[100] Y. Shechter, M. Mironchik, S. Rubinraut, A. Saul, H. Tsubery, M. Fridkin, *Bioconjugate Chem*. **2005**, 16, 913 - 920.

l'un des sept sites de fixation de l'albumine. Cela a pour conséquence d'augmenter la demi-vie plasmatique de l'insuline à plus de cinq heures contre cinq minutes pour l'insuline native.[101]

Dans le cadre de la chimiothérapie anticancéreuse, l'utilisation de l'albumine comme vecteur permettant la circulation prolongée des principes actifs en limitant leur élimination est donc une approche ayant un fort potentiel.

4.1 Physiologie de l'albumine

L'albumine humaine est une protéine constituée de 585 acides aminés, possédant une masse moléculaire de 66 438 Da. Contrairement à la majorité des autres protéines plasmatiques, l'albumine n'est pas une glycoprotéine. Elle possède un nombre élevé de cystéines par rapport aux autres protéines (35 dont 34 sont impliquées dans la formation de ponts disulfures). Seule la cystéine en position 34 présente un thiol libre. Grâce à la présence de ces 17 ponts disulfures, l'albumine possède une très grande stabilité, lui permettant de conserver sa structure tridimensionnelle tout au long de sa circulation plasmatique.[102] Sa structure se compose de trois domaines, notés de I à III, eux-mêmes composés de 2 sous domaines, notés A et B (Figure 17).[103]

4.1.1 Biosynthèse, métabolisme et biodistribution

L'albumine est synthétisée principalement par le foie. Le taux de production de l'albumine est de 13,6 g/jour, soit 3,8 % de l'albumine totale, pour un homme de 70 kg. L'albumine synthétisée est ensuite excrétée vers la circulation sanguine. La concentration plasmatique de l'albumine chez l'Homme est de 40 g/L. Elle représente la majeure partie de thiols libre du plasma sanguin.

La pharmacocinétique de l'albumine chez l'Homme a été étudiée par administration intraveineuse d'albumine modifiée par de l'iode radioactif (I^{125}-Albumine). Le suivi de l'évolution de la concentration plasmatique de l'albumine iodée au cours du temps donne une courbe caractéristique d'un modèle à deux compartiments. Ceci signifie que l'élimination n'est pas linéaire en tous points. Dans un premier temps, une partie de l'albumine administrée présente dans le compartiment intravasculaire est transférée dans le compartiment extravasculaire, par un phénomène appelé fuite transcapillaire, à un taux de 4 à 5 % par heure. Dans un second temps, on observe la diminution linéaire de la concentration d'albumine liée à son élimination et représente une dégradation de 3,7 % de l'albumine totale par jour, soit 13,3 g/jour. La demi-vie plasmatique de l'albumine chez l'Homme a donc été estimée à 19 jours. Cependant, cette valeur varie drastiquement en fonction de l'espèce,[104] par exemple chez la souris, la demi-vie est de 39 heures.

La biodistribution de l'albumine dans l'organisme est régulée par son échange entre les compartiments intravasculaire et extravasculaire. La quantité d'albumine intravasculaire représente 33 % de l'albumine totale. Les 67 % restants se trouvent dans le compartiment extravasculaire (41 % dans la peau, 40 % dans les muscles, 7 % dans l'intestin, 3 % dans le foie et les 9 % restants dans les tissus sous-cutanés et autres organes). Cependant, seulement 73 % de l'albumine extravasculaire

[101] J. Morales, *Drugs*, **2007**, 67, 2557 - 2584.
[102] T. Peters, All About Albumin, *Academic Press*, **1995**.
[103] M.T. Larsen, M. Kuhlmann, M. L. Hvam and K. A. Howard, *Molecular and Cellular Therapies*, **2016**, 4, 3.
[104] F. J. Dixon, P. H. Maurer, M. P. Deichmiller, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **1953**, 83, 287 -288.

participe à l'échange avec le compartiment intravasculaire, le reste de l'albumine est isolé dans les tissus.

Afin de permettre cet échange entre les différents compartiments et tissus du corps, plusieurs mécanismes de transport de l'albumine permettent son endocytose et sa transcytose. En outre, il existe un mécanisme de sélection assurant la conservation de l'albumine fonctionnelle et la dégradation de la protéine potentiellement dénaturée au cours de sa circulation dans l'organisme.

4.1.2 Endocytose de l'albumine

Le passage de l'albumine entre le compartiment intravasculaire et extravasculaire est permis par la présence de récepteurs membranaires de l'endothélium dont l'albumine est un ligand. A ce jour, différents récepteurs de l'albumine ont été découverts (Tableau 2).[105]

Tableau 2 : Les récepteurs de l'albumine et leur localisation.

Protein/Receptor	Tissue	Substrate
Albondin/gp60	Continuous endothelium	Native albumin
gp18	Endothelium, macrophages, fibroblasts and MDA-MB-453 breast cancer cell surfaces	Modified-albumin
gp30	Endothelium, macrophages, fibroblasts and MDA-MB-453 breast cancer cell surfaces	Modified-albumin
SPARC	Endothelial cells, vascular smooth muscle cells, skeletal muscle, fibroblasts, testicular, ovarian, pancreatic and a range of tumor cells	Native albumin
hnRNPs	Human tumor cell lines: CEM T-cell leukemia cells, MCF-7 breast cancer cells and MV3 melanoma cells	Native albumin
Calreticulin	Human tumor cell lines: CEM T-cell leukemia cells, MCF-7 breast cancer cells and MV3 melanoma cells	Native albumin
FcRn	Endothelium, antigen-presenting cells, gut, kidneys, lungs and the blood-brain-barrier (central nervous system endothelium and choroid plexus)	Native albumin
Cubilin	Kidney proximal tubule cells, absorptive intestinal cells, placenta, and visceral yolk-sac cells	Native albumin and probably modified-albumin
Megalin	Kidney proximal tubule cells, absorptive intestinal cells, placenta, visceral yolk-sac cells, choroid plexus, thyrocytes, ciliary epithelium, lungs, parathyroid, endometrium, oviduct, inner ear, and epididymal epithelial cells	Native albumin and probably modified-albumin

4.1.2.1 gp18 et gp30

Il s'agit de 2 glycoprotéines membranaires dont la masse moléculaire définie leur appellation, gp18 et gp30 correspondent aux glycoprotéines de 18 kDa et 30 kDa respectivement. Ces récepteurs sont présents dans de nombreux organes et sont exprimés par diverses cellules, notamment les fibroblastes, les macrophages et les cellules endothéliales. Ces récepteurs sont spécifiques de l'albumine sénescente, dénaturée et endommagée. Ils ont un rôle de récepteurs piégeurs impliqués dans le catabolisme de l'albumine en favorisant son internalisation pour une dégradation par la voie lysosomale.[106]

4.1.2.2 gp60 (Albondine)

L'albondine, est également une glycoprotéine membranaire présente à la surface des cellules endothéliales. Elle est appelée aussi gp60 en raison de sa masse moléculaire de 60 kDa. Elle sert de récepteur spécifique de l'albumine native et favorise sa transcytose et sa perméabilité capillaire. L'albondine est présente sélectivement dans l'endothélium où les jonctions entre les cellules sont très petites, permettant un passage restreint des macromolécules ou protéines aux tissus. Ce récepteur permet le transport sélectif de l'albumine dans les tissus dépourvus d'apport de protéines par le transport en phase fluide.[107]

---

[105] A. M. Merlot, D. S. Kalinowski and D. R. Richardson, *Front. Physiol*. **2014**, 5, 299.
[106] J. E. Schnitzer and J. Bravo, *The Journal of Biological Chemistry*, **1993**, 268, 7562-7570.
[107] J. E. Schnitzer and P. Oh, *The Journal of Biological Chemistry*, **1994**, 269, 6072-6082.

4.1.2.3 SPARC

SPARC est l'accronyme pour « Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein ». Il s'agit d'une glycoprotéine multifonctionnelle appartenant à la famille des protéines matricellulaires. Ces protéines ont un rôle régulateur de l'interaction entre les cellules et la matrice extracellulaire, en se liant aux protéines structurales comme le collagène, ou en régulant l'activité des facteurs de croissances. Leur activité est maximale durant l'embryogénèse et la croissance tissulaire. Chez l'adulte, son activité est réduite au remodelage des tissus (notamment lors du processus de cicatrisation).[108, 109] De plus, cette protéine présente sur l'endothélium vasculaire, permet la transcytose de l'albumine du flux sanguin vers le milieu interstitiel.[110]

4.1.2.4 Complexe mégaline/cubiline

La longue durée de circulation de l'albumine est en partie due à sa très faible élimination rénale. La filtration du sang par les reins permet d'éliminer efficacement les composés de poids moléculaire inférieur à 60 kDa. Du fait de la masse moléculaire élevée de l'albumine (66 kDa), elle échappe en partie à l'excrétion urinaire. Cependant, cette faible différence ne permet pas la rétention totale de l'albumine. Il existe alors un processus qui permet la réabsorption active de l'albumine qui aurait échappé à cette filtration. Il est assuré par la présence d'un complexe protéique associant la mégaline et la cubiline. Ce complexe est capable d'interagir avec l'albumine non retenue et de l'internaliser afin de procéder à sa transcytose vers les vaisseaux lymphatiques permettant son retour à la circulation sanguine.[111]

4.1.2.5 Macropinocytose

En plus des voies d'endocytose spécifiques médiées par des récepteurs, il existe également un mécanisme d'internalisation du liquide interstitiel présent autour de la cellule appelé pinocytose ou macropinocytose selon la quantité de matière engagée dans ce processus. Il s'agit d'une internalisation en phase fluide non sélective d'une partie du liquide interstitiel et de ses composants. Ce processus, comparable à la phagocytose par les macrophages, a pu être observé lors de cultures cellules cancéreuses dès les années 30.[112] Ce type d'internalisation est clathrine-indépendante puisqu'elle ne recrute pas de récepteur membranaire. Elle est réalisée par la polymérisation de filaments d'actine qui crée une invagination de la membrane cellulaire en engloutissant une partie du liquide interstitiel. Lorsqu'elle se referme sous l'action des cavéolines[113], le contenu se retrouve alors piégé dans une cavéole au sein de la cellule, formant un endosome de macropinocytose (ou macropinosome). Il fusionne ensuite avec un lysosome afin de dégrader les molécules incorporées qui serviront de briques élémentaires pour la synthèse de nouvelles protéines.[114] L'internalisation de l'albumine, comme toutes autres protéines plasmatiques, exosomes, nutriments ou débris cellulaires est possible par macropinocytose.[115] La macropinocytose par les cellules est régulée par la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR, responsable de la croissance et la multiplication cellulaire. Son activation dépend

[108] K. Motamed, *Int. J. Biochem. Cell. Biol*., **1999,** 31, 1363 - 1366.
[109] R. A. Brekken, E. H. Sage, *Matrix Biology*, **2000**, 19, 816 - 827.
[110] S. E. Goldblum, X. Ding, S. E. Funk, E. H. Sage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 3448 - 3452.
[111] K. M. K. Sand, M. Bern, J. Nilsen, H. T. Noordzij, I. Sandlie, J. T. Andersen, *Front. Immunol*., **2015**, 5, 682.
[112] W. H. Lewis, *Am. J. Cancer*, **1937**, 29, 666 - 679.
[113] W. Schubert, P. G. Frank, B. Razani, D. S. Park, C.- W. Chow, M. P. Lisanti, *J. Biol. Chem*., **2001**, 276, 48619 - 48622.
[114] W. Palm, *Phil. Trans. R. Soc. B*., **2019**, 374, 20180285.
[115] K. D. Ha, S. M. Bidlingmaier, B. Liu, *Front. Physiol*., **2016**, 7, 381.

notamment des facteurs de croissance extracellulaire mais également de la présence de nutriments intracellulaire tels que les sucres ou acides aminés.

4.1.3 Le rôle du FcRn dans la transcytose et le recyclage de l'albumine

L'albumine et les immunoglobulines G (IgG) sont les 2 seules protéines qui possèdent une longue durée de circulation dans l'organisme. Bien qu'elles détiennent des fonctionnalités distinctes, leur circulation est contrôlée de manière conjointe par l'organisme au moyen d'un récepteur commun : le Récepteur Fc néonatal (FcRn). Son implication pour le recyclage de l'albumine et des IgG a été démontrée en étudiant la demi-vie plasmatique de l'albumine chez des souris génétiquement modifiées déficiente en FcRn. Ainsi, les souris qui n'expriment pas le FcRn ont vu leur taux d'albumine diminué de moitié, avec une demi-vie réduite à 25h par rapport aux 39h des souris normales. De plus, une tendance similaire pour la circulation des IgG a été observée.[116]

Ce récepteur est une protéine transmembranaire composée d'une chaine lourde (constituée de 3 domaines nommés α_1, α_2 et α_3) associée de manière non covalente à une chaine légère de microglobuline β_2 (β_2m). Son rôle est d'assurer la transcytose de ses ligands au travers des tissus et cellules en permettant leur transport et leur conservation afin qu'ils échappent au processus de dégradation lysosomale. Le FcRn est, par nature, capable de se lier au fragment cristallisable (Fc) des IgG. Ce fragment est la partie commune aux différents IgG qui ne participe pas au transport d'antigènes. Il est responsable de la reconnaissance des IgG par les cellules du système immunitaire. Bien que possédant une fonction similaire, les domaines des interactions IgG-FcRn et albumine-FcRn ne se superposent pas. Ainsi, le FcRn a la capacité de se lier simultanément et de manière non compétitive à ses 2 ligands.[117, 118]

Depuis sa découverte, pour le transport materno-fœtal des IgG, [119] son expression s'est révélée ubiquitaire dans les tissus du corps des mammifères tout au long de leur vie. Le FcRn est notamment présent dans les cellules endothéliales, permettant la transcytose des IgG du flux sanguin vers les tissus où ce type d'anticorps est nécessaire pour promouvoir l'immunité. De plus, s'il se lie à une IgG formant un complexe immunitaire avec un antigène, le FcRn permet indirectement la présentation de cet antigène par les cellules du système immunitaires renforçant ainsi la réponse immunitaire innée.[120] (Figure 18)

[116] C. Chaudhury, S. Mehnaz, J. M. Robinson, W. L. Hayton, D. K. Pearl, D. C. Roopenian, C. L Anderson, *J. Exp. Med.,* **2003,** 197, 315 - 322.
[117] J. T. Sockoloskya, F. C. Szoka, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2015**, 91, 109 - 124.
[118] C. Chaudhury, C. L. Brooks, D. C. Carter, J. M. Robinson, C. L. Anderson, *Biochemistry,* **2006**, 45, 4983 - 4990.
[119] M. Pyzik, T. Rath, W. I. Lencer, K. Baker, R. S. Blumberg, *J. Immunol*., **2015**, 194, 4595 - 4603.
[120] M. Pyzik, K. M. K. Sand, J. J. Hubbard, J. T. Andersen, I. Sandlie, R. S. Blumberg, *Front. Immunol*., **2019**, 10, 1540.

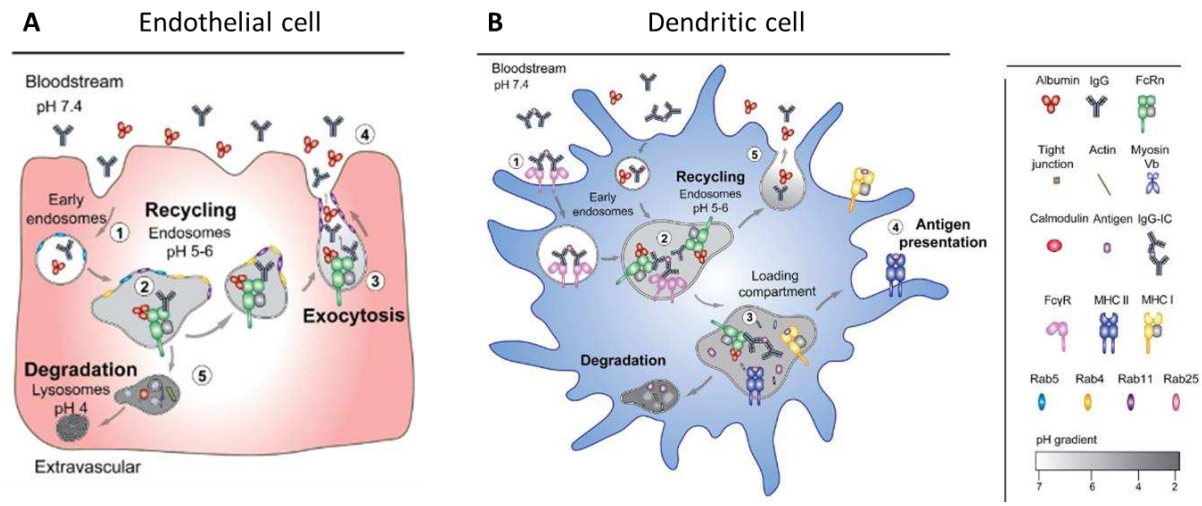


Figure 18 : Transcytose de l'albumine et des IgG par le FcRn à travers les cellules endothéliales (A) et à travers les cellules dendritiques (B). (Adapté de J. T. Andersen *et al.*, *Front. Immunol.*, **2015**, 5, 682)

Le FcRn assure également le maintien de la concentration plasmatique de l'albumine. Il contribue activement au recyclage de l'albumine qui a été internalisée en permettant son exocytose plutôt que sa dégradation lysosomale.[121]

Le processus de la prise en charge des substrats du FcRn est similaire. Il s'agit d'une interaction ligand-récepteur non-covalente et réversible dont la constante d'association est fortement dépendante du pH. A pH physiologique (pH 7), l'interaction est très faible, alors qu'à pH plus acide (pH 5) l'interaction est beaucoup plus importante. Après l'internalisation des IgG et de l'albumine, que ce soit par endocytose du couple ligand-récepteur ou par macropinocytose, un endosome précoce se forme ayant à sa membrane des récepteurs FcRn. Lors de la maturation de l'endosome, le pH diminue renforçant l'affinité du FcRn pour ses substrats. Quand il fusionne ensuite avec un lysosome, le FcRn est fortement fixé à ses substrats et n'est pas incorporé dans ce dernier, mais reste dans l'endosome prévenant ainsi leur dégradation. Il est ensuite dirigé vers l'extérieur de la cellule par exocytose, où le pH redevient neutre. Dès lors, l'interaction est plus faible, l'albumine et les IgG sont recyclés et retournent dans la circulation.

L'interaction albumine-FcRn[122] est due principalement à des interactions hydrophobes avec le domaine DIII de l'albumine (Figure 19-A). En particulier, le tryptophane en position 53 du FcRn interagit avec trois phénylalanines de l'albumine et le tryptophane 59 du FcRn qui est proche de la poche hydrophobe du domaine DIIIA de l'albumine. Un réseau de liaisons hydrogène, au niveau du domaine DI, contribue également à l'interaction FcRn-albumine.[123]

[121] E. G. W. Schmidt, M. L. Hvam, F. Antunes, J. Cameron, D. Viuff, B. Andersen, N. N. Kristensen, K. A. Howard, *J. Biol. Chem.*, **2017,** 292, 13312 - 13322.
[122] J. T. Andersen, B. Dalhus, J. Cameron, M. B. Daba, A. Plumridge, L. Evans, S. O. Brennan, K. S. Gunnarsen, M. Bjørås, D. Sleep, I. Sandlie, *Nat. Commun.*, **2012**, 3, 610.
[123] K. M. K. Sand, M. Bern, J. Nilsen, H. T. Noordzij, I. Sandlie, J. T. Andersen, *Front. Immunol.*, **2015**, 5, 682.

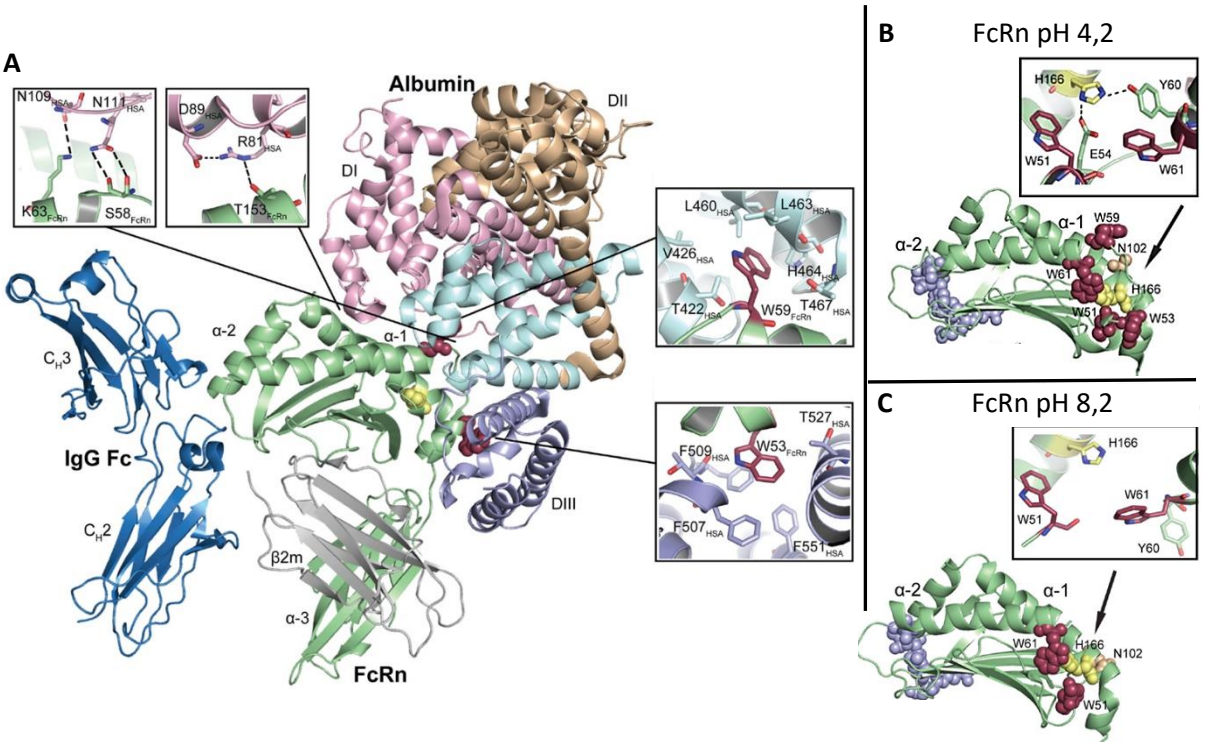


Figure 19 : L'interaction FcRn-Albumine. A) Les acides aminés impliqués. B) et C) Influence du pH sur la présentation des acides aminés des domaines α_1 et α_2 du FcRn. (Adapté de J. T. Andersen *et al*., *Front. Immunol*., **2015**, 5, 682)

La réversibilité de l'interaction albumine-FcRn est causée par la variation de la configuration tridimensionnelle du récepteur en fonction du pH. L'histidine 166 du FcRn est le principal acide aminé responsable de cette variation tridimensionnelle dépendante du pH. En effet, à pH acide, l'histidine 166 est protonée et participe à un réseau de liaison hydrogène intramoléculaire (Figure 19-B). Ce dernier assure une forte interaction permettant notamment la présentation des résidus hydrophobes, essentiels à l'interaction avec l'albumine, à la surface du récepteur. Or, à pH plus basique, cette histidine 166 n'est plus protonée, réduisant son affinité avec les autres acides aminés impliqués dans le réseau de liaison hydrogène. De ce fait, les résidus tryptophanes ne sont plus présentés à la surface du FcRn (Figure 19-C). L'association FcRn-albumine, qui est majoritairement due à cette interaction hydrophobe, perd de l'intensité et l'albumine se dissocie de son récepteur.

L'interaction de l'albumine avec le FcRn est donc capitale pour le maintien de sa concentration plasmatique. Elle est également responsable de sa transcytose entre les différents compartiments de l'organisme lui permettant d'avoir une biodistribution importante. De plus, elle permet une sélection de l'albumine native fonctionnelle. En effet, toutes modifications structurales de l'albumine présentent un risque délétère à cette interaction. Ainsi, une albumine dénaturée aura une affinité moindre pour le FcRn induisant alors son catabolisme par la voie de dégradation lysosomale.

4.2 Tropisme de l'albumine vers la tumeur

4.2.1 Accumulation dans les tumeurs

L'albumine possède une masse moléculaire importante de 66 kDa permettant son accumulation au sein du microenvironnement tumoral par effet EPR. Ce phénomène a été mis en évidence chez des

rats porteurs de différentes tumeurs avec l'administration de radio-isotopes, notamment ^{89}Zr, ^{135}I et ^{111}In, conjugués à l'albumine.[124, 125, 126, 127] (Figure 20)

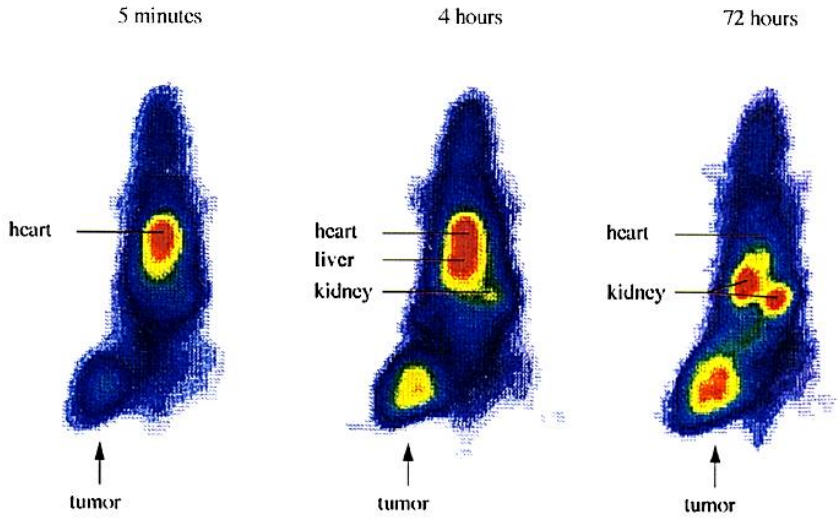


Figure 20 : Accumulation au cours du temps d'albumine de rat radio-marquée ([^{111}In]DTPA-RSA) dans une tumeur Walker-256 induite chez le rat. (issue de D. L. Heene *et al*., *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **1997**, 26, 77 - 100.)

Cependant, plusieurs phénomènes biologiques sous-jacents peuvent expliquer l'accumulation de l'albumine dans les tumeurs. En effet, elle possède de nombreux récepteurs spécifiques ainsi que de nombreuses voies d'internalisation dans les tissus. Dans les cas de cancers, la surexpression de ces processus d'internalisation permet d'expliquer plus en détail les causes biologiques de l'accumulation de l'albumine dans ces tissus.[128]

4.2.2 Catabolisme de l'albumine par les cellules cancéreuses

La baisse du taux d'albumine plasmatique a été observée chez de nombreux patients atteints de différents cancers et corrélée à un mauvais pronostic.[129] Cette diminution de la quantité d'albumine, ainsi que son accumulation dans les tumeurs a permis d'élaborer l'hypothèse selon laquelle l'albumine servirait de source de nutriment pour la tumeur. Elle ne s'accumulerait donc pas simplement au sein de la masse tumorale, mais pénétrerait activement à l'intérieur des cellules où elle serait dégradée par la voie lysosomale. Son utilisation comme réservoir d'acides aminés permettrait de soutenir la croissance tumorale pour la synthèse de protéines, nucléotides ainsi que pour la production d'énergie, en faisant entrer certains acides aminés non essentiels dans le cycle de Krebs.[130, 131, 132]

---

[124] C. Heneweer, J. P. Holland, V. Divilov, S. Carlin, J. S. Lewis, *J. Nucl. Med*. **2011**, 52, 625 - 633.
[125] H. Sinn, H. H. Schrenk, E. A. Friedrich, U. Schilling, W. Maier-Borst, *Nuc. Med. Biol*., **1990**, 17, 819 - 827.
[126] U. Schilling, E. A. Friedrich, H. Sinn, H. H. Schrenk, J. H. Clorius, W. Maier-Borst, *Nuc. Med. Biol*., **1992**, 19, 685 - 659.
[127] A. Wunder. G. Stehle, H. Sinn, H. H. Schrenk, D. Hoff-Biederbeck, F. Bader, E. A. Friedrich, P. Peschke, W. Maier-Borst, D. L. Heene, *Int. J. Oncol.,* **1997**, 11, 497 - 507.
[128] X. Liu, J. Jiang, H. Meng, *Theranostics*, **2019**, 9, 8018 - 8025.
[129] D. Gupta, C. G. Lis, *Nutrition Journal*, **2010**, 9, 69.
[130] G. Stehle, H. Sinn, A. Wunder, H. H. Schrenk, J. C. M. Stewart, G. Hartung, W. Maier-Borst, D. L. Heene, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **1997**, 26, 77 - 100.
[131] New aspects of amino acid metabolism in cancer - L. Vettore, R. L. Westbrook, D. A. Tennant, *Br. J. Cancer*, **2020**, 122, 150 - 156.
[132] N. N. Pavlova, C. B. Thompson, *Cell Metabolism*, **2016**, 23, 27 - 47.

Par sa concentration plasmatique importante et sa composition d'acides aminés, l'utilisation d'albumine par les cellules cancéreuses comme nutriment leur assure un apport élevé en acides aminés. Cet apport serait même supérieur à la concentration plasmatique des acides aminés libres présents dans le plasma. De plus l'albumine est une molécule capable de transporter un grand nombre de composés tels que les acides gras nécessaires à la prolifération cellulaire.

L'albumine semble donc avoir un rôle central dans le support de la croissance des cellules cancéreuses. A titre d'exemple, des études *in vitro* ont montré que des cellules de cancer du pancréas étaient capables de proliférer dans un milieu de culture dépourvu d'acides aminés libres par supplémentation d'une quantité physiologique d'albumine. (Figure 21) [133]

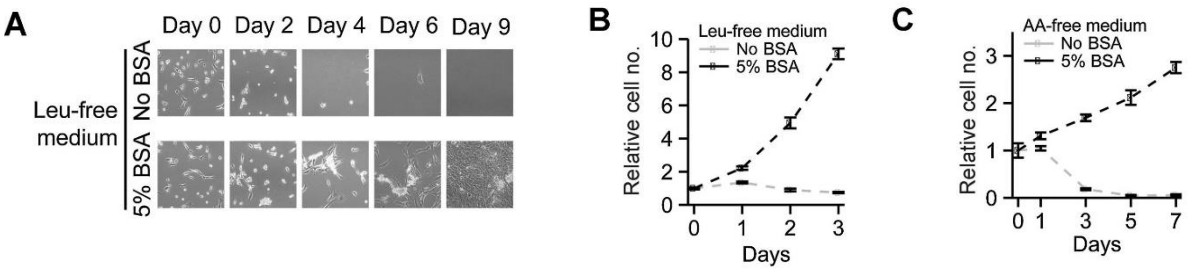


Figure 21 : La supplémentation en albumine permet la prolifération de cellules KRPC en milieu de culture dépourvu de leucine (A-B) et sans aucun acide aminé (C). (adapté de J. D. Rabinowitz *et al*., *Cancer Res*., **2015**, 75, 544 - 553)

Chez l'Homme, l'étude de la concentration des métabolites présents au sein de la tumeur et dans les tissus sains adjacents a été menée sur 49 patients atteints de cancers du pancréas. L'analyse comparative entre les deux types de tissus montre une différence d'abondance des métabolites en fonction de leur catégorie. D'un côté, une tendance significative à l'accumulation de certaines molécules importantes pour la prolifération cellulaire, tels que les acides aminés essentiels et les métabolites pour la synthèse de nucléotides a été observée. De l'autre, on note un appauvrissement des métabolites liés à la production énergétique, ainsi que les acides aminés non essentiels. Ces derniers seraient alors probablement utilisés pour la production d'énergie.

L'accumulation d'albumine au sein des cellules cancéreuses et son utilisation comme source d'acides aminés est donc un phénomène capital leur permettant de supporter une prolifération rapide. Compte tenu de son importance, plusieurs études visant à déterminer la nature des processus d'accumulation et de dégradation lysosomale de l'albumine dans la tumeur ont permis la découverte de différents facteurs impactant son internalisation.

4.2.2.1 Augmentation de la macropinocytose : impact de la mutation du gène KRAS

L'internalisation de protéines extracellulaires par macropinocytose est exacerbée par certaines cellules cancéreuses, notamment dans le cas de tumeur du pancréas. Ce phénomène a pu être mis en évidence *in vivo* grâce à l'administration d'albumine murine marquée à l'azote 15 ([^{15}N]MSA) à des souris développant spontanément des cancers du pancréas en induisant l'expression de l'oncogène KRAS^{G12D}. Au cours de cette expérience, une concentration plus importante d'albumine marquée a été observée dans le pancréas des souris ayant développées une tumeur. Le catabolisme de l'albumine internalisée s'est traduit par une augmentation de la quantité d'acides aminés marqués dans les

[133] J. J. Kamphorst, M. Nofal, C. Commisso, S. R. Hackett, W. Lu,E. Grabocka, M. G. Vander Heiden, G. Miller, J. A. Drebin, D. Bar-Sagi, C. B. Thompson, J. D. Rabinowitz, *Cancer Res*., **2015**, 75, 544 - 553.

différents organes étudiés. De plus, cet important catabolisme de l'albumine est seulement observé pour les tissus cancéreux et non pas pour les cellules pancréatiques saines adjacentes.[134]

Les protéines Ras sont présentes dans toutes les cellules des mammifères. Elles constituent un groupe de guanosine triphosphatase (GTPase) qui inclut trois isoformes : K-Ras, H-Ras et N-Ras. Elles possèdent une fonction hydrolytique intrinsèque qui convertit le guanosine triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP). Les protéines Ras interviennent dans la voie de signalisation Ras-MEK-ERK, notamment par la régulation de la protéine ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) qui fait partie de la catégorie MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Cette voie de signalisation consiste en une cascade de phosphorylation déclenchée par l'activation des récepteurs de facteurs de croissance (GF). Lorsqu'ils sont activés, ils permettent le transfert de GTP sur les protéines Ras (Ras-GTP). Cela induit un changement conformationnel de la protéine qui est alors capable d'activer la protéine Raf, qui active à son tour la protéine MEK pour finalement activer ERK qui participe notamment à la prolifération cellulaire par expression des facteurs de transcription. Lorsque la protéine ERK est active, elle exerce une boucle de rétroaction de la voie de signalisation en inhibant le transfert de GTP sur la protéine RAS. Cette dernière est alors liée à une GDP (Ras-GDP) et devient inactive. (Figure 22) [135]

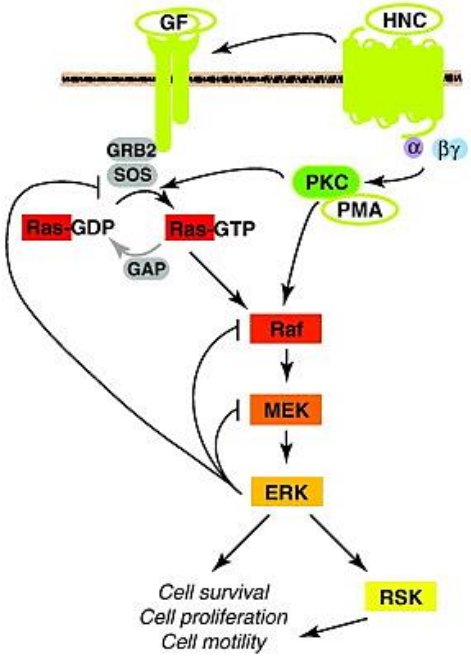


Figure 22 : La voie de signalisation Ras-MEK-ERK. (adapté de J. Blenis *et al*., *TIBS*, **2011**, 36, 320 - 328)

Les mutations des protéines Ras sont présentes dans près d'un tiers des tumeurs humaines. Ces mutations sont oncogènes puisqu'elles provoquent un changement conformationnel de la protéine qui induit son activation permanente, indépendamment de la présence de facteurs de croissance en amont de la voie de signalisation. De plus, dans le cas de patientes atteins de cancers du sein, la présence de mutations au niveau de cette voie de signalisation (notamment les mutations des gènes KRAS et BRAF) induit une résistance aux traitements ciblant les récepteurs de croissance.

[134] S. M. Davidson, O. Jonas, M. A. Keibler, H. W. Hou, A. Luengo, J. R. Mayers, J. Wyckoff, A. M. Del Rosario, M. Whitman, C. R. Chin, K. J. Condon, A. Lammers, K. A. Kellersberger, B. K. Stall, G. Stephanopoulos, D. Bar-Sagi, J. Han, J. D Rabinowitz, M. J. Cima, R. Langer, M. G. V. Heiden, *Nat. Med.*, **2017**, 23, 235 - 241.
[135] M. C. Mendoza, E. E. Er, J. Blenis, *Trends in Biochemical Sciences*, **2011**, 36, 320 - 328.

Particulièrement, l'effet du trastuzumab, qui inhibe le récepteur HER2, est contré par l'activation continue des protéines en aval de la voie de signalisation.[136] Enfin, la présence de mutations des protéines Ras est également associée au développement métastatique des tumeurs en promouvant les caractéristiques mésenchymateuses des cellules[137] ainsi que la résistance à l'anoïkose[138].

La protéine KRas est l'isoforme dont la mutation est la plus répandue chez les patients (22 % des cancers). Les mutations NRas et HRas sont moins répandues, avec une incidence de 8 % et 3 % respectivement. Cependant, la répartition des mutations au sein des isoformes dépend fortement du tissu duquel est issu la malignité. Par exemple, la mutation de la protéine KRas est majoritairement observée pour les cancers du pancréas (60 %), du gros intestin (33 %) et du canal biliaire (31 %). Les phénotypes NRas et HRas sont eux majoritairement mutés dans le cas de cancers de la peau (18 %) et des glandes salivaires (10 %) respectivement.[139]

Il existe de nombreuses mutations oncogènes connues des gènes RAS. Cependant, les sites mutationnels sont systématiquement sur les mêmes positions des protéines, à savoir les acides aminés en position 12, 13 et 61 qui sont communs aux trois isoformes. La présence d'une seule mutation de ces acides aminés suffit à engendrer une modulation de l'activité des protéines. En effet, cette zone des protéines est hypersensible aux mutations puisque ces acides aminés sont impliqués directement dans la conformation du site actif de la protéine qui hydrolyse le GTP en GDP. La modification du site actif résulte alors en une baisse de la vitesse d'hydrolyse du GTP, ce qui a pour conséquence le maintien de la conformation GTP-Ras qui déclenche la cascade de phosphorylation de la voie Ras-MEK-ERK.

Parmi ces mutations, celles du gène KRAS ont été les plus étudiées. Elles ont été reconnues comme un facteur augmentant la macropinocytose de l'albumine par les cellules cancéreuses. Ainsi, des cellules cancéreuses qui possèdent naturellement cette mutation, comme les MIA PaCa-2 qui exprime la mutation $Kras^{G12C}$, ou artificiellement, démontrent une activité macropinocytique plus important que les celles possédant le phénotype normal ($Kras^{WT}$). L'impact de l'augmentation de la macropinocytose de protéines extracellulaires par ces cellules se traduit par une diminution de leur sensibilité à la restriction, voire à l'absence, d'acides aminés essentiels libres.[140]

La dépendance des cellules tumorales mutées KRAS pour la macropinocytose de protéines plasmatiques a été également rapportée *in vivo*. Pour cela, la croissance de tumeurs du pancréas issues de cellules MIA PaCa-2 ($KRas^{G12C}$) et BxPC-3 ($Kras^{WT}$) a été évaluée chez la souris au cours d'un traitement par administration de 5-(N-Ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA). EIPA est une molécule inhibitrice de la macropinocytose fréquemment utilisée *in vitro* pour l'étude des processus d'internalisation en phase fluide. Ainsi, la croissance tumorale des souris traitées par EIPA a été impactée seulement sur le groupe MIA PaCa-2, produisant une diminution de la masse tumorale. (Figure 23)

---

[136] S. Patra, V. Young, L. Llewellyn, J. N. Senapati, J. Mathew, *A. Pac. J. Canc. Prev*., **2017,** 18, 2209 - 2213.
[137] R.-K. Kim, Y. Suh, K.-C. Yoo, Y.-H. Cui, H. Kim, M.-J. Kim, I. G. Kim, S.-J. Lee, *Exp Mol Med.,* ***2015****,* 47, 137.
[138] L. B. Eckert, G. A. Repasky, A. S. Ülkü , A. McFall, H. Zhou, C. I. Sartor, C. J. Der, *Cancer Res*., **2004**, 64, 4585 - 4592.
[139] I. A. Prior, P. D. Lewis, C. Mattos, *Cancer Res*., **2012**, 72, 2457 - 2467.
[140] C. Commisso, S. M. Davidson, R. G. Soydaner-Azeloglu, S. J. Parker, J. J. Kamphorst, S. Hackett, E. Grabocka, M. Nofal, J. A. Drebin, C. B. Thompson, J. D. Rabinowitz, C. M. Metallo, M. G. Vander Heiden, D. Bar-Sagi., *Nature*, **2013**, 497, 633 - 637.

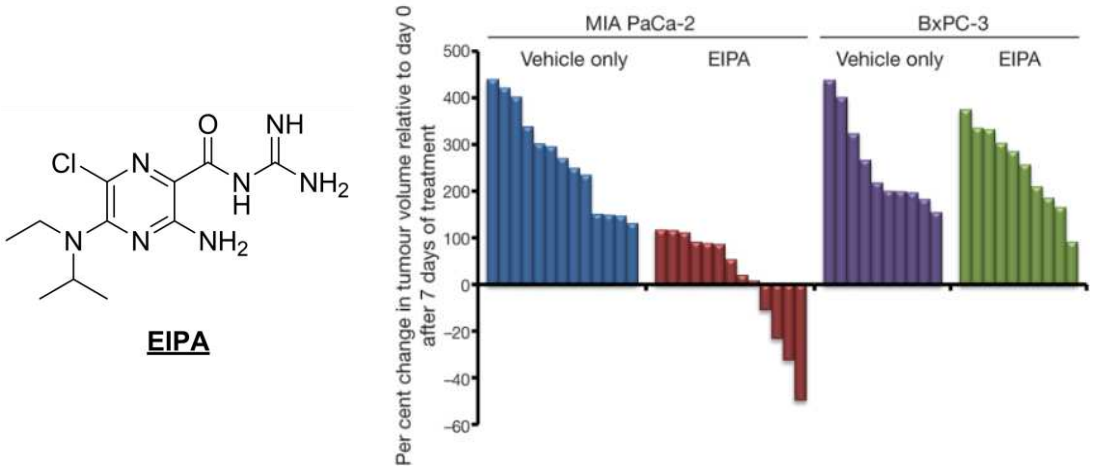


Figure 23 : EIPA inhibe la macropinocytose in vivo et réduit la croissance tumorale des cellules mutées Kras. (issue de D. Bar-Sagi *et al.*, *Nature*, **2013**, 497, 633 - 637)

Ces résultats montrent que l'internalisation de l'albumine par macropinocytose est augmentée pour les cellules possédant une mutation du gène KRAS, et que la prolifération de ces cellules est directement liée à leur capacité à dégrader l'albumine plasmatique. Cependant, si les cellules cancéreuses exprimant une mutation des protéines Ras peuvent soutenir leur prolifération au moyen de l'augmentation de la macropinocytose des protéines plasmatiques, d'autres processus doivent permettre aux cellules possédant le phénotype normal de maintenir leur métabolisme élevé.

4.2.2.2 Sous-expression du récepteur FcRn

La sous-expression du récepteur FcRn permet d'expliquer l'accumulation de l'albumine au sein des cellules cancéreuses qui ne possèdent pas de mutation RAS. Si elle n'est pas recyclée par le FcRn, l'albumine internalisée (par macropinocytose ou par interaction avec ses récepteurs) suit la voie de dégradation lysosomale afin de servir de source d'acides aminés et d'énergie aux cellules tumorales pour supporter leur multiplication.

Chez des patients atteins de cancers du poumon non à petites cellules, une diminution significative de l'expression de ce récepteur a été observée entre les cellules cancéreuses et les tissus sains adjacents. De plus, la sous expression du FcRn a pu être corrélée à un pronostic défavorable pour les patients.[141] Une tendance similaire a également été démontrée dans le cas d'autre pathologies malignes, tels que certains cancers du sein et de la prostate avec une concentration en FcRn presque nulle.[142]

L'impact de l'expression du FcRn sur la capacité des cellules cancéreuses à utiliser l'albumine comme source de nutriment a été étudiée *in vitro* par manipulation génétique. Ainsi la diminution de l'expression du gène sur une lignée de cellule cancéreuse qui exprime fortement le récepteur FcRn induit une augmentation de la concentration intracellulaire d'albumine. De plus, la méthode contraire qui consiste à induire artificiellement une expression élevée du récepteur à une lignée qui en était dépourvue réduit l'internalisation de l'albumine. Finalement, l'étude du recyclage l'albumine montre

[141] E. Dalloneau, N. Baroukh, K. Mavridis, A. Maillet, F. Gueugnon, Y. Courty, A. Petit, T. Kryza, M. Del Rio, S. Guyetant, D. C. Cadena Castaneda, C. Dhommée, C. Arnoult, Andreas Scorilas, V. Gouilleux-Gruart, N. Heuzé-Vourc'h, *Oncotarget*. **2016**, 7, 54415 - 54429.
[142] R. Swiercz, M. Mo, P. Khare, Z. Schneider, R. J. Ober, E. S. Ward, *Oncotarget*, **2017**, 8, 3528 - 3541.

que seule la lignée modifiée pour exprimer fortement le FcRn à la capacité d'effectuer l'exocytose de l'albumine.

Ces résultats indiquent que la présence du récepteur FcRn constitue un facteur majeur pour l'internalisation et la dégradation de l'albumine par les cellules qui possèdent les phénotypes normaux de la protéine Ras. Ainsi, une expression élevée du récepteur FcRn constitue un marqueur significatif d'une plus faible dégradation lysosomale d'albumine en favorisant son recyclage par la cellule, alors que son absence contribue à une accumulation importante d'albumine.

Cette tendance a pu être confirmée par une expérience réalisée *in vivo* sur l'évolution de la masse tumorale en fonction des différentes lignées cellulaires. Ainsi, la faible capacité de recyclage de l'albumine par le récepteur FcRn résulte en une croissance plus importante des tumeurs. Que ce soit par expression naturellement faible (DU145), par inactivation du gène (sh-5 et sh-6 pour la lignée HCC1419) ou bien par mutation non fonctionnelle (H166A-FcRn de la lignée DU145). Pour les groupes qui l'expriment fortement (naturellement par HCC1419 et artificiellement par DU145 WT-FcRn), la croissance tumorale s'est retrouvée fortement diminuée (Figure 24-A et B).

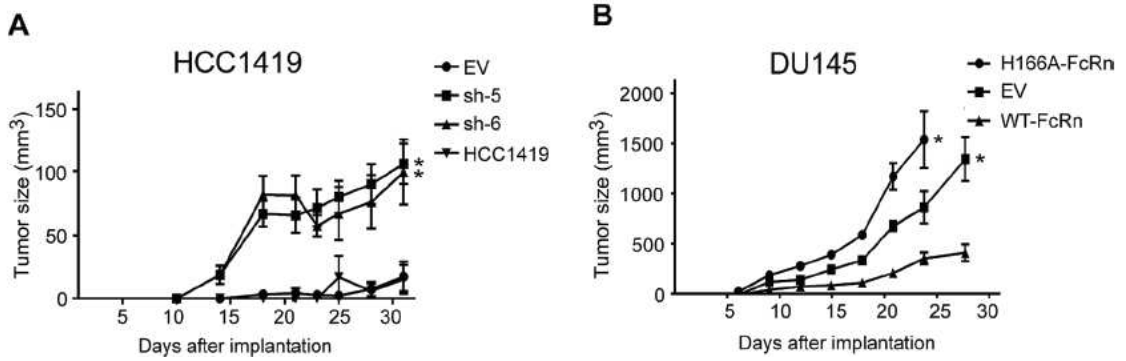


Figure 24 : L'absence de récepteur FcRn, induite (A) ou naturelle (B), favorise la croissance tumorale en permettant aux tumeurs de dégrader l'albumine plasmatique. (issue de E. S. Ward *et al*., *Oncotarget*, **2017**, 8, 3528 - 3541)

La variation de la présence du récepteur FcRn a également impacté le taux d'albumine plasmatique des souris. Une hypoalbuminémie a été observée chez les souris porteuse de tumeurs DU145 dans les groupes qui expriment peu de FcRn (EV) ou alors le FcRn non fonctionnel (H166A-FcRn) par rapport au groupe avec une expression élevée induite (WT-FcRn). De plus, le taux d'albumine plasmatique a pu être corrélé avec la taille de la tumeur.

Ainsi, l'albumine est internalisée puis dégradée en plus grande proportion par les cellules cancéreuses par rapport aux tissus sains. Ce phénomène est possible, soit par la présence d'un oncogène de la protéine Ras qui augmente l'activité macropinocytique, soit par la sous-expression du récepteur FcRn empêchant ainsi le recyclage de l'albumine. Ces deux processus permettent donc aux cellules cancéreuses de supporter leur prolifération importante par le catabolisme de cette protéine plasmatique.

4.3 Les composés médicament-albumine

Du fait de sa biocompatibilité, sa demi-vie de circulation plasmatique élevée ainsi que son accumulation sélective dans les tissus cancéreux, de nombreux composés associant l'albumine à un agent anticancéreux ont été développés.[143]

Ce concept de vectorisation a été décliné en 3 stratégies distinctes. La première est l'encapsulation d'un principe actif dans une nanoparticule d'albumine. La seconde est la préparation d'un conjugué associant un agent cytotoxique à de l'albumine par une liaison covalente. La dernière est la synthèse d'une prodrogue capable de se lier *in situ* à l'albumine plasmatique.

4.3.1 Les nanoparticules d'albumine

L'utilisation de nanoparticules d'albumine présente 3 avantages :

- La solubilité dans l'eau de l'albumine permet d'encapsuler les composés peu hydrosolubles ce qui rend leur administration plus facile.
- La durée de circulation plasmatique élevée de l'albumine chez l'Homme (19 jours) permet d'éviter l'élimination rénale rapide des molécules de faible poids moléculaire, ainsi que leur dégradation hépatique.
- L'albumine s'accumule préférentiellement au niveau de la tumeur.

Cette technique est utilisée cliniquement pour la vectorisation du paclitaxel pour le traitement du cancer du sein métastatique sous le nom d'Abraxane®. Il s'agit d'une formulation du paclitaxel qui résulte en son encapsulation dans une nanoparticule d'albumine. Cette nanoparticule hydrosoluble est obtenue par précipitation et possède l'avantage d'être administrée sans utilisation de solvant potentiellement toxique.[144] Ainsi, la toxicité de l'Abraxane® est nettement inférieure à celle observée lors des traitements avec le paclitaxel. [145] L'Abraxane® est indiqué pour le traitement des cancers du sein métastatiques, du poumon non à petites cellules et du pancréas.[146]

Depuis sa mise sur le marché en 2005, les mécanismes d'accumulation de l'Abraxane® au sein des tumeurs des patients traités par ce composé ont été étudiés afin de déterminer des critères prédictifs de la réponse au traitement. Ainsi, certains biomarqueurs contribuant à l'efficacité thérapeutique de l'Abraxane®, telles que les protéines de la famille des cavéolines et SPARC, ont pu être identifiés.

L'Abraxane® s'accumule au sein des tumeurs par macropinocytose et son internalisation est directement reliée à la présence de Cavéoline-1.[147] Sa surexpression a été observée dans plusieurs

[143] B. Elsadek, F. Kratz, *Journal of Controlled Release*, **2012**, 157, 4 - 28.
[144] A. Sparreboom, C.D. Scripture, V. Trieu, P. J. Williams, T. De, A. Yang, B. Beals, W. D. Figg, M. Hawkins, N. Desai, *Clin. Cancer Res*., **2005**, 11, 4136 - 4143.
[145] E. Miele, G. P. Spinelli, E. Miele, F. Tomao, S. Tomao, *Int. J. Nanomedicine*, **2009**, 4, 99 - 105.
[146] M. N. Kundranda, J. Niu, *Drug Des. Devel. Ther*., **2015**, 9, 3767 - 3777.
[147] M. Chatterjee, E. Ben-Josef, R. Robb, M. Vedaie, S. Seum, K. Thirumoorthy, K. Palanichamy, M. Harbrecht, A. Chakravarti, T. M.Williams, *Cancer Res.,* **2017**, 77, 5925 - 5937.

types de cancer, tels que ceux de la vessie[148], de la prostate[149] et du pancréas[150, 151]. Cette protéine a été identifiée comme biomarqueur pronostic dans le cas de patientes atteintes de cancers du sein métastatiques traités avec l'Abraxane® en combinaison avec la gemcitabine.[152] Dans cette étude, l'espérance de vie des patientes ayant une expression élevée de la Cavéoline-1 a été augmentée. Ce résultat montre que l'efficacité de l'Abraxane® est directement corrélée à l'expression de la protéine.

La surexpression de SPARC a également été associée au développement de formes agressives de cancers, donnant lieu à des pronostics défavorables pour les cancers gastriques[153], pancréatiques[154] et mammaires.[155] En revanche, SPARC a été identifiée comme biomarqueur pronostic de l'efficacité de l'Abraxane® pour le traitement de patients atteints de cancers de la tête et du cou, en favorisant l'accumulation de la nanoparticule.[156] Toutefois, les données concernant l'implication de SPARC sont contradictoires dans la littérature.[157] En effet, une efficacité thérapeutique similaire a été observée pour le traitement de tumeurs pancréatiques chez la souris génétiquement modifiée déficiente en SPARC.[158]

Néanmoins, ces études montrent que l'accumulation de l'albumine est effective chez les patients atteints de cancer et que son utilisation clinique comme vecteur thérapeutique est prometteuse. Bien que cette stratégie soit cliniquement efficace, l'utilisation d'albumine sous forme de nanoparticules contribue fortement à sa dénaturation. Cela entraine *à fortiori* la diminution de sa prise en charge physiologie par l'organisme. De plus, comme toutes nanoparticules encapsulant un agent anticancéreux de manière non covalente, le contrôle du processus de libération du principe actif n'est pas possible, ce qui entraine dans le cas de l'Abraxane®, une libération systémique non sélective du paclitaxel.

4.3.2 Les conjugués médicament-albumine covalents

Afin de limiter la libération non contrôlée du principe actif, l'utilisation de conjugués associant un agent anticancéreux à l'albumine de manière covalente a été étudiée.

---

[148] S. A. Raja, S. T. A. Shah, A. Tariq, N. Bibi, K. Sughra, A. Yousuf, A. Khawaja, M. Nawaz, A. Mehmood, M. J. Khan, A. Hussain, *Oncol Lett*., **2019**, 18, 219 - 226.
[149] S. A. Tahir, S. Kurosaka, R. Tanimoto, A. A. Goltsov, S. Park, Ti. C. Thompson, *Cancer Biol. Ther*., **2013**, 14, 117 - 26.
[150] N. S. Demirci, M. Dogan, G. U. Erdem, S. Kacar, T. Turhan, S. Kilickap, L. C. Cigirgan, E. Kayacetin, Y. Bozkaya, N. Zengin, *Saudi J. Gastroenterol*., **2017**, 23, 183 - 189.
[151] M. Chatterjee, E. Ben-Josef, D. G. Thomas, M. A. Morgan, M. M. Zalupski, G. Khan, C. A. Robinson, K. A. Griffith, C. -S. Chen, T. Ludwig, T. Bekaii-Saab, A. Chakravarti, T. M. Williamsa, *Sci. Rep*., **2015**, 5, 10867.
[152] Y. Zhao, F. Lv, S. Chen, Z. Wang, J. Zhang, S. Zhang, J. Cao,L. Wang, E. Cao, B. Wang, X. Hu, *BMC Cancer*, **2018**, 18, 1019.
[153] C. S. Wang, K. H. Lin, S. L. Chen, Y. F. Chan, S. Hsueh, *Br. J. Cancer*. **2004**, 91, 1924 - 1930.
[154] J. Vaz, D. Ansari, A. Sasor, R. Andersson, *Pancreas,* **2015**, 44, 1024 - 1035.
[155] J. L. Lindner, S. Loibl, C. Denkert, B. Ataseven, P. A. Fasching, B. M. Pfitzner, B. Gerber, S. Gade, S. Darb-Esfahani, B. V. Sinn, J. Huober, K. Engels, H. Tesch, T. Karn, F. Pommerenke, C. Liedtke, M. Untch, V. Müller, B. Rack, C. Schem, G. von Minckwitz, *Annals of Oncology*, **2015**, 26, 95 - 100.
[156] N. Desai, V. Trieu, B. Damascelli, P. Soon-Shiong, *Transl. Oncol.*, **2009**, 2, 59 - 64.
[157] H. Shao, H. Tang, O. E. Salavaggione, C. Yu, B. Hylander, W. Tan, E. Repasky, A. A. Adjei, G. K. Dy, *Journal of Thoracic Oncology*, **2011**, 6, 998 - 1005.
[158] A. Neesse, K. K. Frese, D. S. Chan, T. E. Bapiro, W. J. Howat, F. M. Richards, V. Ellenrieder, D. I. Jodrell, D. A. Tuveson, *Gut*, **2014**, 63, 974 - 983.

4.3.2.1 Conjugués albumine-méthotrexate

Le méthotrexate est une molécule qui possède une activité antimétabolique, empêchant notamment la métabolisation de l'acide folique par les cellules. Comme tous les composés de faibles poids moléculaire, son efficacité est limitée par sa faible durée de circulation, diminuant son exposition aux cellules tumorales. De plus, des résistances aux traitements par le méthotrexate peuvent apparaitre, notamment en raison de la modulation de l'expression du récepteur assurant son assimilation par les cellules tumorales.

Afin d'améliorer son profil pharmacocinétique, plusieurs composés associant le méthotrexate à l'albumine de manière covalente ont été développés (Figure 25-A).[159] De cette façon, la conjugaison à l'albumine augmente significativement la durée d'exposition du principe actif, tout en diminuant son élimination rénale et hépatique. De plus, le mécanisme d'internalisation du conjugué par les cellules tumorales est dans ce cas différent de celui du principe actif seul, ce qui permet de s'affranchir des phénomènes de résistances.[160] En effet, l'internalisation de l'albumine par les cellules cancéreuses n'est pas dépendante des récepteurs assimilés à l'acide folique.

Ces conjugués ont été synthétisés par la fonctionnalisation des fonctions amines des lysines de la protéine, par condensation avec l'acide carboxylique du méthotrexate. Cette méthode de préparation n'est pas régiosélective et les sites de fonctionnalisation sont aussi nombreux que les résidus lysines disponibles. Le nombre de motif méthotrexate inséré n'est alors contrôlé que par la stœchiométrie de la réaction. En procédant de cette manière, des conjugués possédant différents ratios albumine-méthotrexate (DAlbR : Drug to Albumin Ratio) allant d'un équivalent (**15** DAlbR 1) à vingt équivalents de méthotrexate (**15** DAlbR 20) ont été préparés. L'efficacité antitumorale de ces composés a ensuite été évaluée sur des rats Sprague-Dawley portant des tumeurs Walker-256. Contre toutes attentes, l'accumulation tumorale maximale a été obtenue pour le composé **15** avec un DAlbR de 1. L'explication de ce résultat a pu être apportée par l'étude de la biodistribution des différents conjugués. En effet, plus la charge en méthotrexate est élevée, plus le conjugué s'accumule au niveau du foie. Ainsi, la dénaturation structurelle de l'albumine induite par la fonctionnalisation d'un nombre trop important de résidus lysine favorise la dégradation hépatique de la protéine (Figure 25-B).

[159] G. Stehle, H. Sinn, A. Wunder, H. H. Schrenk, S. Schütt, W. Maier-Borst, D. L. Heene, *Anticancer Drugs*, **1997**, 8, 677 - 685.
[160] K. Wosikowski, E. Biedermann, B. Rattel, N. Breiter, P. Jank, R. Löser, G. Jansen, G. J. Peters, *Clin. Cancer Res.*, **2003**, 9, 1917 - 1926.

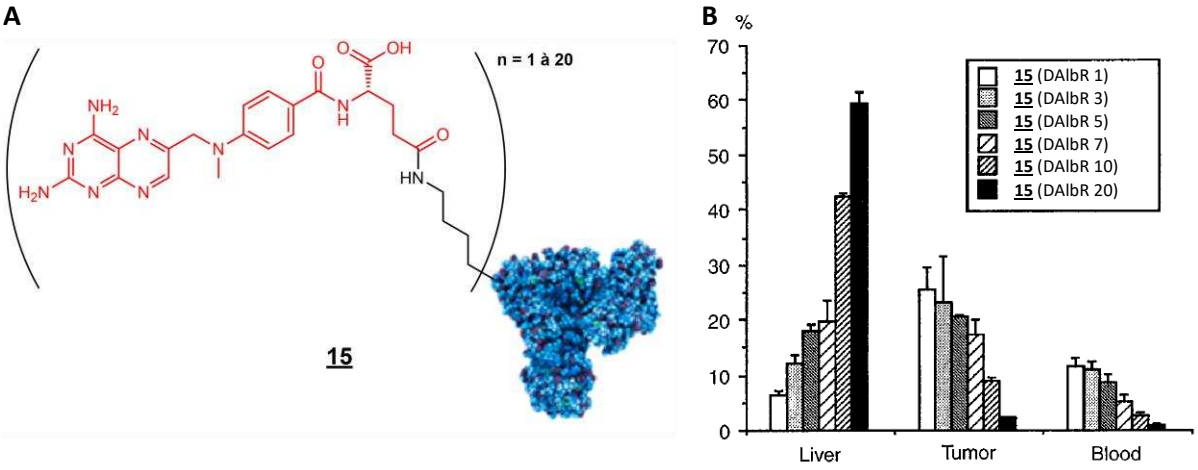


Figure 25 : A) Structure des conjugués albumine-méthotrexate 15. B) Biodistribution des conjugués liés à de l'albumine de rat, chez le rat (indiquée en pourcentage de la dose administrée).

Le développement du conjugué **15** avec le DAlbR de 1 a été poursuivi avec succès jusqu'en étude clinique de phase I, faisant de ce composé le premier conjugué à l'albumine étudié chez l'Homme. [161] [162] [163] [164] Cependant, lors d'une étude clinique de phase II chez des patients atteints de cancers des reins métastatiques, l'efficacité de ce composé n'a pas pu être démontrée.[165]

4.3.2.2 Conjugué albumine-doxorubicine

Le conjugué **16** associant l'albumine à la doxorubicine via une chaine pégylée a également été développé. Dans ce cas, la liaison avec la protéine est assurée grâce à un groupement maléimide qui réagit sélectivement avec le thiol de la cystéine en position 34 selon une addition de Michael. Cette stratégie de bioconjugaison permet d'obtenir un composé homogène avec un DAlbR de 1 (Figure 26-A).[166] Après son administration, le conjugué s'accumule au sein de la masse tumorale où il est internalisé par les cellules cancéreuses. Sa dégradation lysosomale permet alors de libérer directement la doxorubicine ou un analogue lié à un catabolite de l'albumine déclenchant ainsi une activité cytotoxique.

[161] G. Stehle, A. Wunder, H. Sinn, H. H. Schrenk, S. Schütt, E. Frei, G. Hartung, W. Maier-Borst, D. L. Heene, *Anticancer Drugs*, **1997**, 8, 835 - 844.
[162] A. Wunder, G. Stehle, H. H. Schrenk, G. Hartung, D. L. Heene, W. Maier-Borst, H. Sinn, *Int. J. Cancer*, **1998**, 76, 884 - 890.
[163] A. M. Burger, G. Hartung, G. Stehle, H. Sinn, H. H.Fiebig, *Int. J. Cancer*, **2001**, 92, 718 - 724.
[164] G. Hartung, G. Stehle, H. Sinn, A. Wunder, H. H. Schrenk, S. Heeger, M. Kränzle, L. Edler, E. Frei, H. H. Fiebig, D. L. Heene, W. Maier-Borst, W. Queisser, *Clin. Cancer Res.*, **1999**, 5, 753 - 759.
[165] A. N. Vis, A. van der Gaast, B. W. van Rhijn, T. K. Catsburg, C. Schmidt, G. H. Mickisch, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2002**, 49, 342 - 345.
[166] H. Liu, M. Sun, Z. Liu, C. Kong, W. Kong, J. Ye, J. Gong, D. C. S. Huang, F. Qian, *Journal of Controlled Release*, **2019,** 296, 40 - 53.

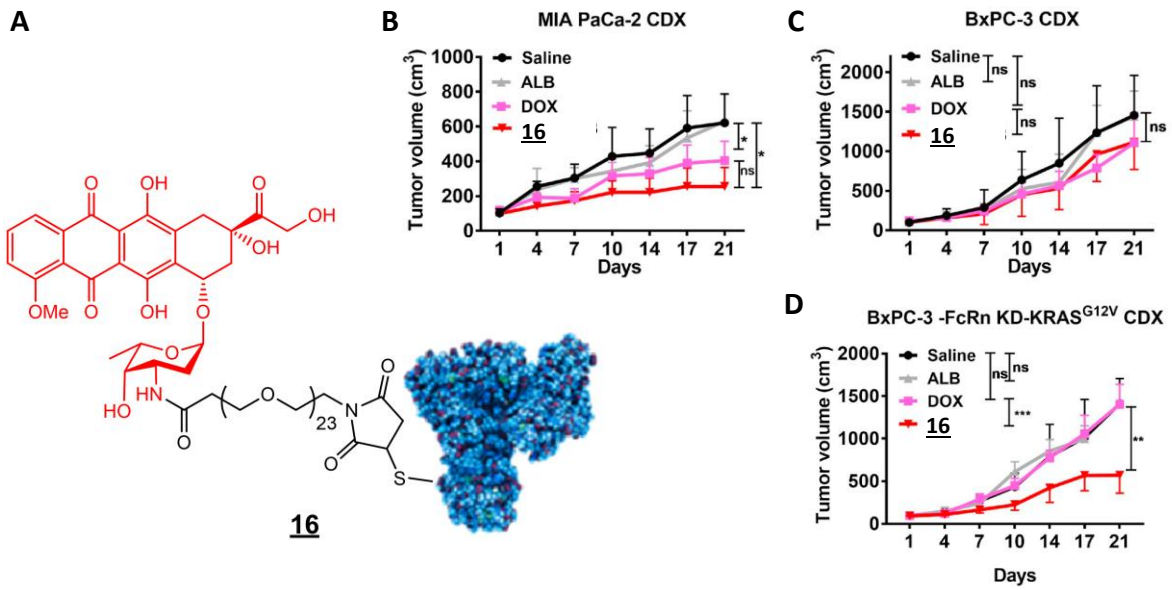


Figure 26 : A) Structure du vecteur 16. B-D) Efficacité thérapeutique de 16 (dose équivalente à 9 mg.kg^{-1} de doxorubicine) comparée à la doxorubicine (6 mg.kg^{-1}) chez la souris pour le traitement de tumeurs pancréatiques sous-cutanées MIA PaCa-2 (B), BxPC-3 (C) et BxPC-3 possédant la mutation KRas^{G12V} et sous exprimant le FcRn (D).

L'étude du vecteur **16** a permis de corréler son activité anticancéreuse avec l'internalisation de l'albumine, médiée par les mutations Kras et l'expression du récepteur FcRn, par les cellules tumorales. Pour cela, l'efficacité thérapeutique du composé **16** a été comparée à celle de la doxorubicine, pour le traitement de tumeurs pancréatiques chez la souris (Figure 26-B à D). Ainsi, les tumeurs issues de cellules MIA PaCa-2, connues pour leur expression de la mutation KRAS, sont plus sensibles au conjugué à l'albumine **16** qu'à la doxorubicine (Figure 26-B). Cependant, les cellules BxPC-3, connues pour leur expression du phénotype Kras sain, ne répondent pas aux deux traitements (Figure 26-C). En revanche, l'induction de la mutation KRas^{G12V} ainsi que la sous expression du FcRn chez les cellules BxPC-3 sensibilisent considérablement les tumeurs aux traitements avec le conjugué **16** (Figure 26-C). Finalement, l'efficacité du traitement par le conjugué à l'albumine **16** est due à l'augmentation de l'internalisation de l'albumine, ainsi que sa dégradation par les cellules cancéreuses conduisant à la libération de la doxorubicine.

4.3.3 Les conjugués médicament-albumine formés *in situ* par le ciblage de l'albumine plasmatique

Afin de s'affranchir de l'administration d'albumine exogène, différentes molécules ont été développées pour le ciblage de l'albumine plasmatique. La stratégie repose sur la formation *in situ* du conjugué en ciblant sélectivement le thiol libre de la cystéine 34 de l'albumine au moyen d'un groupement maléimide présent sur le vecteur.

4.3.3.1 Vecteurs développés par le groupe de Félix Kratz

L'équipe de Félix Kratz a été la première à mettre au point une stratégie de ciblage de l'albumine endogène pour l'utiliser comme vecteur macromoléculaire d'agent anticancéreux.[167] Ce concept a mené au développement de l'Aldoxorubicine, un analogue de la doxorubicine lié par une fonction

[167] F. Kratz, R. Müller-Driver, I. Hofmann, J. Drevs, C. Unger, *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 1253 - 1256.

hydrazone, acido-sensible, à un maléimide.[168] Après son administration par voie intraveineuse, le groupement maléimide réagit, *in vivo*, avec le thiol libre de l'albumine plasmatique par une addition de Michael (Figure 27). Le vecteur macromoléculaire **17** ainsi formé s'accumule dans la tumeur aussi bien passivement par effet EPR, qu'activement par l'interaction avec les protéines gp60 et SPARC. Deux scénarii sont alors possibles :

- Le pH légèrement acide du microenvironnement tumoral hydrolyse la fonction hydrazone et libère la doxorubicine dans le milieu extracellulaire. L'agent anticancéreux pénètre alors passivement dans les cellules tumorales pour exercer son activité cytotoxique.
- L'albumine est internalisée par macropinocytose. L'endosome s'acidifie, fusionne avec un lysosome où le pH plus acide (de l'ordre de 5) et hydrolyse la liaison hydrazone libérant la doxorubicine directement au sein des cellules.

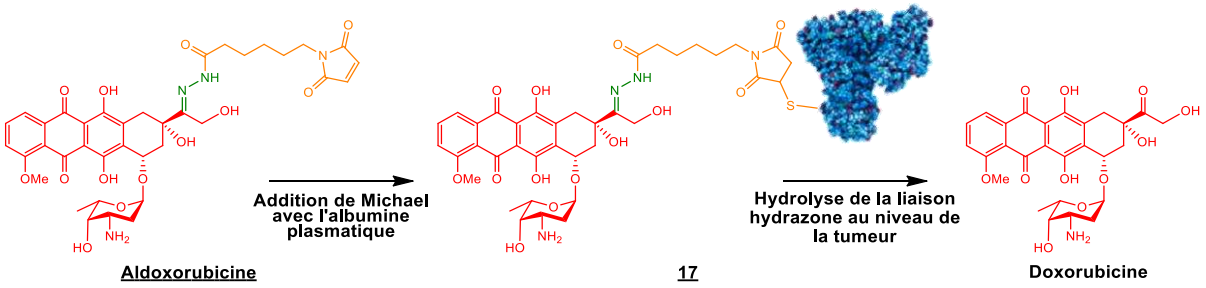


Figure 27 : Structure et mode d'action de l'Aldoxorubicine.

L'Aldoxorubicine est le premier vecteur qui cible l'albumine plasmatique étudié chez l'Homme. Ce composé est actuellement en cours d'évaluation clinique de phase III pour le traitement du sarcome, démontrant ainsi le potentiel de cette stratégie de vectorisation.[169] Très récemment, une sonde radiomarquée à l'^{111}In capable de se lier à l'albumine plasmatique et de quantifier son accumulation dans les tumeurs solides a été développée comme agent compagnon de l'Aldoxorubicine afin d'évaluer *a priori* l'efficacité de la thérapie.[170]

Cependant, du fait de la faible stabilité de la liaison hydrazone dans le plasma, la doxorubicine peut être libéré dans l'organisme de manière non contrôlée, générant une toxicité pour les cellules saines.

Depuis la conception de l'Aldoxorubicine, le groupe de Kratz a fortement contribué au développement de cette stratégie de ciblage en étudiant différents mécanismes pour l'activation sélective de vecteurs de la doxorubicine, de la camptothécine, du paclitaxel et du méthotrexate. Ainsi, des vecteurs capables de se lier à l'albumine plasmatique et sensible à la présence de protéases telles

[168] F. Kratz, A. Warnecke, K. Scheuermann, C. Stockmar, J. Schwab, P. Lazar, P. Drückes, N. Esser, J. Drevs, D. Rognan, C. Bissantz, C. Hinderling, G. Folkers, I. Fichtner, C. Unger, *J. Med. Chem*., **2002**, 45, 5523 - 5533.
[169] L. D. Cranmer, *Onco Targets Ther*., **2019**, 12, 2047 - 2062.
[170] S. Daum, J. P. Magnusson, L. Pes, J. Garcia Fernandez, S. Chercheja, F. Medda, F. I. Nollmann, S. D. Koester, P. Perez Galan, A. Warnecke, K. Abu Ajaj, F. Kratz, *Nucl. Med. Mol. Imaging,* **2019**, 53, 189 - 198.

que la cathepsine B,[171, 172] la métalloprotéase matricielle 2,[173] la plasmine,[174] la PSA[175, 176, 177] ainsi que la uPA (urokinase-type-Plasminogen Activator, surexprimée dans le cas de tumeurs mammaires, ovariennes ou cervicales)[178] ont été développés.

Très récemment, deux vecteurs **18** et **19** acido-sensibles d'analogues de l'auristatine E ont été étudiés par cette équipe (Figure 28-A).

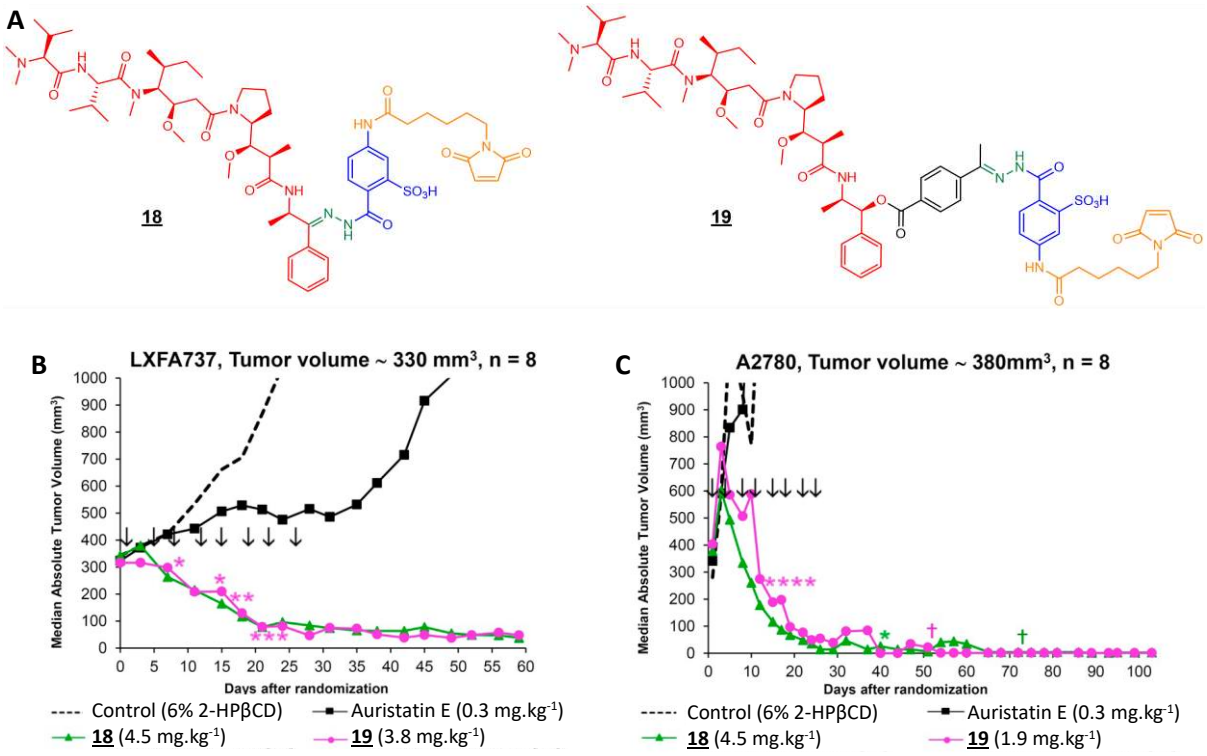


Figure 28 : Structure des vecteurs d'analogues de l'auristatine E 18 et 19 (A). Efficacité des vecteurs 18 et 19 comparée à celle de l'auristatine E chez la souris, pour le traitement de tumeurs pulmonaire LXFA737 (B) et ovarienne (C).

L'efficacité thérapeutique de ces vecteurs a été étudiée chez la souris sur un large panel de xénogreffes de tumeurs humaines dérivées de patients (cancers du poumon non à petites cellules, de la tête et du cou) et de lignées cellulaires (mélanome et carcinome ovarien). Alors que l'efficacité de l'auristatine E est très limitée en raison de sa forte toxicité systémique, les vecteurs **18** et **19** ont pu être administrés à des doses dix fois supérieures à la DMT de l'auristatine E, augmentant ainsi la fenêtre thérapeutique (Figure 28-B et C). Grâce à cela, une activité anticancéreuse remarquable a été obtenue sur l'ensemble des tumeurs étudiées. Alors que le vecteur **18** s'est montré très efficace sans

[171] B. Schmid, D. -E. Chung, A. Warnecke, I. Fichtner, F. Kratz, *Bioconjugate Chem*., **2007**, 18, 702 - 716.
[172] K. Abu Ajaj, R. Graeser, I. Fichtner, F. Kratz, *Cancer Chemother. Pharmacol*., **2009**, 64, 413 - 418.
[173] A. M. Mansour, J. Drevs, N. Esser, F. M. Hamada, O. A. Badary, C. Unger, I. Fichtner, F. Kratz, *Cancer Research,* **2003**, 63, 4062 - 4066.
[174] A. Warnecke, I. Fichtner, G. Saß, F. Kratz, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*., **2007**, 340, 389 - 395.
[175] B. Elsadek, R. Graeser, A. Warnecke, C. Unger, T. Saleem, N. El-Melegy, H. Madkor, F. Kratz, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 234 - 238.
[176] B. Elsadek, R. Graeser, N. Esser, C. Schäfer-Obodozie, K. Abu Ajaj, C. Unger, A. Warnecke, T. Saleem, N. El-Melegy, H. Madkor, F. Kratz, *Eur. J. Cancer*, **2010**, 46, 3434 - 3444.
[177] R. Graeser, D.-E. Chung, N. Esser, S. Moor, C. Schächtele, C. Unger, F. Kratz, *Int. J. Cancer*, **2008**, 122, 1145 - 1154.
[178] D. -E. Chung, F. Kratz, *Bioorg. Med. Chem. Lett*., **2006**, 16, 5157 - 5163.

induire d'effets indésirables majeurs, une toxicité importante été observée lors des traitements avec **19**. En effet, la fonction ester assurant la liaison avec le principe actif s'est révélée instable lors de son incubation dans le sang de souris, conduisant à la libération non sélective de l'auristatine E.

4.3.3.2 Vecteurs maléimylés de la gemcitabine

Le groupe de Jin Sun s'est également intéressé à cette approche pour la conception de vecteurs de la gemcitabine. En effet, en plus de sa faible demi-vie plasmatique, il existe deux limitations majeures à l'efficacité de ce composé :

- La gemcitabine est un analogue de nucléoside. Son internalisation par les cellules est réalisée par les transporteurs de nucléosides spécifiques, tel que le hENT (human Equilibrative Nucleoside Transporter) dont l'expression peut varier, donnant lieu à une résistance thérapeutique.
- Cette molécule est rapidement métabolisée par la cytidine désaminase, présente dans toutes les cellules, en un métabolite inactif le 2',2'-difluoro-2'-deoxyuridine (dFdU).

Le développement de vecteurs de la gemcitabine capables de se lier à l'albumine plasmatique permet de s'affranchir de ces limitations. La conjugaison à la protéine lui assure une demi-vie plasmatique importante, un mécanisme d'internalisation alternatif ainsi qu'une protection contre sa métabolisation en dFdU.

Quatre vecteurs de la gemcitabine ciblant l'albumine plasmatique ont alors été préparés (Figure 29-A).[179] Ils sont constitués d'un groupement maléimide relié à la gemcitabine soit par une fonction carbamate au niveau de l'amine aromatique, soit par une fonction carbonate sur l'alcool primaire. De plus, pour chaque catégorie de composé, la liaison entre le principe actif et le maléimide est totalement aliphatique ou bien réductible au moyen d'un pont disulfure.

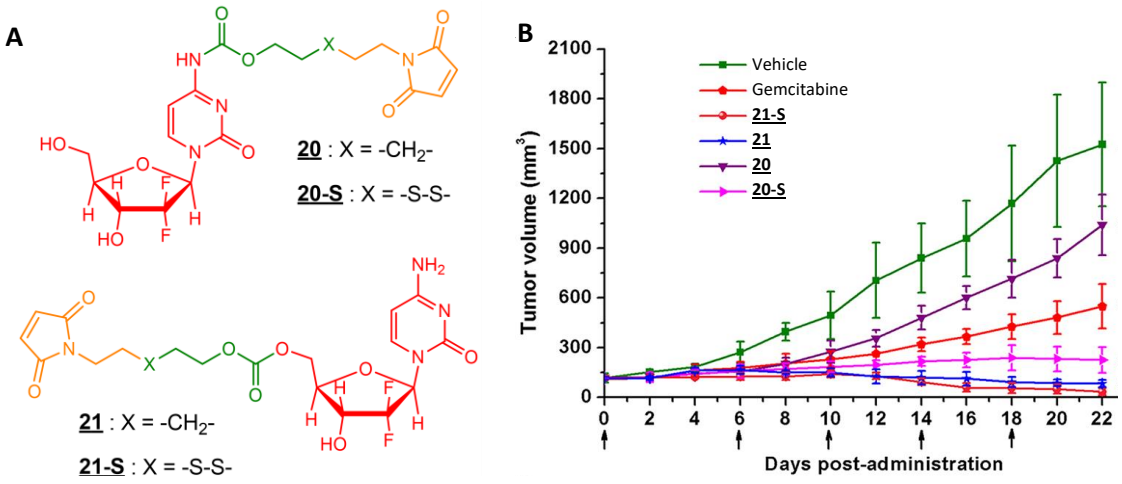


Figure 29 : Structure (A) des vecteurs de la gemcitabine 20, 20-S, 21 et 21-S et leur efficacité thérapeutique (B) comparée à la gemcitabine (doses équivalentes à 8 mg.kg^{-1} de gemcitabine) sur des tumeurs 4T1 implantées chez la souris.

Ces quatre vecteurs ont été étudiés *in vivo* pour le traitement de tumeurs 4T1 implantées chez la souris (Figure 29-B). Les résultats montrent une activité inhibitrice sur la croissance tumorale pour tous les vecteurs par rapport au groupe contrôle, sans engendrer d'effets indésirables. Les vecteurs

[179] H. Zhang, K. Wang, K. Na, D. Li, Z. Li, D. Zhao, L. Zhong, M. Wang, L. Kou, C. Luo, H. Zhang, Q. Kan, H. Ding, Z. He, J. Sun, *J. Med. Chem.*, **2018**, 61, 11, 4904 - 4917.

20-S, **21** et **21-S** (qui comportent une fonction clivable pont disulfure et/ou carbonate) ont une efficacité thérapeutique supérieure à celle de la gemcitabine à la même dose, contrairement au composé **20** (carbamate).

Il s'avère que l'activité antitumorale de ces composés est corrélée à leur stabilité plasmatique. En effet, les vecteurs les plus efficaces sont ceux qui permettent la libération la plus aisée de la gemcitabine. Cependant, ces résultats sont contrastés car ces vecteurs ne sont pas sélectifs, puisqu'ils conduisent à la libération d'une quantité importante de gemcitabine lors de leur incubation dans du sang de rat. En revanche, le vecteur le plus stable et le plus sélectif ne permet pas une inhibition de la croissance tumorale supérieure à celle obtenue par les traitements avec la gemcitabine.

Malgré la faible sélectivité des vecteurs **20-S**, **21** et **21-S** et le manque d'efficacité du vecteur **20**, leur capacité à cibler l'albumine leur a conféré une demi-vie plasmatique accrue par rapport à la gemcitabine. De plus, les vecteurs macromoléculaires formés permettent de diminuer considérablement la formation du métabolite inactif dFdU. Cette protection vis-à-vis de la cytidine désaminase est due soit à la dérivatisation de la fonction amine par un carbamate, soit à l'encombrement stérique de l'albumine. Il est à noter que des vecteurs ciblant l'albumine plasmatique destinés à libérer du paclitaxel soit en milieu réducteur, par un pont disulfure, soit en milieu oxydant, par un thioéther, sont également rapportés dans la littérature.[180]

Un autre vecteur de la gemcitabine a également été développé par cette équipe dans le but de maintenir une efficacité thérapeutique importante sans compromettre sa stabilité plasmatique.[181] La structure de vecteur **22** a été inspirée de celle du composé **20** qui a montré la plus grande stabilité dans l'étude précédemment décrite. Cependant, la liaison carbamate a été substituée par une liaison amide hydrolysable par la cathepsine B (Figure 30-A). Ainsi, après son administration par voie intraveineuse, suivie de la formation du conjugué macromoléculaire *in situ*, le vecteur s'accumule au sein du microenvironnement tumoral. Il est alors internalisé par macropinocytose, puis est dirigé vers le compartiment lysosomale de la cellule. La cathepsine B hydrolyse alors la liaison amide et la gemcitabine est libérée intracellulairement.

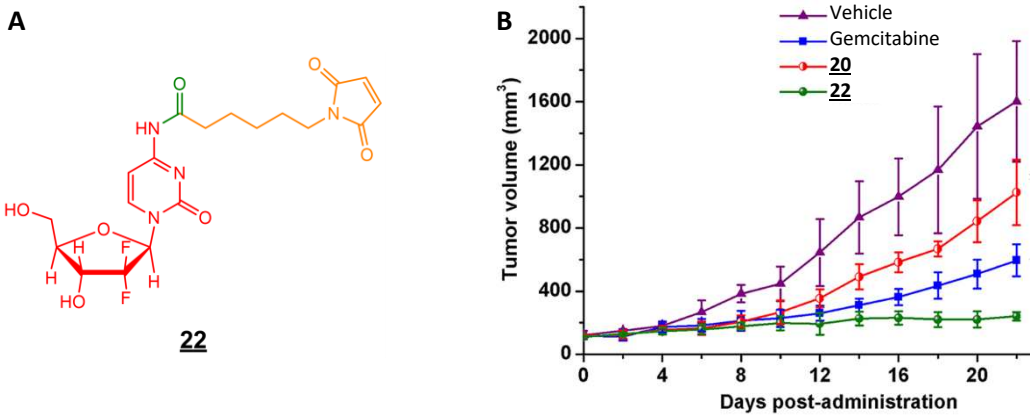


Figure 30 : A) Structure du vecteur de la gemcitabine 22. B) Efficacité thérapeutique des vecteurs 20 et 22 comparée à la gemcitabine (doses équivalentes à 8 mg.kg^{-1} de gemcitabine administrées aux jours 0, 6, 10, 14 et 18) sur des tumeurs 4T1 implantées chez la souris.

[180] J. Yang, Q. Lv, W. Wei, Z. Yanga, J. Dong, R. Zhang, Q. Kan, Z. He, Y. Xu, *Drug Deliv.*, **2018**, 25, 807 - 814.
[181] H. Zhang, Z. Sun, K. Wang, N. Li, H. Chen, X. Tan, L. Li, Z. He, J. Sun, *Bioconjugate Chem.*, **2018**, 29, 1852 - 1858.

L'efficacité thérapeutique du vecteur **22** a ensuite été évaluée *in vivo* et comparée à celles du vecteur stable **20** et de la gemcitabine (Figure 30-B). Ainsi, à doses équivalentes, le vecteur **22** a produit une inhibition de la croissance tumorale bien supérieure à celle des autres traitements. De plus, ce vecteur s'est montré stable lors de son incubation dans du sang de rat.

4.3.3.3 Vecteurs glucuronylés ciblant l'albumine plasmatique

Notre équipe a entrepris le développement de vecteurs glucuronylés capables de se lier *in situ* à l'albumine plasmatique et pouvant être activés sélectivement par la β-glucuronidase surexprimée dans le microenvironnement tumoral. Cette stratégie a mené à la conception du vecteur de la doxorubicine **23**, un analogue de **HMR 1826**, fonctionnalisé en position benzylique par une chaine pégylée se terminant par un maléimide (Figure 31-A).[182]

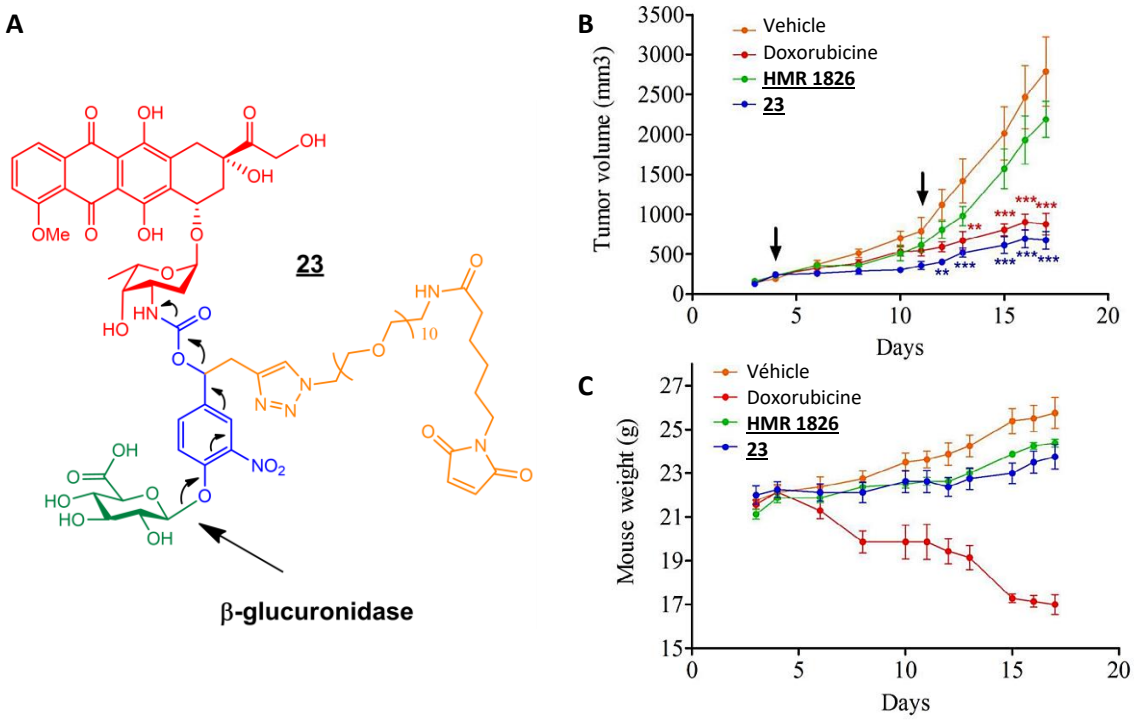


Figure 31 : A) Structure et mécanisme de décomposition du vecteur 23. B) Efficacité thérapeutique de 23 (23,7 mg.kg^{-1} équivalents en doxorubicine) sur des tumeurs pulmonaires murines LLC, implantées en sous-cutané chez la souris, comparée avec celles de la doxorubicine à sa DMT (8 mg.kg^{-1}) et du vecteur HMR 1826 (23,7 mg.kg^{-1} équivalents en doxorubicine) administré en i.v. aux jours 4 et 11. C) Evolution du poids des souris au cours des traitements.

L'efficacité du vecteur **23** a été comparée à celles de **HMR 1826** et de la doxorubicine pour le traitement de tumeurs murines LLC chez la souris (Figure 31-B). Lors de cette expérience, l'administration de **HMR 1826** n'a apporté aucun bénéfice thérapeutique. Les traitements par le vecteur **23** et la doxorubicine ont quant à eux produit une inhibition significative de la croissance tumorale. Cependant, la doxorubicine a induit de lourds effets secondaires, avec une perte de poids importante (Figure 31-C). En effet, l'utilisation d'anthracyclines chez la souris provoque une toxicité rénale significative. En revanche, les deux vecteurs glucuronylés ont permis l'administration d'une quantité équivalente à quatre fois la DMT de la doxorubicine sans induire de signe évident de toxicité, notamment au niveau des reins. Cette étude montre que le ciblage de l'albumine plasmatique permet

[182] 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.

d'augmenter considérablement l'efficacité des vecteurs glucuronylés tout en réduisant la toxicité du principe actif.

Par la suite, des vecteurs glucuronylés d'autres principes actifs tels qu'un inhibiteur de protéine kinase[183] et la MMAE **24**[184] (Figure 32-A) ont été synthétisés au laboratoire.

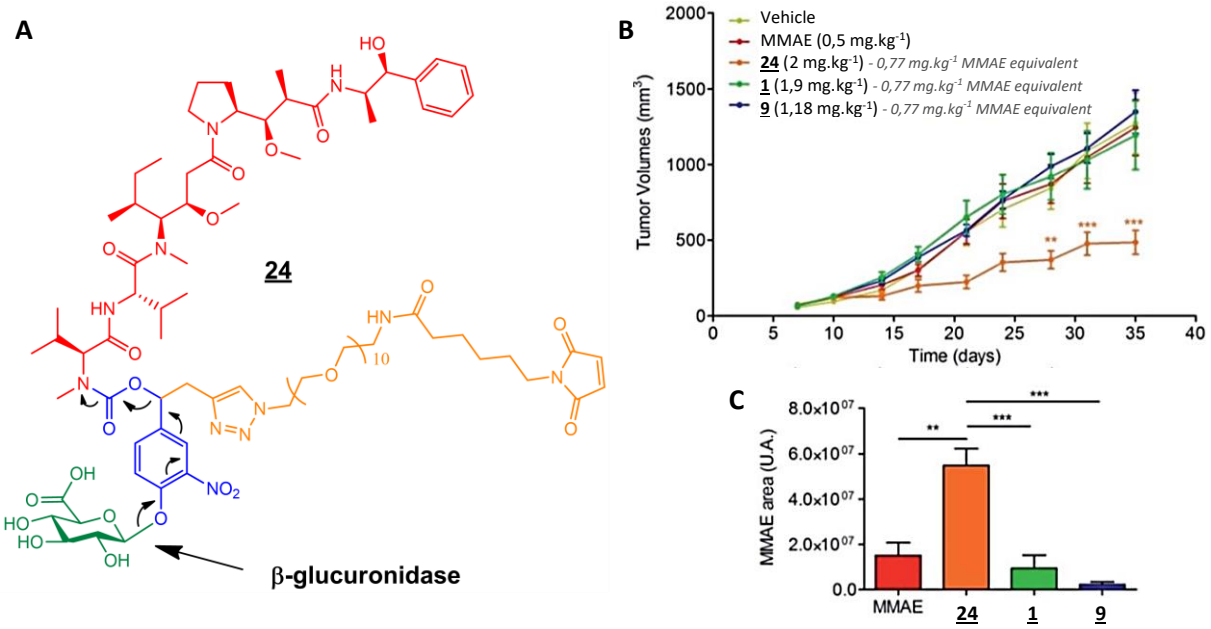


Figure 32 : A) Structure et mécanisme de décomposition du vecteur 24. B) Efficacité thérapeutique de 24 sur des tumeurs issues de cellules KB implantées en s.c. chez la souris comparée avec celles de la MMAE, des vecteurs 1 (acide folique) et 9 (glucuronylé) administré en i.v. aux jours 7, 14, 21 et 28. C) Quantification de la MMAE dans les tumeurs.

L'efficacité thérapeutique du vecteur **24** a été comparée à celles du vecteur de la MMAE **1**, ciblant les récepteurs de l'acide folique, de l'analogue glucuronylé **9** ne présentant pas de maléimide et de la MMAE, sur des xénogreffes de tumeurs KB implantées en sous-cutané chez la souris (Figure 32-B). Ainsi, pour une quantité équimolaire administrée chez les animaux (équivalente à 0,77 $mg.kg^{-1}$ en MMAE), seul le vecteur **24** a induit une inhibition de la croissance tumorale. Une expérience complémentaire a permis de démontrer que la quantité de MMAE libérée au niveau des tumeurs lors du traitement avec le vecteur **24** était six et vingt-cinq fois supérieure à celles mesurées pour les vecteurs **1** et **9**, respectivement (Figure 32-C).

Cette approche thérapeutique semble donc extrêmement prometteuse. En effet, le ciblage de l'albumine plasmatique pour le transport de vecteurs glucuronylés permet une accumulation plus importante de principe actif au niveau de la tumeur. De plus, le double ciblage du microenvironnement tumoral produit une efficacité thérapeutique supérieure à celle obtenue avec un vecteur ciblant les spécificités membranaires des cellules cancéreuses comme le récepteur de l'acide folique. Enfin, le mode d'accumulation des vecteurs liés à l'albumine au niveau de la tumeur est indépendant de l'expression de récepteurs membranaires. Cela permet alors d'envisager leur utilisation pour la thérapie d'un plus grand nombre de pathologies malignes.

---

[183] G. Compain, N. Oumata, J. Clarhaut, E. Péraudeau, B. Renoux, H. Galons, S. Papot, *Eur. J. Med. Chem.*, **2018**, 158, 1 - 6.

[184] B. Renoux, F. Raes, T. Legigan, E. Péraudeau, B. Eddhif, P. Poinot, I. Tranoy-Opalinski, J. Alsarraf, O. Koniev, S. Kolodych, S. Lerondel, A. Le Pape, J. Clarhaut, S. Papot, *Chem. Sci.,* **2017**, 8, 3427 - 3433.

Dans ce cadre, l'efficacité antitumorale du vecteur **24** a été évaluée sur des xénogreffes orthotopiques de tumeurs du sein MDA-MB-231 et du pancréas MIA PaCa-2 implantées chez la souris (Figure 33). Ces deux pathologies ont été sélectionnées puisqu'elles présentent un taux de mortalité important chez l'Homme. La lignée cellulaire MDA-MB-231 est issue d'un cancer du sein triple négatif métastatique. Cette forme de tumeur est très agressive et présente un pronostic défavorable. En effet, elle n'exprime pas les récepteurs de l'estrogène, de la progestérone et le HER2, la rendant particulièrement résistante aux thérapies hormonales et ciblées (trastuzumab). Le carcinome du pancréas possède également un très mauvais pronostic avec un taux de survie à cinq ans de 5 %. Ce taux élevé de mortalité chez l'Homme s'explique par le diagnostic tardif de la pathologie. En effet, les cancers du pancréas sont souvent asymptomatiques et donc découverts à un stade très avancé.

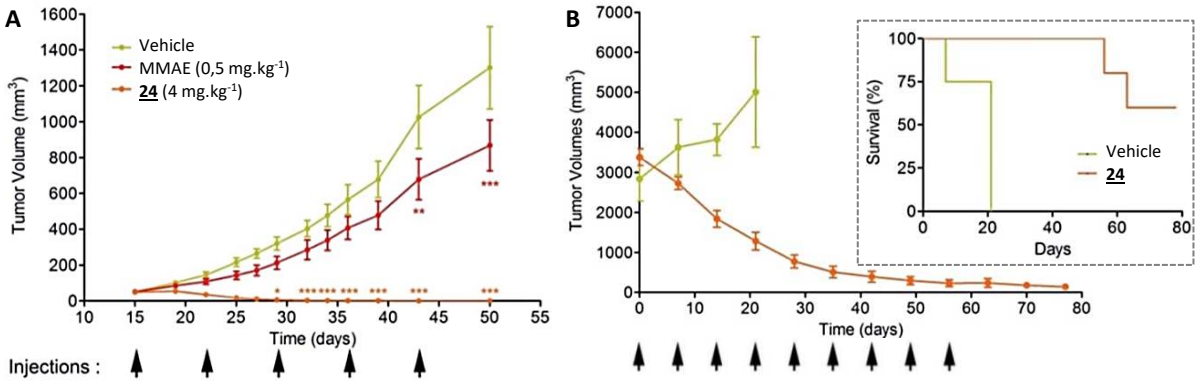


Figure 33 : Efficacité thérapeutique du vecteur 24 (4 mg.kg^{-1}) pour le traitement de xénogreffes tumorales MDA-MB-231 (A) et MIA PaCa-2 fortement hypoxiques (B) orthotopiques chez la souris. Le taux de survie des souris (B) est indiqué dans l'insert. Les flèches correspondent aux dates d'administrations i.v. des traitements.

Ainsi, sur ces modèles tumoraux, l'administration hebdomadaire du vecteur **24** à 4 mg.kg^{-1} conduit à une réduction drastique de la masse tumorale, sans induire d'effet secondaire. Une régression totale et durable des tumeurs MDA-MB-231 a été obtenue pour la moitié des souris traitées (Figure 33-A). Pour le traitement des tumeurs MIA PaCa-2 fortement hypoxiques (taille initiale comprise entre 2,5 et 3,5 cm^3), le taux de survie des souris a été considérablement augmenté (Figure 33-B). En effet, alors que toutes les souris non traitées sont mortes au cours des 20 premiers jours, une réduction du volume tumoral de plus de 92 % a été obtenue à la fin du traitement. De plus, une souris sur cinq ne présentait plus de tumeur à la fin du protocole.

4.3.3.4 Vecteurs de sels de platine ciblant l'albumine plasmatique

L'utilisation clinique de sels de platine, tel que le cisplatine, comme agents anticancéreux est encore aujourd'hui indiquée dans de nombreux cas de cancers. Cependant, ces composés ne sont pas sélectifs des cellules tumorales et leurs utilisations en chimiothérapie provoque de lourds effets secondaires conduisant à l'interruption prématurée des traitements.[185]

Afin d'augmenter la sélectivité de cette classe de médicaments, le groupe de Félix Kratz a développé plusieurs vecteurs d'analogues du carboplatine comportant une fonction maléimide permettant leur ligation *in situ* à l'albumine plasmatique.[186, 187] Bien que ces vecteurs soient plus efficaces que le carboplatine, le transport de platine à son degré d'oxydation II (forme active) présente

[185] N. J. Wheate, S. Walker, G. E. Craig, R. Oun, *Dalton Trans*., **2010**, 39, 8113 - 8127.
[186] A. Warnecke, I. Fichtner, D. Garmann, U. Jaehde, F. Kratz, *Bioconjugate Chem*., **2004**, 15, 1349 - 1359.
[187] D. Garmann, A. Warnecke, G. V. Kalayda, F. Kratz, U. Jaehde, *J. Control. Release*, **2008**, 131, 100 - 106.

toujours un risque important de toxicité. Pour pallier ce problème, le développement de sels de platine au degré d'oxydation IV (forme inactive) destinés à être réduits au niveau des cellules tumorales a été entrepris. On peut citer par exemple le satraplatine qui a été évalué chez l'Homme lors d'études clinique de phase III.[188] En tirant parti des bénéfices liés à l'utilisation de sels de platine (IV), des vecteurs analogues de l'oxaliplatine capable de se lier à l'albumine plasmatique ont été étudiés.[189, 190] Parmi ces vecteurs, le composé **25** a montré une efficacité thérapeutique importante chez la souris porteuse de tumeurs CT-26 produisant une régression totale pour trois quarts des tumeurs. (Figure 34)

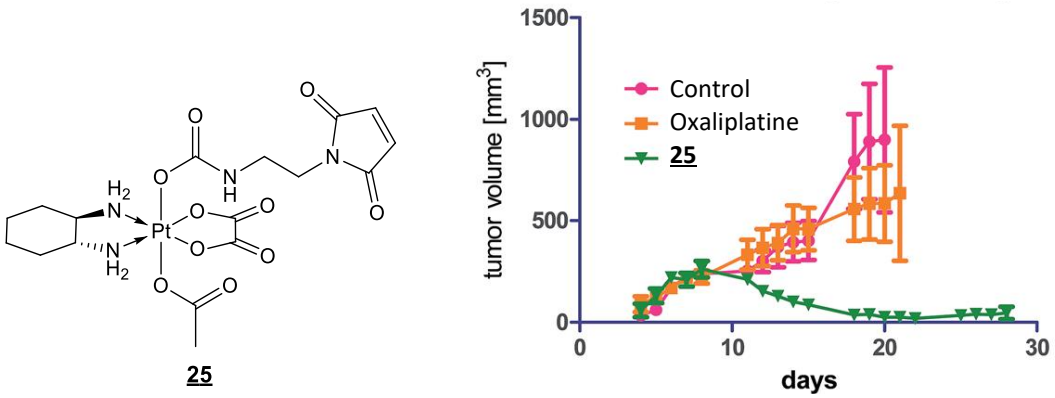


Figure 34 : Structure et efficacité thérapeutique, chez la souris femelle, du vecteur 25 (9 mg.kg^{-1} équivalent en oxaliplatine) comparé à l'oxaliplatine (9 mg.kg^{-1}) pour le traitement de tumeurs CT-26.

4.3.4 Vecteurs non covalents ciblant l'albumine plasmatique

L'utilisation de l'albumine comme vecteur de médicament a également été envisagée de manière supramoléculaire.

4.3.4.1 Vecteurs supramoléculaires de sels de platine

Une stratégie de ciblage de l'albumine plasmatique pour la vectorisation de sels de platine (IV) de manière non covalente a été étudiée, au moyen de groupements hydrophobes tels que des chaines d'acides gras.[191] La préparation d'analogues de cisplatine possédant différentes longueurs de chaines aliphatiques a permis d'identifier que l'acide palmitique générait la meilleure interaction avec l'albumine. De plus, cette dernière a augmenté la stabilité du sel de platine lors de son incubation dans du sang humain, limitant ainsi la libération anarchique d'espèces active de platine.

Ce concept a par la suite été étendu au développement de vecteurs de sels de platine ciblant les transporteurs GLUT surexprimés par les cellules tumorales.[192] Plusieurs vecteurs possédant à la fois une chaine grasse carbonée ainsi que différentes unités sucres ont été synthétisés. L'ajout de tels motifs présente un double avantage, ils permettent à la fois le ciblage des transporteurs de glycosides surexprimés par les cellules cancéreuses et l'augmentation de l'hydrophilie du composé. Parmi ces

[188] H. Choy, C. Park, M. Yao, *Clin. Cancer Res*., **2008**, 14, 1633 - 1638.
[189] V. Pichler, J. Mayr, P. Heffeter, O. Domotor, E. A. Enyedy, G. Hermann, D. Groza, G. Kollensperger, M. Galanksi, W. Berger, B. K. Keppler and C. R. Kowol, *Chem. Commun*., **2013**, 49, 2249 - 2251.
[190] J. Mayr, P. Heffeter, D. Groza, L. Galvez, G. Koellensperger, A. Roller, B. Alte, M. Haider, W. Berger, C. R. Kowol, B. K. Keppler, *Chem. Sci*., **2017**, 8, 2241 - 2250.
[191] Y. -R. Zheng, K. Suntharalingam, T. C. Johnstone, H. Yoo, W. Lin, J. G. Brooks, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc*., **2014**, 136, 8790 - 8798.
[192] J. Ma, Q. Wang, Z. Huang, X. Yang, Q. Nie, W. Hao, P. G. Wang, X. Wang, *J. Med. Chem*., **2017**, 60, 5736 - 5748.

vecteurs, le composé **26**, un analogue de l'oxaliplatine associé à un glucose et un acide palmitique, s'est montré très prometteur avec une biodistribution préférentielle au niveau de la tumeur. (Figure 35)

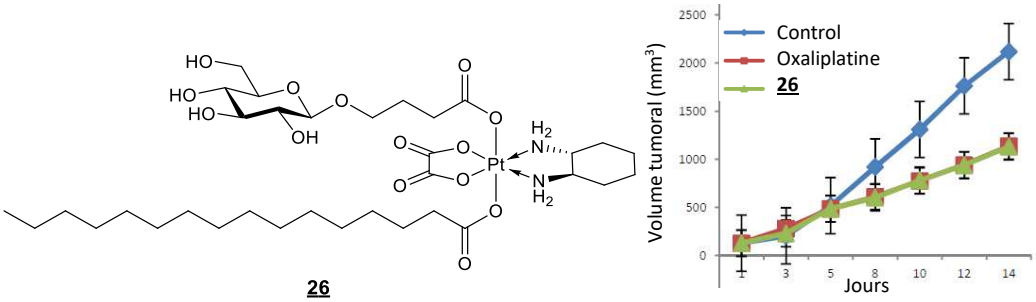


Figure 35 : Structure et efficacité thérapeutique du vecteur 26 comparé à l'oxaliplatine pour le traitement de tumeurs MCF-7 chez la souris.

L'efficacité thérapeutique de ce composé a ensuite été évaluée chez la souris, en comparaison avec l'oxaliplatine, pour le traitement de tumeurs MCF-7 (Figure 35). Ainsi, l'administration intrapéritonéale des composés a conduit à une inhibition similaire de la croissance tumorale. De plus, le traitement avec le vecteur **26** a montré une toxicité inférieure à celle de l'oxaliplatine.

4.3.4.2 Vecteurs glucuronylés supramoléculaires de la MMAE

Très récemment, plusieurs vecteurs glucuronylés de la MMAE ont été développés pour le ciblage supramoléculaire de l'albumine plasmatique. Pour cela, l'incorporation de groupements hydrophobes trityle **27**, 4-iodophényle et un dérivé de l'acide stéarique **29**, au sein de la structure des vecteurs a été étudiée (Figure 36-A).[193]

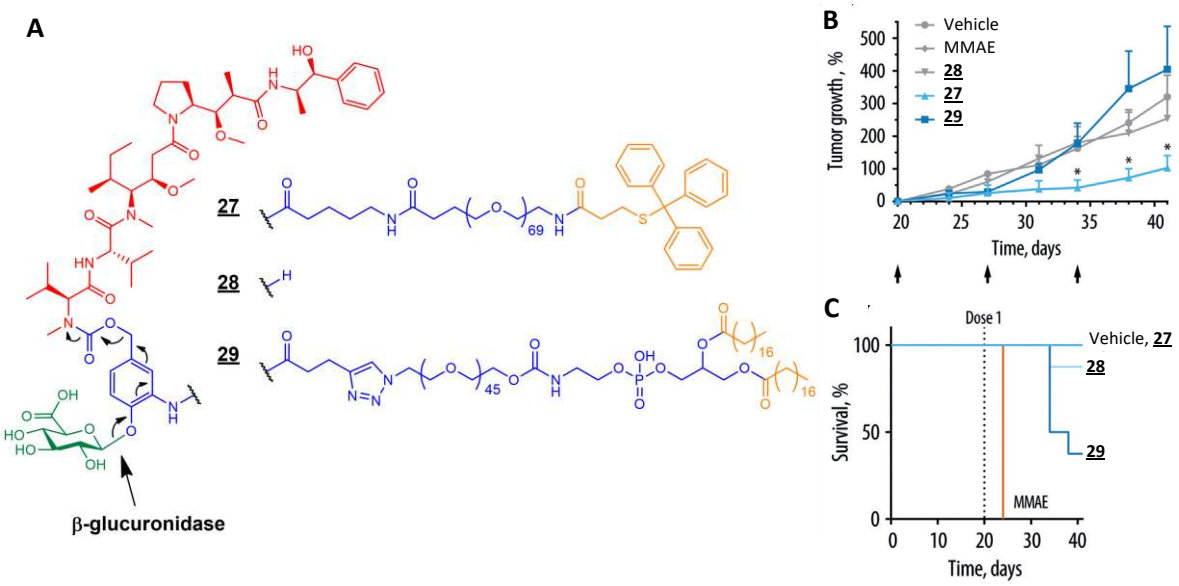


Figure 36 : A) Structure et mécanisme de décomposition des vecteurs 27, 28 et 29. B) Efficacité des vecteurs (doses équivalentes à 1,5 mg.kg^{-1} en MMAE) comparée à celle de la MMAE (1,5 mg.kg^{-1}) pour le traitement de xénogreffes ectopiques MDA-MB-231 chez la souris. C) Taux de survie des souris.

[193] M. T. J. Olesen, R. Walther, P. P. Poier, F. Dagnæs-Hansen, A. N. Zelikin, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2020**, 59, 7390 - 7396.

Cette stratégie a été évaluée chez la souris pour la thérapie de tumeurs mammaires MDA-MB-231 ectopiques (Figure 36-B). L'originalité de cette approche réside notamment dans le mode d'administration des vecteurs. Lors de cette étude, les composés sont injectés en sous-cutané, contrairement aux autres conjugués qui ciblent l'albumine plasmatique de manière covalente en utilisant la chimie des maléimides. En effet, dans ce dernier cas, la voie intraveineuse est privilégiée puisqu'elle permet d'éviter une réaction non sélective avec les molécules intracellulaires possédant un thiol libre comme le glutathion.

Ainsi, l'efficacité thérapeutique des vecteurs a été évaluée et comparée à celle d'une quantité équivalente en MMAE (1,5 $mg.kg^{-1}$). Contre toute attente, les vecteurs comportant un motif connu pour se lier à l'albumine plasmatique tel que le composé **29**, dérivé de l'acide stéarique n'ont procuré aucun bénéfice thérapeutique. Cependant, ils ont tout de même conduit à une diminution de la toxicité de la MMAE. En effet, cette dernière a conduit au décès de l'ensemble des souris dans les jours qui ont suivi son administration. En revanche, le composé **27** qui comporte une fonction trityle s'est montré relativement efficace produisant une inhibition de la croissance tumorale. Une expérience complémentaire *in vivo* a permis de montrer que la fonction trityle est bien responsable de l'activité du vecteur **27**. En effet, en absence de ce motif, le composé **28** ne produit aucun effet antitumoral. De plus, une étude par modélisation moléculaire a montré une forte interaction entre le groupement trityle et l'albumine.

Cette étude a permis de montrer que le ciblage de l'albumine au moyen d'interaction non covalente permet de faciliter l'administration des vecteurs qui était alors jusque-là pratiquée par voie intraveineuse. Il est important de noter que l'administration sous-cutanée de ces vecteurs glucuronylés n'engendre pas de toxicité liée à la libération de la MMAE au niveau de la zone d'injection. Jusque-là, tous les vecteurs glucuronylés étaient administrés en intraveineuse en tirant parti de leur forte hydrophilie qui limite la diffusion passive des principes actifs dans les cellules saines.

5 Présentation du sujet de thèse

L'ensemble de ces travaux démontre que le transport de principes actifs par l'albumine plasmatique est une stratégie extrêmement prometteuse dans le cadre du ciblage thérapeutique. Dans ce cadre, notre laboratoire a entrepris le développement de nombreux vecteurs qui tirent profit du tropisme de l'albumine plasmatique pour les tumeurs solides ainsi que de la surexpression de la β-glucuronidase dans le microenvironnement tumoral. Ces vecteurs sont très polyvalents, permettant le transport de nombreux agents cytotoxiques et la thérapie de différentes pathologies malignes. Ces vecteurs sont parfaitement solubles dans l'eau ce qui facilite grandement leur administration intraveineuse sans avoir recours à l'utilisation de solvants potentiellement toxiques. De plus, l'association du vecteur avec la protéine plasmatique se déroule directement dans le flux sanguin, ce qui permet d'éviter de potentielles réactions allergiques liées à l'administration d'albumine exogène.

Les travaux qui sont présentés dans ce manuscrit entrent dans le cadre du développement de nouveaux systèmes moléculaires programmés pour cibler le microenvironnement tumoral. Pour être efficaces, ces vecteurs doivent 1) assurer le transport de puissants agents cytotoxiques en toute innocuité pour les tissus sains 2) reconnaitre sélectivement les tumeurs et 3) libérer la substance active uniquement au sein de la masse tumorale.

Le chapitre 1 présentera les travaux effectués dans le cadre de la conception d'un vecteur glucuronylé trimérique de l'auristatine monométhyle E capable de se lier *in situ* à l'albumine plasmatique. Ce vecteur se compose de trois motifs glucuronide-espaceur-MMAE et d'une fonction maléimide reliés entre eux par une plateforme moléculaire à base d'acide gallique. Après son administration par voie intraveineuse, le vecteur réagira avec le thiol libre de l'albumine plasmatique pour former le bioconjugué correspondant qui possèdera un DAlbR (Drug to Albumin Ratio) contrôlé de trois. En transportant trois molécules de MMAE, ce vecteur devrait être plus efficace que son homologue monomérique pour le traitement des tumeurs solides.

Le chapitre 2 traitera de nos travaux dédiés au développement de vecteurs inédits ciblant d'autres enzymes que la β-glucuronidase dans le microenvironnement tumoral. Jusqu'alors, le ciblage de la β-glucuronidase s'est montré très efficace pour le traitement de tumeurs solides chez la souris. Cependant, l'expression extracellulaire de cette enzyme est sujette à une variation importante en fonction de la localisation, des thérapies subies préalablement et du stade de développement de la maladie. La découverte de nouvelles glycosidases capables de catalyser la libération de médicaments anticancéreux permettrait d'étendre le champ d'application des vecteurs enzymo-sensibles. Dans ce cadre, nous avons entrepris la synthèse et l'évaluation biologique du premier vecteur β-D-*N*-acétylglucosaminylé de la MMAE capable de se lier directement dans le flux sanguin à l'albumine plasmatique.

Dans le dernier chapitre, nous étudierons une nouvelle stratégie de vectorisation permettant d'augmenter l'efficacité thérapeutique de médicaments anticancéreux utilisés cliniquement, sans modifier leur structure. Pour y parvenir, nous tirerons profit du tropisme de l'albumine vers les tissus cancéreux pour y accumuler de la doxorubicine au moyen d'interactions non covalentes. Ainsi, nous avons développé un vecteur associant un maléimide, permettant sa prise en charge par l'albumine plasmatique, à trois molécules de β-cyclodextrines. Cette fonctionnalisation de la protéine plasmatique permettra d'augmenter sa capacité à interagir avec des principes actifs hydrophobes au moyen d'interactions supramoléculaire, de type hôte-invité, afin d'augmenter leur concentration au niveau de la tumeur.

CHAPITRE 1 : Conception de vecteurs glucuronylés trimériques capables de se lier *in situ* à l'albumine

1 Introduction

Les résultats obtenus *in vivo* avec la prodrogue de la MMAE **24** montrent que l'utilisation de vecteurs glucuronylés capables de se lier *in situ* avec l'albumine plasmatique est une stratégie prometteuse pour le traitement des tumeurs solides. Afin d'augmenter l'efficacité de cette approche de ciblage, nous avons étudié une nouvelle génération de vecteurs permettant d'accroitre le DAlbR. De cette manière, la protéine plasmatique transportera plusieurs copies du principe actif, ce qui devrait conduire *in fine* à l'augmentation de la concentration du médicament libéré au sein de la tumeur. Une stratégie similaire est déjà employée pour la préparation de conjugués médicament-anticorps tel que Adcetris™ qui présente un DAR moyen de 4. En revanche, dans le cas des ADC, le contrôle du DAR demeure encore problématique et ces derniers sont dans la plupart des cas utilisés sous forme de mélange hétérogène de plusieurs conjugués avec des DAR variables.

1.1 Etat de l'art

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent, l'augmentation du DAlbR a déjà été étudiée au moyen des vecteurs **15** en fonctionnalisant l'albumine avec 1 à 20 copies de la molécule active sur les résidus lysines. Cependant, cette approche s'est révélée inefficace entrainant une dénaturation de la protéine favorisant son élimination rénale. De plus, la méthode de préparation utilisée engendre un problème d'homogénéité des conjugués.

L'utilisation de vecteurs possédant un maléimide permet d'obtenir des conjugués extrêmement homogènes. En effet, ils réagissent sélectivement avec l'unique thiol libre de l'albumine aussi bien *in vitro*, pour la pré-conjugaison, qu'*in vivo*, pour la formation *in situ* du bioconjugué. Cependant, la conception de vecteurs efficaces possédant un DAlbR supérieur à un par cette stratégie demeure un véritable défi.

Récemment, l'étude de plusieurs vecteurs de la MMAE conduisant à différents DAlbR a été réalisée.[194] Pour cela, le vecteur de la MMAE **30**, sensible à la cathepsine B, a été utilisé au travers de plusieurs approches. Ainsi, le composé **30** a été employé pour former des conjugués soit *in situ* avec l'albumine plasmatique soit *ex vivo* avec une albumine recombinante. Dans ce dernier cas, il est plus facile de maitriser la quantité de MMAE transportée par la protéine. En effet, la première approche repose sur une bioconjugaison dans le flux sanguin et ne permet pas un véritable contrôle de la quantité de bioconjugué formé après l'administration du vecteur **30** par voie intraveineuse. Au contraire, la préparation *ex vivo* du conjugué **31** conduit à une parfaite maitrise de sa concentration plasmatique lors de son injection. De plus, grâce à une albumine comportant trois thiols libres,

[194] X. Liu, R. P. Mohanty, E. Y. Maier, X. Peng, S. Wulfe, A. P. Looney, K. L. Aung, D. Ghosh, *Journal of Controlled Release*, **2020**, 328, 1 - 12.

synthétisée via la réduction de l'un des ponts disulfures de la protéine, le conjugué **32** avec un DAlbR proche de 3 a été obtenu.

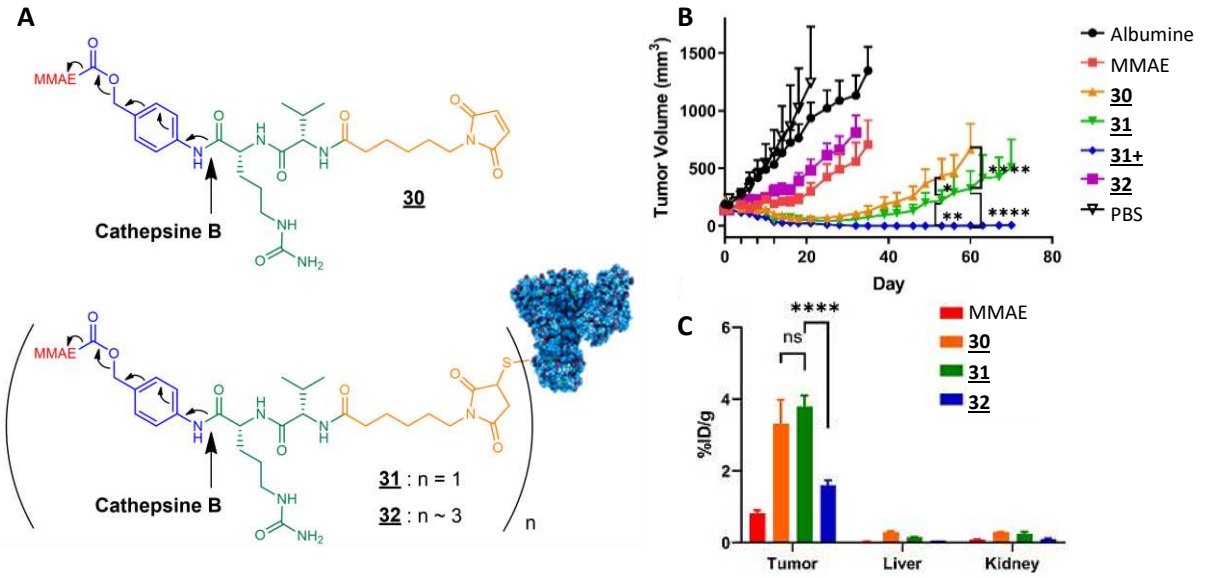


Figure 37 : A) Structure et mécanisme de décomposition des vecteurs 30, 31 et 32. B) Efficacité thérapeutique des vecteurs 30, 31 et 32 comparée à celle de la MMAE à une dose équivalente à 0,5 mg.kg^{-1} MMAE (dans le cas du vecteur 31 une quantité équivalente à 0,9 mg.kg^{-1} MMAE, ligne 31+, a également été administrée). C) Biodistribution des vecteurs 30, 31 et 32 et de la MMAE.

L'efficacité de ces différentes approches a été évaluée *in vivo* pour le traitement de tumeurs pancréatiques humaines MIA PaCa-2 implantées en sous-cutané. Les composés ont été administrés à leur dose maximale tolérée correspondant à 0,5 mg.kg^{-1} de MMAE. Le composé **31** s'est révélé moins toxique permettant ainsi son administration à une dose plus importante (0,9 mg.kg^{-1} équivalent MMAE). Lors de cette expérience, tous les traitements ont conduit à l'inhibition de la croissance tumorale. Le vecteur **31** avec le DAlbR de 1 s'est montré très efficace aux deux doses utilisées. A la plus forte dose, une régression durable des tumeurs a été obtenue. Lors de l'administration de la même quantité des vecteurs **30** et **31**, une régression relativement similaire a été observée, suivie d'une reprise de la croissance à l'issue des traitements. Le conjugué **32** avec le DAlbR d'environ 3 s'est montré beaucoup moins efficace, conduisant à une faible inhibition de la croissance tumorale comparable à celle obtenue avec la MMAE libre administrée à la même dose.

Il est important de noter que seul le vecteur **31** avec le DAlbR de 1 conduit à une diminution de la toxicité systémique de la MMAE. En effet les autres approches conduisent à une dose maximale tolérée similaire à celle du principe actif. Une étude pharmacocinétique a permis d'identifier les causes probables de cette toxicité. Tout d'abord, une plus faible stabilité plasmatique du vecteur **30** a été observée. En effet, lors de son administration, une quantité de MMAE plus importante a été mesurée dans le plasma des souris résultant de la libération prématurée du principe actif dans l'organisme.

Dans le cas du conjugué **32** avec le DAlbR de 3, la toxicité n'est pas due à une libération prématurée de la MMAE. En revanche, ce composé présente une demi-vie plasmatique réduite par rapport aux autres conjugués testés lors de cette étude. La toxicité du vecteur **32** pourrait alors être liée à sa métabolisation dans les tissus sains. Cette hypothèse a été partiellement démontrée par l'étude de sa biodistribution montrant une accumulation tumorale plus faible que les autres vecteurs. Cela explique également la plus faible efficacité de ce vecteur démontrant que la modification de la

structure de l'albumine a un impact négatif quant à son utilisation comme transporteur de médicament pour des applications en oncologie.

Une albumine recombinante a récemment été développée afin de permettre la génération de bioconjugués possédant un DAlbR plus élevé en évitant d'avoir recours à la dénaturation de la protéine.[195] Cet analogue protéique a la particularité de posséder trois thiols libres tout en maintenant une forte interaction avec le FcRn. Dans ce cas, les thiols supplémentaires ont été introduits par la substitution de certains acides aminés, non essentiels à l'interaction avec le FcRn, par des cystéines. Cette stratégie a été évaluée pour le transport d'agents d'imagerie fluorescents (Alexa Fluor 680) dans le but de déterminer la demi-vie de l'albumine recombinante chez la souris. Un temps de circulation 1,3 fois supérieur à celui de l'albumine normale a été mesuré attestant de sa meilleure interaction avec le FcRn. De cette manière, des conjugués à l'albumine possédant un DAlbR plus élevé pourraient être obtenus sans compromettre la pharmacocinétique et les propriétés de l'albumine fonctionnalisée. En revanche, aucun médicament n'a, pour l'heure, été véhiculé par cette technique.

Il est tout de même possible d'augmenter le DAlbR des conjugués sans modifier la structure de l'albumine. Pour cela, l'incorporation de plateformes moléculaires de ramification, assurant l'assemblage des différentes parties des vecteurs tout en maintenant un contrôle strict du DAlbR, a été étudiée.

Dans cette optique, le groupe de Kratz a étudié deux vecteurs hétérodimériques capables de former un vecteur macromoléculaire avec l'albumine plasmatique possédant un DAlbR de 2. Le composé **33**[196] véhicule à la fois la doxorubicine et le paclitaxel alors que le vecteur **34**[197] associe la doxorubicine au composé **35**, un inhibiteur d'une protéine impliquée dans l'efflux de principes actifs surexprimée dans le cas de cancers multi-résistants.

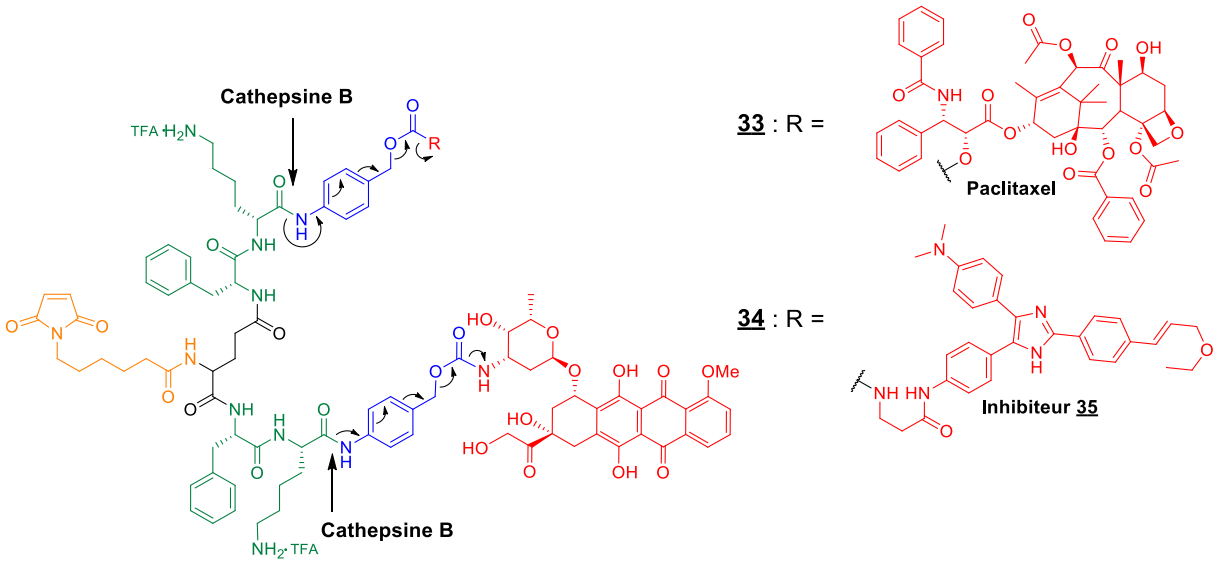


Figure 38 : Structure et mécanisme de décomposition des vecteurs hétérodimériques 33 et 34.

[195] K. K. Schelde, K. Nicholls, F. Dagnæs-Hansen, K. Bunting, H. Rawsthorne, B. Andersen, C. J. A. Finnis, M. Williamson, J. Cameron, K. A. Howard, *J. Biol. Chem.*, **2019**, 294, 3735 - 3743.
[196] K. Abu Ajaj, M. L. Biniossek, F. Kratz, *Bioconjugate Chem.*, **2009**, 20, 390 - 396.
[197] K. Abu Ajaj, F. Kratz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 995 - 1000.

L'étude *in vitro* de ces deux vecteurs a permis de démontrer leur capacité à réagir sélectivement avec le thiol de l'albumine humaine ainsi que leur aptitude à libérer les deux principes actifs lors de leur incubation avec la cathepsine B ainsi que des homogénats de cellules tumorales. Une évaluation du vecteur **34** a été réalisée *in vivo* au cours de laquelle la toxicité a été le principal critère. En effet, lors d'une étude préliminaire consistant à administrer une combinaison des deux principes actifs (doxorubicine 6 $mg.kg^{-1}$, **35** 5 $mg.kg^{-1}$), une toxicité importante a été mesurée chez la souris. En revanche, l'administration du vecteur **34** à une quantité équivalente en doxorubicine à 24 $mg.kg^{-1}$ n'a pas entrainé d'effets indésirables, démontrant que l'utilisation de l'albumine comme transporteur de médicaments contribue fortement à la baisse de leur toxicité.

Au laboratoire, l'augmentation du DAlbR a tout d'abord été étudiée au travers du vecteur glucuronylé dimérique **36** (Figure 39-A).[198] Il a été conçu pour véhiculer deux molécules de MMAE dont la libération résulte d'un unique clivage enzymatique. Ce processus d'amplification semble prometteur pour le ciblage de la β-glucuronidase extracellulaire qui présente une activité hydrolytique limitée en raison du pH du microenvironnement tumoral.

L'efficacité du vecteur dimérique **36** a été évaluée pour le traitement de tumeurs issues de cellules cancéreuses LS174T. Cette lignée cellulaire, issue d'un adénocarcinome colorectal, est reconnue pour sa faible expression de β-glucuronidase extracellulaire.[66] Cette caractéristique rend alors l'utilisation du vecteur **36** qui comporte un amplificateur moléculaire très attractive.

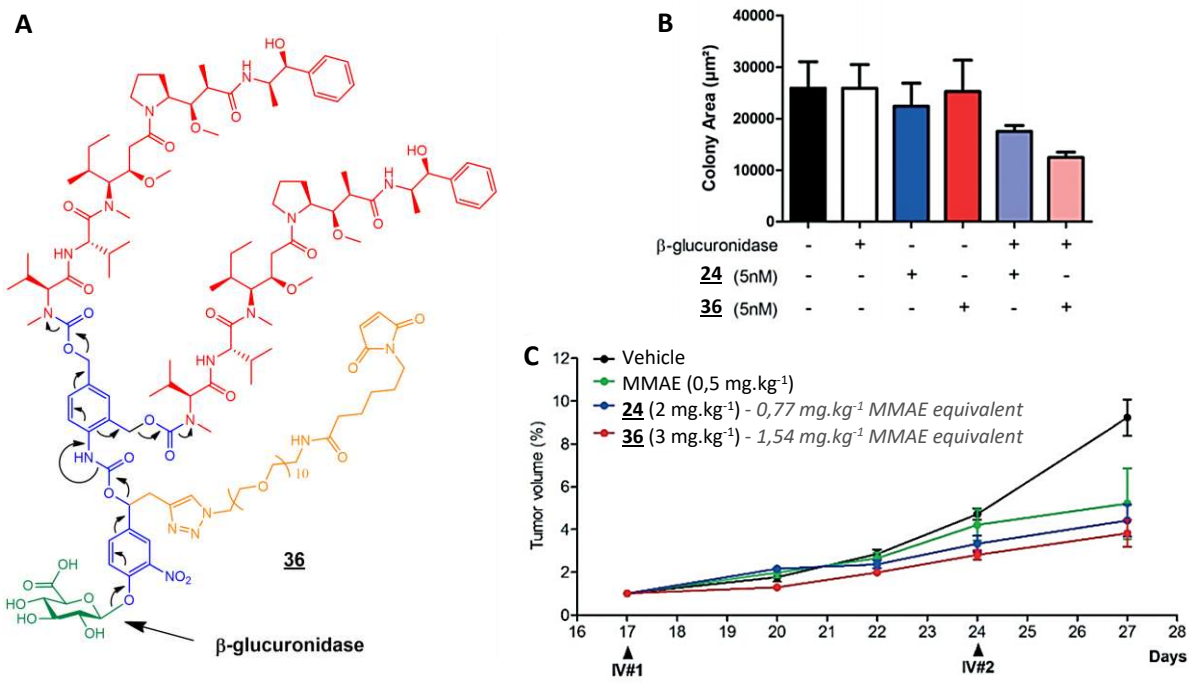


Figure 39 : A) Structure et mécanisme de décomposition du vecteur dimérique 36. B) Activité antiprolifératives du vecteur 36 (5 nM) comparée à celle du monomère 24 (5 nM) sur des cultures tridimensionnelles de cellules LS174T. C) Efficacité thérapeutique du vecteur 36 (3 $mg.kg^{-1}$) comparée à celles du monomère 24 (2 $mg.kg^{-1}$) et de la MMAE (0,5 $mg.kg^{-1}$) chez la souris porteuse de xénogreffes tumorales LS174T implantées en sous-cutané.

Afin d'évaluer l'impact de l'augmentation du DAlbR, une expérience *in vitro* a été réalisée en comparant le dimère **36** avec le vecteur monomérique **24** (Figure 39-B). Pour cela, des colonies de

[198] B. Renoux, L. Fangous, C. Hötten, E. Péraudeau, B. Eddhif, P. Poinot, J. Clarhautau, S. Papot, *Med.Chem.Commun.*, **2018**, 9, 2068-2071.

cellules LS174T, cultivées en trois dimensions, ont été incubées en présence de 5 nM des deux vecteurs et de β-glucuronidase. Dans ce cadre, une activité antiproliférative plus importante a été obtenue pour le vecteur dimérique **36**, attestant de la libération d'une plus grande quantité de MMAE.

Le vecteur dimérique **36** a ensuite été étudié *in vivo* pour le traitement de xénogreffes tumorales LS174T sous-cutanées chez la souris en comparaison avec le vecteur monomérique **24** et la MMAE (Figure 39-C). Afin de mettre en évidence un potentiel bénéfice thérapeutique, le vecteur glucuronylé monomérique **24** a été administré à une quantité suboptimale de 2 $mg.kg^{-1}$. Le vecteur dimérique **36** a, quant à lui, été injecté à 3 $mg.kg^{-1}$, soit une quantité équimolaire par rapport au composé **24**. De ce fait, la quantité de MMAE transportée par le vecteur **36** correspond à sa dose efficace (1,54 $mg.kg^{-1}$ en MMAE correspondant à 4 $mg.kg^{-1}$ du vecteur **24**) et devrait produire un effet antitumoral important.

Lors de cette expérience, tous les composés ont conduit à une inhibition de la croissance tumorale par rapport au groupe contrôle. L'augmentation du DAlbR n'a cependant pas produit le bénéfice thérapeutique escompté. En effet, aucune différence significative d'efficacité n'a été observée entre les vecteurs **24** et **36**. Bien que la raison permettant d'expliquer cet échec ne soit pas encore connue, plusieurs hypothèses peuvent être émises. L'incorporation d'un motif auto-immolable supplémentaire pourrait ralentir la libération de la MMAE. Ainsi des intermédiaires inactifs pourraient diffuser en dehors du microenvironnement tumoral et donc réduire la quantité de principe actif accumulée au sein de la tumeur. On peut également évoquer une potentielle différence quant au rendement de la ligation avec l'albumine dans le plasma, en raison d'une pharmacocinétique et d'une biodistribution différente entre les deux vecteurs. Si le vecteur **36** réagit de façon moins efficace avec la protéine, la concentration en MMAE déposée au niveau de la masse tumorale sera réduite limitant de fait l'activité antitumorale.

Il faut néanmoins noter que le composé **36** a été le premier vecteur comportant un mécanisme d'amplification moléculaire dédié à la libération de médicaments testé chez la souris.

1.2 Stratégie envisagée pour la conception d'un vecteur glucuronylé trimérique de la MMAE

Suite aux résultats obtenus lors de l'évaluation du vecteur **36** chez la souris, nous avons conçu une nouvelle génération de vecteurs glucuronylés dans le but d'augmenter le DAlbR. Dans ce contexte, nous avons développé le vecteur trimérique de la MMAE **37**. (Figure 40-A)[199]

Ce vecteur se compose de trois motifs glucuronide-espaceur-MMAE pégylés reliés entre eux par un acide gallique central comportant une fonction maléimide capable de réagir avec l'albumine plasmatique. La présence des trois glucuronides et des chaines PEG devraient conférer au vecteur un caractère hydrophile important, favorisant son administration par voie intraveineuse.

Le choix de l'acide gallique comme élément central de la plateforme moléculaire a été motivé par sa structure. En effet, ce dernier possède trois phénols directement fonctionnalisables permettant l'incorporation des trois espaceurs auto-immolables de manière symétrique. De plus, la présence d'un acide carboxylique offre la possibilité d'introduire un groupement maléimide de façon orthogonale à celle des phénols. Finalement, la structure plane du cycle aromatique permet une répartition spatiale

[199] R. Châtre, J. Lange, E. Péraudeau, P. Poinot, S. Lerondel, A. Le Pape, J. Clarhaut, B. Renoux, S. Papot, *J. Controll. Release*, **2020**, 327, 19 - 25.

qui limite l'encombrement stérique, avec d'un côté les motifs glucuronylés et de l'autre la fonction maléimide.

Ainsi, après son injection, la réaction d'addition entre le maléimide du vecteur trimérique **37** et le thiol libre de l'albumine conduira *in situ* à la formation du bioconjugué **38**, possédant un DAlbR contrôlé de 3 (Figure 40-B). Le vecteur macromoléculaire **38** s'accumulera alors au niveau de la tumeur où la β-glucuronidase extracellulaire catalysera la décomposition des trois motifs enzymo-sensibles pour libérer les trois molécules de MMAE. Dans ce cadre, les chaines PEG reliant le motif acide gallique aux espaceurs auto-immolables devraient permettre d'assurer une reconnaissance enzymatique efficace des substrats glucuronylés en les éloignant suffisamment de la protéine plasmatique.

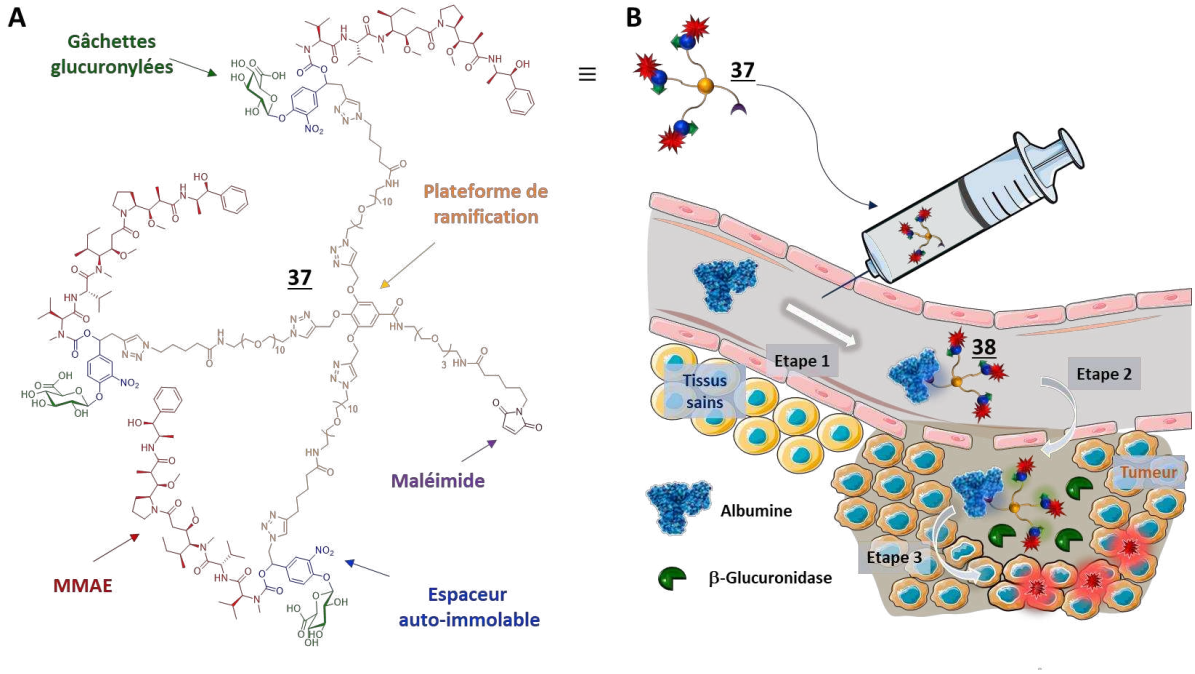


Figure 40 : Structure (A) et mode d'action (B) du vecteur trimérique 37.

2 Synthèse du vecteur glucuronylé trimérique de la MMAE 37

2.1 Schémas rétrosynthétiques

Une stratégie de synthèse convergente a été retenue pour la préparation du vecteur trimérique **37** (Figure 41). Le vecteur **37** peut être obtenu par addition de l'amine primaire du composé **39** sur l'ester de *N*-hydroxysuccinimide de l'acide 6-maléimidocaproïque **63**. Le composé clé de cette stratégie de synthèse est l'amine **40**. Elle possède en effet trois azotures permettant la conjugaison des trois unités **59** sur la même plateforme moléculaire, via une triple réaction de cycloaddition [3+2] catalysée par le cuivre (I). L'alcyne **59** peut être obtenu après déprotection du glucuronide correspondant, synthétisé précédemment au laboratoire.

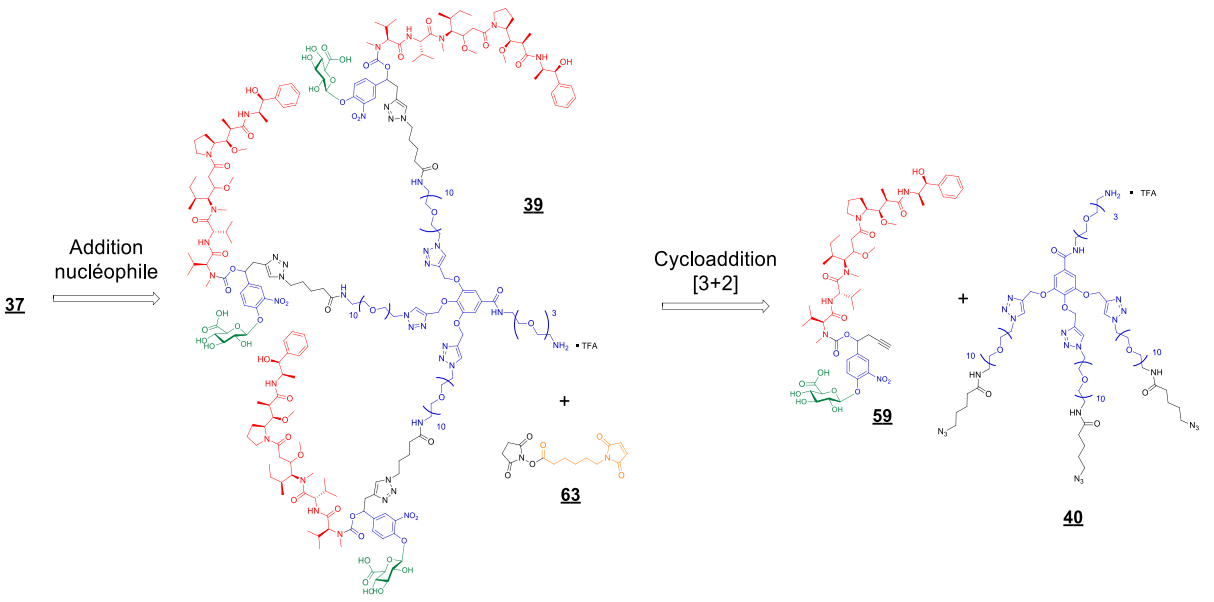


Figure 41 : Stratégie de synthèse convergente du vecteur trimérique 37.

La synthèse de la plateforme moléculaire de ramification **40** a été envisagée selon la stratégie présentée sur la Figure 42.

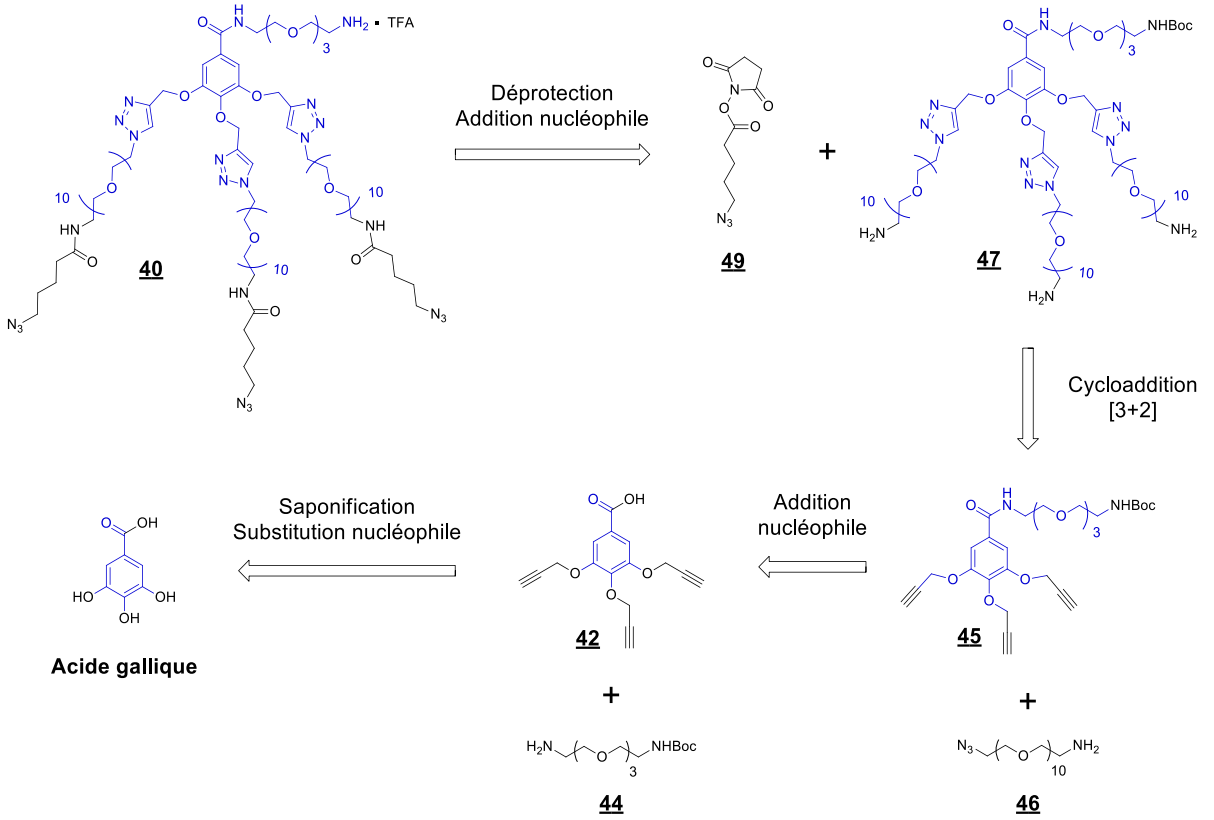


Figure 42 : Stratégie de synthèse de l'espaceur ramifié 40.

Cette dernière pourra être obtenue par addition de la triamine **47** sur l'ester de NHS de l'acide azidovalérique **49**, suivie de la déprotection de l'amine. La triamine **47** résultera d'une triple réaction de cycloaddition [3+2] catalysée par le cuivre (I) entre l'azoture de la chaine polyéthylène glycol **46** et le trialcyne **45**. Ce dernier sera préparé par condensation entre l'amine de la chaine PEG **44** et l'acide

carboxylique **42**. Enfin, la perpropargylation de l'acide gallique suivie de la saponification de l'ester conduira au composé **42** permettant la ramification de la structure du vecteur trimérique **37**.

2.2 Synthèse du vecteur trimérique de la MMAE 37

2.2.1 Synthèse de l'espaceur hydrophile 40

La synthèse de l'espaceur hydrophile **40** est réalisée en 6 étapes à partir de l'acide gallique commercial (Figure 43).

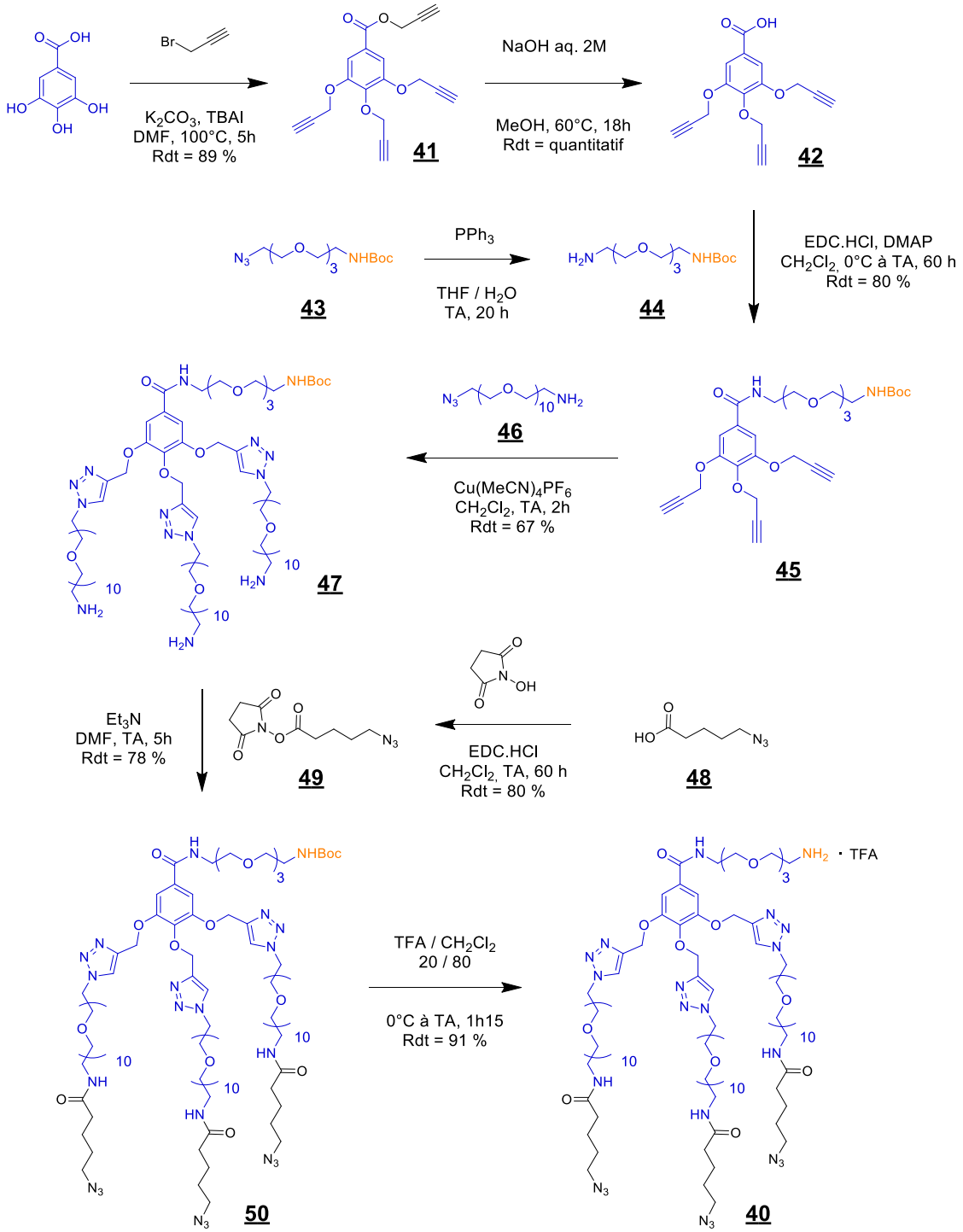


Figure 43 : Synthèse de l'espaceur trimérique 40.

Le composé tripropargylé **42** est préparé en 2 étapes à partir de l'acide gallique selon un protocole adapté de la littérature.[200] Tout d'abord, l'acide gallique est perpropargylé dans le DMF à l'aide du bromure de propargyle en présence de carbonate de potassium et catalysé par TBAI. Cette réaction permet d'obtenir le composé **41** avec un rendement de 89 %. L'analyse RMN ^{1}H confirme la formation du composé **41** avec l'apparition de trois triplets à 2,54 ppm (2H), 2,52 ppm (1H) et 2,46 ppm (1H) présentant une constante de couplage en ^4J de 2,5 Hz correspondant aux protons des alcynes vrais. La fonction ester de propargyle est ensuite saponifiée par une solution aqueuse de soude à 2M dans le méthanol pour former l'acide carboxylique **42** avec un rendement quantitatif. Ceci est confirmé en RMN ^{1}H par la disparition du triplet de la fonction alcyne à 2,46 ppm.

La première chaine PEG est ensuite introduite par un couplage de type peptidique entre l'acide carboxylique **42** et l'amine **44**. Cette dernière est obtenue par la réduction de Staudinger de l'azoture **43** correspondant par de la triphénylphosphine dans un mélange THF/eau. Il est à noter que le brut réactionnel est utilisé directement, sans purification intermédiaire, pour la réaction suivante. La réaction de condensation entre l'acide carboxylique **42** et l'amine **44** est réalisée en présence de l'agent de couplage EDC.HCl et catalysée par la DMAP. Cette réaction permet d'accéder au composé **45** avec un rendement de 80 %. L'analyse RMN ^{1}H confirme la structure du composé attendu avec l'apparition d'un singulet à 1,42 ppm intégrant pour 9 protons, caractéristique de la présence du groupement Boc.

Une triple réaction de cycloaddition azoture-alcyne [3+2] permet d'introduire les trois autres chaines PEG **46** sur le trialcyne **45**. Cette réaction a été réalisée dans le dichlorométhane en présence de $Cu(MeCN)_4PF_6$. Cette source du cuivre (I) a été retenue puisque ce catalyseur peut être utilisé dans le dichlorométhane, solvant dans lequel les composés **45** et **46** sont parfaitement solubles malgré leur grande différence de polarité. Cette réaction permet d'isoler le *tris*-triazole **47** avec un rendement de 67 % après une purification par chromatographie en phase inverse. Il est important de noter que lors de la purification, l'éluant utilisé (eau/acétonitrile) n'est pas acidifié par de l'acide trifluoroacétique. En effet, la présence d'acide pourrait entrainer le clivage du carbamate de *tert*-butyle lors de l'évaporation des solvants. La formation du composé **47** a été confirmée par la présence de deux singulets en RMN ^{1}H à 7,94 et 8,21 ppm, qui intègrent respectivement pour un et deux protons, correspondants aux protons des triazoles.

Les 3 azotures du composé **50** sont introduits par réaction entre la triamine **47** et l'ester de NHS de l'acide azidovalérique **49**. Ce dernier a été préparé à partir de l'acide azidovalérique **48**, précédemment synthétisé au laboratoire selon un protocole issu de la littérature,[201] par condensation entre l'acide carboxylique **48** et le *N*-hydrosuccinimide en présence d'EDC.HCl dans le dichlorométhane. Cette réaction permet d'obtenir le composé **49** avec un rendement de 80 % après une purification par chromatographie flash.

L'addition de la triamine **47** sur l'ester actif de l'acide azidovalérique **49** est réalisée dans le *N,N*-diméthylformamide en présence de triéthylamine. Cette étape permet d'obtenir le triazoture **50** avec un rendement de 78 % après une purification par chromatographie sur gel de silice. L'insertion des chaines alkyles est confirmée par RMN ^{1}H grâce à l'apparition de deux triplets, intégrants pour 6

[200] K. Shioe, S. Ishikura, Y. Horino, H. Abe, *Chem. Pha. Bull.* **2013**, 61, 1308 - 1314.
[201] T. Fricke, R. J. Mart, C. L. Watkins, M. Wiltshire, R. J. Errington, P. J. Smith, A. T. Jones, R. K. Allemann, *Bioconjugate Chem*., **2011**, 22, 1763 - 1767.

protons chacun, à 3,27 ppm (^3J = 6,6 Hz) et 2,17 ppm (^3J = 7,1 Hz) correspondants aux signaux des méthylènes en alpha des azotures et des amides. Un multiplet caractéristique en RMN ^{1}H, entre 1,73 ppm et 1,53 ppm intégrant pour 12 protons traduit la présence des autres CH_2.

La déprotection de l'amine est réalisée par protonolyse du carbamate de *tert*-butyle du composé **50,** en présence d'acide trifluoroacétique à 20 % dans le dichlorométhane. Cette réaction permet d'obtenir le composé **40** sous forme d'un sel de trifluoroacétate avec un rendement de 91 % après purification par chromatographie en phase inverse. Ceci est confirmé par la disparition du singulet à 1,39 ppm en RMN ^{1}H, correspondant aux 9 protons du groupement *tert*-butyle.

2.2.2 Synthèse du glucuronide de la MMAE 59

Le glucuronide de la MMAE **59** est préparé en 6 étapes à partir de la glucuronolactone **54** commerciale (Figure 44).

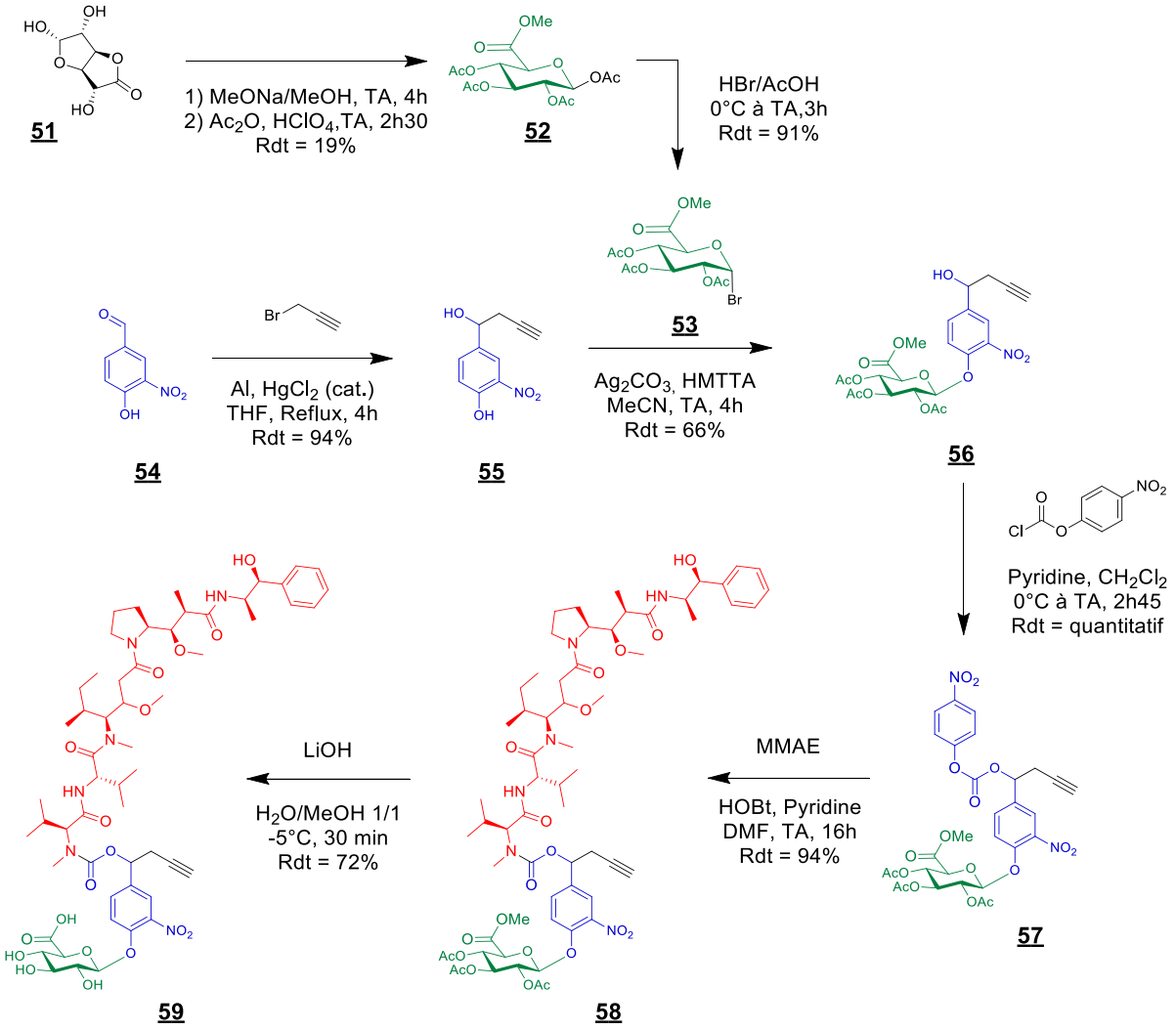


Figure 44 : Synthèse du glucuronide de la MMAE 59.

Le glucuronide bromé **53** est préparé à partir de la glucuronolactone **51** selon la méthode décrite par Bollenback.[202] Dans un premier temps la lactone **51** est ouverte à l'aide de méthanolate de sodium

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

produisant l'ester méthylique du pyranose correspondant. Ce dernier est traité par de l'anhydride acétique en présence d'une quantité catalytique d'acide perchlorique afin d'obtenir le glucuronide peracétylé **52**, isolé par précipitation avec un rendement de 19 % sur les deux étapes. De plus, seul le glucuronide d'anomérie β précipite au cours de la réaction. En effet, l'analyse RMN ^{1}H du précipité indique un doublet à 5,77 ppm avec une constante de couplage de 8,0 Hz caractéristique du proton anomérique d'un β-glucuronide.

La position anomérique du glucuronide **52** 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 **53** est ainsi obtenu avec un rendement de 91 %. Le spectre RMN ^{1}H 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 alpha du glucuronide.

L'alcool benzylique **55** a été synthétisé à partir du 3-nitro-4-hydroxybenzaldéhyde **54** selon une méthode précédemment développée au laboratoire.[203] Tout d'abord, le tripropargylaluminium est formé par la réaction entre le bromure de propargyle et de l'aluminium métallique catalysée par $HgCl_2$ dans le THF. Il est ensuite additionné sur le 3-nitro-4-hydroxybenzaldéhyde **54** conduisant à la formation de l'alcool benzylique **55** sous forme d'un mélange racémique avec un rendement de 94 %. L'analyse RMN ^{1}H confirme la réduction de l'aldéhyde avec la disparition du singulet à 10,05 ppm au profit de l'apparition d'un triplet à 4,81 ppm avec une constante de couplage de 6,2 Hz correspondant au proton benzylique. De plus, l'insertion du propargyle est confirmée par la présence d'un triplet à 2,11 ppm avec une constante de couplage de 2,6 Hz caractéristique d'un alcyne vrai.

La réaction de glycosylation chimiosélective entre le sucre bromé **53** et la fonction phénol du composé **55** a été réalisée dans l'acétonitrile en présence de Ag_2CO_3 et de HMTTA (1,1,4,7,10,10-hexaméthyltriéthylènetétramine).[204] La présence de ce dernier dans le milieu réactionnel s'est révélée indispensable au déroulement de la réaction. En effet, une étude antérieure menée au laboratoire a montré qu'en absence de HMTTA, l'ion Ag^{+} forme un complexe irréversible avec la fonction alcyne, ne permettant pas à la réaction de glycosylation de se dérouler correctement. L'utilisation de HMTTA permettrait alors de former un complexe d'argent préférentiel, actif vis-à-vis de la réaction de glycosylation. Le glucuronide **56** a été obtenu avec un rendement de 66 % après purification par chromatographie flash sur gel de silice sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères inséparables. La génération d'un seul anomère est confirmée par RMN ^{13}C avec la présence d'un signal à 99,5 ppm.

L'alcool benzylique du composé **56** est activé par du chloroformiate de *para*-nitrophényle en présence de pyridine dans le dichlorométhane. Cette réaction permet d'isoler le carbonate activé **57** avec un rendement quantitatif. L'analyse RMN ^{1}H du carbonate mixte **57** permet de confirmer la présence du groupement nitrophényle *para*-substitué grâce aux deux doublets à 8,28 et 7,38 ppm avec une constante de couplage de 9,1 Hz, correspondant respectivement aux protons en *ortho* et en *méta* de la fonction NO_2.

[203] M. Thomas, J. Clarhaut, P.-O. Strale, I. Tranoy-Opalinski, J. Roche, S. Papot, *ChemMedChem*, **2011**, 6, 1006-1010.
[204] F. Stazi, G. Palmisano, M. Turconi, S. Clini, M. Santagostino, *J. Org. Chem*., **2004**, 69, 1097 - 1103.

La MMAE est introduite par substitution du carbonate activé du composé **57** en présence de HOBt et de pyridine dans le DMF. Cette réaction permet d'obtenir le composé **58** avec un rendement de 94 %.

L'hydrolyse des acétates et de l'ester de méthyle du glucuronide **58** a été réalisée en présence de LiOH dans un mélange méthanol/eau à -5°C pendant 30 minutes. Le glucuronide de la MMAE déprotégé **59** est obtenu, sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères, avec un rendement de 72 % après purification par chromatographie en phase inverse. La déprotection totale du motif glucuronide est confirmée par RMN ^{1}H par l'absence des singulets caractéristiques des protons des groupements CH_3 des fonctions acétates et de l'ester de méthyle.

2.2.3 Synthèse du trimère 39 par cycloaddition [3+2] et insertion du motif maléimide

Le trimère **39** a été synthétisé par une triple réaction de cycloaddition [3+2] entre les deux synthons **40** et **59** précédemment préparés (Figure 45). En raison de la complexité de la réaction de triple cycloaddition, liée à la nature des substrats de départ ainsi qu'à la formation d'un composé de haut poids moléculaire sous la forme de plusieurs diastéréoisomères, la réaction a été suive exclusivement par LC-MS.

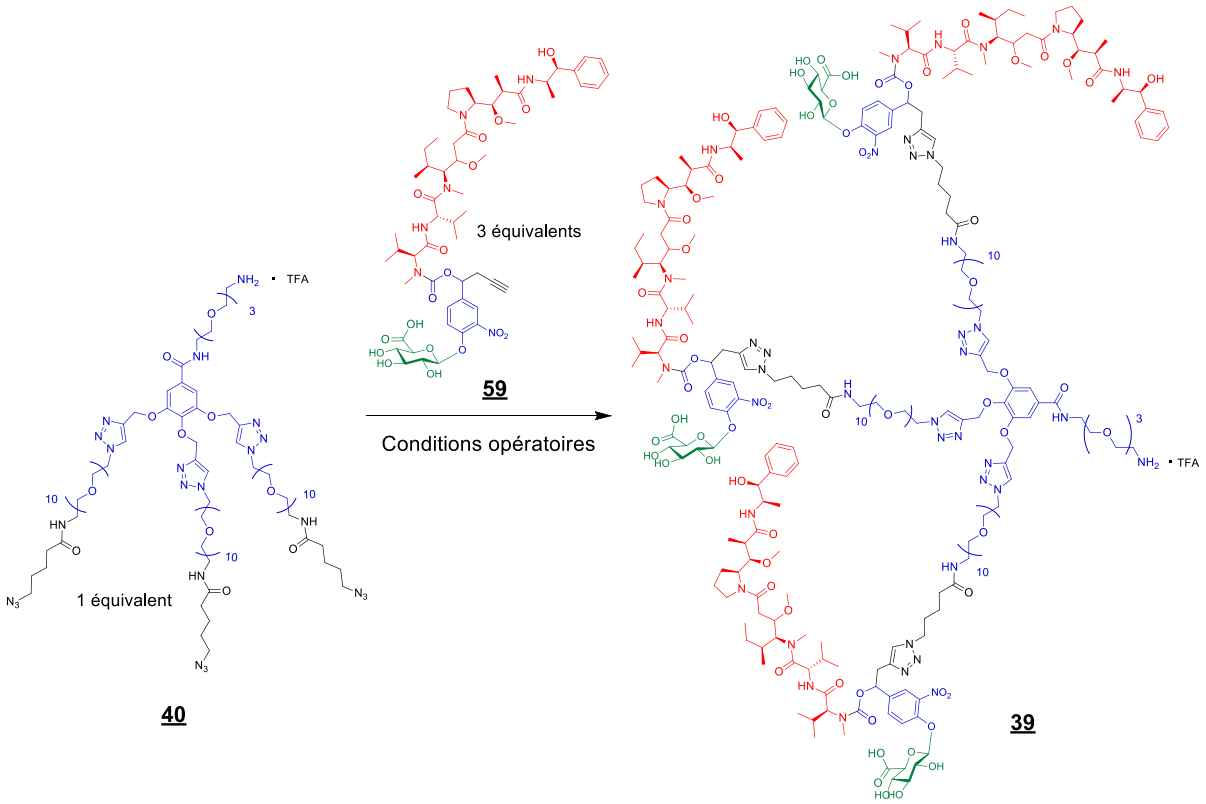


Figure 45 : Triple réaction de cycloaddition pour la formation du trimère 39.

Dans les conditions précédemment utilisées ($Cu(MeCN)_4PF_6$, CH_2Cl_2), aucun produit de cycloaddition n'a été observé. En effet, le glucuronide **59** s'est révélé insoluble dans le dichlorométhane. Dans ce cadre, une optimisation des conditions opératoires a été entreprise pour la préparation du trimère **39**.

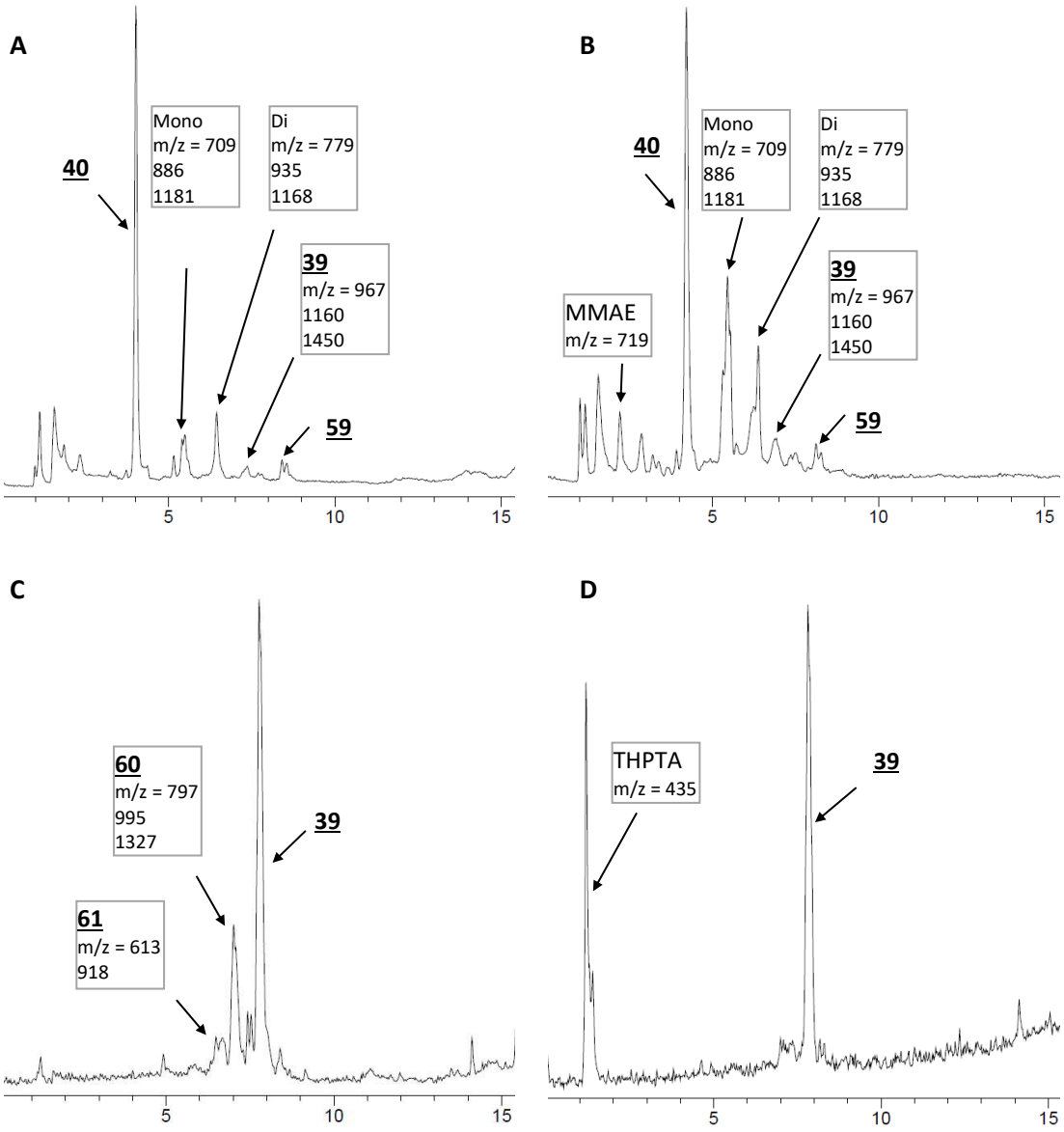


Figure 46 : Chromatogrammes LC-MS du milieu réactionnel de la triple cycloaddition [3+2] obtenus en fonction des conditions opératoires.

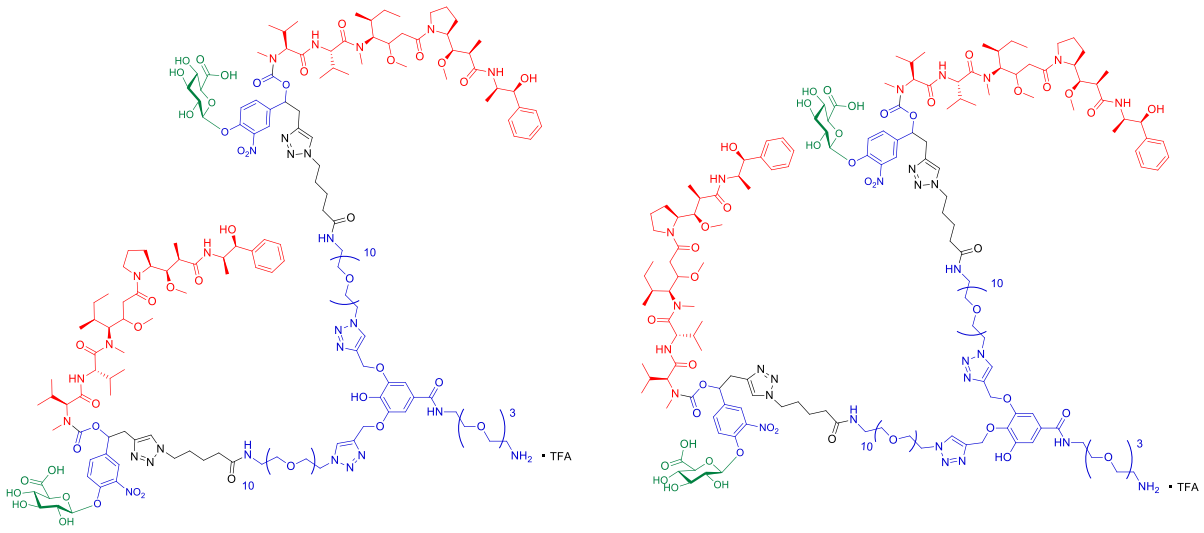
Dans un premier temps, le diméthylsulfoxyde a été choisi comme solvant de la réaction en présence du catalyseur $Cu(MeCN)_4PF_6$ (1 équivalent). Malgré une meilleure solubilité du glucuronide **59**, la formation du trimère **39** est très minoritaire (Figure 46-A). En effet, le triazoture **40** de départ est très majoritaire et seulement des traces des produits de mono, di et tri cycloadditions sont observées après 66 heures de réaction. Un excès plus important de catalyseur (3 équivalents), ne permet pas d'obtenir une meilleure réactivité et un chromatogramme similaire est obtenu. Dans ces conditions opératoires, il semblerait que le cuivre (I) soit désactivé au cours de la réaction puisque aucun avancement supplémentaire n'est observé au cours du temps. Il est à noter que l'ajout d'ascorbate de sodium (6 équivalents) dans le milieu réactionnel n'offre aucun avancement quant à l'avancement de la réaction.

L'ajout séquentiel de catalyseur (4 x 3 équivalents) au cours de la réaction ne conduit pas non plus à une réaction totale après 6 jours (Figure 46-B). Dans ce cas, le trimère **39** est obtenu en mélange avec les composés de départ, l'alcyne **59** et de triazoture **40**, ainsi que des intermédiaires réactionnels

issus de la simple cycloaddition [3+2] et de la double cycloaddition [3+2]. Malgré la plus grande proportion du trimère **39** par rapport aux conditions précédentes, sa formation reste minoritaire. De plus, des produits de dégradation sont observés, comme l'atteste l'apparition de MMAE dans le milieu réactionnel.

D'autres conditions opératoires ont été expérimentées en utilisant une autre source de cuivre (I). Pour cela, une réduction *in situ* de sulfate de cuivre (II) (3 équivalents) par de l'ascorbate de sodium (3 équivalents) a été réalisée dans un mélange eau/*tert*-butanol (1,6/1). Dans ces conditions, les produits de départ sont consommés après 5 heures de réaction (Figure 46-C). De plus la présence résiduelle des intermédiaires réactionnels, issus de la mono et di cycloaddition, n'est plus observée au profit de la formation du composé **39** souhaité. Après purification par chromatographie en phase inverse, le trimère **39** est obtenu sous forme d'un mélange de six diastéréoisomères avec un rendement modeste de 46 %.

Cela peut être expliqué par la formation d'un produit secondaire au cours de la réaction. En effet, le chromatogramme LC-MS montre un signal inattendu (m/z = 797 ; 995 ; 1327) avec un temps de rétention de 7 minutes. Une analyse par HRMS du composé isolé a permis d'identifier un signal associé à une masse moléculaire de 3976 Da correspondant aux phénols **60** ($[M+5H]^{5+}$ = 796 ; $[M+4H]^{4+}$ = 995 ; $[M+3H]^{3+}$ = 1326). Ces phénols pourraient résulter de la dégradation du trimère **39** par la rupture d'une des liaisons éthers entre l'acide gallique et un triazole (Figure 47).



60-*para* **60-*méta***

Figure 47 : Sous-produits 60 de la triple réaction de cycloaddition.

Une analyse RMN ^{1}H de ce produit a permis de confirmer la présence d'un mélange de régioisomères qui se traduit par l'apparition de plusieurs singulets (Figure 48-B : 5,18 ; 5,16 ; 5,05 et 5,03 ppm) comparés aux deux singulets à 5,18 ppm (4H) et 5, 03 ppm (2H) du trimère **39** (Figure 48-A). Ces signaux correspondent aux protons des méthylènes reliant les triazoles à l'acide gallique. En effet, la présence d'un phénol en *méta* ou *para* de l'amide induit un effet électronique (-I, +M) sur le cycle aromatique qui produit un décalage des déplacements chimiques des protons portés par les méthylènes en alpha des éthers aromatiques.

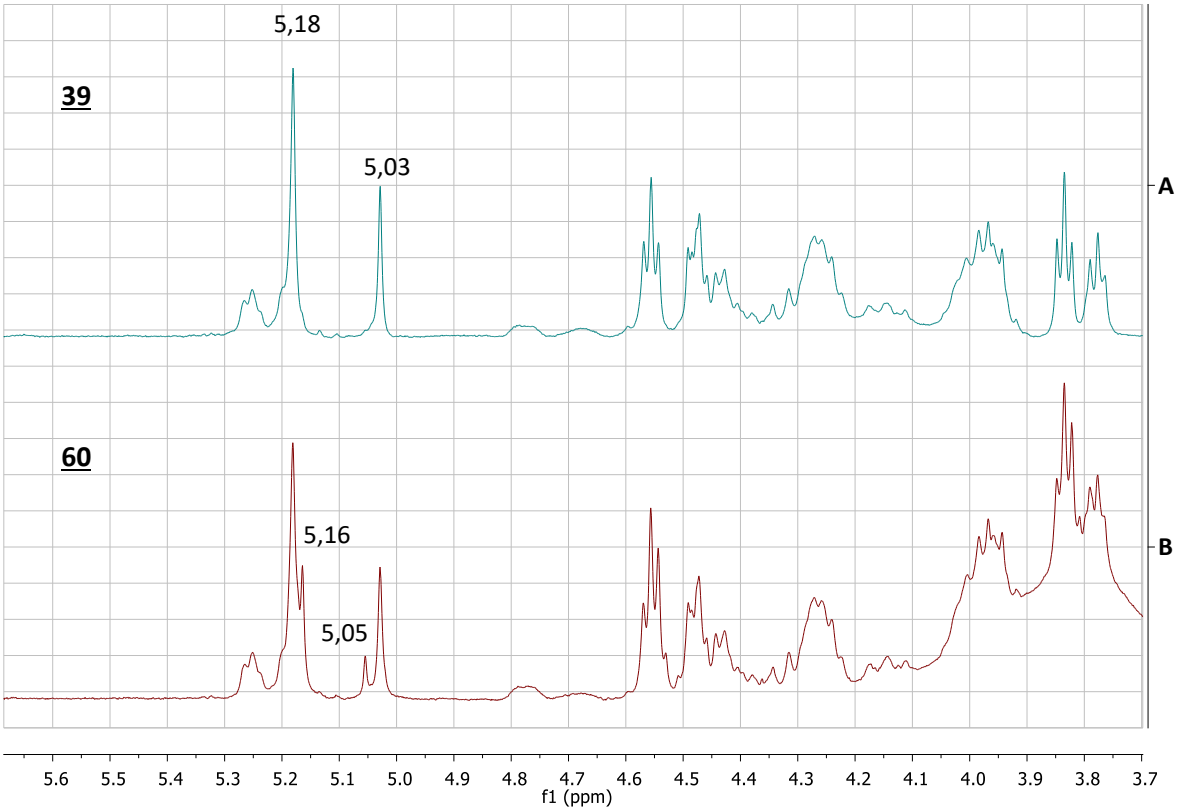


Figure 48 : Spectres RMN ^{1}H du trimère 39 (A) et du produit secondaire 60 (B) pris dans le DMSO-d6 à 400 MHz.

La formation de ce sous-produit pourrait être liée à la forte complexation du cuivre par le *tris*-triazole **39** (Figure 49). Cette interaction exalterait alors l'électrophilie du triazole. De plus, l'effet électroattracteur induit par la présence de l'éther aromatique appauvrirait à nouveau la densité électronique du méthylène en position 4 du triazole. Cette conjonction des effets électroniques permettrait alors le départ du groupement triazole par substitution nucléophile d'une molécule d'eau présente dans le milieu réactionnel.

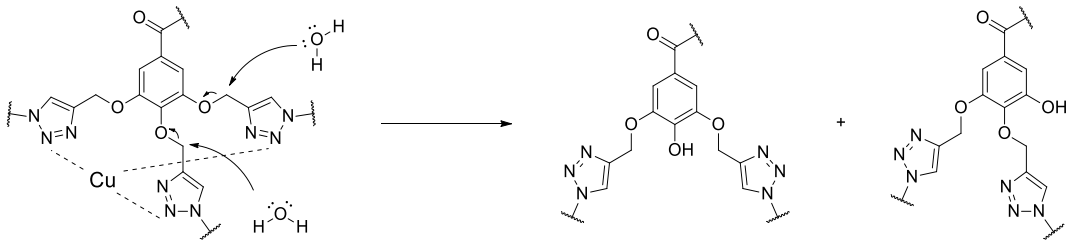
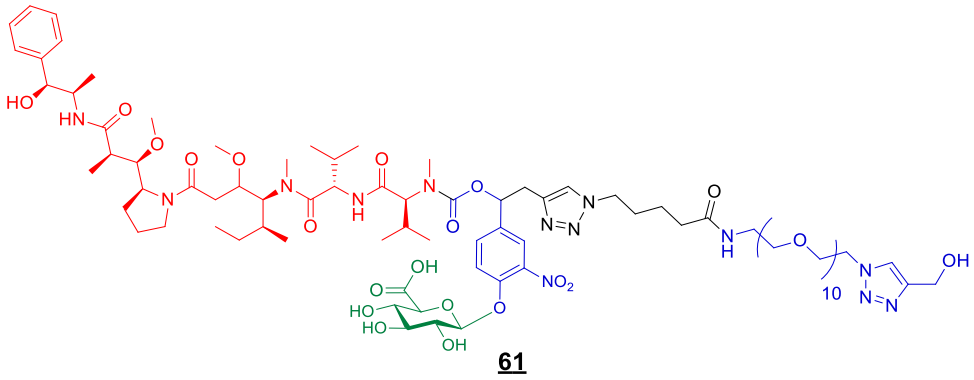


Figure 49 : Mécanisme réactionnel proposé pour la formation des phénols 60.

Une indication supplémentaire, en faveur de ce mécanisme, est obtenue par l'analyse LC-MS du milieu réactionnel. En effet, on observe un signal avec un temps de rétention de 6,5 minutes avec des rapports m/z de 623 et 918, correspondant à la structure du composé **61** (M= 1834 Da ; $[M+2H]^{2+}$ = 918 ; $[M+3H]^{3+}$ = 612). (Figure 50).



61

Figure 50 : Produit d'élimination supposé 61 observé par LC-MS.

Afin d'éviter la formation de ce sous-produit, l'utilisation d'un ligand du cuivre a été envisagée. En effet, une complexation compétitive du métal permettrait de limiter l'interaction cuivre-*tris*-triazole **39**. Pour cela nous avons choisi d'utiliser le THPTA (*tris*-hydroxypropyltriazolylmethylamine), un ligand commercial soluble en milieu aqueux et déjà utilisé pour de nombreuses réactions de cycloaddition [3+2].[205] Ce ligand est lui aussi un *tris*-triazole, ce qui renforce l'hypothèse de la complexation précédemment évoquée.

De nouvelles conditions opératoires ont été expérimentées en utilisant le triazoture **40** (1 équiv.), l'alcyne **59** (4 équiv.), $CuSO_4$ (3,5 équiv.) en présence de THPTA (3,5 équiv.) dans le mélange eau/*tert*-butanol (1/1,6) (Figure 51). La solution est alors agitée afin de former le complexe cuivre-THPTA préalablement à la réduction du métal par l'ascorbate de sodium (3,5 équiv.).

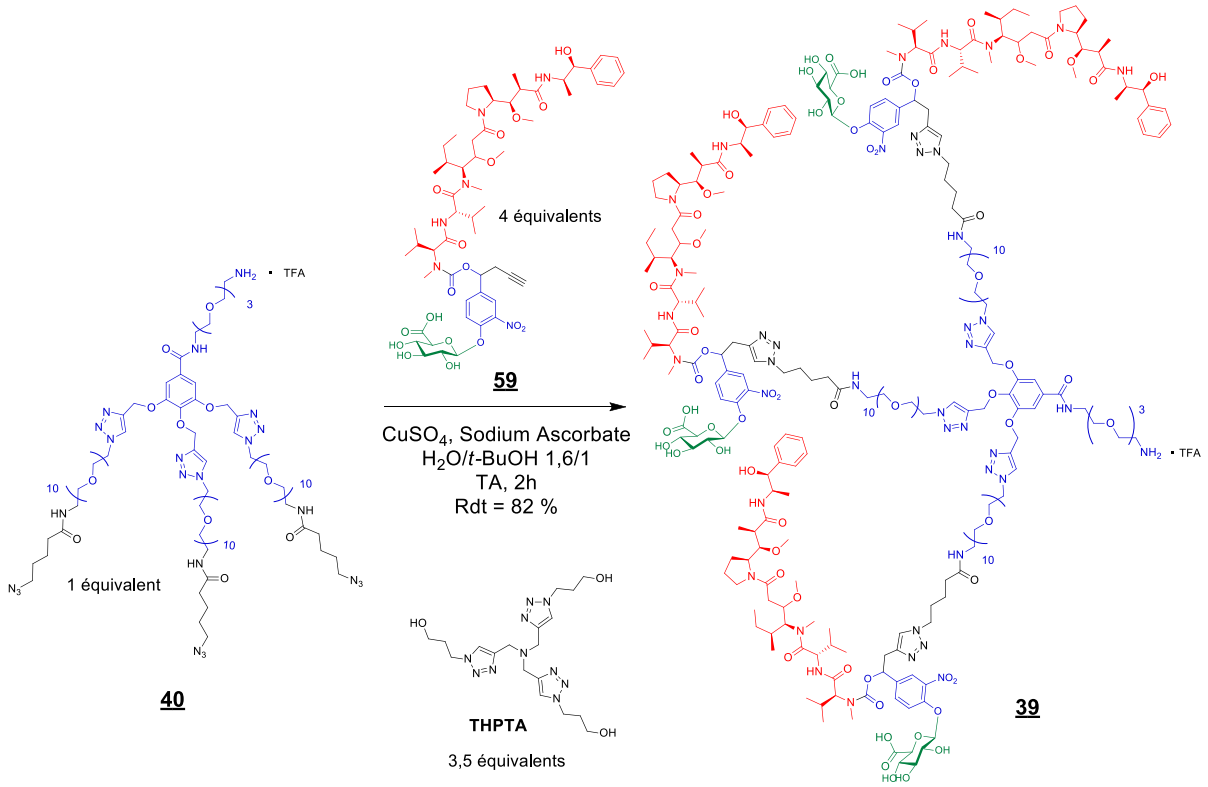


Figure 51 : Triple réaction de cycloaddition [3+2] pour la formation du tris-triazole 39.

[205] X. Chen, G. N. Khairallah, R. A. J. O'Hair, S. J. Williams, *Tetrahedron Letters*, **2011**, 52, 2750 - 2753.

Dans ces conditions, la formation du produit secondaire **60** n'est plus observée dans le milieu réactionnel (Figure 46-D). La complexation préférentielle du cuivre par le THPTA permet donc de réduire son interaction avec les triazoles du trimère **39** et d'inhiber la formation des phénols **60**. Le composé **39** est obtenu avec un rendement de 82 % après purification par chromatographie en phase inverse. Une analyse HRMS permet de confirmer la formation du *tris*-triazole **39** avec une masse moléculaire de 5793,0484 Da ($[M+H]^+$). (Figure 52)

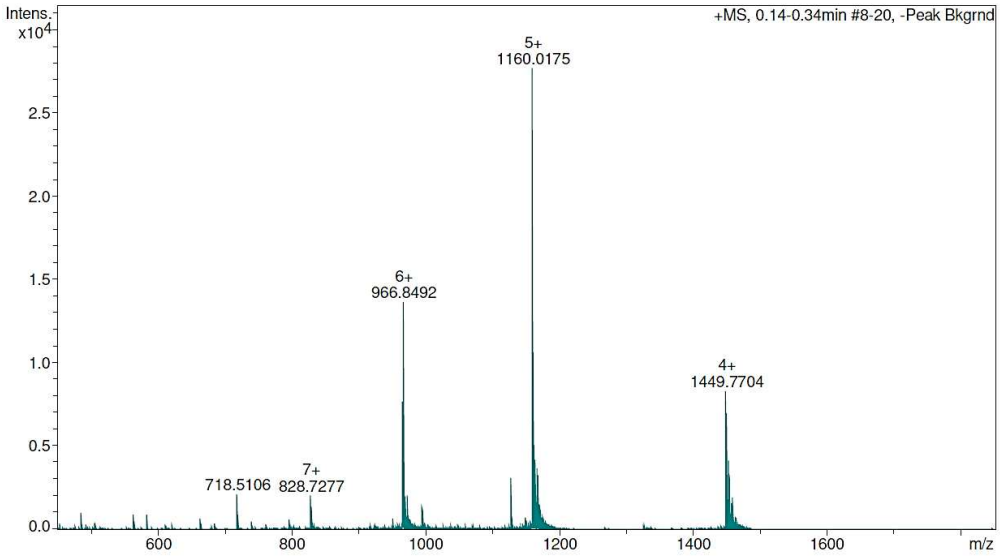


Figure 52 : Spectre HRMS du tris-triazole 39.

Enfin l'introduction du motif maléimide est réalisée par réaction entre l'amine du trimère **39** et l'ester de *N*-hydroxysuccinimide **63**. Ce dernier a été préparé en deux étapes successives à partir de l'anhydride maléique commercial selon une méthode décrite dans la littérature (Figure 53).[206] L'ouverture de l'anhydride cyclique par l'acide 6-aminohexanoïque conduit tout d'abord au diacide **62**. Ce dernier est ensuite mis en présence de NHS et d'EDC.HCl à 35°C afin d'obtenir le composé **63** avec un rendement de 63% sur deux étapes. La formation du maléimide **63** a été confirmée par analyse RMN ^{1}H. 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.

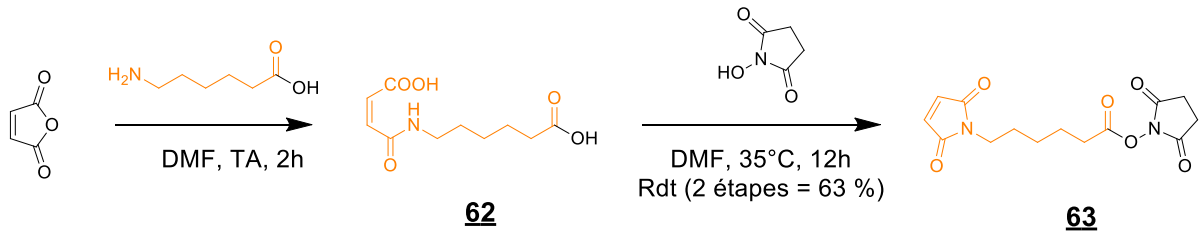


Figure 53 : Synthèse du maléimide 63.

La réaction d'addition nucléophile de l'amine du trimère **39** sur l'ester de *N*-hydroxysuccinimide **63** est réalisée dans le diméthylsulfoxyde en présence de triéthylamine. Le vecteur trimérique **37** est

[206] H. Y. Song, M. H. Ngai, Z. Y. Song, P. A. MacAry, J. Hobley, M. J. Lear, *Org. Biomol. Chem*., **2009**, 7, 3400 - 3406.

obtenu après une purification par chromatographie en phase inverse avec un rendement de 98 %. (Figure 54)

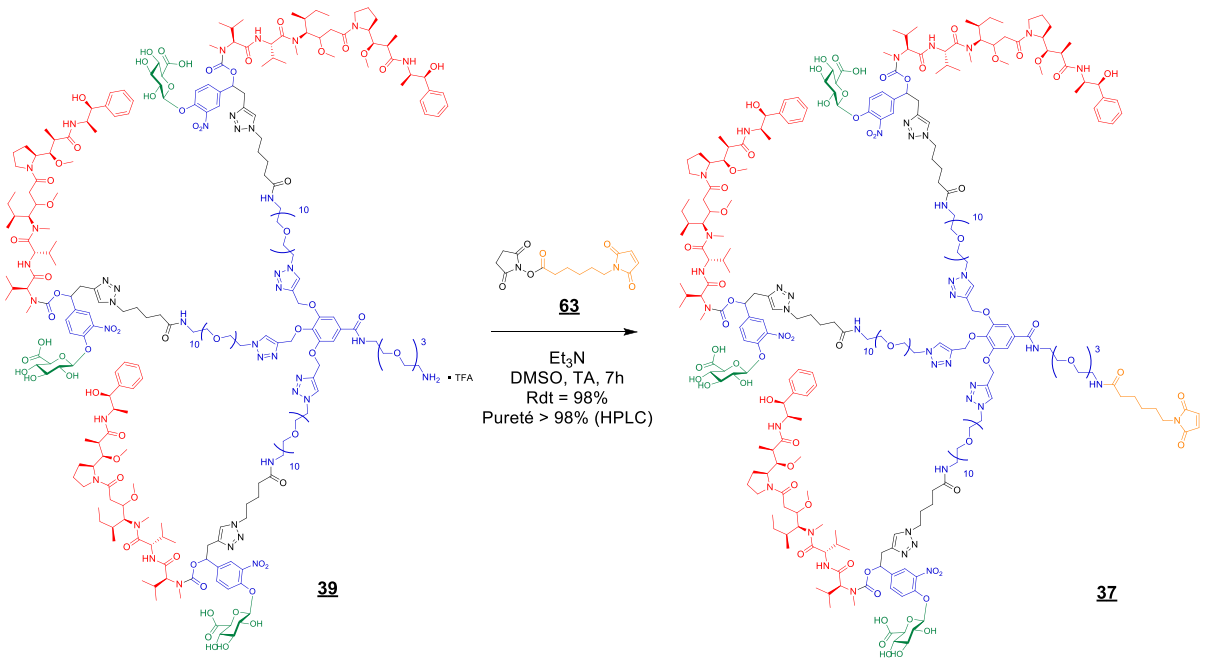


*Figure 54 : Synthèse du vecteur trimérique **37**.*

L'introduction du motif maléimide est confirmée en RMN ^{1}H par la présence d'un singulet à 6,79 ppm intégrant pour deux protons, caractéristique du maléimide. Une analyse HRMS confirme la formation du vecteur **37** d'une masse moléculaire de 5986.1215 Da ($[M+H]^{+}$) (Figure 55-A). L'HPLC du produit après purification indique une pureté supérieure à 98 % satisfaisante pour son évaluation biologique. (Figure 55-B)

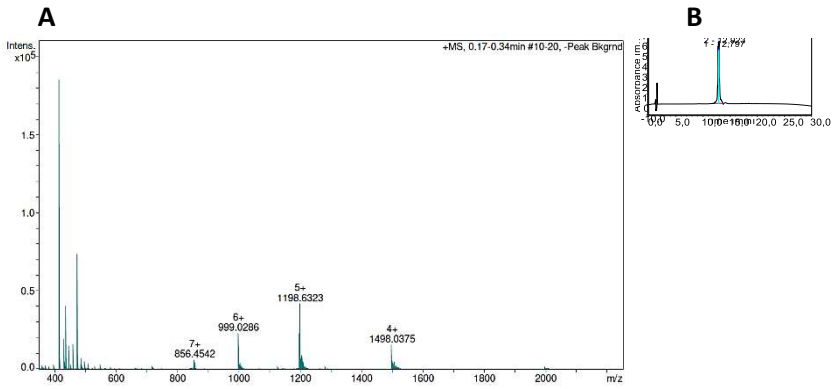


*Figure 55 : Analyses par HRMS (A) et HPLC (B) du vecteur trimérique **37**.*

Le vecteur glucuronylé trimérique de la MMAE **37** est obtenu après 8 étapes, à partir de l'acide gallique commercial, avec un rendement global de 27 %.

3 Evaluation biologique du vecteur trimérique 37

3.1 Evaluation préliminaire

Tout d'abord, nous avons étudié la réaction d'addition de Michael du thiol de l'albumine sur le motif maléimide du vecteur trimérique **37** (Figure 56). Cette étape étant cruciale au bon fonctionnement de la stratégie de vectorisation, il est nécessaire de s'assurer que le bioconjugué **38** se forme rapidement en présence d'albumine. En effet, cette réaction aura lieu *in fine* dans la circulation sanguine, où la réaction d'addition sera en compétition avec l'élimination rénale du vecteur **37**.

Le composé **37** (1 mg.mL^{-1}) a été incubé à 37 °C dans une solution aqueuse d'albumine humaine à 5 % (50 mg.mL^{-1}). L'évolution de la composition du mélange au cours du temps est suivie par HPLC. Dans ces conditions, on observe la disparition du vecteur **37** (tr = 12,6 minutes) et l'apparition d'un nouveau signal à 9,5 minutes correspondant au bioconjugué **38**. La formation de ce dernier est rapide et peut être détectée après seulement deux minutes d'incubation (Figure 56-B-c). Après 32 minutes, le vecteur **37** a totalement disparu au profit de la formation du bioconjugué **38** (Figure 56-B-d).

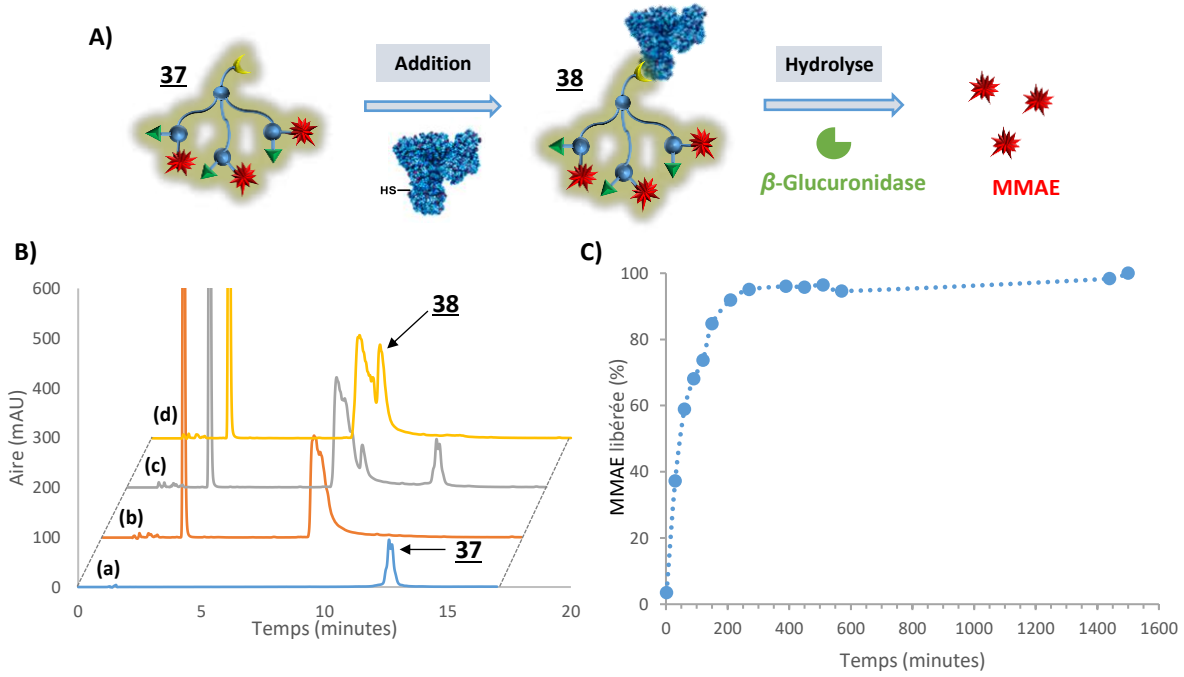


Figure 56 : A) Schéma réactionnel. B) Chromatogrammes HPLC de la ligation à l'albumine du vecteur 37 dans l'eau à 37 °C (a : Vecteur 37 ; b : Albumine ; c : analyse après 2 minutes d'incubation ; d : analyse après 32 minutes d'incubation). C) Libération de la MMAE en fonction du temps lors de l'hydrolyse enzymatique du vecteur macromoléculaire 38 par la β-glucuronidase (Escherichia Coli, 400 U.mL^{-1}) dans du tampon phosphate (0,02 M, pH = 7) à 37 °C.

Cette expérience montre que le maléimide est suffisamment éloigné des motifs auto-immolables, permettant ainsi à la réaction d'addition de Michaël de se dérouler avec une cinétique favorable. La sélectivité de la réaction de bioconjugaison a pu être déterminée grâce à la digestion trypsique du milieu réactionnel, suivie d'une analyse LC-MS/MS. On observe la présence du fragment de l'albumine ALVLIAFAQYLQQCPFEDHVK, contenant la cystéine 34, lié de manière covalente au vecteur trimérique. En effet, un signal correspondant au composé **64** avec un rapport m/z de

1204,06367 $[M+7H]^{7+}$ a pu être détecté (Figure 57). En conclusion, la formation du bioconjugué **38** résulte bien de l'addition de Michael entre le thiol de l'albumine et le maléimide du vecteur **37**.

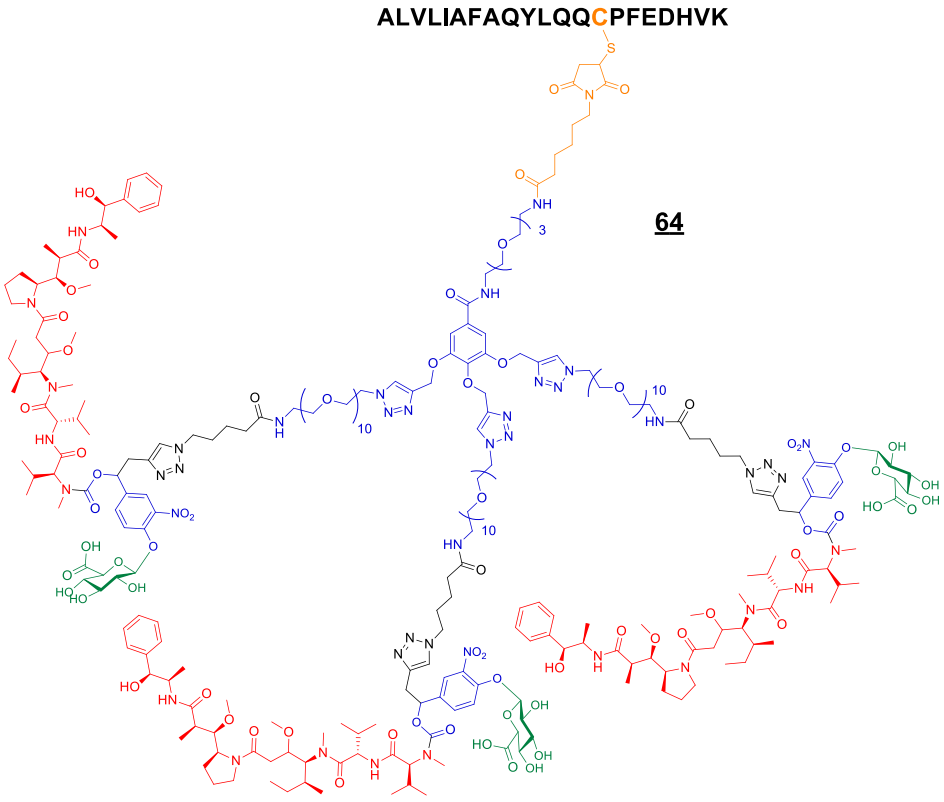


Figure 57 : Structure du fragment de l'albumine liée au vecteur 37.

La stabilité, ainsi que la capacité du vecteur macromoléculaire **38** à libérer la MMAE en présence de β-glucuronidase ont ensuite été étudiées. En effet, il est nécessaire que la libération du principe actif s'effectue sélectivement au niveau du microenvironnement tumoral sous l'action de l'enzyme pour éviter la destruction anarchique de cellules saines.

Pour cela, le vecteur macromoléculaire **38** a été incubé pendant 3 jours dans l'eau à 37 °C. Lors de cette expérience, le vecteur **38** est parfaitement stable et aucune libération de MMAE n'a été mise en évidence. Il est également important de noter que la réaction de rétro-Michael n'est pas observée dans ces conditions. Ce résultat indique que le bioconjugué formé est stable et ne conduit pas à la déconjugaison incontrôlée du vecteur trimérique **37**.

Après la ligation à l'albumine, l'hydrolyse enzymatique des gâchettes glucuronylées a été étudiée. La vitesse de libération de la MMAE sous l'effet de la β-glucuronidase est un paramètre important pour permettre de confiner son activité cytotoxique au niveau du microenvironnement tumoral. Le bioconjugué **38** a été placé en solution dans du tampon phosphate (0,02 M, pH = 7) à 37 °C en présence de β-glucuronidase (E. Colis, 400 U/mL). La libération de MMAE a alors été suivie par LC-MS (Figure 56-C). Après 30 minutes d'incubation avec l'enzyme, 37 % de la MMAE a été libérée et la réaction est totale après 3h30. Ainsi, grâce à l'espacement apporté par les chaines PEG, la présence de l'albumine ne semble pas avoir un impact stérique délétère pour la reconnaissance des glucuronides par la β-glucuronidase.

La libération totale de la MMAE a été mise en évidence grâce à la digestion trypsique du milieu réactionnel à l'issue de la réaction d'hydrolyse enzymatique. En effet, l'analyse LC-MS/MS de ce dernier a permis de montrer la présence du fragment de l'albumine lié de manière covalente à la plateforme moléculaire **65** résultant du clivage des trois glucuronides (m/z 944,47999 $[M+6H]^{6+}$) (Figure 58). Cela permet de conclure que la totalité des glucuronides sont substrats de l'enzyme et que son action conduit à la libération totale de la MMAE dans ces conditions.

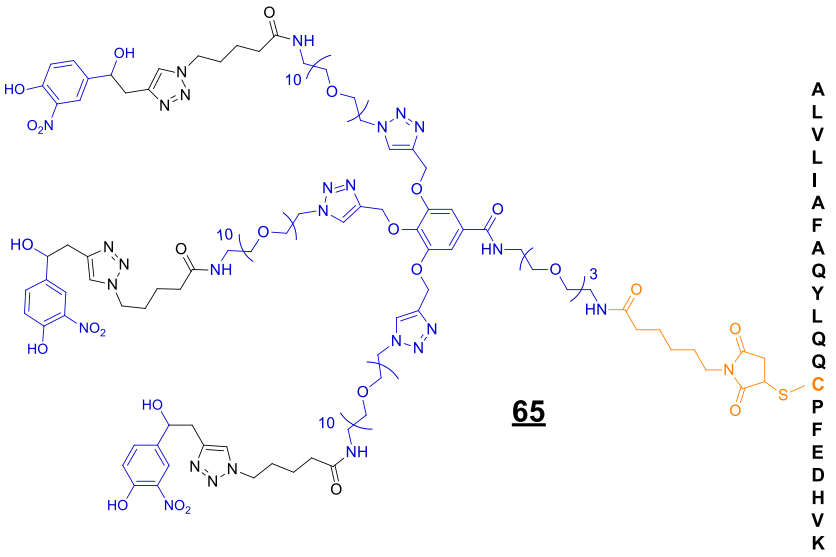


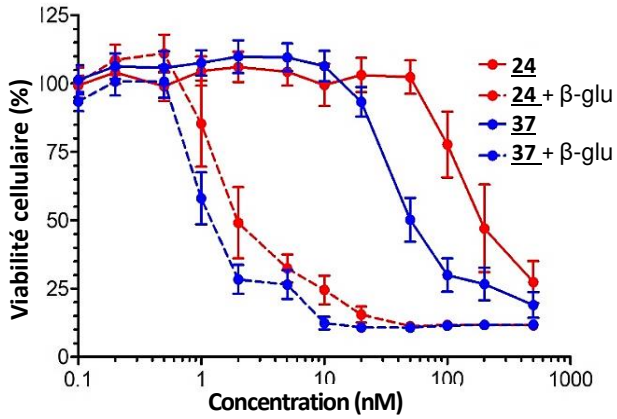
Figure 58 : Structure du fragment de l'albumine liée au vecteur 37 résultant de la libération de la MMAE.

En conclusion, le vecteur trimérique **37** est capable de se lier de manière covalente avec l'albumine humaine. Le vecteur macromoléculaire **38** formé est stable dans les conditions physiologiques de pH et de température. La libération de la MMAE n'est effectuée qu'en présence de β-glucuronidase. Ces résultats prometteurs nous ont conduits à poursuivre l'évaluation du vecteur **37** dans les milieux biologiques.

3.2 Evaluation de l'activité antiprolifératives du vecteur 37

3.2.1 Cytotoxicité sur des cultures cellulaires en 2 dimensions

L'activité antiproliférative du vecteur trimérique **37** a été évaluée sur la lignée tumorale humaine MIA PaCa-2 et comparée à celle du monomère **24**. Pour cela, les deux vecteurs ont été placés dans le milieu de culture en absence ou en présence de β-glucuronidase et la viabilité cellulaire a été mesurée après 72 heures d'incubation. (Figure 59)



Conditions d'incubation	IC_{50} (nM)
24	93,70 ± 7,70
24 + β-glucuronidase	3,27 ± 1 ,00
37	55,66 ± 6,36
37 + β-glucuronidase	1,32 ± 0,22

Figure 59 : IC_{50} des vecteurs 24 et 37 en présence ou absence de β-glucuronidase (β-glu) sur la lignée cellulaire MIA PaCa-2 mesurés après 72 heures d'incubation.

On constate que les glucuronides **24** et **37** possèdent un profil cytotoxique similaire. En effet, l'activité antiproliférative des vecteurs est augmentée de manière significative lorsqu'ils sont incubés en présence d'enzyme. Ce résultat démontre que la libération de la MMAE dans le milieu de culture est déclenchée par l'hydrolyse enzymatique des gâchettes glucuronylées.

Cependant, l'incubation du vecteur trimérique **37** avec la β-glucuronidase conduit à une activité antiproliférative supérieure à celle du monomère **24**. En effet, l'IC_{50} de **37** est 2,5 fois inférieure à celle de **24** (IC_{50} de 1,32 nM et 3,27 nM respectivement), ce qui est en accord avec la quantité de MMAE supplémentaire transportée.

Cette observation s'applique également lors de l'incubation des vecteurs en absence d'enzyme. En effet, le trimère **37** est 1,75 fois plus toxique que le monomère **24** avec une IC_{50} de 55,66 nM contre 93,70 nM respectivement. Ce résultat peut être également expliqué par la plus grande quantité de MMAE transportée par le vecteur **37**. Ainsi, l'internalisation d'une même quantité de vecteur par diffusion passive conduira, dans le cas de **37**, à la libération d'une quantité de MMAE supérieure lors de la dégradation lysosomale des vecteurs.

Néanmoins, le ratio de cytotoxicité observé en absence ou présence d'enzyme (QIC_{50})[207] est en faveur du vecteur trimérique **37**. En effet, il est de 42 pour ce dernier contre 28 pour le monomère **24**. Ainsi, le trimère **37** pourrait posséder une fenêtre thérapeutique supérieure à celle du monomère correspondant.

3.2.2 Cytotoxicité sur des cultures cellulaires en trois dimensions

L'activité de la MMAE sur les cultures cellulaires en deux dimensions peut être parfois insuffisante pour prédire l'efficacité d'un vecteur.[198] En effet, la MMAE déclenche l'anoïkose, qui est une mort cellulaire provoquée par la perte d'adhérence des cellules sur la matrice extracellulaire. Cependant, lorsque les cellules sont cultivées en deux dimensions, elles prolifèrent dans un milieu avec peu d'adhésion cellulaire. Elles sont donc moins sensibles à l'anoïkose, contrairement aux milieux de cultures en trois dimensions. Cette dernière méthode est donc mieux adaptée pour estimer l'efficacité

[207] L. F. Tietze, T. Herzig, T. Feuerstein, I. Schuberth, *Eur. J. Org. Chem*. **2002**, 10, 1634 - 1645.

thérapeutique des vecteurs de la MMAE. L'activité antiproliférative du vecteur trimérique **37** a donc été étudiée sur des cultures tridimensionnelles de cellules MIA PaCa-2 (Figure 60).

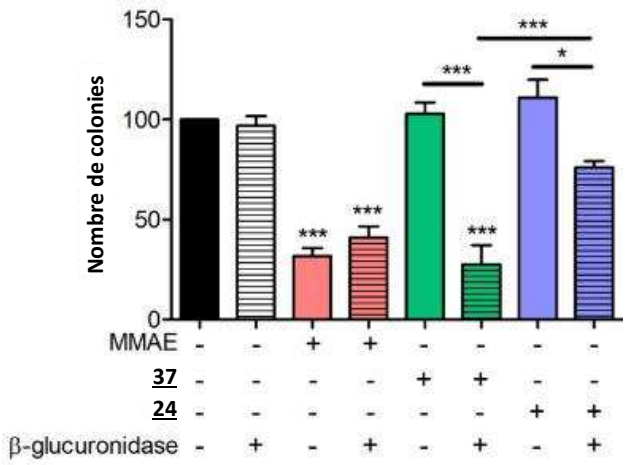


Figure 60 : Activité antiproliférative des vecteurs 37, 24 et de la MMAE après 6 jours d'incubation à 5 nM en absence ou présence de β-glucuronidase sur des cultures tridimensionnelles de cellules MIA PaCa-2. La quantification indique le nombre moyen de colonies ± SEM (n=5).

Pour cela, des colonies de cellules MIA PaCa-2 ont été incubées durant 6 jours en présence de de 5 nM de MMAE, **37** ou **24**. A cette concentration, la MMAE réduit le nombre de colonies en raison de sa cytotoxicité. En revanche, la même dose du vecteur **37** n'affecte pas la prolifération cellulaire, démontrant que ce dernier est significativement moins toxique que la MMAE libre. En revanche, son incubation en présence β-glucuronidase réduit fortement le nombre de colonies, attestant de la libération enzymatique de la MMAE. Une observation similaire peut être faite lors de l'incubation du vecteur monomérique **24**. Cependant, lorsqu'il est placé en présence de β-glucuronidase, ce dernier est significativement moins toxique que le trimère **37**. Cela démontre que le transport d'une plus grande quantité de MMAE au moyen du vecteur **37** contribue à l'augmentation de l'activité antiproliférative.

En conclusion, le vecteur trimérique **37** est capable de libérer efficacement la MMAE sous l'action de la β-glucuronidase dans des milieux biologiques complexes. En outre, il est plus efficace que son homologue monomérique **24** pour la destruction de cellules cancéreuses. Ainsi, l'augmentation du DAlbR devrait permettre d'accroitre le potentiel thérapeutique des vecteurs glucuronylés capables de se lier à l'albumine plasmatique.

3.3 Etudes *in vivo* du vecteur 37

3.3.1 Evaluation de la tolérabilité du vecteur trimérique 37

Dans un premier temps, nous avons évalué la toxicité aigüe du vecteur trimérique **37** chez la souris C57BL/6. Pour cela, quatre groupes de deux souris saines ont reçu une dose unique du vecteur **37** (4,32, 6,48, 9,72 et 12,96 $mg.kg^{-1}$) par voie intraveineuse dans la veine caudale puis l'évolution du poids des souris a été mesurée au cours du temps. (Figure 61)

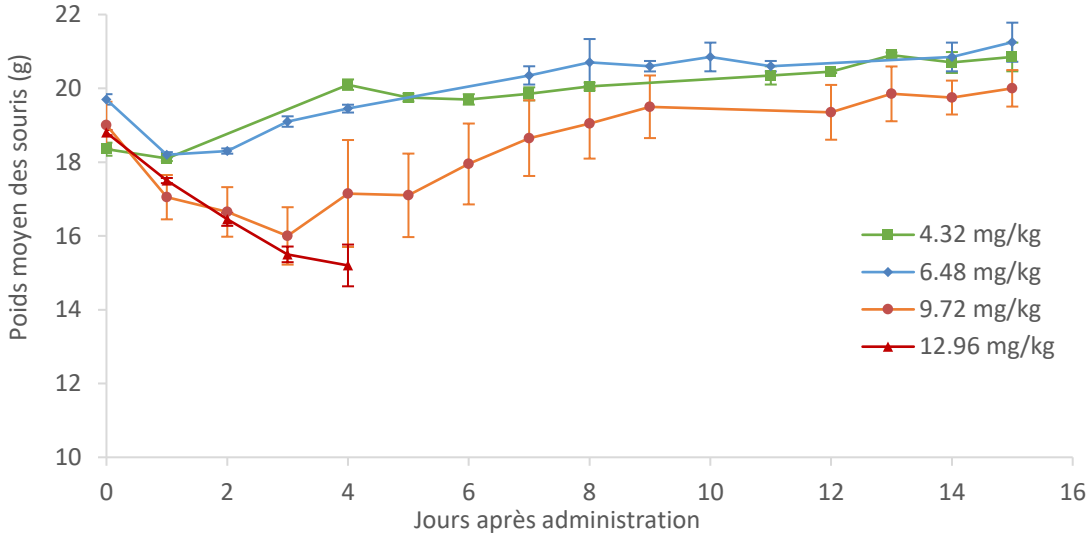


Figure 61 : Suivi du poids des souris C57BL/6 après administration I.V. du vecteur trimérique 37 à différentes doses. Chaque point montre la moyenne ± l'écart standard obtenue à partir de 2 souris.

Aux doses de 4,32 et 6,48 mg.kg^{-1}, le vecteur **37** est bien toléré puisqu'aucun signe majeur de toxicité n'est observé. La dose de 9,72 mg.kg^{-1} conduit quant à elle à une perte de poids non négligeable (< à 20 % du poids initial). On note cependant un retour rapide au poids initial quelques jours après l'administration du vecteur. En revanche, toutes les souris traitées avec 12,96 mg.kg^{-1} de **37** ont subi une perte de poids importante (> à 25 % du poids initial) et ont dû être euthanasiées. Au cours de cette expérience, la dose maximale tolérée du vecteur trimérique **37** est donc estimée à 9,72 mg.kg^{-1}. Cela correspond à une dose équivalente à 3,49 mg.kg^{-1} de MMAE, soit 7 fois la dose maximale tolérée de cette dernière (0,5 mg.kg^{-1}). [184]

La tolérabilité a également été évaluée chez la souris double transgénique HSA/hFcRn (obtenues chez genOway) exprimant naturellement à la fois le récepteur FcRn humain et l'albumine humaine.[208] La durée de circulation de l'albumine chez la souris (39 heures) est beaucoup plus courte que celle enregistrée chez l'Homme (19 jours). Ainsi, la toxicité de **37** chez la souris transgénique a été mesurée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, afin d'évaluer l'impact de la demi-vie de l'albumine sur les effets indésirables induits par les traitements. (Figure 62).

Au cours de cette expérience, aucune différence notable de toxicité n'a été enregistrée par rapport à celle réalisée chez les souris C57BL/6 non modifiées génétiquement. On peut conclure que la nature de l'albumine, et sa durée de circulation, n'a pas d'influence sur la toxicité aigüe du vecteur **37** chez la souris.

[208] D. Viuff, F. Antunes, L. Evans, J. Cameron, H. Dyrnesli, B. T. Ravn, M. Stougaard, K. Thiam, B. Andersen, S. Kjærulff, K. A. Howard, *Journal of Controlled Release*, **2016**, 223, 22 - 30.

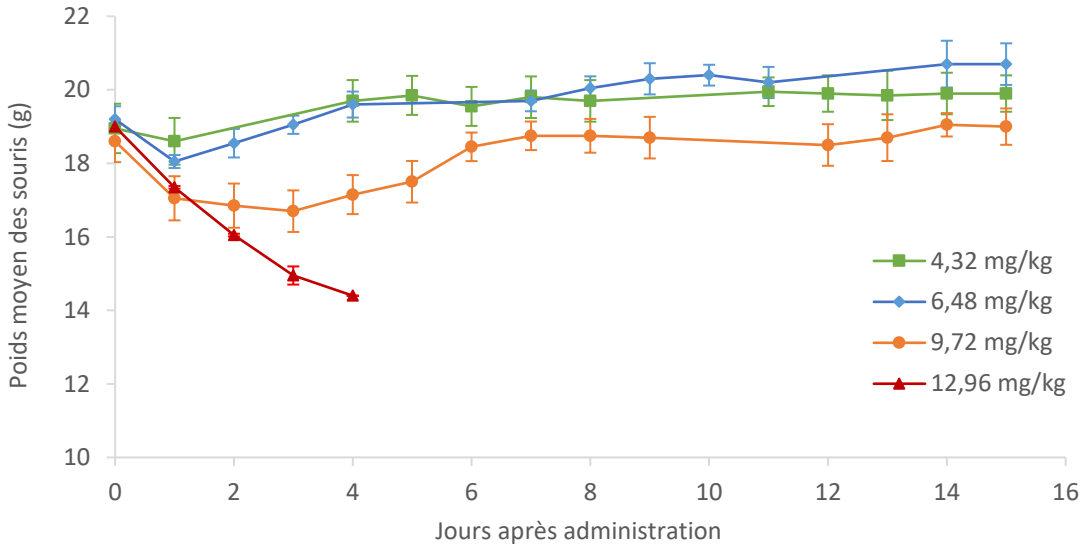


Figure 62 : Suivi du poids des souris transgéniques après administration I.V. du vecteur trimérique 37 à différentes doses. Chaque point montre la moyenne ± l'écart standard obtenue à partir de 2 souris.

Nous avons également réalisé une étude comparative de tolérabilité avec des injections répétées du vecteur **37** à la plus forte dose supportée de 9,72 mg.kg-1. Dans ce cas, les animaux, transgéniques ou non, ont subi quatre injections intraveineuses du vecteur **37** aux jours 0, 10, 20 et 30 du protocole expérimental et l'évolution de leur poids a été suivie au cours du temps. (Figure 63)

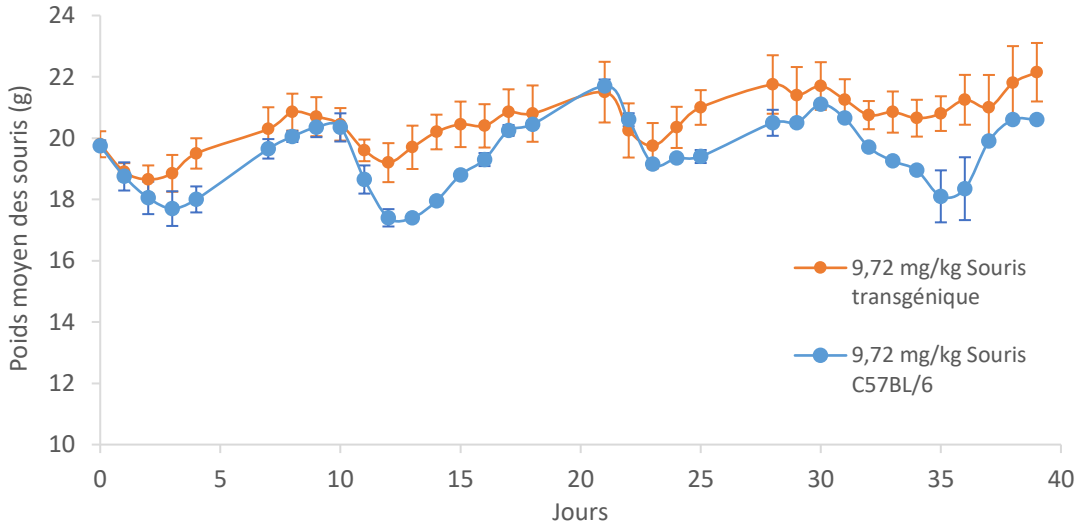


Figure 63 : Suivi pondéral des souris lors d'administrations multiples du vecteur trimérique 37 aux jours 0, 10, 20 et 30. Chaque point montre la moyenne ± l'écart standard obtenue à partir de 2 souris.

Les résultats obtenus montrent que l'administration répétée du vecteur **37** à une dose de 9,72 $mg.kg^{-1}$ est bien supportée malgré une perte de poids enregistrée (< à 20 %) les jours suivant chaque injection. Comme précédemment, on note un retour au poids initial quatre jours après chaque administration. Cependant, une des deux souris du groupe C57BL/6 a dû être euthanasiée après la 3ème dose en raison d'une perte de poids de plus de 25 % au jour 36. En comparant les valeurs moyennes des deux groupes, on remarque que les souris exprimant l'albumine humaine subissent moins les effets des traitements répétés, avec une perte de poids moins importante ainsi qu'une récupération plus rapide.

On peut donc émettre l'hypothèse qu'une durée de circulation plus élevée de l'albumine a un impact favorable sur la toxicité chronique du vecteur **37**. Ce résultat semble prometteur en vue d'une utilisation clinique.

3.3.2 Pharmacocinétique de 37 chez la souris

Une étude pharmacocinétique a ensuite été réalisée afin d'analyser l'évolution de la concentration plasmatique du vecteur **37** au cours du temps. Pour cela, des souris Swiss Webster mâles âgées de 8 semaines ont été sélectionnées. En effet, cette souche possède une masse corporelle plus importante que celle des autres lignées, ce qui rend le prélèvement de sang à des intervalles rapprochés plus favorable. Les souris ont été réparties en deux groupes de trois animaux et chaque groupe a reçu une injection de **37** à 4,32 $mg.kg^{-1}$ ou 6,48 $mg.kg^{-1}$. Des prélèvements de sang ont été effectués à 1, 4, 12, 24, 48, 120 et 168 heures après l'administration de **37** par voie intraveineuse.

La concentration plasmatique du vecteur **37** a été déterminée indirectement, à la suite de l'hydrolyse enzymatique des échantillons de plasma par la β-glucuronidase. La quantité de MMAE libérée est alors mesurée par LC-MS/MS et est directement proportionnelle à la concentration du vecteur **37**. Cette technique de quantification est la plus adaptée puisque le dosage direct de la concentration de **37** n'est pas possible. En effet, le complexe macromoléculaire **38** formé *in situ* ne serait pas séparable de l'albumine murine native présente en large excès. Ainsi, nous obtenons une courbe d'évolution de la concentration plasmatique de la MMAE en fonction du temps. (Figure 64)

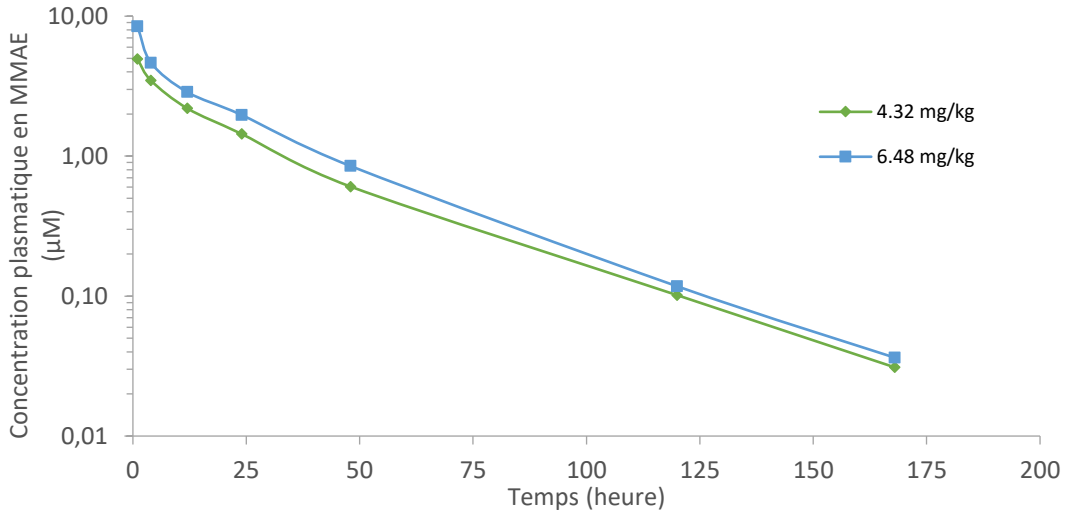


Figure 64 : Pharmacocinétique du vecteur trimérique 37 à 4,32 et 6,48 $mg.kg^{-1}$ chez la souris Swiss Webster mâle. Les prélèvements ont été effectués à 1, 4, 12, 24, 48, 120 et 168 heures après administration par voie intraveineuse.

Les courbes obtenues pour les deux doses de **37** sont similaires. Elles représentent une décroissance pluri-exponentielle classique d'une administration par voie intraveineuse. Les valeurs de concentration en MMAE une heure après l'injection dépendent de la dose administrée. Les aires sous la courbe (Area Under the Curve : AUC) sont elles aussi proportionnelles à la quantité de **37** administrée (Tableau 3). La pharmacocinétique de ce dernier est donc linéaire.

Tableau 3 : Paramètres pharmacocinétiques du vecteur 37 à 4,32 et 6,48 mg.kg-1 chez la souris Swiss Webster mâle.

Dose administrée	Cmax ($ng.mL^{-1}$)	Tmax (h)	AUCt ($h.ng.mL^{-1}$)	AUCinf ($h.ng.mL^{-1}$)	AUCextra (%)	Kel (h^{-1})
37 (4,32 $mg.kg^{-1}$)	3542,7	1	82917,76	83814	1,07	0,024
37 (6,48 $mg.kg^{-1}$)	6090,5	1	115250,5	116239	0,85	0,024

Cmax : Concentration maximale mesurée
Tmax : Temps auquel la concentration maximale a été mesurée
AUCt : Aire sous la courbe entre le premier et le dernier prélèvement, mesurée selon la méthode des trapèzes
AUCinf : Aire sous la courbe avec extrapolation à l'infini
AUCextra : Aire sous la courbe extrapolée entre le dernier prélèvement et l'infini
Kel : Constante d'élimination mesurée lors de la phase d'élimination

On constate que les courbes sont représentatives d'un modèle de distribution à deux compartiments. En effet, dans les premières heures qui suivent l'administration du vecteur **37**, une grande partie de la dose administrée est éliminée rapidement. Ainsi, lors de l'administration de ce dernier à 6,48 $mg.kg^{-1}$ une diminution de 45 % de la concentration plasmatique de MMAE est observée entre les prélèvements réalisés à une et quatre heures. Pour la dose à 4,32 $mg.kg^{-1}$ une diminution de 30 % est mesurée sur ce même intervalle. Cette diminution est représentative de la somme de la distribution de **37** dans l'organisme et de son élimination rénale.

Après cette phase de distribution, une seconde phase, d'élimination pure est observée 12 heures après l'administration de **37**. Cette dernière est caractérisée par la linéarité de la courbe de concentration en fonction du temps. Elle permet de déterminer la demi-vie plasmatique du vecteur **37** une fois lié à l'albumine. Ainsi, on obtient une valeur de $t_{1/2\,\beta}$ de 28 heures, comparable à celle des vecteurs de la MMAE qui ciblent l'albumine plasmatique tel que le composé **30** précédemment décrit ($t_{1/2\,\beta}$ de 28 heures, voir page 62). Cette valeur est cependant moins importante que celle de l'albumine murine native (39 heures). On peut alors supposer que la présence du vecteur **37** sur la cystéine 34 de l'albumine contribue à la diminution de l'interaction entre cette dernière et le FcRn. En effet, il a été démontré que la fonctionnalisation de l'albumine sur cette position pouvait défavoriser cette interaction.[209, 210, 211]

Néanmoins, cette durée de circulation plasmatique est considérablement supérieure à celle des vecteurs glucuronylés classiques comme **HMR 1826** ($t_{1/2\,\beta}$ = 9 minutes).[65] On peut alors conclure que la prise en charge du vecteur **37** par l'albumine dans le flux sanguin contribue à l'augmentation de sa demi-vie de circulation plasmatique. Sa pharmacocinétique est donc favorable à son utilisation dans le cadre d'une chimiothérapie anticancéreuse.

[209] Y. Leblanc, M. Berger, A. Seifert, N. Bihoreau, G. Chevreux, *Protein Science*. **2019**, 28, 1982 - 1992.
[210] S. S. Petersen, E. Kläning, M. F. Ebbesen, B. Andersen, J. Cameron, E. S. Sørensen, K. A. Howard, *Mol. Pharmaceutics*, **2016**, 13, 677 - 682.
[211] M. B Caspersen, M. Kuhlmann, K. Nicholls, M. J. Saxton, B. Andersen, K. Bunting, J. Cameron, K. A. Howard, *Ther. Deliv*., **2017**, 8, 511 - 519.

3.3.3 Evaluation de l'efficacité thérapeutique du vecteur 37

3.3.3.1 Efficacité du vecteur trimérique 37 comparée au monomère 24 sur un modèle de cancer du pancréas MIA PaCa-2

Dans le but de montrer l'effet du DAlbR sur l'activité antitumorale, une étude comparative entre le trimère **37** et le monomère **24** a été réalisée dans le cadre du traitement de tumeurs du pancréas MIA PaCa-2 implantées en orthotopique. Afin de pouvoir comparer l'efficacité thérapeutique de ces deux composés, nous avons choisi d'administrer le monomère **24** à une dose de 2 $mg.kg^{-1}$ (1,1 $\mu mol.kg^{-1}$, 0,77 $mg.kg^{-1}$ en MMAE). En effet, cette dose ne suffit pas pour provoquer une diminution totale de la masse tumorale, mais produit une inhibition significative de la croissance de la tumeur. Dans ces conditions, le bénéfice potentiel apporté par l'augmentation du DAlbR pourra être mesuré.

Trois doses du trimère **37** ont été sélectionnées : 2,16 $mg.kg^{-1}$ (0,35 $\mu mol.kg^{-1}$, 0,77 $mg.kg^{-1}$ en MMAE), 4,32 $mg.kg^{-1}$ (0,7 $\mu mol.kg^{-1}$, 1,55 $mg.kg^{-1}$ en MMAE) et 6,48 $mg.kg^{-1}$ (1,1 $\mu mol.kg^{-1}$, 2,33 $mg.kg^{-1}$ en MMAE). La correspondance entre les doses de **37** et de **24** est indiquée dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Correspondance entre les doses du monomère 24 et du trimère 37 utilisées durant l'étude.

Doses du trimère 37			**Comparaison au monomère 24** (2 $mg.kg^{-1}$, 1,1 $\mu mol.kg^{-1}$, 0,77 $mg.kg^{-1}$ MMAE)	
Massique ($mg.kg^{-1}$)	Molaire ($\mu mol.kg^{-1}$)	MMAE véhiculée ($mg.kg^{-1}$)	Ratio **37**/**24** en MMAE	Ratio **37**/**24** molaire
2,16	0,35	0,77	1	0,33
4,32	0,7	1,55	2	0,66
6,48	1,1	2,33	3	1

Les vecteurs **37** et **24** ont été administrés aux animaux (n = 8 par groupe), par voie intraveineuse dans la veine caudale aux jours 37, 44, 50 et 64 après l'induction des tumeurs. L'évolution du volume tumoral a été suivie par échographie tridimensionnelle une fois par semaine. Le poids des souris a également été mesuré tout au long de l'étude afin d'évaluer l'apparition d'effets indésirables. (Figure 65)

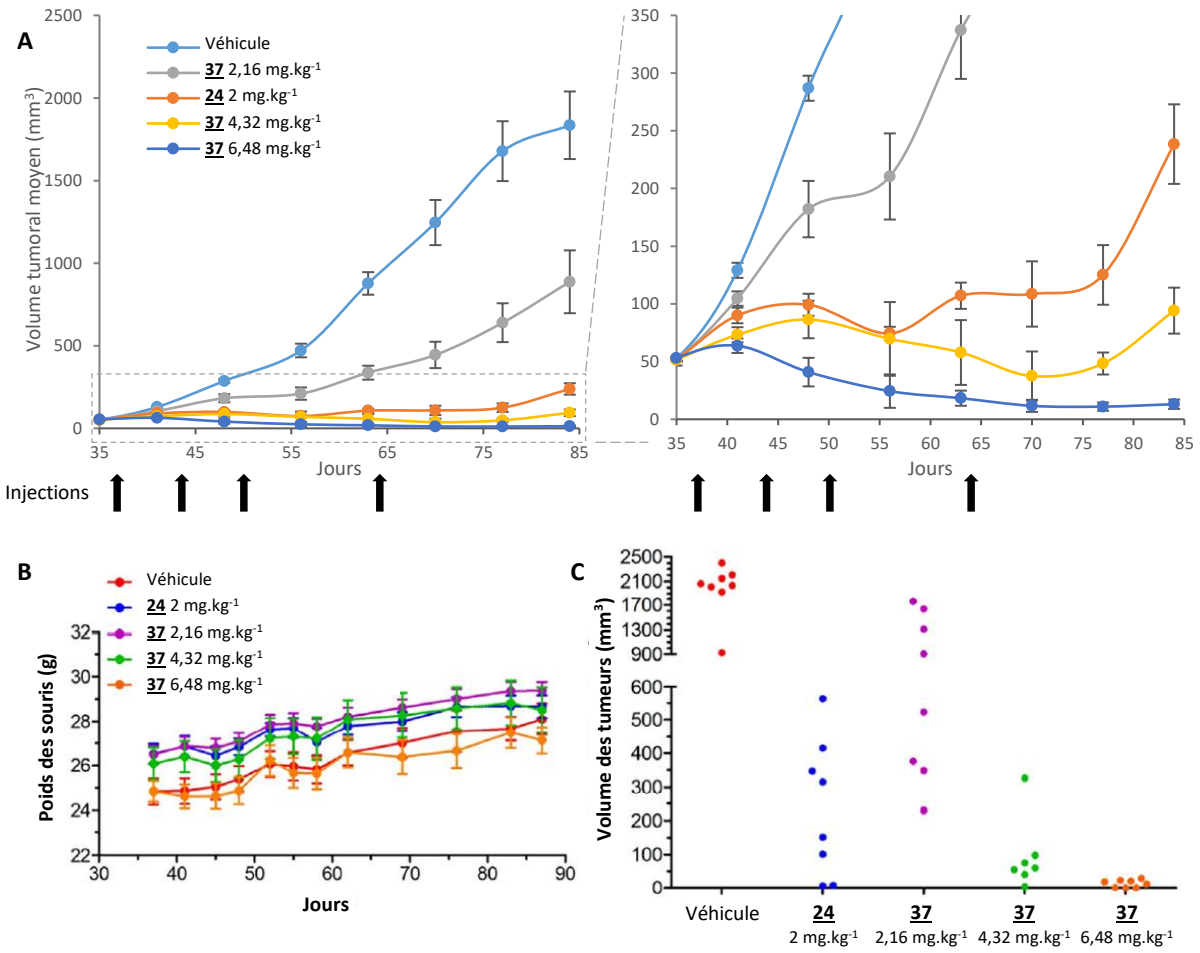


Figure 65 : (A) Efficacité thérapeutique du vecteur trimérique 37 comparée à celle du vecteur monomérique 24 pour le traitement de tumeurs MIA PaCa-2 orthotopique chez la souris (volume initial 50 mm³). Les composés ont été administrés aux jours 37, 44, 50 et 64. Chaque point correspond à la moyenne des volumes tumoraux ± SEM. (B) Poids moyens des souris traitées par 24 et 37. (C) Volumes des tumeurs prélevées au jour 84.

Le vecteur trimérique **37** est efficace à toutes les doses testées sans induire de perte de poids aux animaux. En outre, la réponse thérapeutique dépend de la dose administrée (Tableau 5). En effet, l'administration de **37** à 4,32 et 6,48 mg.kg^{-1} provoque une réduction du volume tumoral alors que la dose de 2,16 mg.kg^{-1} n'entraine qu'une inhibition de la croissance de la tumeur. De plus, l'effet antitumoral obtenu avec 6,48 mg.kg^{-1} est plus important et prolongé dans le temps qu'avec l'injection de 4,32 mg.kg^{-1} du vecteur **37**. Enfin, à la fin du protocole 3/8 souris traitées à 6,48 mg.kg^{-1} ne présentent plus de tumeur détectable contre 1/8 avec une dose de 4,32 mg.kg^{-1}.

Tableau 5 : Valeurs moyennes des volumes tumoraux au jour 84 et taux d'inhibition des différents traitements.

	Groupe				
	Véhicule	**24** (2 mg.kg^{-1})	**37** (2,16 mg.kg^{-1})	**37** (4,32 mg.kg^{-1})	**37** (6,48 mg.kg^{-1})
Volume tumoral moyen (mm³)	1834	238	887	94	13
Inhibition (% du groupe contrôle)	0	87	51	95	> 99

Le traitement avec le vecteur monomérique **24** conduit également à une forte inhibition de la croissance tumorale. Cependant, l'administration d'une quantité équimolaire du vecteur **37** (6,48 $mg.kg^{-1}$) produit une efficacité thérapeutique nettement supérieure à celle du glucuronide **24**. En effet, le volume moyen des tumeurs à la fin du protocole (jour 84) est 18 fois inférieur lorsque les animaux sont traités par le vecteur **37**.

De plus, l'administration de **37** à une dose sub-stœchiométrique (4,32 $mg.kg^{-1}$), par rapport à **24**, conduit également à une inhibition plus importante de la croissance tumorale. En effet, le volume tumoral moyen est 2,5 fois inférieur au jour 84. Cela démontre que le transport d'une quantité plus élevée de MMAE grâce à l'augmentation du DAlbR contribue à l'augmentation de l'activité anticancéreuse.

En revanche, lorsque ces deux vecteurs sont administrés à une dose équivalente en MMAE, une inhibition de la croissance tumorale moins importante est obtenue avec le vecteur **37** (2,16 $mg.kg^{-1}$, 0,35 $\mu mol.kg^{-1}$). A cette dose, la concentration plasmatique de ce dernier est trois fois moins importante que celle de **24**. Ce résultat semble indiquer que la concentration plasmatique en maléimide a une influence sur la réaction de ligation à l'albumine. Comme l'addition de Michael se déroule dans le flux sanguin, une diminution de la vitesse de réaction pourrait favoriser l'élimination rénale du vecteur et conduire à une réponse thérapeutique plus faible.

Il est à noter que l'augmentation du DAlbR semble induire une réponse antitumorale prolongée. En effet, lorsque les injections sont espacées de 14 jours (jours 50 et 64), les volumes tumoraux continuent à diminuer lors des traitements avec **37** à 4,32 $mg.kg^{-1}$ et 6,48 $mg.kg^{-1}$, alors que l'on observe une reprise de la croissance des tumeurs entre les deux administrations de **24**.

A l'issue de cette expérience, nous pouvons conclure que l'augmentation du DAlbR permet d'augmenter significativement l'efficacité thérapeutique des vecteurs glucuronylés qui ciblent l'albumine plasmatique. De plus, la possibilité d'espacer les administrations de 14 jours tout en conservant une activité anticancéreuse importante devrait permettre une réduction de la toxicité du traitement.

*3.3.3.2 Efficacité du vecteur trimérique **37** administré toutes les deux semaines sur un modèle de cancer du pancréas MIA PaCa-2*

Comme nous l'avons observé précédemment, le vecteur trimérique semble avoir une activité anticancéreuse prolongée. Afin de vérifier cette hypothèse, une seconde expérimentation animale a été réalisée sur le même modèle tumoral, en administrant le vecteur **37** aux animaux (n = 8 par groupe) à 2,16 $mg.kg^{-1}$ et 6,48 $mg.kg^{-1}$ tous les 14 jours.

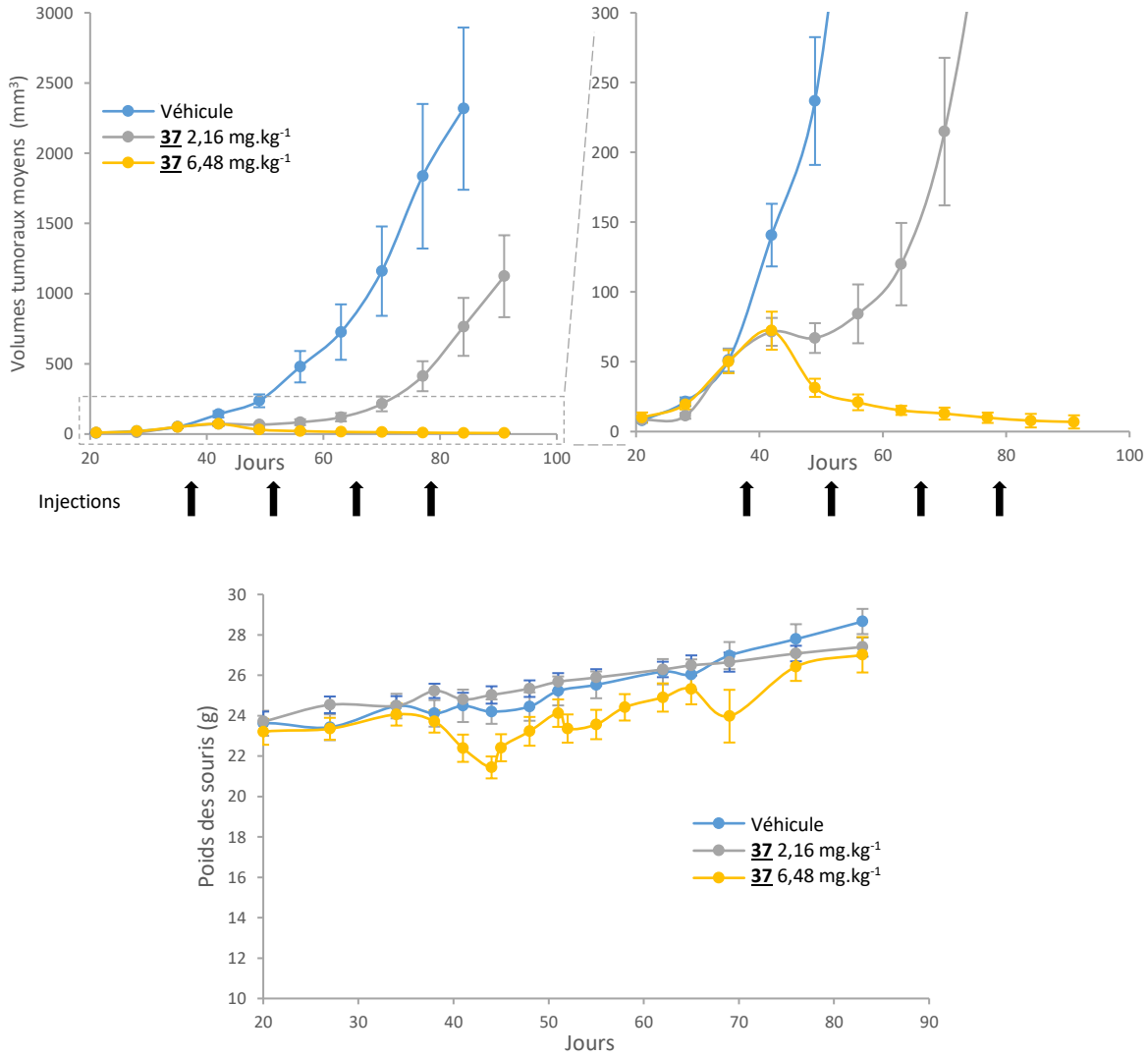


Figure 66 : Efficacité thérapeutique du vecteur trimérique 37 pour le traitement de tumeurs MIA PaCa-2 orthotopique chez la souris (volume initial 50 mm³). Le vecteur 37 a été administré aux jours 37, 51, 65 et 79. Chaque point correspond à la moyenne des volumes tumoraux ± SEM.

Dans ce cas, l'administration de **37** produit une réponse thérapeutique significative par rapport au groupe contrôle aux deux doses testées (Tableau 6). Une inhibition de la croissance des tumeurs est obtenue pour la dose de 2,16 mg.kg^{-1}. La dose de 6,48 mg.kg^{-1} conduit quant à elle, à une nette régression de la masse tumorale. On constate également qu'à cette dose, le volume tumoral continue de régresser tout au long de l'étude. Ce résultat indique que l'activité anticancéreuse est effectivement prolongée dans le temps même à l'issue de la première administration. A la fin du protocole (jour 91), 2/8 souris traitées avec **37** à 6,48 mg.kg^{-1} ne présentaient plus de tumeurs détectables.

Tableau 6 : Valeurs moyennes des volumes tumoraux au jour 84 et taux d'inhibition des différents traitements.

	Groupe		
	Véhicule	**37** (2,16 mg.kg^{-1})	**37** (6,48 mg.kg^{-1})
Volume tumoral moyen (mm^3)	2317	763	8
Inhibition (% du groupe contrôle)	0	67	>99

Cette étude démontre que l'augmentation du délai d'une à deux semaines entre les administrations du vecteur trimérique **37** n'a pas d'impact sur son efficacité thérapeutique. En effet, cette dernière est comparable à celle obtenue lors de l'expérience précédente malgré un espacement des doses de 14 jours. Ce schéma de traitement possède alors l'avantage de limiter la toxicité potentielle du vecteur **37** en laissant un temps de repos plus important entre chaque traitement.

Les très bons résultats obtenus lors des évaluations biologiques font du vecteur **37** un potentiel candidat médicament pour le traitement des cancers du pancréas. En effet, il n'y a actuellement aucun protocole thérapeutique efficace pour soigner cette pathologie maligne dont le taux de de mortalité à cinq ans suivant le diagnostic est de 95 %. En revanche, la stratégie de synthèse du vecteur **37** à partir d'un mélange racémique du composé **55** génère six diastéréoisomères inséparables, difficilement compatible avec une utilisation clinique. En effet, dans ce cas il serait nécessaire d'étudier les profils thérapeutiques de chaque diastéréoisomère, aussi bien seuls qu'en mélange.

4 Synthèse et évaluation thérapeutique du vecteur trimérique diastéréopur 37-R et de deux analogues 72-R et 73-R.

4.1 Séparation du mélange racémique

Pour initier son transfert vers la clinique, un seul stéréoisomère du vecteur **37** a été synthétisé. Nous avons tout d'abord réalisé la séparation des deux énantiomères de l'espaceur central **55** par chromatographie chirale (Figure 67-A). Dans un premier temps, une étude analytique par HPLC chirale a été mise en œuvre afin de trouver les conditions optimales de séparation des deux énantiomères. Ainsi, une élution à 25 °C avec un gradient linéaire d'un mélange *n*-hexane/éthanol (90/10 à 60/40 sur 60 minutes, débit 1 $mL.min^{-1}$) avec une colonne Chiralpak AD-H (longueur 250 mm, diamètre interne 4,6 mm, taille de particules 5 µm) permet une excellente séparation des isomères **55-*(R)*** et **55-*(S)*** (tr = 15,4 minutes et tr = 24,4 minutes). (Figure 67-B)

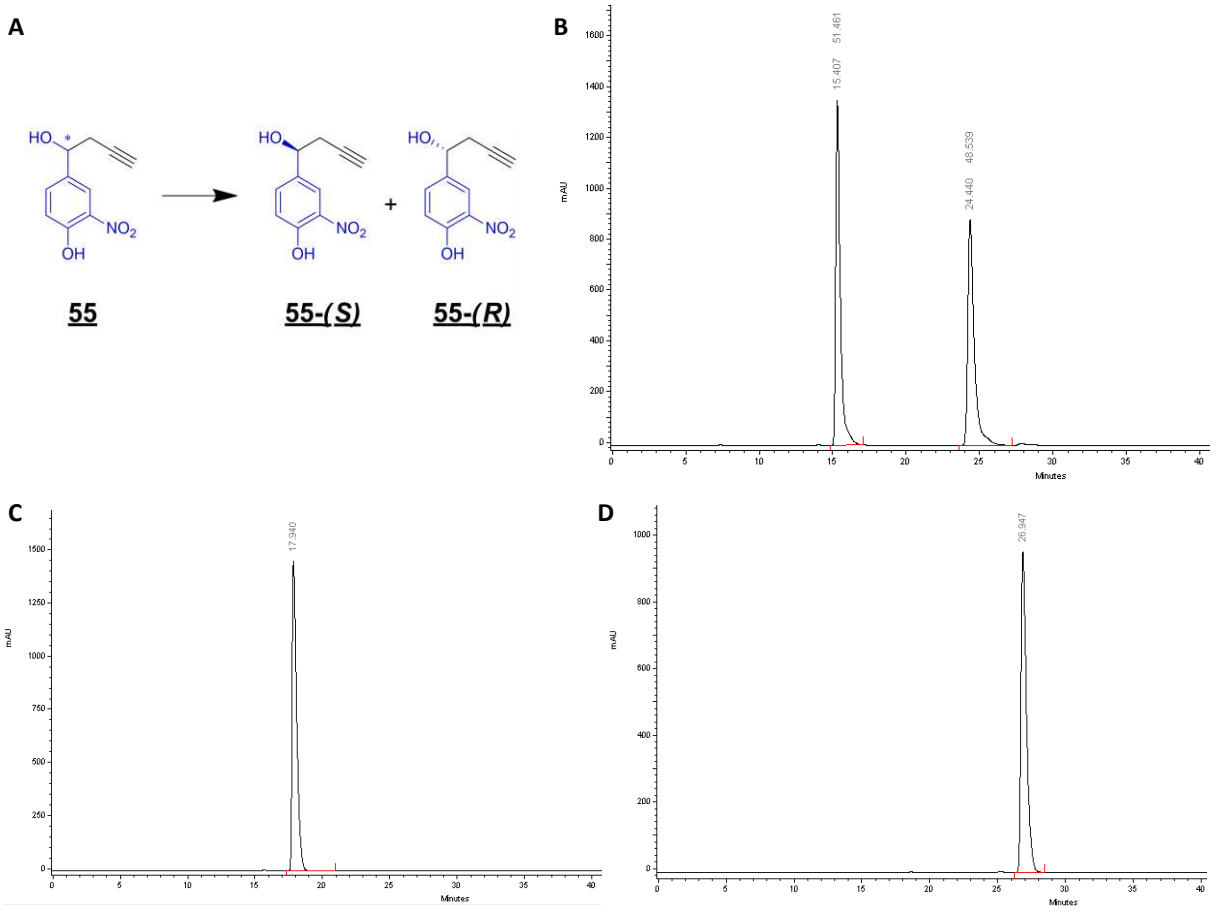


Figure 67 : Séparation des énantiomères 55-(R) et 55-(S).

La séparation du mélange racémique a ensuite été réalisé par chromatographie flash en utilisant une cartouche chirale (Chiral IA 20 µm) avec une élution isocratique optimisée (*n*-hexane/éthanol 95/5, débit 20 mL.min^{-1}). Ces conditions permettent d'obtenir les composés énantiopurs **55-*(R)*** ($[\alpha]_D^{20}$ = + 44,7°, tr = 17,9 minutes, Figure 67-C) et **55-*(S)*** ($[\alpha]_D^{20}$ = - 50,7°, tr = 26,9 minutes, Figure 67-D).

Cependant, ces derniers se présentent sous la forme d'une huile qui ne permet pas la détermination de leur configuration absolue par diffraction des rayons X. Nous avons donc décidé de dérivatiser la fonction phénol de **55-*(S)*** et **55-*(R)*** sous la forme d'esters de para-nitrophényle. Pour cela, chaque énantiomère a été mis en présence du chlorure de 4-nitrobenzyle **66** et de triéthylamine dans le THF à 0 °C (Figure 68). Les esters **67-*(S)*** et **67-*(R)*** ont alors été obtenus après 30 minutes de réaction avec des rendements de 61 % et 60 % respectivement. La réaction est chimiosélective puisque seule la fonction phénol est estérifiée. En effet, le pKa plus acide de ce dernier permet sa déprotonation sélective par la triéthylamine générant un phénolate plus nucléophile que l'alcool secondaire. La structure a été confirmée par la disparition du signal correspondant au phénol à 10,48 ppm en RMN ^{1}H.

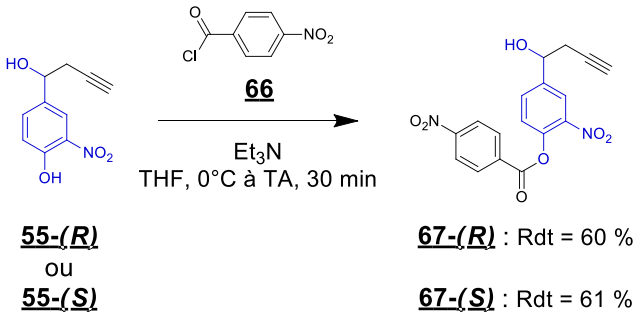


Figure 68 : Dérivatisation des phénols 55-(R) et 55-(S).

L'analyse par diffraction des rayons X des cristaux obtenus (voir partie expérimentale) a permis d'attribuer une configuration *R* pour l'énantiomère avec un temps de rétention de 17,9 minutes et une configuration *S* à celui possédant un temps de rétention de 26,9 minutes.

4.2 Synthèse des composés diastéréoisomériquement purs 37-R et 37-S

La préparation des glucuronides déprotégés diastéréoisomériquement purs **59-S** et **59-R** a été réalisée par deux chercheurs du laboratoire (Alexandra Bordes et Yvain Gérard) selon le protocole utilisé précédemment en série racémique. (Figure 69)

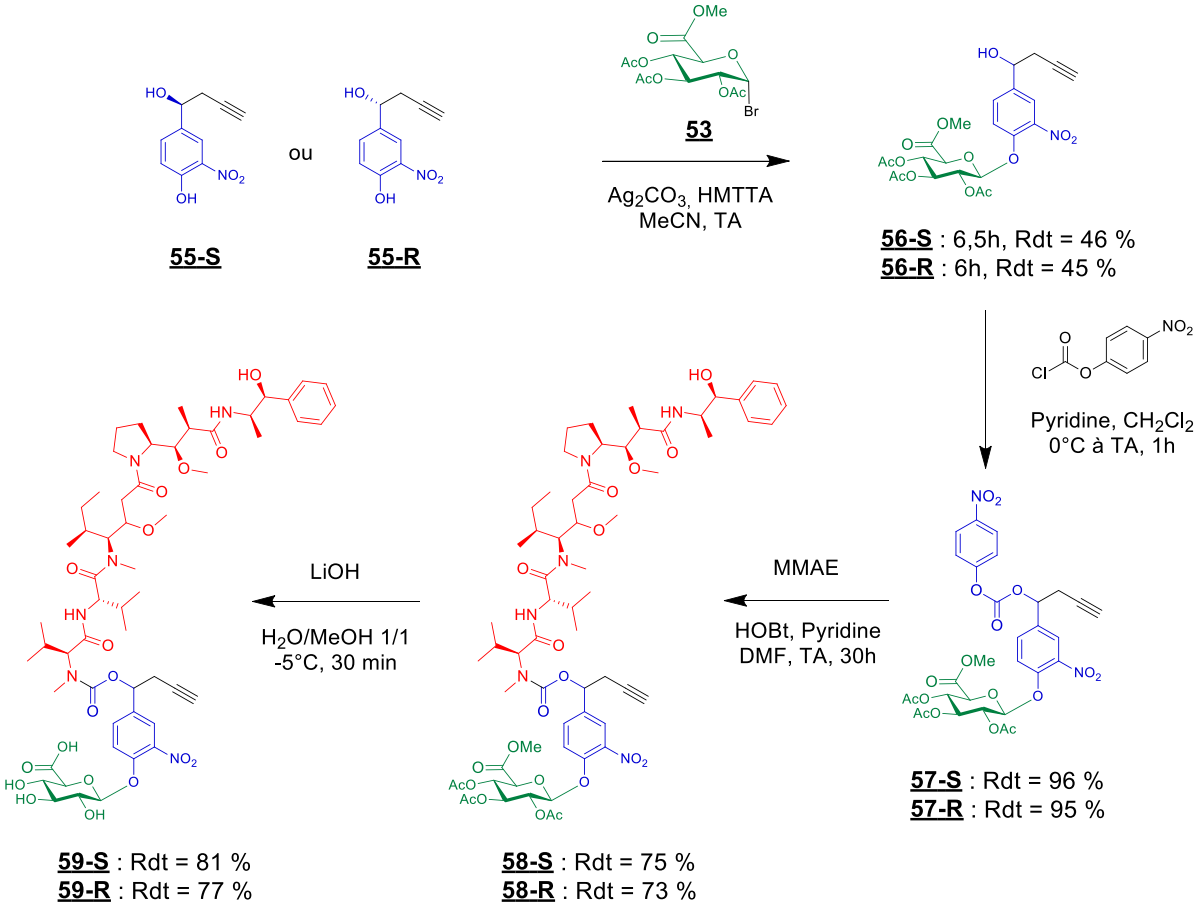


Figure 69 : Synthèse des deux diastéréoisomères 59-R et 59-S.

Ensuite, la triple réaction de cycloaddition entre les composés **59-R** ou **59-S** et le triazoture **40** permet d'obtenir respectivement les trimères **39-R** (67 %) et **39-S** (85 %). Enfin, le maléimide est introduit, ce qui permet d'obtenir les vecteurs **37-R** (76%) et **37-S** (82%) (Figure 70).

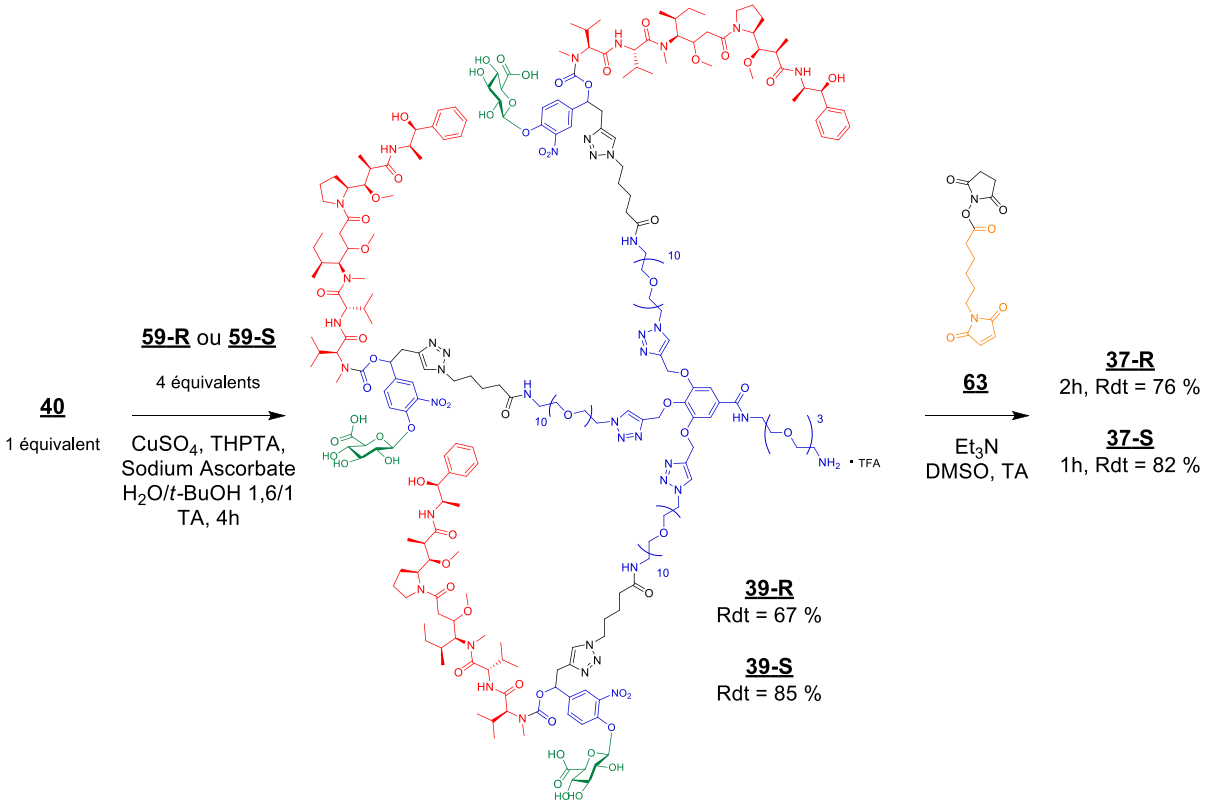


Figure 70 : Synthèse des deux diastéréoisomères 37-R et 37-S.

Afin de déterminer quel diastéréoisomère sera conservé pour poursuivre le développement du vecteur **37**, nous avons réalisé un test d'hydrolyse enzymatique avec les deux composés **37-R** et **37-S**. En effet, la configuration du centre asymétrique pourrait avoir un impact sur la reconnaissance des glucuronides par la β-glucuronidase conduisant à une modification de la cinétique de la réaction enzymatique.

Ainsi, les vecteurs **37-R** et **37-S** ont été placés en présence d'une solution d'albumine humaine afin d'obtenir les vecteurs macromoléculaires correspondant **38-R** et **38-S**. Ces derniers ont ensuite été incubés dans du tampon phosphate en présence de β-glucuronidase et la quantité de MMAE libérée a été mesurée au cours du temps par HPLC-MS (Figure 71).

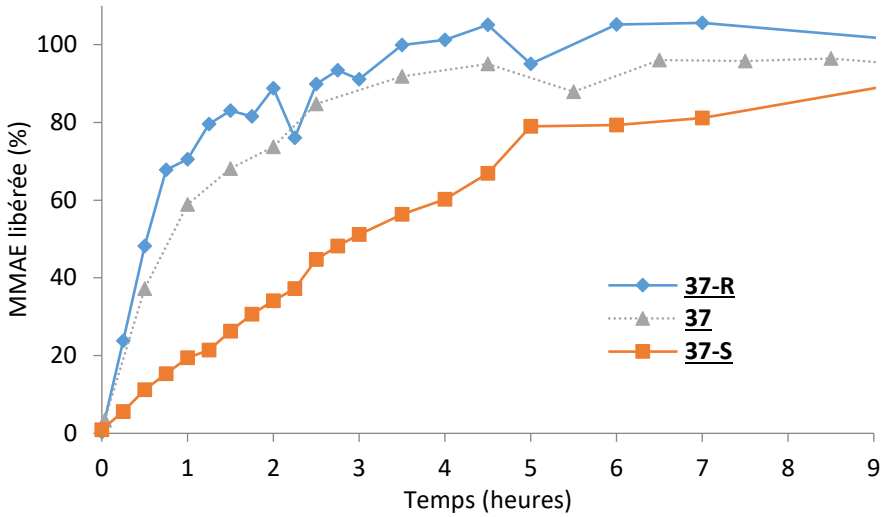


Figure 71 : Hydrolyses enzymatiques des vecteurs 37-R et 37-S comparées à celle de 37.

Les résultats obtenus montrent que le diastéréoisomère **37-R** conduit à la libération totale de la MMAE en 3,5 heures. En revanche, pendant la même durée d'incubation, seulement 56 % de la MMAE est libérée par le diastéréoisomère **37-S**. De plus, la vitesse initiale est considérablement réduite dans le cas de **37-S** avec 5 % de MMAE libérée après 15 minutes de réaction, contre 37 % pour **37-R**. Lorsque l'on compare ces données avec celles obtenues en utilisant le mélange de diastéréoisomères **37**, on observe que ce dernier conduit à une vitesse de libération intermédiaire à celle des deux composés diastéréoisomériquement purs.

Les résultats de cette expérience indiquent que le centre stéréogène en position benzylique de l'espaceur auto-immolable a une influence sur la cinétique de libération du principe actif. Ainsi, la structure tridimensionnelle du composé **37-S** pourrait réduire la vitesse d'hydrolyse des glucuronides par la β-glucuronidase en défavorisant son approche au niveau du site actif de l'enzyme. Pour la suite du développement du vecteur **37**, nous avons sélectionné le composé **37-R** qui conduit à la libération la plus rapide de la MMAE.

4.3 Modification de la nature du maléimide

4.3.1 Stabilité des maléimides en conditions physiologiques

La fonction maléimide est un motif important de cette stratégie de vectorisation. Cette dernière est un élément clé puisqu'elle permet la prise en charge du vecteur par l'albumine plasmatique directement dans le flux sanguin. Elle doit donc présenter une cinétique de réaction élevée avec le thiol de la protéine afin de favoriser la réaction d'addition. Cette caractéristique a déjà été étudiée par le passé par le groupe de Félix Kratz démontrant le bénéfice de l'utilisation d'un maléimide possédant une chaine carbonée constituée de 5 méthylènes reliant la fonction carbonyle au maléimide. En effet, cette longueur de chaine permet une réactivité optimale puisqu'elle correspond à la profondeur de la cavité de la protéine dans laquelle se situe la cystéine 34.[168]

Il est à noter que la réaction d'addition n'est pas le seul paramètre important. La stabilité de la liaison thiosuccinimide doit aussi être élevée. En effet, la réaction de rétro-Michael peut diminuer la concentration plasmatique du vecteur conduisant à une plus faible efficacité thérapeutique. Cette dernière a été mise en évidence lors de l'incubation prolongée de conjugués médicaments-anticorps

dans des échantillons de sang. La déconjugaison spontanée des principes actifs a été observée via la diminution de leur DAR au cours du temps conduisant à une diminution de leur efficacité thérapeutique.[212]

Si nous n'avons pas mis en évidence un tel phénomène lors des études *in vitro* avec le vecteur **37**, il n'est pas à exclure que la réaction de rétro-Michael puisse avoir lieu dans le flux sanguin et ainsi réduire l'efficacité thérapeutique de **37**. De plus, lors de la circulation du vecteur macromoléculaire **38** dans l'organisme, de la MMAE pourrait être libérée de façon incontrôlée dans les tissus sains conduisant à l'apparition d'effets secondaires. En effet, si la réaction de rétro-Michael se déroule de manière intracellulaire, au moment du recyclage de l'albumine par le FcRn, la déconjugaison pourrait provoquer une toxicité envers les cellules saines.

Cependant, l'équilibre de la réaction d'addition de Michael est rompu lorsque le thiosuccinimide **A** est hydrolysé sous la forme d'un dérivé de l'acide succinamique **B** (Figure 72). La vitesse d'ouverture du cycle est dépendante de la nature du maléimide, notamment de la chaine carbonée liée à l'atome d'azote. Dans le cas du maléimide utilisé pour **37**, la demi-vie d'hydrolyse dans les conditions physiologiques est de 310 heures (Figure 73).

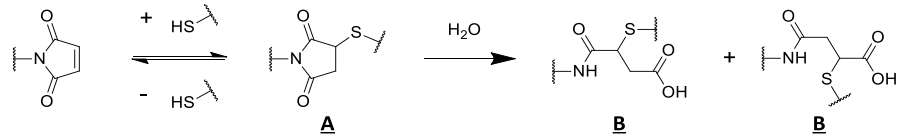


Figure 72 : Mécanismes hydrolytiques des maléimides.

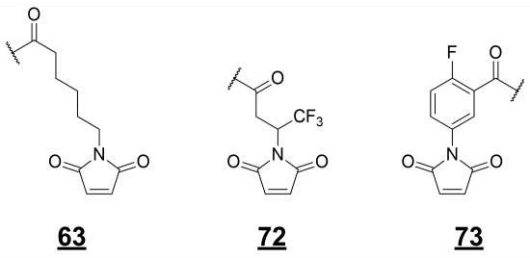
L'hydrolyse des thiosuccinimides a été étudiée dans la littérature pour former des bioconjugués plus stables dans les milieux biologiques.[213] En revanche, elle implique une étape supplémentaire post-conjugaison pour ouvrir l'hétérocycle, incompatible avec notre approche de ligation *in situ*.

Plusieurs maléimides ont été développés pour conduire spontanément et rapidement aux conjugués stables.[214] Une caractéristique particulièrement étudiée est l'introduction de groupements électroattracteurs (effet -I ou -M) à proximité de l'atome d'azote.[215, 216] Leur rôle est d'appauvrir électroniquement l'atome d'azote afin de favoriser l'addition d'une molécule d'eau sur le carboxyle adjacent. Ainsi, la cinétique d'ouverture du cycle sera augmentée réduisant *de facto* la réaction de rétro-Michael. Cette approche a été évaluée pour la préparation de conjugués médicaments-anticorps

[212] J. F. Ponte, X. Sun, N. C. Yoder, N. Fishkin, R. Laleau, J. Coccia, L. Lanieri, M. Bogalhas, L. Wang, S. Wilhelm, W. Widdison, J. Pinkas, T. A. Keating, R. Chari, H. K. Erickson, J. M. Lambert, *Bioconjugate Chem*., **2016**, 27, 1588 - 1598.
[213] L. N. Tumey, M. Charati, T. He, E. Sousa, D. Ma, X. Han, T. Clark, J. Casavant, F. Loganzo, F. Barletta, J. Lucas, E. I. Graziani, *Bioconjugate Chem*., **2014**, 25, 1871 - 1880.
[214] J. M. J. M. Ravasco, H. Faustino, A. Trindade, P. M. P. Gois, *Chem. Eur.* J., **2019**, 25, 43 - 59.
[215] S. D. Fontaine, R. Reid, L. Robinson, G. W. Ashley, D. V. Santi, *Bioconjugate Chem*. **2015**, 26, 145−152.
[216] E. Tobaldi, I. Dovgan, M. Mosser, J.-M. Becht, A. Wagner, *Org. Biomol. Chem*., **2017**, 15, 9305 - 9310.

stables.[217, 218, 219] L'augmentation de leur stabilité a alors favorisé le maintien du DAR des bioconjugués au cours de leur circulation plasmatique, procurant une meilleure efficacité thérapeutique.

Afin d'étudier l'impact de ces paramètres, les deux maléimide **72** et **73** ont été évalués. Le choix de ces derniers a été basé sur les données de la littérature concernant la vitesse d'hydrolyse du thiosuccinimide (Figure 73). Ces maléimides ont l'avantage de posséder une fonction carbonyle. Ils peuvent donc être fonctionnalisés sous la forme d'un ester de *N*-hydroxysuccinimide qui peut alors réagir avec le trimère **39-R** sans modifier notre stratégie de synthèse.



Composé	Hydrolyse thiosuccinimide ($t_{1/2}$ minutes)
63	18600 (37°C)[215]
72	182 (37°C)[215]
73	258 (22°C)[217] 42 (37°C)[217]

Figure 73 : Structure des maléimides 63, 72 et 73 et leurs caractéristiques.

4.3.2 Synthèse des deux analogues 74-R et 75-R

La formation des esters activés **72** et **73** a été réalisée en deux étapes successives selon un protocole identique (Figure 74). Les diacides carboxyliques **70** et **71** sont générés dans le DMF par réaction entre l'anhydride maléique et les aminoacides commerciaux **68** et **69** respectivement. Après une heure de réaction, le *N*-hydroxysuccinimide et l'agent de couplage EDC.HCl sont ajoutés au milieu réactionnel. Cette réaction permet d'obtenir les maléimides **72** et **73** avec des rendements respectifs de 62 et 54 % sur deux étapes, après purification par chromatographie flash. La formation des esters activés est confirmée par la présence d'un signal à 6,88 ppm (**72**) et 6,89 ppm (**73**) caractéristique du *N*-hydroxysuccinimide en RMN ^{1}H.

[217] R. Christie, R. Fleming, B. Bezabeh, R. Woods, S. Mao, J. Harper, A. Joseph, Q. Wang, Z.-Q. Xu, H. Wu, C. Gao, N. Dimasi, *J. Controll. Release*, **2015**, 220, 660 - 670.
[218] R. P. Lyon, J. R. Setter, T. D. Bovee, S. O. Doronina, J. H. Hunter, M. E. Anderson, C. L. Balasubramanian, S. M. Duniho, C. I. Leiske, F. Li, P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.*, **2014**, 32, 1059 - 1062.
[219] W. Viricel, G. Fournet, S. Beaumel, E. Perrial, S. Papot, C. Dumontet, B. Joseph, *Chem. Sci.*, **2019**, 10, 4048 - 4053.

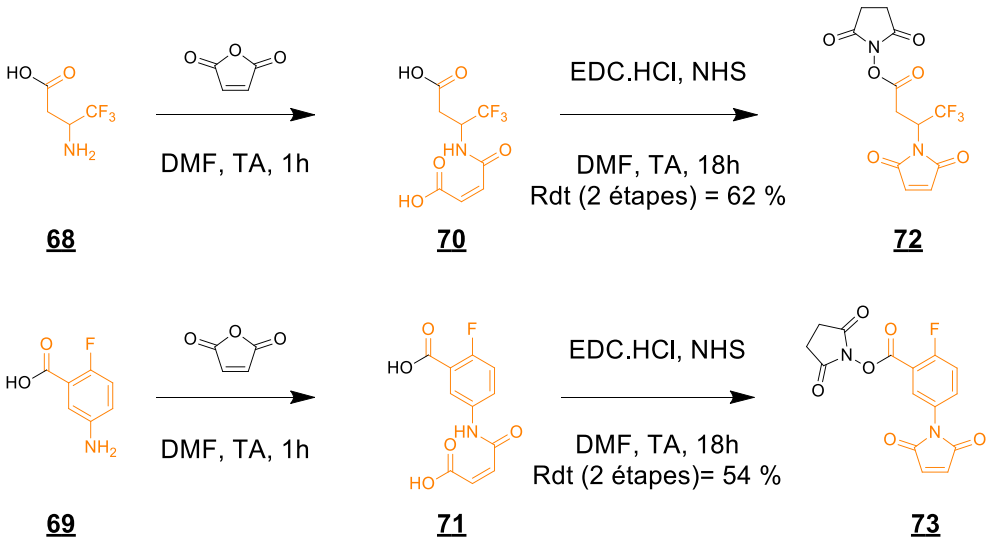


Figure 74 : Synthèse des maléimides 72 et 73.

La réaction entre les esters actifs **72** et **73** et le trimère **39-R** a été réalisée dans le DMSO en présence de triéthylamine (Figure 75). Après purification par chromatographie en phase inverse, les composés **74-R** et **75-R** sont obtenus avec un rendement de 60 et 48 % respectivement. Leur structure a été confirmée par HMRS (**74-R** : m/z 2026,6743 $[M+3Na]^{3+}$, m/z 1525,7564 $[M+4Na]^{4+}$; **75-R** m/z 1525,2611 $[M+4Na]^{4+}$, m/z 1224,8078 $[M+5Na]^{5+}$).

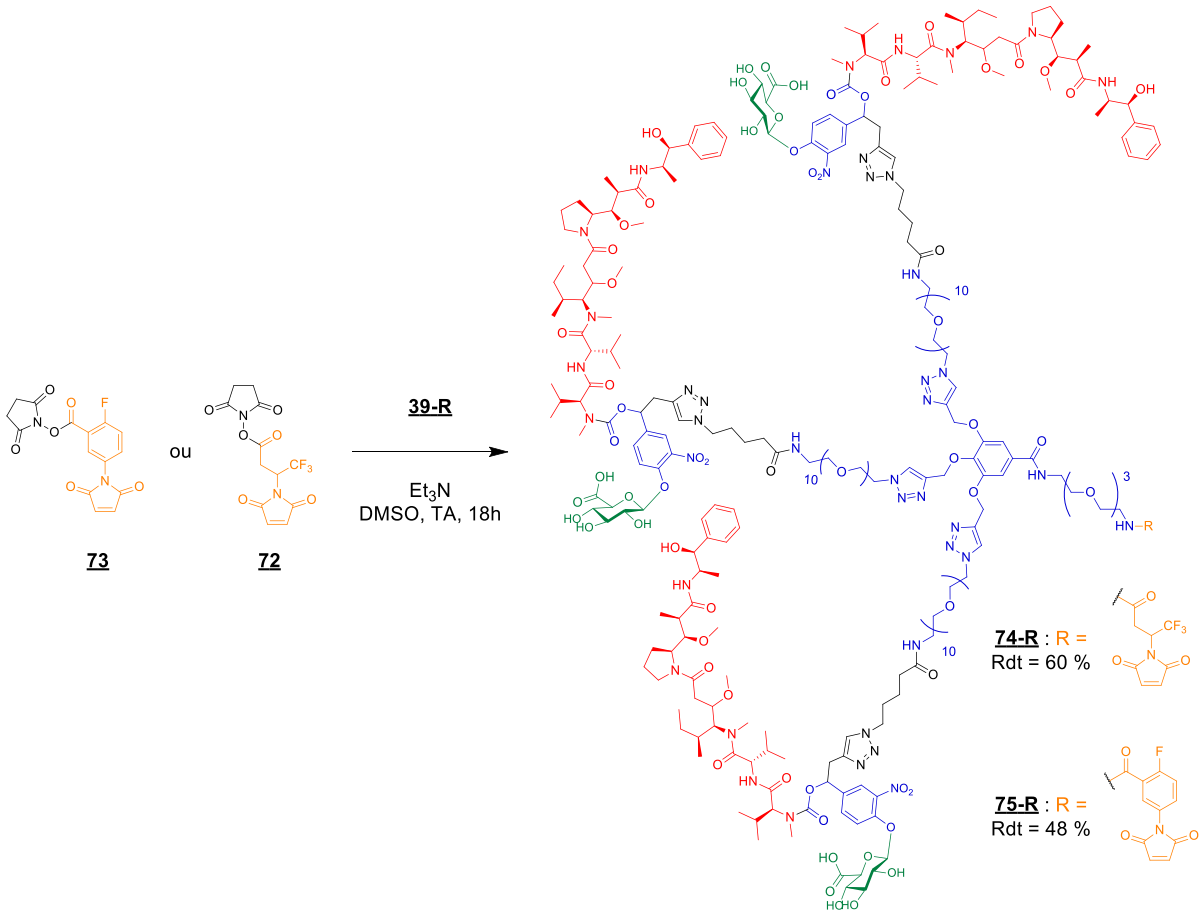


Figure 75 : Synthèse des deux vecteurs 74-R et 75-R.

4.3.3 Evaluations biologiques des vecteurs trimériques 37-R, 74-R et 75-R

4.3.3.1 Tolérabilité des vecteurs trimériques 37-R, 74-R et 75-R

Le potentiel bénéfice lié à la modification de la fonction maléimide sur la toxicité aigüe des vecteurs **37-R**, **74-R** et **75-R** a été évalué chez la souris. Pour cela, chaque composé a été administré à trois souris, par voie intraveineuse dans la veine caudale, à une dose de 9,72 et 12,96 mg.kg^{-1}. Ces doses ont été choisies puisqu'elles induisaient, dans le cas de **37**, une perte de poids importante après son administration. Le poids des souris a été mesuré quotidiennement durant cinq jours après l'administration des composés afin d'évaluer l'apparition de signes de toxicités. Une perte de poids supérieure à 10 % a été définie comme toxique pour cette expérience.

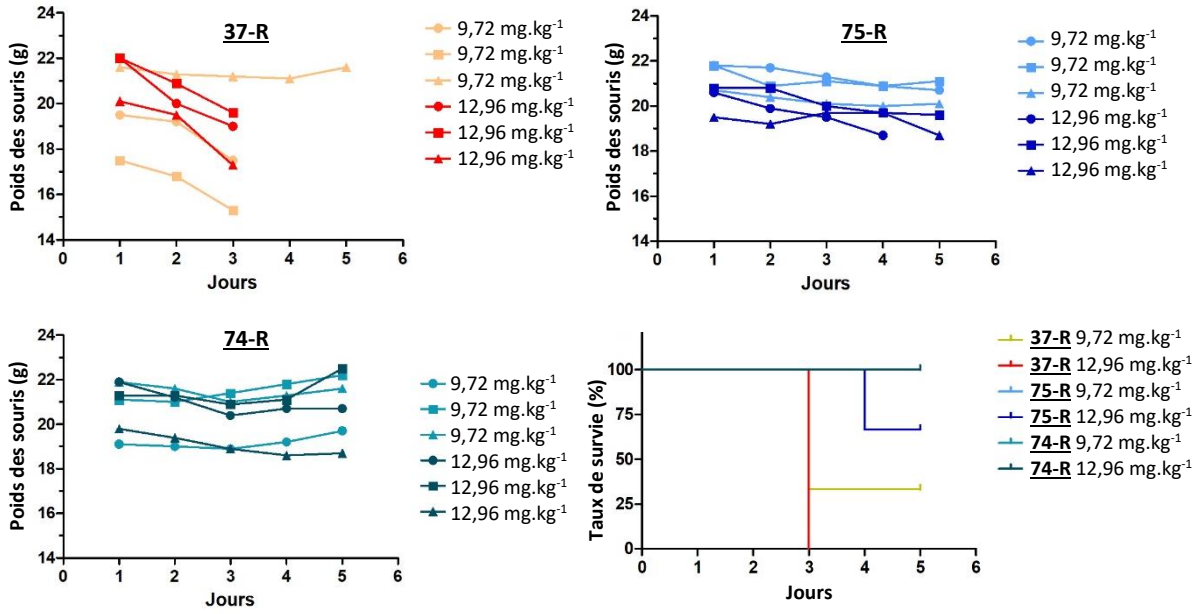


Figure 76 : Suivi pondéral individualisé et taux de survie des souris C57BL/6 après une administration I.V. unique des vecteurs trimériques 37-R, 74-R et 75-R à 9,72 et 12,96 mg.kg^{-1}.

Les résultats obtenus indiquent que la nature du maléimide a un impact sur la toxicité aigüe des vecteurs. En effet, la dose de **37-R** à 9,72 mg.kg^{-1} entraine une perte de poids supérieure à 10 % pour 2/3 souris. Son administration à 12,96 mg.kg^{-1} conduit à l'euthanasie de la totalité du groupe en raison de sa trop forte toxicité. En revanche, l'administration de **74-R** et **75-R** à 9,72 mg.kg^{-1} n'induit pas d'effets secondaires observables. A la dose de 12,96 mg.kg^{-1}, une perte de poids de 10 % n'est observée que pour 1/3 souris ayant reçu le vecteur **75-R** et le composé **74-R** est parfaitement bien supporté.

Les composés **74-R** et **75-R** permettent l'administration d'une quantité plus importante de MMAE que le vecteur **37-R** tout en réduisant considérablement l'apparition d'effets indésirables. Cette expérience semble indiquer que la stabilité de la liaison thioéther reliant les vecteurs et l'albumine plasmatique est un facteur prépondérant quant à la toxicité de cette approche thérapeutique.

Cependant, un autre phénomène pourrait également expliquer ce résultat. En effet, la présence de groupements électroattracteurs liés à l'atome d'azote du maléimide les rend plus susceptibles à l'hydrolyse. Cette réaction pourrait entrer en compétition avec la réaction d'addition de Michael dans le plasma (Figure 72). Or, l'acide maléamique **C** ne conduit pas au produit d'addition 1,4 **B** en présence de thiols. Ce phénomène risque donc de réduire le rendement de la réaction de conjugaison dans le

flux sanguin. Dans ce cas, l'élimination rénale des vecteurs serait accélérée, ce qui diminuerait considérablement leur toxicité mais aussi leur efficacité thérapeutique.

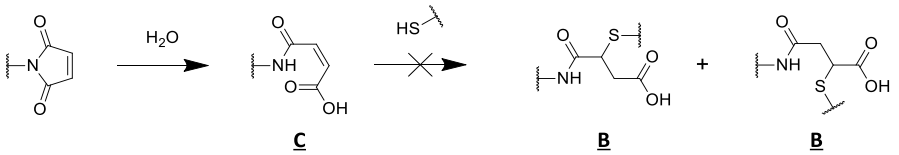


Figure 77 : Mécanisme hydrolytique des maléimides.

Ainsi, nous avons décidé de comparer la stabilité des maléimides de **37-R**, **74-R** et **75-R** en solution dans le tampon phosphate (pH 7,4) à 37°C (Figure 78).

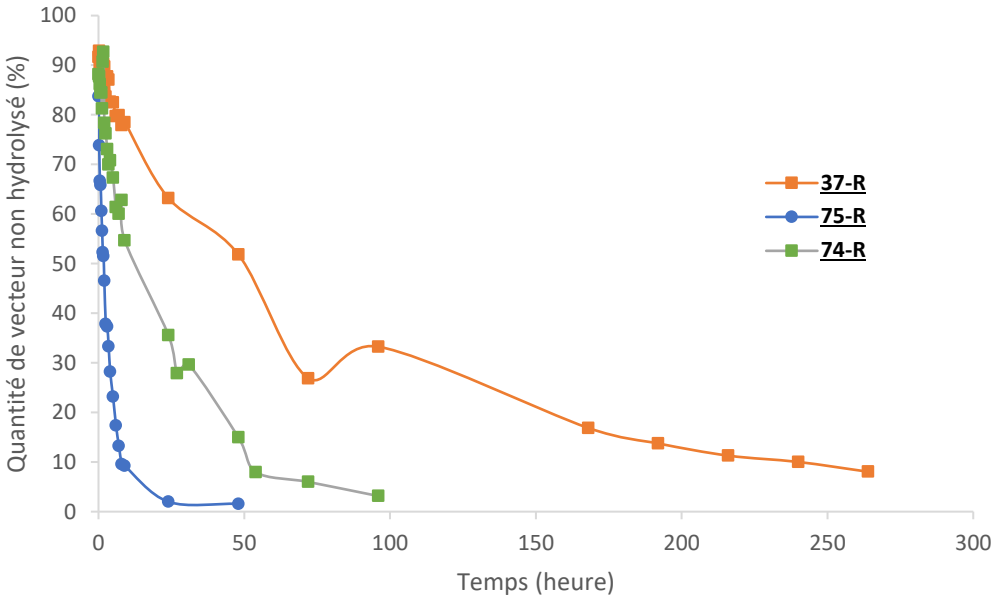


Figure 78 : Stabilité à l'hydrolyse aqueuse des maléimides des vecteurs 37-R, 74-R et 75-R dans le PBS pH 7,4 à 37°C.

Les résultats obtenus montrent que les trois maléimides présentent des cinétiques d'hydrolyse différentes. Les vecteurs **75-R**, **74-R** et **37-R** possèdent en effet des demi-vies de 2, 12 et 48 heures respectivement.

Ces données sont en corrélation avec les valeurs de stabilité des thiosuccinimides correspondants en solution aqueuse (Figure 73). En outre, la stabilité de l'ensemble des maléimides évalués lors de cette étude semble être suffisante pour assurer une ligation efficace des vecteurs **75-R**, **74-R** et **37-R** à l'albumine dans le flux sanguin.

4.3.3.2 Efficacité thérapeutique des vecteurs trimériques 37-R, 74-R et 75-R sur un modèle de cancer du sein MDA-MB-231

Afin d'évaluer si la diminution de la toxicité des vecteurs était accompagnée de la baisse de leur efficacité thérapeutique, nous avons évalué cette dernière sur un modèle de tumeur mammaire MDA-MB-231 implantées en orthotopique chez la souris. Pour cela, les vecteurs **37-R**, **74-R** et **75-R** ont été administrés trois fois, avec un délai de 14 jours comme étudié précédemment, à une dose de 1,1 µmol.kg^{-1} (équivalente à 6,48 mg.kg^{-1} du vecteur **37-R**). (Figure 79)

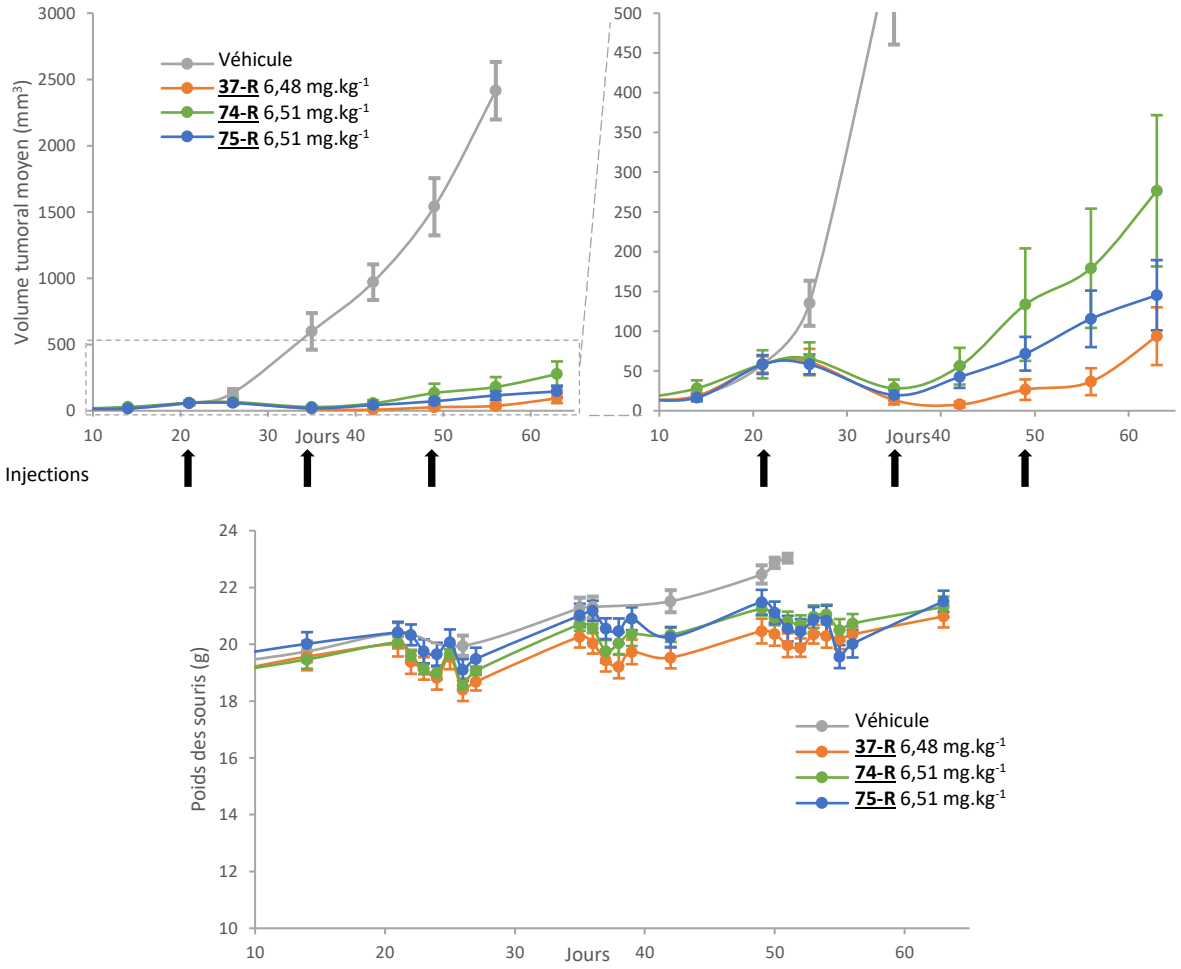


Figure 79 : Efficacité thérapeutique des vecteurs trimériques 37-R, 74-R et 75-R pour le traitement de tumeurs MDA-MB-231 orthotopique chez la souris (volume initial 58 mm³). Les vecteurs ont été administrés aux jours 21, 35 et 49. Chaque point correspond à la moyenne des volumes tumoraux ± SEM.

On constate alors que tous les composés ont une activité thérapeutique significative par rapport au groupe contrôle. En effet, une réduction de la masse tumorale est obtenue, pour tous les groupes, dès la première administration. De plus, à l'issue de la première injection, 2/6 souris traitées par le vecteur **37-R** ne présentaient plus de tumeurs à partir du jour 35. Une observation similaire a pu être faite avec le vecteur **75-R** conduisant à la régression totale et durable d'une tumeur.

Au jour 56, la totalité des animaux du groupe contrôle ont dû être euthanasiés en raison d'une masse tumorale trop importante. En revanche, aucune mortalité n'a été observée dans les groupes traités avec les vecteurs **37-R**, **74-R** et **75-R** jusqu'à la fin du protocole (jour 63). Ces derniers ont conduit à une forte inhibition de la croissance tumorale par rapport au groupe contrôle au jour 56. (Tableau 7)

Tableau 7 : Valeurs moyennes des volumes tumoraux au jour 56 et taux d'inhibition des différents traitements.

	Groupe			
	Véhicule	**74-R** (6,51 mg.kg^{-1})	**75-R** (6,51 mg.kg^{-1})	**37-R** (6,48 mg.kg^{-1})
Volume tumoral moyen (mm^3)	2415	179	115	36
Inhibition (% du groupe contrôle)	0	92	95	98

Cette étude indique que les maléimides des vecteurs **74-R** et **75-R** sont capables de réagir *in vivo* avec le thiol de l'albumine et de produire une activité anticancéreuse importante. Nous ne pouvons cependant pas exclure que les maléimides soient hydrolysés partiellement dans le flux sanguin au préalable de leur addition avec la protéine. Néanmoins, ce résultat indique qu'une quantité non négligeable de la dose administrée de **74-R** et **75-R** s'associe de manière covalente avec l'albumine. En effet, il n'y a pas de différence significative entre l'efficacité thérapeutique de **75-R** et celles de **74-R** et **37-R**. Cela démontre qu'une quantité similaire de MMAE est libérée au niveau des tumeurs quel que soit le vecteur administré. En revanche, **37-R** est significativement plus efficace que **74-R**. Il est intéressant de noter que **37-R** est le composé le plus toxique et le plus efficace, alors que **74-R** est le moins toxique et le moins efficace. Il semble donc que ces deux paramètres soient liés entre eux. Un plus faible rendement de bioconjugaison *in situ* permettrait d'expliquer cette observation. Il peut être la conséquence d'une hydrolyse plus rapide, ou bien d'une cinétique d'addition moins élevée. Nous pouvons conclure les vecteurs **74-R** et **75-R** permettent d'augmenter la fenêtre thérapeutique de cette stratégie de ciblage par rapport au vecteur **37-R**, en diminuant la toxicité des traitements tout en maintenant une très bonne efficacité thérapeutique.

Bien que la réponse antitumorale soit très importante après l'injection de la première dose des vecteurs **37-R**, **74-R** et **75-R**, avec une régression de la masse tumorale observée pour tous les groupes, il semblerait que les administrations suivantes aient un effet bien moins important. En effet, au jour 42, une reprise de la croissance tumorale a été constatée pour l'ensemble des groupes. La raison à cette résistance à la thérapie est à ce jour encore inconnue. Néanmoins, plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à l'apparition de ce phénomène. Tout d'abord, une diminution de l'activité enzymatique de la β-glucuronidase dans le microenvironnement tumoral conduisant alors à la libération d'une plus faible quantité de MMAE pourrait expliquer cette observation. Cette diminution de l'activité enzymatique pourrait provenir de la déplétion de l'enzyme ou bien de sa localisation au niveau de la tumeur qui ne serait alors plus accessibles aux vecteurs macromoléculaires. De même, la diminution de l'accessibilité des tissus malins pourrait réduire l'efficacité des traitements.

5 Conclusion

Le but de cette étude était d'augmenter l'efficacité des vecteurs glucuronylés capables de cibler le microenvironnement tumoral. Dans ce cadre nous avons réalisé la synthèse et l'évaluation biologique d'un nouveau vecteur trimérique de la MMAE **37** présentant un DAlbR de trois. Pour cela nous avons conçu une plateforme de ramification moléculaire à base d'acide gallique. Cette dernière assure la liaison entre trois motifs auto-immolables indépendants capables de libérer de la MMAE sous l'action de la β-glucuronidase et un maléimide pouvant réagir *in vivo* avec la fonction thiol de

l'albumine plasmatique par une réaction d'addition de Michael. Le vecteur macromoléculaire **38** formé s'accumule dans le microenvironnement tumoral où il est alors activé par la β-glucuronidase extracellulaire pour libérer trois molécules de MMAE.

La formation rapide du vecteur macromoléculaire **38** a été vérifiée grâce à l'incubation de **37** dans une solution d'albumine humaine. Il s'est révélé stable dans les conditions physiologiques et la libération de MMAE n'a pas été observée après 3 jours d'incubation. En revanche, en présence de β-glucuronidase la totalité du principe actif est rapidement libéré. Les expériences conduites *in vitro* sur les lignées tumorales ont démontré que le vecteur trimérique **37** était plus efficace que le monomère correspondant **24**, avec une augmentation significative de l'activité antiprolifératives.

L'efficacité thérapeutique de ce nouveau vecteur a été évaluée sur un modèle de tumeurs du pancréas implanté en orthotopique chez la souris. En accord avec les résultats obtenus *in vitro*, ces essais ont montré que le trimère **37** présente une activité anticancéreuse supérieure à celle du monomère **24**, aussi bien à une quantité équimolaire qu'à une quantité sub-stœchiométrique. Les résultats de cette étude confirment que l'augmentation du DAlbR des vecteurs glucuronylés est une approche très prometteuse pour le développement de traitements sélectifs et efficaces des tumeurs solides.

Afin d'initier le transfert de **37** vers la clinique, nous avons réalisé la synthèse du vecteur sous la forme d'un seul stéréoisomère. Le stéréoisomère choisi dans ce cadre a été sélectionné sur la base des cinétiques d'hydrolyses enzymatiques des différents isomères synthétisés. En parallèle, les analogues **74-R** et **75-R**, ont été étudiés dans le but d'évaluer l'impact de la modification du maléimide sur la toxicité et l'efficacité thérapeutique des vecteurs. Les essais menés chez des souris porteuses de tumeurs mammaires ont démontré que les trois vecteurs, **37-R**, **74-R** et **75-R**, possédaient une activité antitumorale importante conduisant à une forte inhibition de la croissance tumorale. Cependant, ces modifications n'ont pas permis d'obtenir une efficacité thérapeutique supérieure à celle du vecteur **37-R**. En revanche, elles ont conduit à une diminution significative de la toxicité de ce type de vecteur.

Les travaux présentés au cours de ce chapitre ont été valorisés par leur publication dans le journal international à comité de lecture *Journal of Controlled Release*.[199] Un brevet d'invention a également été publié pour l'utilisation des vecteurs **37-R**, **74-R** et **75-R** dans le cadre du traitement des tumeurs solides.[220] Ce brevet est actuellement licencié par l'entreprise Seekyo qui assure le transfert clinique de cette technologie. Actuellement, le vecteur **37-R** (renommé SKY01) est en cours d'évaluation chez la souris pour le traitement de xénogreffes de tumeurs pancréatiques dérivées de biopsies de patients. Au cours de cette étude, son efficacité est comparée à la gemcitabine, le médicament de référence utilisé cliniquement.

[220] WO 2020/225323 A1.

CHAPITRE 2 : Développement d'un vecteur de la MMAE substrat de la β-D-*N*-acétylglucosaminidase

1 Introduction

Le ciblage de la β-glucuronidase avec des vecteurs glucuronylés capables de se lier *in vivo* à l'albumine est une stratégie très efficace pour le traitement d'une grande variété de pathologies malignes. Son expression dans le microenvironnement tumoral fait de cette enzyme une cible de choix pour la libération sélective de différents principes actifs. En revanche, dans le but de développer des polychimiothérapies vectorisées, la découverte d'autres enzymes présentes en concentration importante dans la matrice extracellulaire des tumeurs solides est d'un grand intérêt. L'activité de la β-glucuronidase est en effet réduite dans le microenvironnement tumoral en raison du pH qui n'est pas optimal pour son fonctionnement (6 – 6,5). Ainsi, la saturation de cette enzyme, provoquée par l'afflux d'une quantité importante de vecteur dans les tissus malins, pourrait constituer une limite pour cette stratégie de ciblage. Dans ce contexte, le développement de nouvelles gâchettes glycosylées ciblant d'autres enzymes que la β-glucuronidase est une alternative intéressante pour contourner ce problème. En effet, l'utilisation d'un cocktail de vecteur substrat de différentes enzymes devrait permettre de limiter la saturation de l'activité d'une enzyme unique et ainsi conduire à la libération sélective d'une concentration plus élevée de l'agent anticancéreux dans la tumeur. En outre, cette approche pourrait être adaptée au ciblage de molécules actives différentes dont la libération serait contrôlée par une glycosidase spécifique lors de polychimiothérapies vectorisées, une stratégie encore jamais employée à ce jour.

Dans ce cadre, nous avons étudié le ciblage de la β-D-*N*-acétylglucosaminidase. Cette enzyme est une glycosidase lysosomale présente dans la grande majorité des cellules. Elle possède une activité hydrolytique sélective des résidus *N*-acétylglucosamines présents sur les glycoprotéines qui contribue à l'activation ou l'inactivation des propriétés de ces dernières. La présence de ce motif est issue d'un équilibre entre l'activité de la D-*N*-acétylglucosaminyltransférase, qui fixe les résidus *N*-acétylglucosamine, et celle de la β-D-*N*-acétylglucosaminidase. De cet équilibre résultent de nombreux processus de signalisations importants pour la prolifération cellulaire. Un déséquilibre de cette homéostasie a été observé dans certains cas de cancer, conduisant à l'apparition de propriétés oncogènes aux protéines.[221, 222, 223, 224, 225]

De plus, la β-D-*N*-acétylglucosaminidase participe à l'hydrolyse de l'acide hyaluronique qui est un polymère d'un disaccaride constitué d'un glucuronide relié à un *N*-acétylglucosaminide par une alternance de liaisons β-1,3 et β-1,4 (Figure 80). L'acide hyaluronique est un constituant de la matrice

[221] A. Peixoto, M. Relvas-Santos, R. Azevedo, L. L. Santos, J. A. Ferreira, *Front. Oncol.*, **2019**, 9, 380.
[222] H. Nie, H. Ju, J. Fan, X. Shi, Y. Cheng, X. Cang, Z. Zheng, X. Duan, W. Yi, *Nat. Commun*. **2020**, 11, 36.
[223] R. Muniz de Queiroz, R. Madan, J. Chien, W. B. Dias, C. Slawson, *JBC*, **2016**, 291, 18897 - 18914.
[224] Z. Ma, K. Vosseller, *JBC*, **2014**, 289, 34457 - 34465.
[225] J. A. Hanover, W. Chen, M. R. Bond, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **2018**, 50, 155 - 173.

extracellulaire. Ce polymère de haut poids moléculaire possède plusieurs fonctions. Il permet notamment de moduler la viscosité du liquide synovial au niveau des cartilages. Pour les tissus cutanés, il participe à leur hydratation et à la cohésion entre les cellules. L'acide hyaluronique est un élément essentiellement restructuré lors des processus inflammatoires, la cicatrisation et la néo-carcinogénèse. En revanche, ce dernier n'est pas directement substrat de la β-glucuronidase ni de la β-*N*-acétylglucosaminidase. La première étape de son catabolisme est réalisée par l'hyaluronidase qui permet la dégradation du polymère d'acide hyaluronique en plus petits oligosaccharides qui seront alors substrats des deux glycosidases.[226, 227]

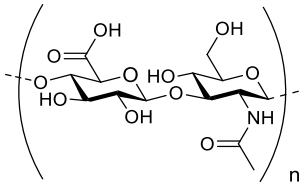


Figure 80 : Structure de l'acide hyaluronique.

Lors de la prolifération et la migration des cellules cancéreuses, une étape de remodelage et de dégradation de la matrice extracellulaire est nécessaire. Ainsi, une élévation de l'activité des hyaluronidases[228, 229, 230, 231, 232, 233] et de la β-D-*N*-acétylglucosaminidase a été observée dans plusieurs types de cancers. Par exemple, la surexpression de cette dernière a été mesurée dans le cas de cancers induits chez le hamster[234] mais également chez la femme atteinte de tumeurs de l'ovaire[235] et du sein[236]. Dans ce dernier cas, il a été démontré que le caractère invasif des tumeurs mammaires était corrélé à l'activité de cette enzyme. De plus, une expérience *in vitro* a permis de montrer que sa surexpression extracellulaire provenait de sa sécrétion par les cellules tumorales.[237]

Cette enzyme peut également être sécrétée par les cellules du système immunitaire comme les macrophages. Leur capacité à libérer la β-D-*N*-acétylglucosaminidase a été démontrée lors de la phagocytose.[238, 239] Ainsi leur infiltration au niveau du microenvironnement tumoral pourrait contribuer à l'augmentation de l'activité de cette enzyme.

---

[226] H. Harada, M. Takahashi, *JBC*, **2007**, 282, 5597 - 5607.
[227] R. Stern, Hyaluronidases in Cancer Biology, *Academic Press*, **2008**, Chapitre 12, 207 - 220.
[228] P. Bertrand, N. Girard, C. Duval, J. D'Anjou, C. Chauzy, J.-F. Ménard, B. Delpech, *Int. J. Cancer,* **1997**, 73, 327 - 331.
[229] C. O. McAtee, A. R. Berkebile, C. G. Elowsky, T. Fangman, J. J. Barycki, J. K. Wahl III, O. Khalimonchuk, N. Naslavsky, S. Caplan, M. A. Simpson, *JBC*, **2015**, 290, 13144 - 13156.
[230] H. Bouga, I. Tsouros, D. Bounias, D. Kyriakopoulou, M. S. Stavropoulos, N. Papageorgakopoulou, D. A. Theocharis, D. H. Vynios, *BMC Cancer*, **2010**, 10, 499.
[231] Caitlin O. McAtee, Joseph J. Barycki, Melanie A. Simpson, *Adv. Cancer Res*., **2014**, 123, 1 - 34.
[232] C. J. Whatcott, H. Han, R. G. Posner, G. Hostetter, D. Von Hoff, *Cancer Discov*., **2011**, 1, 291 - 296.
[233] C. Peng, M. Wallwiener, A. Rudolph, K. Cuk, U. Eilber, M. Celik, C. Modugno, A. Trumpp, J. Heil, F. Marmé, D. Madhavan, J. Nees, S. Riethdorf, S. Schott, C. Sohn, K. Pantel, A. Schneeweiss, J. Chang-Claude, R. Yang, B. Burwinkel, *Int. J. Cancer*, **2016**, 138, 2499 - 2509.
[234] S. Balasubramanian, B.Nagarajan, S.Govindasamy, *Cancer Letters*, **1996**, 101, 9 - 14.
[235] B. Woynarowska, H. Wikiel, R. J. Bernacki, *Cancer, Res*., **1989**, 49, 5598 - 5604.
[236] C. Slawson, J. Pidala, R. Potter, *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, 1537, 147 - 157.
[237] K. T. Ramessur, P. Greenwell, R. Nash, M. V. Dwek, *British Journal of Biomedical Science*, **2010**, 67, 189 - 196.
[238] L. C. Meagher, J. S. Savill, A. Baker, R. W. Fuller, C. Haslett, *J. Leukoc. Biol*., **1992**, 52, 269 - 273.
[239] R. Bourbouze, F. Raffi, G. Dameron, H. Hali-Miraftab, F. Loko, J. L. Vilde, *Clin. Chim. Acta*, **1991**, 199, 185 - 94.

Cependant, contrairement à la β-glucuronidase, aucune étude n'a été réalisée afin de démontrer une potentielle accumulation extracellulaire de cette glycosidase dans le microenvironnement tumoral. En effet, à ce jour, cette enzyme n'a été détectée que dans des biopsies de tissus cancéreux, ou des prélèvements de sérum provenant de sa diffusion dans la circulation sanguine.

Bien que l'augmentation de la concentration en β-*N*-acétylglucosaminidase soit une caractéristique intéressante pour la libération sélective de principes actifs, très peu de composés substrats de cette enzyme ont été développés à des fins thérapeutiques. Plusieurs *N*-acétylglucosaminides capables de libérer des sondes fluorescentes ont été étudiés pour la quantification de l'activité enzymatique de la β-*N*-acétylglucosaminidase.[240, 241, 242, 243] En revanche, seulement deux autres applications d'utilisation de *N*-acétylglucosaminides ont été rapportées dans la littérature.

En 2008, le groupe de Keefer a étudié la vectorisation de l'oxyde nitrique sous la forme de *N*-acétylglucosaminides. L'oxyde nitrique est en effet un composé d'intérêt puisqu'il régule de nombreux processus cellulaires. Son effet toxique a été démontré *in vitro* sur des microbes phagocytés par des macrophages.[244] Deux ans plus tard, ce même groupe a développé d'autres composés substrats de la β-*N*-acétylglucosaminidase destinés à libérer de l'oxide nitrique sous la forme de diazéniumdiolates. Dans ce cadre, le composé **76** a été évalué *in vitro* sur une culture de fibroblastes humains pour sa capacité à libérer intracellulairement l'oxyde nitrique (Figure 81). [245]

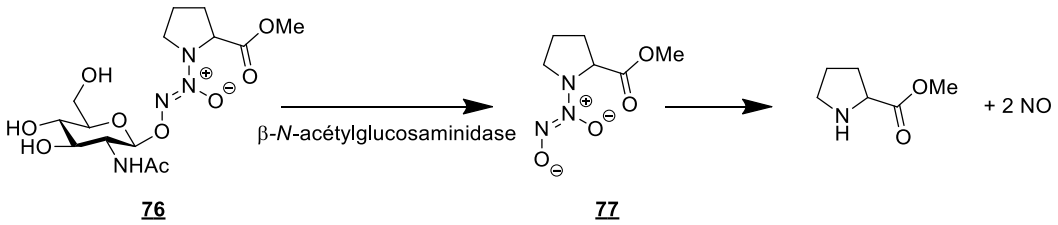


Figure 81 : Vecteur N-acétylglucosaminylé permettant la libération d'oxyde nitrique.

Ainsi, lors de son incubation, une augmentation de la quantité de NO intracellulaire a été mesurée, attestant de la rupture de la liaison glycosidique, suivie de la décomposition du diazéniumdiolate **77** intermédiaire. Cependant, la faible pénétration cellulaire des *N*-acétylglucosaminides représente une limite importante quant à l'efficacité de cette approche.

La vectorisation de molécules anti-inflammatoires telles que la prednisone sous la forme du *N*-acétylglucosaminide **78** a également été envisagée (Figure 82). [246] La prednisone est un corticostéroïde qui engendre de nombreux effets secondaires lors de son utilisation chronique. Sa libération sélective au niveau de la zone d'inflammation où l'enzyme est sécrétée pourrait ainsi diminuer les effets

[240] J. Borooah, D. H. Leaback A P. G. Walker, *Biochem. J.*, **1961**, 78, 106 - 110.
[241] L. Dong, S. Shen, H. Lu, S. Jin, J. Zhang, *ACS Sensors*, **2019**, 4, 1222 - 1229.
[242] K. Miura, Y. Aoyama, Y. Natsu, R. Koyama, T. Hirano, T. Nishio, W. Hakamata, *Chem. Pharm. Bull*. **2020**, 68, 526 - 533.
[243] F. Yan, X. Tian, Z. Luan, L. Feng, X. Ma, T. D. James, *Chem. Commun*., **2019**, 55, 1955 - 1958.
[244] C. A. Valdez, J. E. Saavedra, B. M. Showalter, K. M. Davies, T. C. Wilde, M. L. Citro, J. J. Barchi, J. R. Deschamps, D. Parrish, S. El-Gayar, U. Schleicher, C. Bogdan, L. K. Keefer, *J. Med. Chem*. **2008**, 51, 3961 - 3970.
[245] R. S. Nandurdikar, A. E. Maciag, S. Y. Hong, H. Chakrapani, M. L. Citro, L. K. Keefer, J. E. Saavedra, *Org. Lett*., **2010**, 12, 56 - 59.
[246] WO 2008/153394.

indésirables enregistrés lors de l'administration systémique du corticostéroïde. Cependant, aucune donnée sur l'efficacité du vecteur **78** n'est disponible actuellement dans la littérature.

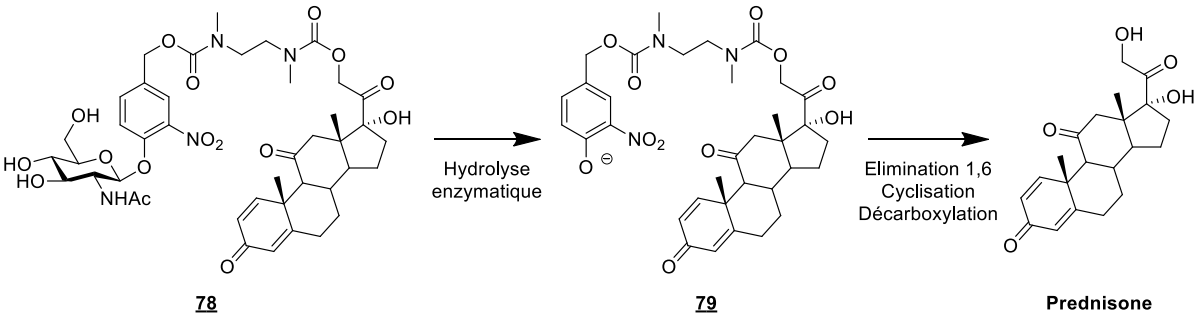


Figure 82 : Vecteur N-acétylglucosaminylé de la prednisone.

Dans le but d'évaluer le potentiel du ciblage de la β-D-*N*-acétylglucosaminidase pour la libération d'agents anticancéreux, nous avons entrepris l'étude du vecteur **80**, basé sur une stratégie similaire à celle développée pour le vecteur **24** ciblant la β-glucuronidase. (Figure 83)

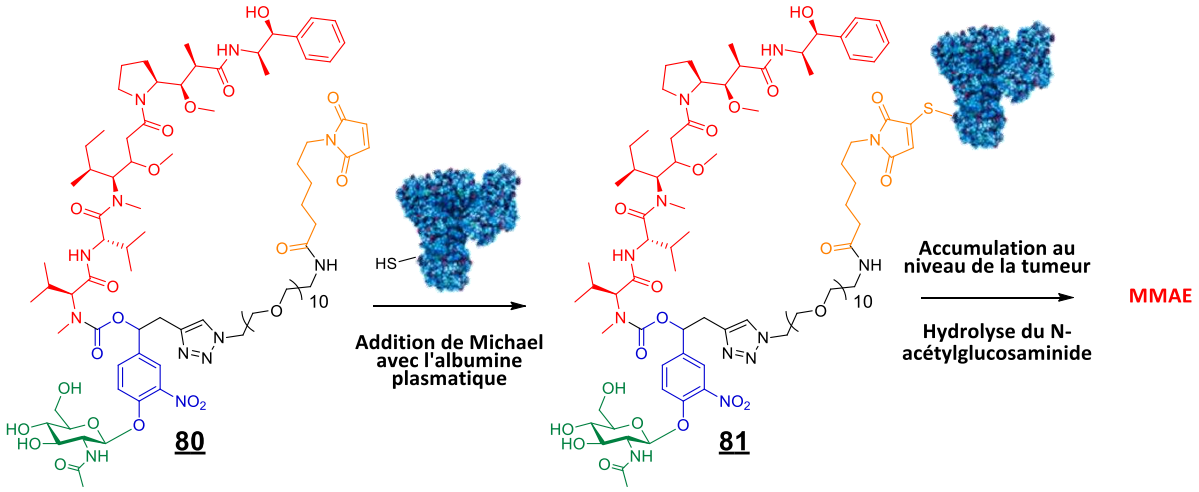


Figure 83 : Structure et mode d'action du vecteur 80.

Le composé **80** véhicule de la MMAE relié à un motif *N*-acétylglucosaminide par un espaceur auto-immolable. Cet espaceur devrait assurer la reconnaissance du glycoside par l'enzyme. Il comporte également une fonction maléimide permettant sa ligation à l'albumine plasmatique. Après administration du vecteur **80** par voie intraveineuse, le vecteur macromoléculaire **81** formé *in situ* devrait s'accumuler au niveau de la tumeur grâce au tropisme de l'albumine. La *N*-acétylglucosaminidase extracellulaire permettra d'hydrolyser la liaison glycosidique libérant ainsi la MMAE. Il est également possible que le vecteur **80** soit internalisé par les cellules cancéreuses par macropinocytose et suive la voie de dégradation lysosomale.

2 Synthèse du vecteur de la MMAE **80** substrat de la β-D-*N*-acétylglucosaminidase

2.1 Schéma rétrosynthétique

Le vecteur **80** pourra être synthétisé selon une stratégie de synthèse similaire à celle des vecteurs **24** et **37** à partir du *N*-acétylglucosaminide **84** (Figure 84). Ce composé clé sera obtenu par une réaction de glycosylation entre l'espaceur central **55** précédemment décrit et le α-D-chloroglucosamine tétraacétate **83**.

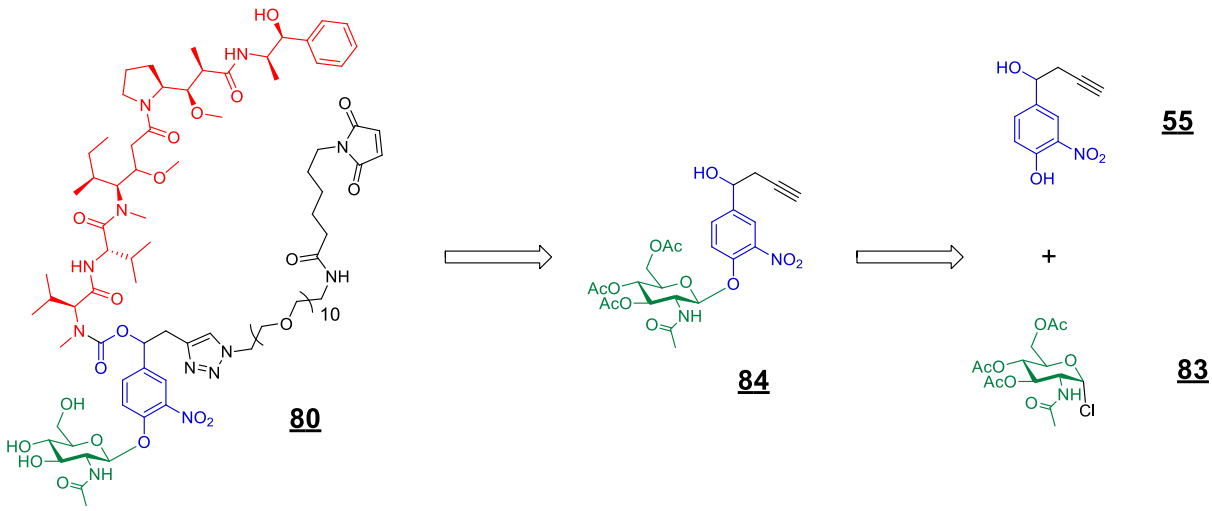


Figure 84 : Schéma rétrosynthétique.

2.2 Synthèse du vecteur 80

Le vecteur **80** substrat de la β-D-*N*-acétylglucosaminidase est synthétisé en 7 étapes en partant du *N*-acétylglucosamine commercial **82** (Figure 85 et Figure 86).

L'α-D-chloroglucosamine tétraacétate **83** est préparé en une seule étape par le traitement du *N*-acétylglucosamine **82** commercial par du chlorure d'acétyle, utilisé comme solvant.[247] Les alcools du sucre effectuent tout d'abord une addition nucléophile sur le chlorure d'acétyle pour former les esters correspondants par élimination de l'ion chlorure de l'intermédiaire tétraédrique. Ce dernier réalise ensuite la substitution nucléophile de l'acétate présent sur la position anomérique. On obtient donc le sucre protégé et activé **83** avec un rendement de 61%. La stéréochimie α de la position anomérique est confirmée par RMN ^{1}H avec la présence d'un doublet à 6,19 ppm avec une constante de couplage de 3,7 Hz.

[247] N. Floyd, B. Vijayakrishnan, J. R. Koeppe, B. G. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 7798 - 7802.

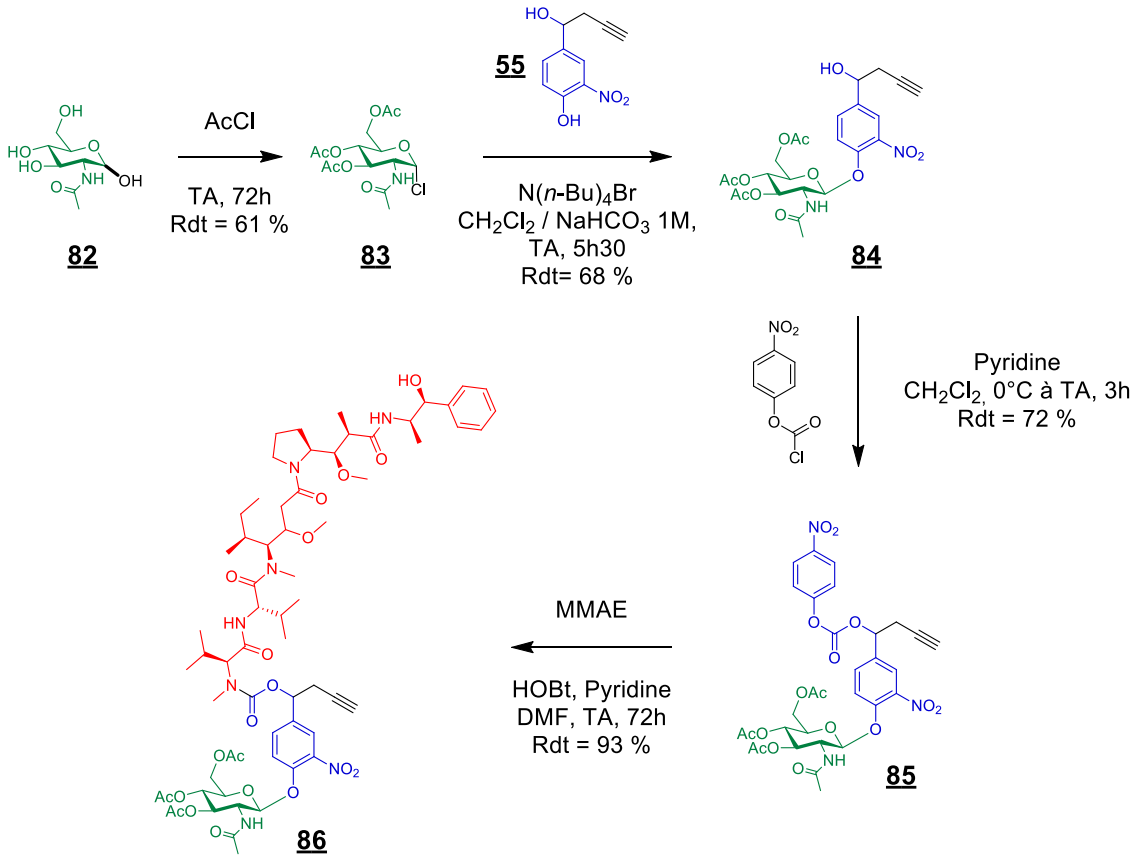


Figure 85 : Synthèse de l'intermédiaire 86.

L'introduction du motif sucre est réalisée par glycosylation du phénol **55**. Cette réaction de substitution nucléophile est réalisée dans un mélange biphasique CH_2Cl_2 / $NaHCO_3$ 1M, en présence d'un catalyseur de transfert de phase, le bromure de *tétra*-butylammonium.[248, 249] Après déprotonation du phénol **55**, la substitution nucléophile du chlore sur la position anomérique activée du sucre **83** conduit à un seul glycoside. Cette réaction est chimiosélective puisqu'aucun produit issu de la glycosylation de l'alcool benzylique n'est observé. En effet, le pKa du nitrophénol, plus faible que celui de l'alcool secondaire, permet la déprotonation sélective du phénol exaltant ainsi son caractère nucléophile. Le composé **84** est alors obtenu avec un rendement de 68 %. La stéréochimie β de la liaison glycosidique est confirmée par RMN ^{1}H par la présence d'un doublet à 5,50 ppm avec un constante de couplage de 8,2 Hz caractéristique d'un glycoconjugué d'anomérie β.

Ensuite, l'alcool benzylique **84** est activé à l'aide de chloroformiate de *para*-nitrophénol en présence de pyridine dans le dichlorométhane. Cette réaction permet d'obtenir le carbonate mixte **85** avec un rendement de 72 %. La formation du carbonate mixte **85** a été confirmée par une analyse RMN ^{1}H grâce à la présence de deux doublets à 8,28 et 7,38 ppm avec une constante de couplage de 9,2 Hz, correspondant respectivement aux protons en *ortho* et en *méta* de la fonction NO_2 du groupement nitrophényle *para*-substitué.

La MMAE est introduite en substituant le *para*-nitrophénol du carbonate activé **85** en présence de HOBt et de pyridine dans le DMF. Le carbamate **86** est alors obtenu avec un rendement de 93 %.

[248] R. Roy, F. D. Tropper, *Can. J. Chem.*, **1991**, 69, 817 - 821.
[249] WO 2008/153394 A2.

Trois étapes successives permettent d'accéder au vecteur **80** (Figure 86).

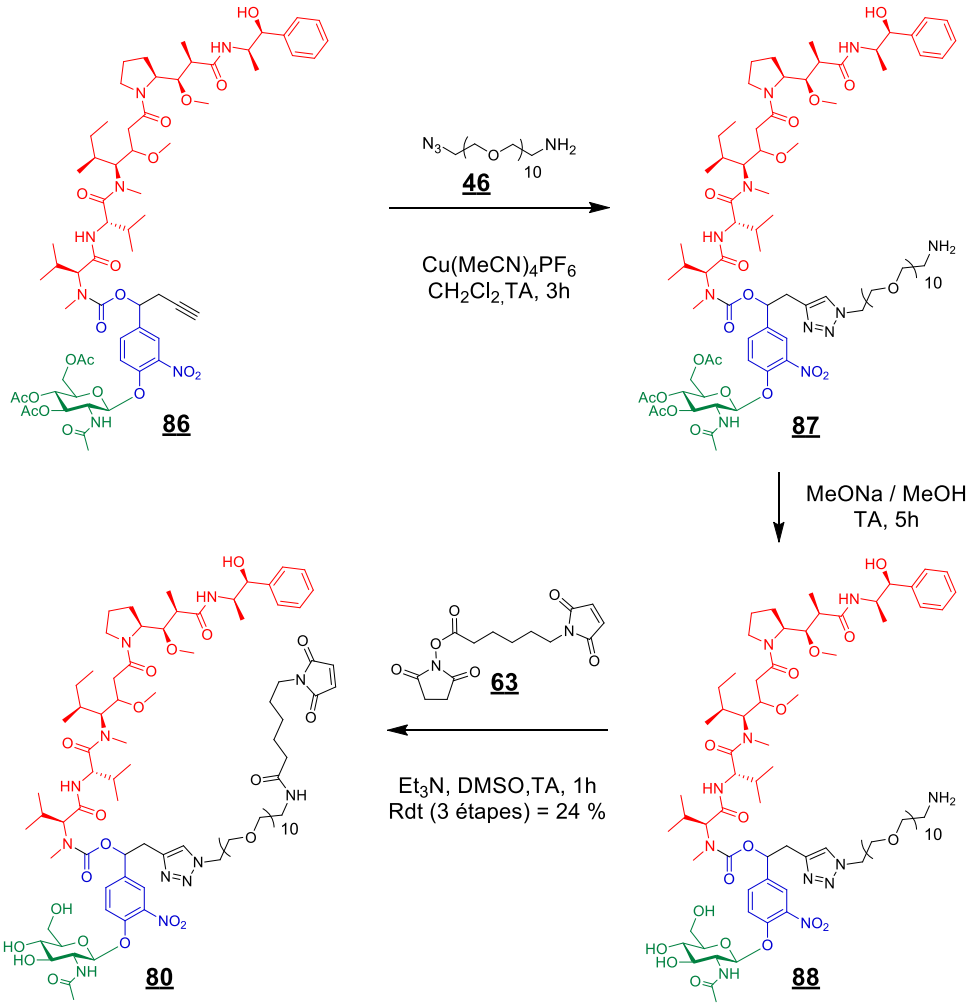


Figure 86 : Synthèse du vecteur 80.

Une réaction de cycloaddition [3+2] catalysée par le cuivre (I) entre l'azoture de la chaine PEG **46** et l'alcyne **86**, réalisée dans le dichlorométhane en présence de $Cu(MeCN)_4PF_6$, permet d'accéder au triazole **87** (tr = 6,8 minutes, m/z = 904 $[M+2H]^{2+}$ et 603 $[M+3H]^{3+}$) (Figure 87-A). Cependant, dans ces conditions, la formation d'un produit secondaire est observée après trois heures de réaction. En effet, le chromatogramme LC-MS du milieu réactionnel indique un pic à 6,6 minutes dont les rapports m/z de 912 et 609 semblent correspondre à la structure du composé hydroxylé (M+16) **86-OH** ($[M+2H]^{2+}$ et $[M+3H]^{3+}$ respectivement) (Figure 87-B). Cette hypothèse est appuyée par la littérature puisque la formation des 5-hydroxytriazoles comme sous-produits des réactions de cycloaddition [3+2] y est rapportée.[205] Dans cette étude, les auteurs notent que l'utilisation d'un ligand du cuivre, tel que le THPTA permet d'inhiber la formation de ce produit secondaire. Ces conditions pourront alors être utilisées dans l'avenir afin d'éviter l'apparition du composé **87-OH**.

La déprotection des alcools du *N*-acétylglucosaminide **87** est réalisée par transestérification des acétates avec une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol. Après 5 heures de réaction, la réaction est totale puisque le pic à 6,8 minutes correspondant au composé **87** a disparu au profit de l'apparition d'un produit plus polaire (tr = 5,8 minutes) dont les rapports m/z de 841 et 561 correspondent au composé totalement déprotégé **88** ($[M+2H]^{2+}$ et $[M+3H]^{3+}$ respectivement). On peut

également noter la présence du composé **88-OH** issu de la transestérification des acétates du sous-produit **87-OH**. (Figure 87-C)

Enfin, la réaction entre l'amine brute **88** et l'ester de NHS de l'acide maléimidocaproïque **63** en présence de triéthylamine dans le DMSO permet d'introduire le motif maléimide. Le composé **80** est alors obtenu avec un rendement de 24 % sur trois étapes après purification par chromatographie en phase inverse. Sa structure a été confirmée par HRMS indiquant des signaux avec des rapports m/z de 1895,9952 $[M+Na]^+$ et 959,9933 $[M+2Na]^{2+}$ correspondant au vecteur **80**. Ce rendement modeste peut être expliqué par la complexité de la séparation par chromatographie du brut réactionnel à l'issue des trois étapes, notamment en raison de la faible différence entre les temps de rétention du vecteur **80** et du sous-produit **80-OH** (Figure 87-D).

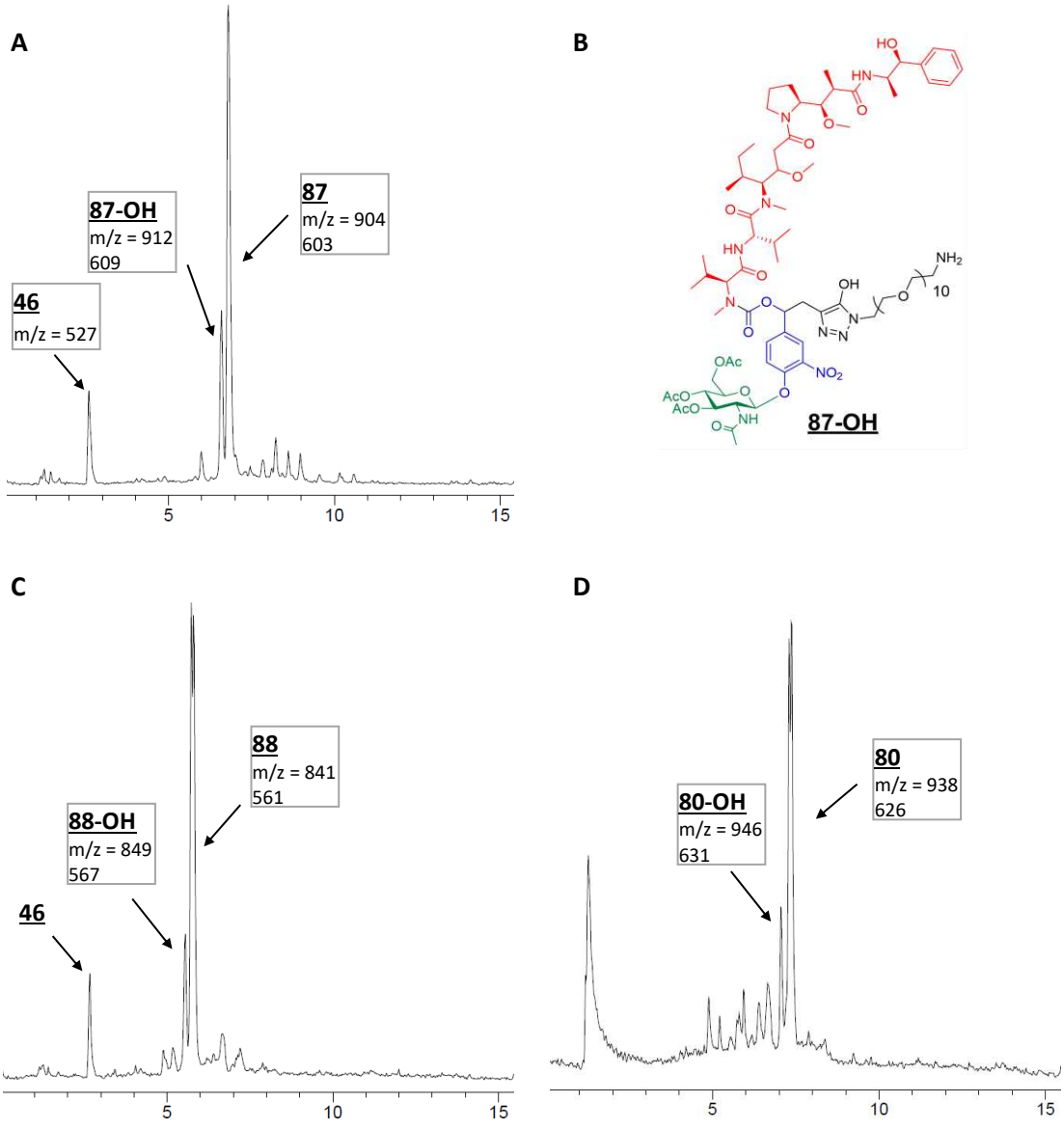


Figure 87 : Chromatogrammes LC-MS du milieu réactionnel pour la formation des composés 87 (A), 88 (C) et 80 (D). (B) structure supposée du produit secondaire formé au cours de la réaction de cycloaddition [3+2].

Le vecteur **80** a été synthétisé en 7 étapes à partir du *N*-acétylglucosamine commercial **82** avec un rendement global de 6 %.

2.3 Evaluation biologique du vecteur 80

2.3.1 Evaluation de l'activité antiproliférative du vecteur 80

L'activité antiproliférative du vecteur **80** a été évaluée sur les lignées tumorales humaines KB et MDA-MB-231 et comparée à celle de la MMAE. Pour cela, le composé **80** a été placé dans le milieu de culture en absence ou en présence de β-*N*-acétylglucosaminidase et la viabilité cellulaire a été mesurée après 72 heures d'incubation (Figure 88).

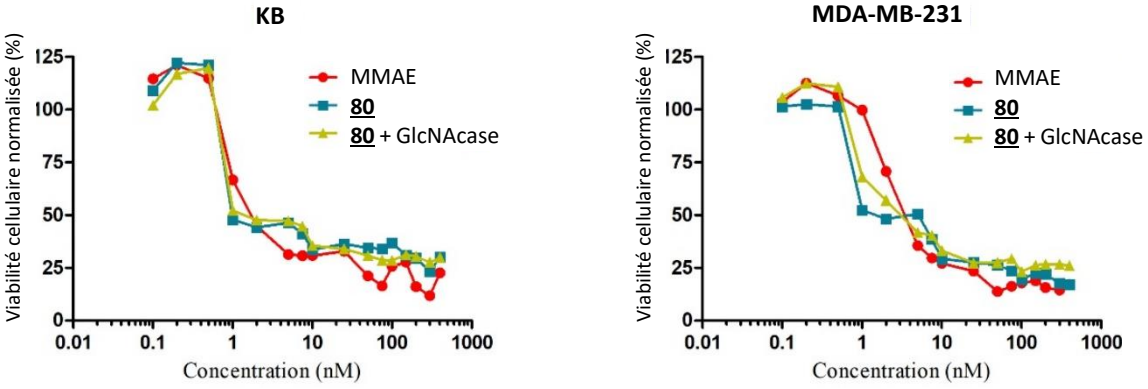


Figure 88 : Activité antiproliférative de la MMAE et du vecteur 80 en présence ou absence de β-N-acétylglucosaminidase (GlcNAcase) sur les lignées cellulaires KB et MBA-MB-231 mesurés après 72 heures d'incubation.

On constate que le vecteur **80**, possède une activité antiproliférative similaire à celle de la MMAE. En effet, son incubation en absence ou en présence de β-*N*-acétylglucosaminidase conduit à la cytotoxicité identique, sur les deux lignées cellulaires.

Ce résultat surprenant montre que le vecteur **80** ne permet pas de masquer la toxicité de la MMAE, contrairement à son analogue glucuronylé **24**. Ce résultat pourrait être expliqué par la différence de polarité entre les glucuronides et les *N*-acétylglucosaminides qui ne présentent pas de fonctions chimiques ionisables (acide carboxylique). Ainsi, le composé **80** pourrait pénétrer passivement au travers de la membrane cellulaire, puis être activé par la β-*N*-acétylglucosaminidase lysosomale pour conduire à la libération de la MMAE. Une seconde hypothèse est basée sur la libération de la β-*N*-acétylglucosaminidase par ces cellules cancéreuses. En effet, il a été démontré que ces dernières pouvaient sécréter cette enzyme dans le milieu de culture.[236, 237] Ce phénomène pourrait alors être responsable de l'activation du vecteur **80** indépendamment de l'addition de la β-*N*-acétylglucosaminidase au milieu de culture.

Afin de vérifier ces hypothèses, d'autres expériences sont nécessaires. Il serait par exemple intéressant de doser l'activité de la β-*N*-acétylglucosaminidase présente dans le milieu de culture. Afin d'évaluer la pénétration passive du vecteur **80**, la cytotoxicité de ce dernier pourrait être également comparée à celle du conjugué **81**. La présence de l'albumine devrait en effet limiter l'internalisation de la MMAE et, de fait, sa toxicité. Cette expérience permettrait ainsi de vérifier si la cytotoxicité de **80** est liée à sa pénétration passive au sein des cellules tumorales.

2.3.2 Evaluation de l'efficacité thérapeutique de la prodrogue 80 in vivo

L'efficacité thérapeutique du vecteur **80** a été évaluée chez la souris, sur un modèle de tumeur mammaire triple négatif de type MDA-MB-231 (Figure 89). Le composé **80** a été administré trois fois, avec un délai de 14 jours, par voie intraveineuse dans la veine caudale, à une dose de 4 $mg.kg^{-1}$

(correspondant à la dose efficace du vecteur monomérique **24**) et comparé au vecteur **37-R** à la dose de 6,48 mg.kg^{-1}. Il est à noter que cette expérience a été réalisée au cours de l'étude *in vivo* de **37-R** présentée sur la Figure 79 (Page 102).

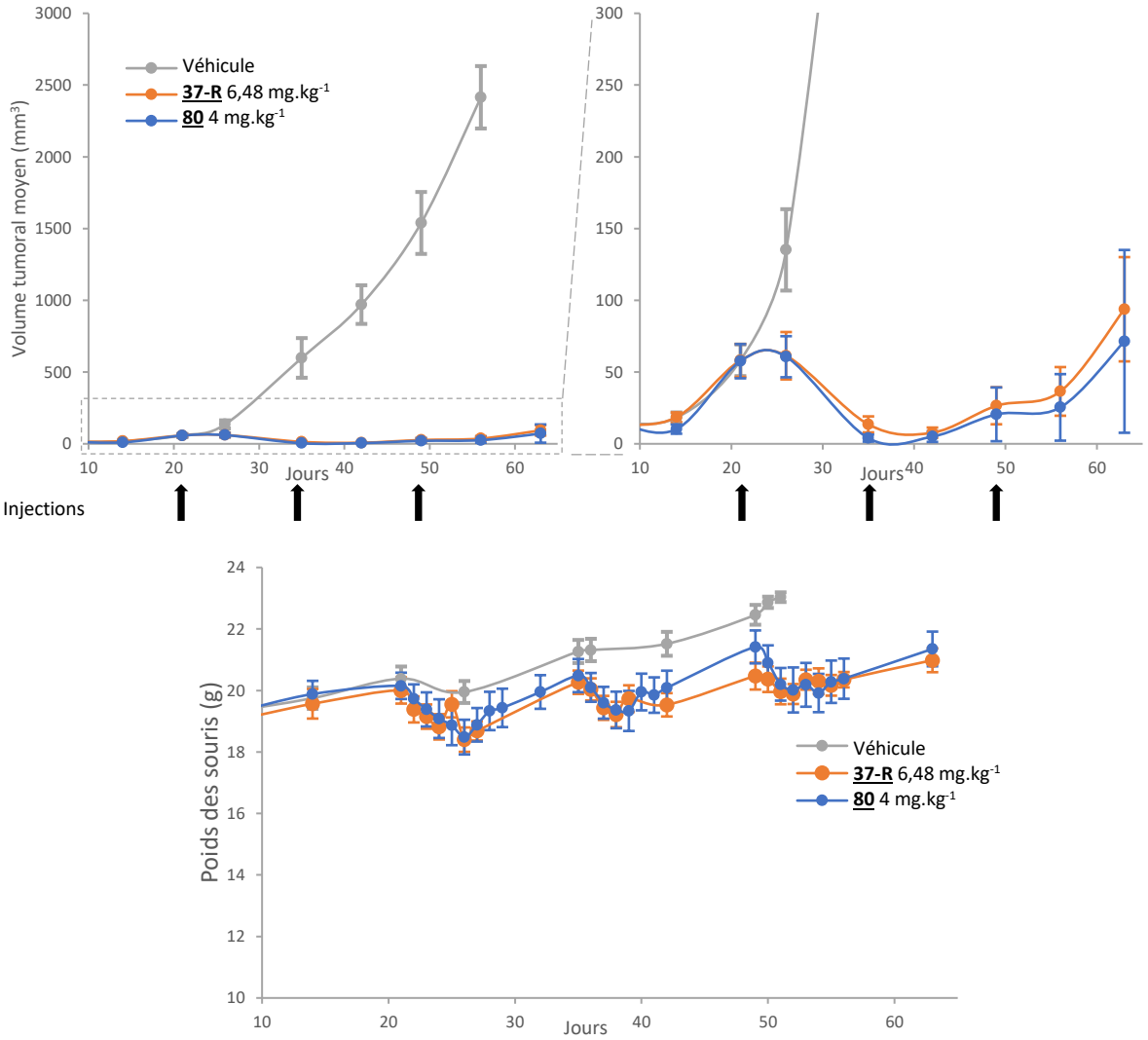


Figure 89 : Efficacité thérapeutique du vecteur 80 comparé à 37-R pour le traitement de tumeurs MDA-MB-231 orthotopique chez la souris (volume initial 58 mm³). Les vecteurs ont été administrés aux jours 21, 35 et 49. Chaque point correspond à la moyenne des volumes tumoraux ± SEM.

On constate que le vecteur **80** possède une activité thérapeutique significative par rapport au groupe contrôle. En effet, une réduction de la masse tumorale est obtenue, dès la première administration. De plus, à l'issue de la première injection, 4/6 souris traitées par le vecteur **80** ne présentaient plus de tumeurs détectables à partir du jour 35.

Le vecteur **80** a également été bien supporté par les animaux puisqu'aucune mortalité n'a été observée jusqu'à la fin du protocole (jour 63). Au jour 56, les traitements avec le vecteur **80** ont conduit à une forte inhibition de la croissance tumorale par rapport au groupe contrôle (99 %). A la fin de l'expérience (jour 63), une régression totale et durable de la tumeur a été obtenue pour 3/6 souris. En revanche, une reprise de la tumorigénèse a été observée pour une des souris qui ne présentait plus de tumeur détectable au jour 35.

Comme dans le cas de **37-R**, la réponse initiale au traitement avec **80** est également très importante, conduisant à une réduction de 90 % de la taille initiale des tumeurs. Cependant, au jour 42 du protocole, une reprise de la croissance tumorale a été constatée. Il semblerait également que l'administration suivante (jour 49) ait relativement peu d'effet, comme nous l'avions constaté pour les vecteurs glucuronylés trimériques **37-R**, **74-R** et **75-R**.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées afin d'expliquer ce phénomène commun aux deux expériences effectuées sur le même modèle de tumeur mammaire. Tout d'abord, considérons l'hypothèse de la diminution de l'activité enzymatique. Dans ce cas, nous pouvons envisager que l'activité de la β-glucuronidase et celle de la β-D-*N*-acétylglucosaminidase soient réduites. Deux phénomènes peuvent alors en être la cause. Premièrement, si la présence extracellulaire de ces enzymes provient de leur sécrétion par les cellules du système immunitaire (neutrophiles et macrophages), une diminution de leur présence dans le microenvironnement conduirait à une baisse de l'activation des vecteurs glycosylés. Deuxièmement, si elle est originaire des cellules tumorales elles-mêmes, une diminution de leur sécrétion par ces dernières conduirait à la même observation. Quoiqu'il en soit, le phénomène de résistance observé est commun aux deux types de vecteurs indépendamment de leur voie d'activation. En revanche, ces deux stratégies partagent un même mode de transport via l'albumine plasmatique. A ce titre, si l'activité des enzymes est inchangée, une diminution du tropisme de l'albumine vers la tumeur aurait donc un effet sur les deux types de vecteurs. Ainsi, cela conduirait à l'accumulation d'une plus faible quantité de vecteur au niveau du microenvironnement tumoral. Finalement, si les vecteurs sont activés à la suite de leur internalisation par macropinocytose, une diminution de l'activité endocytique des cellules tumorales conduirait à la baisse de l'efficacité thérapeutique observée.

3 Conclusion

Le but de cette étude était d'étudier le ciblage de la β-D-*N*-acétylglucosaminidase afin de libérer sélectivement un agent cytotoxique au niveau des tumeurs. Dans ce cadre nous avons réalisé la synthèse et l'évaluation biologique du vecteur *N*-acétylglucosaminylé de la MMAE **80**. Ce dernier comporte une *N*-acétylglucosamine reliée à la MMAE par un espaceur auto-immolable. Le ciblage des tissus cancéreux est rendu possible par la présence du groupement maléimide de **80** pouvant réagir *in vivo* avec la fonction thiol de l'albumine plasmatique par une réaction d'addition de Michael. Le vecteur macromoléculaire **81** (Figure 83) formé est alors capable de s'accumuler au niveau de la tumeur grâce au tropisme physiopathologique de l'albumine au niveau de la malignité ainsi qu'aux défauts de vascularisation liés à la néo-angiogenèse tumorale par effet EPR.

L'efficacité thérapeutique de ce nouveau vecteur a été évaluée sur un modèle de tumeur mammaire triple négative MBA-MB-231 implantées chez la souris. Ces essais ont montré que le vecteur **80** présente une activité anticancéreuse très importante. Ainsi, le développement de vecteurs *N*-acétylglucosaminylés est une approche très prometteuse pour le développement de nouveaux traitements sélectifs et efficaces des pathologies malignes.

CHAPITRE 3 : Vectorisation d'agents anticancéreux non modifiés au moyen d'interactions supramoléculaires

1 Introduction

La conception de nouveaux systèmes moléculaires programmés pour le ciblage et la libération sélective de molécules bioactives dans un tissu d'intérêt est une approche extrêmement prometteuse. En effet, les résultats cliniques et précliniques obtenus avec des composés tels que Adcetris, l'Aldoxorubicine, ou encore les vecteurs **24** et **37**, qui ont été développés récemment au laboratoire démontrent l'efficacité de cette approche thérapeutique. Cependant, les coûts de développement, de fabrication, de démonstration de l'innocuité pour les patients et du bénéfice thérapeutique de ces nouvelles molécules cytotoxiques sont très importants et peuvent représenter un frein quant à leur mise sur le marché.

Diminuer la toxicité d'un médicament tout en augmentant son efficacité thérapeutique est l'un des objectifs majeurs du développement de nouveaux traitements chimiothérapeutiques. A ce titre, l'Abraxane (nanoparticule d'albumine encapsulant du paclitaxel) a permis d'apporter un bénéfice significatif pour la thérapie de plusieurs tumeurs solides par rapport à l'utilisation du paclitaxel seul. Ce médicament tire parti de l'affinité de l'albumine pour les molécules hydrophobes par l'intermédiaire d'interactions supramoléculaires. En revanche, l'interaction hydrophobe entre l'albumine et le paclitaxel n'est pas suffisante pour permettre sa prise en charge directement dans le flux sanguin. C'est pourquoi, la formulation préalable du paclitaxel sous la forme d'une nanoparticule d'albumine a démontré une plus grande efficacité. Cependant, avant d'être utilisé chez l'Homme, l'Abraxane a dû suivre le long processus des évaluations précliniques puis cliniques nécessaires au développement de nouvelles entités médicamenteuses présentant un agent cytotoxique. De plus, pour que cette stratégie soit étendue à la vectorisation d'un autre principe actif, dans le cadre d'une polychimiothérapie par exemple, il serait nécessaire de synthétiser et d'évaluer un tout nouveau composé associant un autre agent anticancéreux à la nanoparticule d'albumine.

Le transport de principes actifs de manière non covalente par l'albumine plasmatique a déjà été étudiée au travers du sel de platine **26** (Figure 35, Page 56) et du vecteur glucuronylé de la MMAE **27** (Figure 36, Page 56) tous deux, interagissant *in situ* avec la protéine au moyen d'interactions hydrophobes. Cependant, ces approches utilisent de nouveaux promédicaments dont l'innocuité n'est pas garantie et qui devront subir l'ensemble des phases préclinique et clinique obligatoires afin d'être commercialisés.

Dans le cadre de nos travaux visant à améliorer l'efficacité des chimiothérapies anticancéreuses, nous avons étudié une nouvelle approche basée sur l'utilisation de l'albumine plasmatique comme vecteur thérapeutique. Ainsi, nous avons conçu une plateforme moléculaire non toxique capable de se lier de manière covalente avec l'albumine directement dans le flux sanguin et possédant la capacité d'interagir avec différentes classes d'agents anticancéreux via des interactions supramoléculaires.

L'objectif de cette stratégie est d'augmenter la sélectivité de principes actifs déjà utilisés chez l'Homme sans en modifier la structure.

Pour cela, nous avons choisi de tirer profit des propriétés uniques des cyclodextrines, puisqu'elles sont des molécules biocompatibles, non toxiques et dotées d'une grande affinité pour les composés hydrophobes.

1.1 Présentation de la stratégie de ciblage

Nous avons étudié une nouvelle approche pour le ciblage thérapeutique d'agents anticancéreux déjà utilisés en clinique, basé sur l'utilisation du trimère de cyclodextrines **89** (Figure 90-A). Ce dernier comporte un motif maléimide, capable de réagir avec le thiol de l'albumine plasmatique, et trois β-cyclodextrines connues pour leurs propriétés d'encapsulation de principes actifs hydrophobes tel que la doxorubicine. La présence de trois cyclodextrines au sein de la même structure moléculaire permet d'augmenter leur concentration locale et donc de favoriser les interactions hôte-invité. L'administration par voie intraveineuse du composé **89** conduira à la formation *in vivo* du vecteur macromoléculaire **90** qui circulera dans l'organisme avec une demi-vie similaire à celle de la protéine plasmatique (Figure 90-B Etape 1). La présence des trois cyclodextrines sur l'albumine pourra alors être exploitée pour le transport et la vectorisation de principes actifs hydrophobes.

Nous avons choisi d'illustrer ce concept avec la doxorubicine. Après son administration par voie intraveineuse, cette dernière devrait être prise en charge par les cyclodextrines associées à la protéine plasmatique, par la formation du complexe d'inclusion **91** (Figure 90-B Etape 2). Celui-ci permettra alors de contrôler la biodistribution du principe actif au moyen d'interactions supramoléculaires en favorisant son accumulation au niveau du microenvironnement tumoral, limitant ainsi les dommages potentiels pour les tissus sains (Figure 90-B Etape 3). De plus, cette accumulation augmentera la concentration de la doxorubicine intratumorale. La libération de l'agent anticancéreux se produira alors via la dissociation équilibrée du complexe d'inclusion **91** (Figure 90-B Etape 4). Cette stratégie thérapeutique présente l'avantage d'utiliser un adjuvant, non toxique, dont le développement clinique est bien moins contraignant que celui d'un composé cytotoxique.

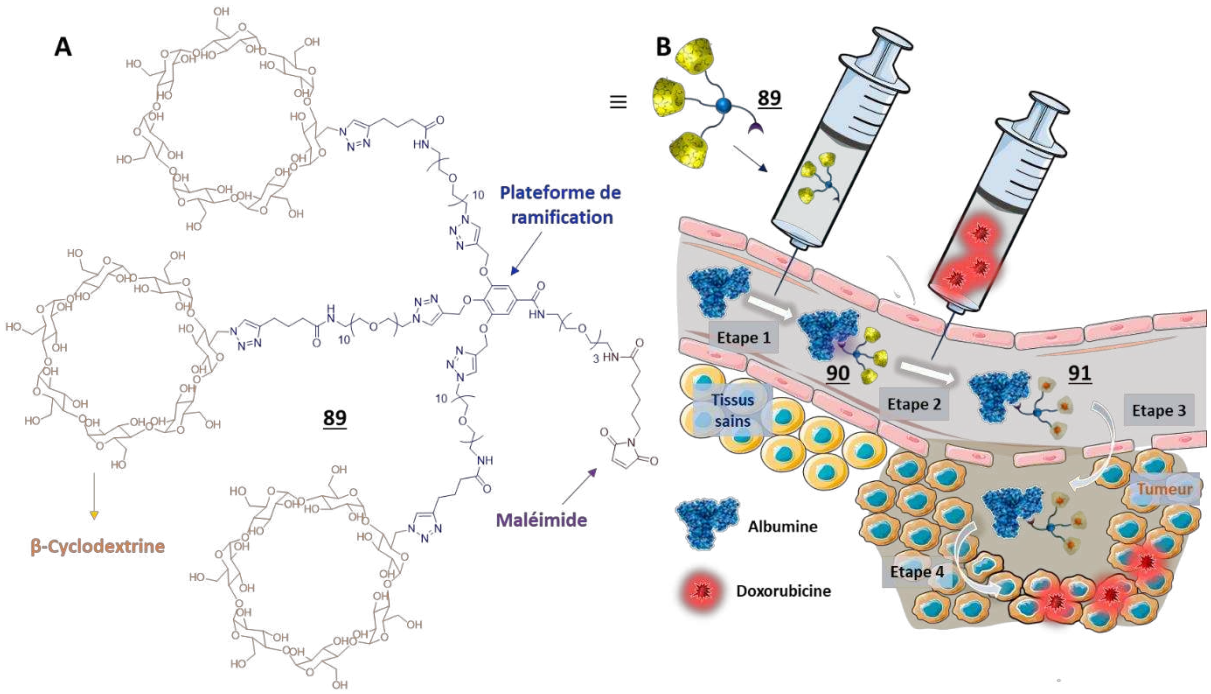


Figure 90 : A) Structure du vecteur 89. B) Schéma du concept de vectorisation envisagée.

1.2 Les cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques naturels constituées d'unités D-glucose reliées entre elles par une liaison α-1,4. Les cyclodextrines sont différenciées en fonction de leur taille, et donc du nombre de motifs D-glucoses présents dans leur structure. Les trois types de cyclodextrines les plus fréquemment rencontrés sont la α-cyclodextrine, la β-cyclodextrine et la γ-cyclodextrine qui sont constituées de 6, 7 et 8 motifs D-glucopyranoses respectivement.[250] (Figure 91)

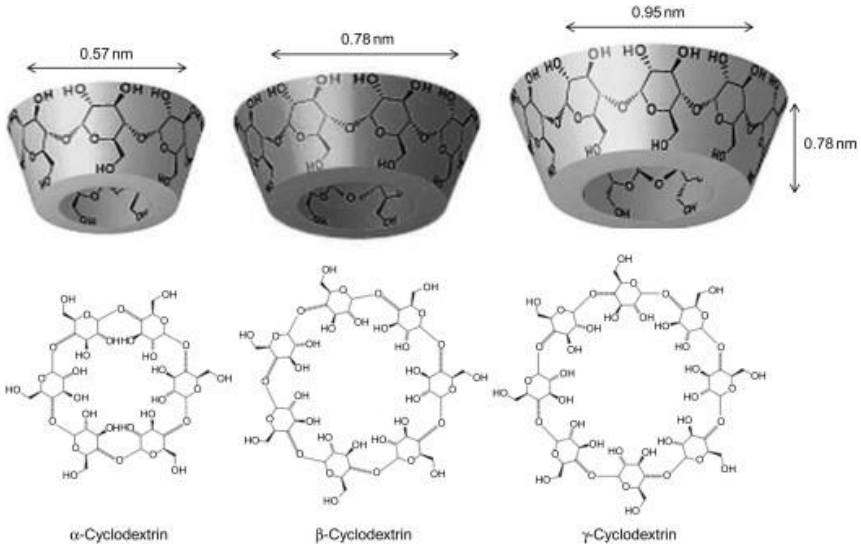


Figure 91 : Structure des cyclodextrines α, β et γ.

La particularité de ces structures réside dans leur conformation tridimensionnelle. L'orientation des résidus hydroxyles primaires et secondaires de part et d'autre du squelette de la cyclodextrine

[250] E.M. Martin Del Valle, *Process Biochemistry*, **2004**, 39, 1033 - 1046.

laisse apparaitre une cavité conique hydrophobe capable d'interagir avec une grande variété de molécules. Cette interaction se traduit par la formation d'un complexe d'inclusion de type hôte-invité dont la nature dépend fortement de la molécule invitée et du solvant dans lequel elle a lieu.[251] En milieu aqueux, la cavité apolaire de la cyclodextrine est occupée par des molécules d'eau générant des interactions polaires-apolaires énergétiquement défavorables (Figure 92). Lors de l'addition d'une molécule hydrophobe dans le milieu, les molécules d'eau présentes au sein de la cavité sont chassées de cette dernière à la faveur de la formation d'un complexe d'inclusion où les interactions hydrophobes sont favorisées.

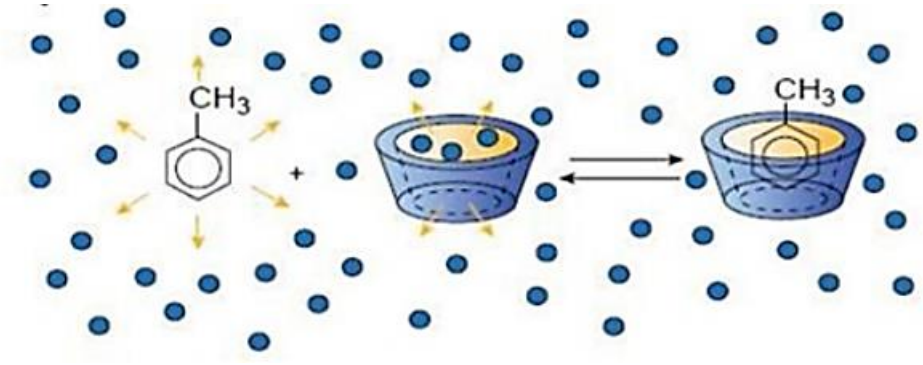


Figure 92 : Exemple de formation d'un complexe d'inclusion. Les flèches jaunes représentent les forces répulsives des interactions polaires-apolaires.

La stabilité de cet édifice supramoléculaire est dépendant de plusieurs paramètres, tels que le solvant et les tailles respectives de la cyclodextrine et de la molécule invitée. Ainsi, l'α-cyclodextrine ne peut encapsuler que des molécules de faible masse moléculaire. Cependant, si la γ-cyclodextrine possède une cavité bien plus grande, sa structure est trop peu rigide pour conduire à la formation de complexes d'inclusion suffisamment stables. En revanche, la rigidité et la taille de la cavité de la β-cyclodextrine permet de former des complexes stables avec de nombreux aromatiques et hétérocycles. Ces caractéristiques ont alors favorisé l'utilisation de la β-cyclodextrine pour des applications d'encapsulations, notamment de principes actifs.

1.3 Encapsulation d'agents anticancéreux tel que la doxorubicine

La formation de complexes d'inclusion avec la β-cyclodextrine a particulièrement été étudiée, pour la formulation de principes actifs très hydrophobes, tels que des agents anticancéreux, des molécules anti-inflammatoires, des antalgiques ou des antibiotiques afin de faciliter leur

[251] R. Singh, N. Bharti, J. Madan, S. N. Hiremath, *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, **2010**, 2, 171-183.

administration.[252, 253] De même, leur utilisation comme capsule a été développée afin de délivrer des agents anticancéreux de manière plus sélective au niveau des tumeurs.[254, 255, 256, 257, 258, 259]

Cette stratégie a particulièrement été explorée pour l'encapsulation et le transport de la doxorubicine[260, 261, 262, 263, 264] par le développement de nanoparticules,[265, 266] polymères[267, 268, 269] ou dendrimères[270] de β-cyclodextrines en tirant parti de sa forte interaction hôte-invité avec ces dernières.

Dans une moindre mesure, des agents de ciblage tels que l'acide folique ont également été fonctionnalisés par des cyclodextrines dans le but de transporter des molécules cytotoxiques aux sein des cellules tumorales exprimant le récepteur correspondant.[271, 272] En revanche, aucune stratégie n'a été étudiée pour permettre l'encapsulation *in situ* du principe actif par ces oligosaccharides cycliques.

2 Synthèse du vecteur **89**

2.1 Schéma rétrosynthétique

Le vecteur **89** pourra être obtenu par réaction entre l'ester de NHS du maléimide **63** et l'amine **100** (Figure 93). Cette dernière sera accessible grâce à une triple réaction de cycloaddition [3+2] entre la 6-monoazido-6-monodeoxy-β-cyclodextrine **99** et le trialcyne **95**. Celui-ci sera quant à lui disponible

[252] S. B. Carneiro, F. Í. Costa Duarte, L. Heimfarth, J. S. Siqueira Quintans, L. J. Quintans-Júnior, V. F. Veiga Jr, Á. A. Neves de Lima, *Int. J. Mol. Sci*., **2019**, 20, 642.
[253] F. N. S. Al-Heibshy, E. Başaran, N. Öztürk, M. Demirel, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **2020**, 46, 1495 - 1506.
[254] K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie*, Chem. Rev*., **1998**, 98, 2045 - 2076.
[255] C. Di Donato, M. Lavorgna, R. Fattorusso, C. Isernia, M. Isidori, G. Malgieri, C. Piscitelli, C. Russo, L. Russo, R. Iacovino, *Molecules*, **2016**, 21, 1644.
[256] B. Gidwani, A. Vyas, *Biomed. Res. Int*., **2015**, 2015, 198268.
[257] J. Zhang, P. X. Ma, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2013**, 65, 1215 - 1233.
[258] D. Zhang, P. Lv, C. Zhou, Y. Zhao, X. Liao, B. Yang, *Materials Science and Engineering: C*, **2019**, 96, 872 - 886.
[259] J. Wankar, N. G. Kotla, S. Gera, S. Rasala, A. Pandit, Y. A. Rochev, *Adv. Funct. Mater*. **2020**, 1909049.
[260] O. Bekers, J. H. Beijnen, M. Otagiri, A. Bult, W. J. M. Underberg, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1990**, 8, 671 - 674.
[261] N. Husain, T. T. Ndou, A. Munoz De La Pena, I. M. Warner, *Applied Spectroscopy*, **1992**, 46, 652 - 658.
[262] O. Swiech, A. Mieczkowska, K. Chmurski, R. Bilewicz, *J. Phys. Chem. B*, **2012**, 116, 1765 - 1771.
[263] N. Mohammad, S. Vikram Singh, P. Malvi, B. Chaube, D. Athavale, M. Vanuopadath, S. S. Nair, B. Nair, M. K. Bhat, *Sci. Rep*., **2015**, 5, 11853.
[264] O. Swiech, P. Dutkiewicz, K. E. Wójciuk, K. Z. Chmurski, M. Kruszewski, R. Bilewicz, *J. Phys. Chem. B*, **2013**, 117, 13444 - 13450.
[265] M.-X. Zhao, B.-J. Zhu, W.-J. Yao, D.-F. Chen, C. Wang, *Chem. Biol. Drug. Des*., **2018**, 91, 285 - 293.
[266] E. C. da S. Santosa, A. Watanabea, M. D. Vargasa , M. N. Tanaka, F. Garciab , C. M. Ronconi, *New J. Chem*., **2018**, 42, 671 - 680.
[267] A. Kowalczyk, A. Kasprzak, M. Poplawska, M. Ruzycka, I. P. Grudzinski, A. M. Nowicka, *Int. J. Mol. Sci*., **2020**, 21, 5832.
[268] R. Anand, F. Manoli, I. Manet, S. Daoud-Mahammed, V. Agostoni, R. Gref, S. Monti, *Photochem. Photobiol. Sci*., **2012**, 11, 1285 - 1292.
[269] L. Y. Qiu, R. J. Wang, C. Zheng, Y. Jin, L. Q. Jin, *Nanomedicine*, **2010**, 5, 193 - 208.
[270] T. Yousef, N. Hassan, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem*., **2017**, 87, 105 - 115.
[271] A. Okamatsu, K. Motoyama, R. Onodera, T. Higashi, T. Koshigoe, Y. Shimada, K. Hattori, T. Takeuchi, H. Arima, *Bioconjugate Chem*., **2013**, 24, 724 - 733.
[272] S. Salmaso, A. Semenzato, P. Caliceti, *Bioconjugate Chem*., **2004**, 15, 997 - 1004.

après la fonctionnalisation de la triamine **47** (Chapitre 1, Figure 43, Page 68) par l'ester de NHS de l'acide hexynoïque **93**.

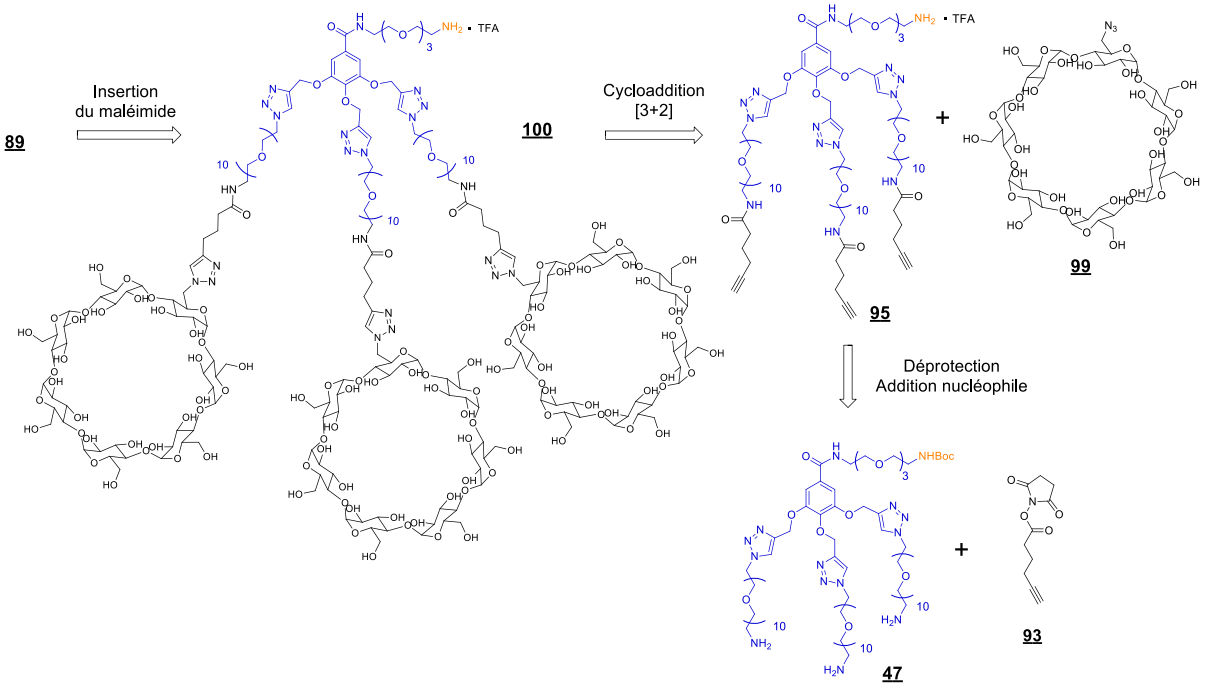


Figure 93 : Schéma rétrosynthétique.

2.2 Synthèse du vecteur 89

2.2.1 Préparation du trialcyne 95

L'ester de NHS de l'acide hexynoïque **93** est préparé par une réaction de couplage de type peptidique entre l'acide hexynoïque **92** et le N-hydroxysuccinimide en présence d'EDC.HCl (Figure 94). Après une nuit de réaction à température ambiante dans le dichlorométhane, l'ester actif **93** est obtenu avec un rendement de 86 % après purification sur gel de silice. Une analyse RMN ^{1}H a permis de confirmer la structure du composé **93**, avec un triplet à 2,01 ppm (^{4}J de 2,8 Hz) intégrant pour un proton correspondant à l'alcyne vrai. De plus, un singulet large à 2,84 ppm intégrant pour quatre protons atteste de la présence du motif NHS.

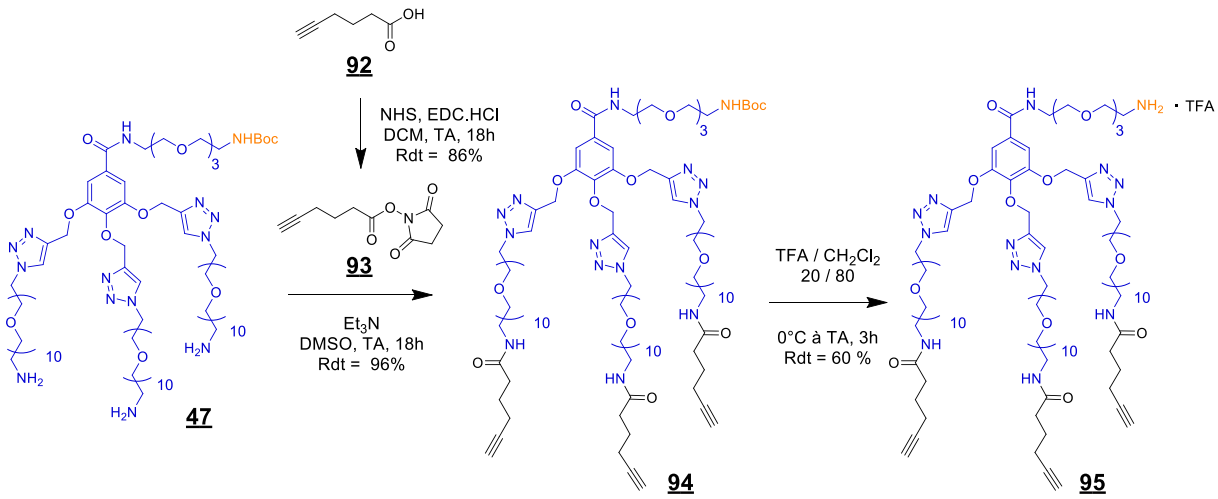


Figure 94 : Synthèse du trialcyne 95.

L'addition de la triamine **47** sur l'ester activé **93** est réalisée dans le DMSO en présence de triéthylamine. Cette réaction permet d'obtenir le trialcyne **94** avec un rendement de 96 % après sa purification par chromatographie flash. L'insertion des fonctions alcyne est confirmée par analyse RMN ^{1}H avec la présence d'un triplet à 2,03 ppm intégrant pour trois protons avec une constante de couplage de 2,4 Hz.

La déprotection de l'amine du composé **94** est réalisée par la décarbamoylation de la fonction carbamate de *tert*-butyle en présence d'acide trifluoroacétique à 20 % dans le dichlorométhane. Une purification par chromatographie en phase inverse permet alors d'accéder au composé **95** sous la forme d'un sel d'acide trifluoroacétique avec un rendement de 60 %. La déprotection de la fonction amine est confirmée par la disparition du singulet du groupement *tert*-butyle à 1,37 ppm en RMN ^{1}H.

2.2.2 Préparation de la 6-monoazido-6-monodeoxy-β-cyclodextrine 99

La 6-monoazido-6-monodeoxy-β-cyclodextrine **99** a été préparée en deux étapes à partir de la β-cyclodextrine **97** (Figure 95). Tout d'abord, la β-cyclodextrine est monotosylée en utilisant le tosylimidazole **96** selon un protocole issu de la littérature.[273] Ce réactif est synthétisé par une réaction de substitution nucléophile de l'imidazole sur le chlorure de tosyle dans le dichlorométhane avec un rendement de 92 %. La 6-monotosyl-β-cyclodextrine **98** est obtenue par substitution nucléophile de l'imidazole du composé **96** par une des fonctions hydroxyles en position 6 de la β-cyclodextrine. Cette réaction est réalisée dans l'eau en présence d'hydroxyde de sodium. L'acidification du milieu réactionnel (pH = 5 - 6) permet de faire précipiter la β-cyclodextrine activée **98**, qui est alors isolée par filtration avec un rendement de 40 %. Le spectre RMN ^{1}H confirme la structure de la β-cyclodextrine **98** avec l'apparition de deux doublets (2H) à 7,74 et 7,42 ppm avec constante de couplage de 8,0 Hz correspondants aux protons aromatiques ainsi qu'un singulet (3H) à 2,42 ppm correspondant au méthyle du groupement tosyle.

[273] C. Bertolla, S. Rolin, B. Evrard, L. Pochet, B. Masereel, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, 18, 1855 - 1858.

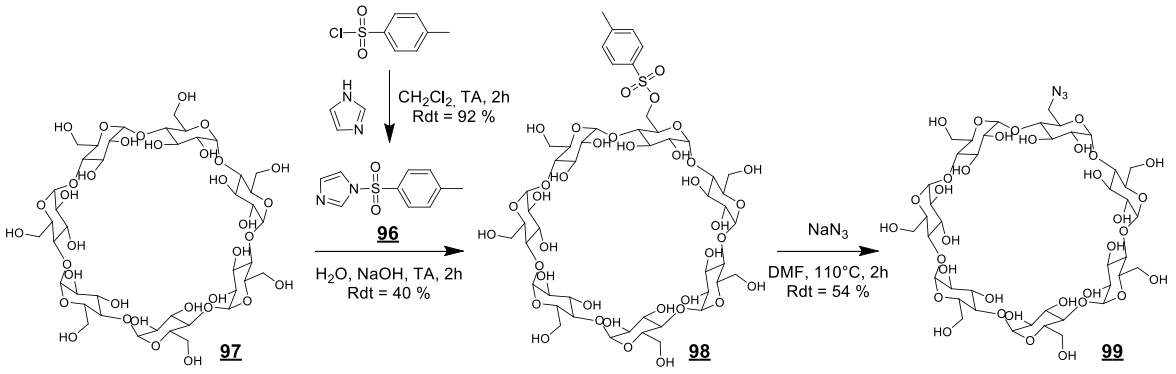


Figure 95 : Synthèse de la 6-monoazido-6-monodeoxy-β-cyclodextrine 99.

La sélectivité de la réaction est contrôlée par la formation d'un complexe d'inclusion du tosylimidazole **96** dans la cavité hydrophobe de la β-cyclodextrine **97** avec une stœchiométrie de 1 : 1 favorisant alors le composé **98** issu de la monotosylation (Figure 96).

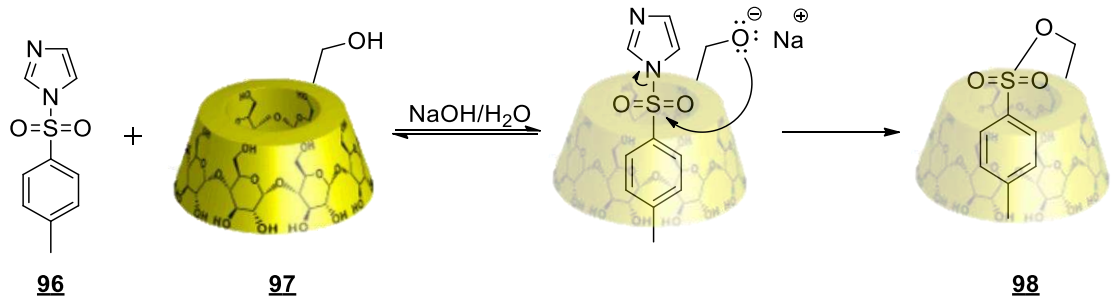


Figure 96 : Mécanisme réactionnel de la monosubstitution sélective du tosylimidazole.

La deuxième étape consiste à substituer l'alcool activé du composé **98** via une réaction de substitution nucléophile par l'azoture de sodium dans le DMF à chaud. Une recristallisation du brut réactionnel dans un mélange H_2O/acétone (2/8) permet d'isoler la 6-monoazido-6-monodeoxy-β-cyclodextrine **99** avec un rendement de 54%.

2.2.1 Synthèse du trimère **89** par triple réaction de cycloaddition [3+2]

La triple réaction de cycloaddition [3+2] entre l'azidocyclodextrine **99** et le trialcyne **95** a été réalisée dans un premier temps dans des conditions similaires à celles utilisées pour la synthèse du vecteur **37**. (Figure 97)

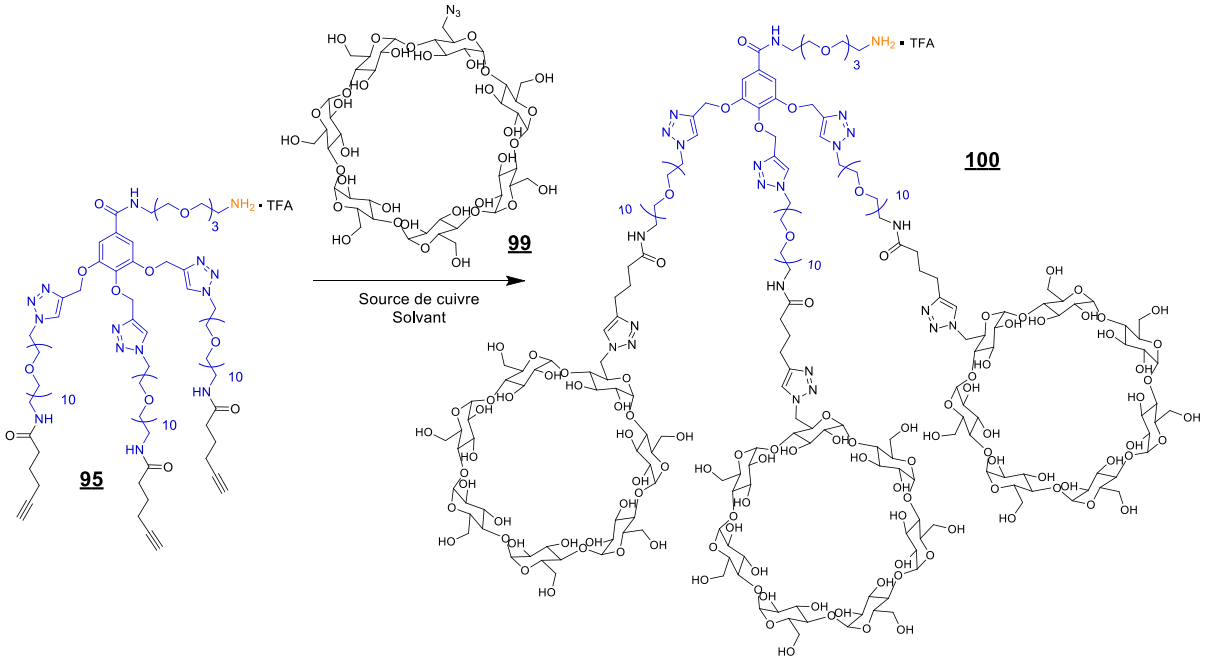


Figure 97 : Triple réaction de cycloaddition [3+2].

Il est à noter que dans ces conditions réactionnelles (mélange H_2O/*t*-butanol ; $CuSO_4$/Ascorbate de sodium ; sans THPTA) l'avancement de la réaction est très faible (Figure 98-A). En effet, après 88 heures de réaction et l'ajout séquentiel de $CuSO_4$ et d'ascorbate de sodium (4 x 3 équivalents), on constate la présence résiduelle du trialcyne de départ **95**, ainsi que des intermédiaires correspondant à la mono et di cycloaddition. Le trimère **100** est néanmoins formé au cours de la réaction. Cependant, nous observons également par LC-MS du milieu réactionnel la formation des produits de dégradation correspondant aux composés **101** et **102** issus de la rupture d'une des liaisons éther (Figure 99). Cette faible réactivité peut être expliquée par l'inclusion de l'ion cuivreux au sein de la cavité de la cyclodextrine, défavorisant alors la réaction de cycloaddition.

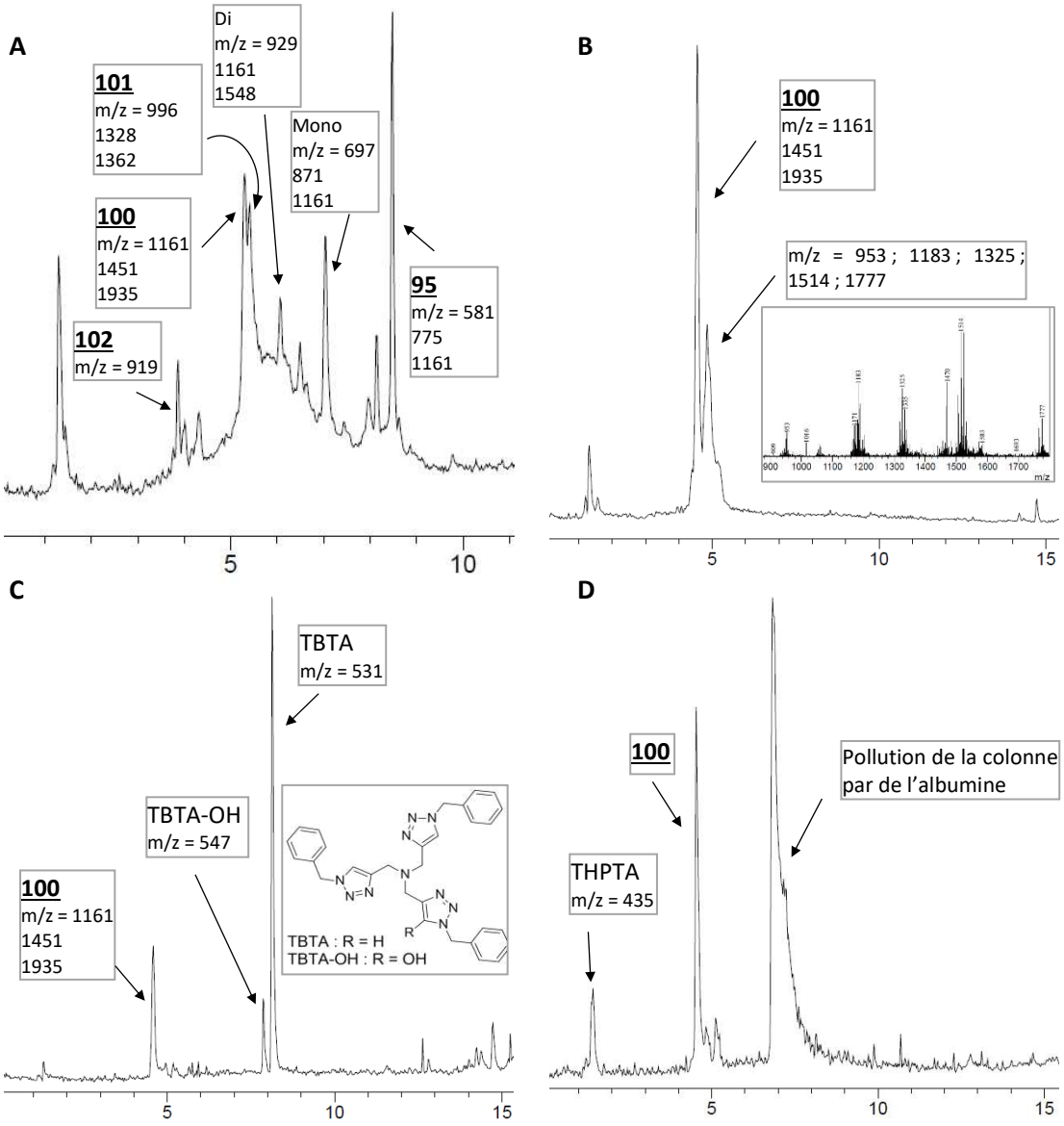


Figure 98 : Chromatogrammes LC-MS du milieu réactionnel de la triple cycloaddition [3+2] obtenus en fonction des conditions opératoires.

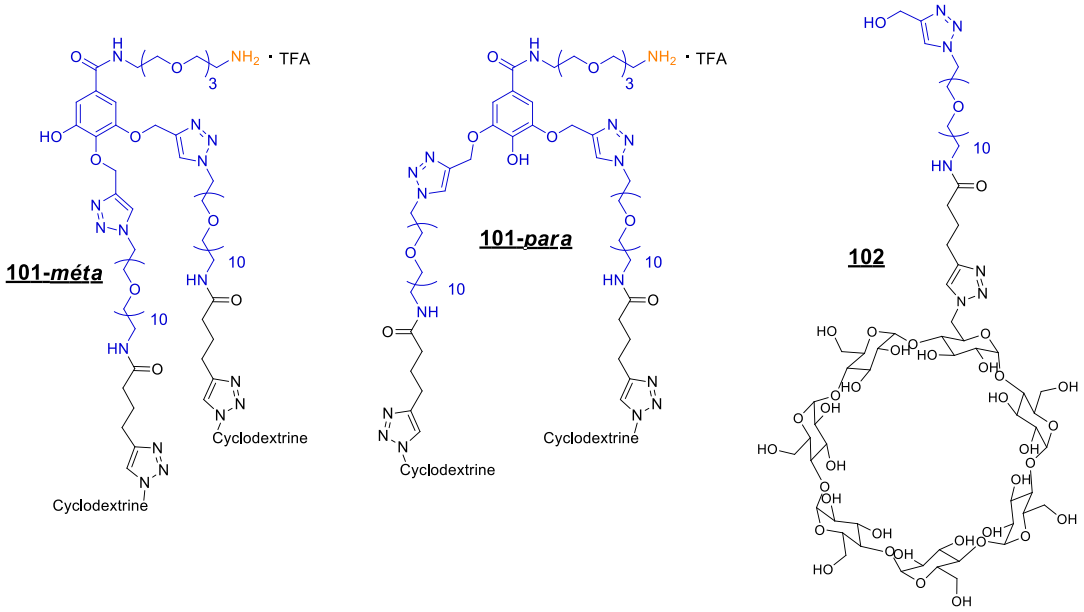


Figure 99 : Produits de dégradations observés.

Pour pallier ce problème, les deux synthons **95** et **99** ont été mis en réaction dans le DMSO en présence de $Cu(MeCN)_4PF_6$ (Figure 98-B). Après deux jours de réaction, le trimère de cyclodextrine **100** a été isolé avec un rendement de 31 % après une purification par chromatographie en phase inverse. Dans ces conditions, les produits de dégradation **101** et **102** n'ont pas été observés. Il semblerait donc que l'utilisation du DMSO comme solvant de la réaction défavorise la complexation du cuivre sur le motif *tris*-triazole, limitant ainsi la rupture de la liaison éther. Cependant, la formation d'un nouveau produit secondaire inconnu à ce jour, dont le spectre de masse indique un composé de haut poids moléculaire, difficilement séparable du trimère **100** souhaité limite fortement le rendement de la réaction.

Afin d'accélérer la réaction et d'éviter la formation de produits secondaires, nous avons utilisé le TBTA (tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine) comme ligand du cuivre (Figure 98-C). Il s'agit d'un ligand analogue au THPTA utilisé pour la synthèse du vecteur **37** (Chapitre 1). Dans ces conditions opératoires, aucun produit de dégradation n'est observé au cours de la réaction. Le trimère de cyclodextrines **100** a alors été obtenu en cinq heures avec un rendement de 56 % après purification par chromatographie en phase inverse. Il est à noter que le TBTA semble contribuer activement à l'inhibition de la dégradation du trimère **100**. En effet, on peut observer un pic, plus polaire que le TBTA. Le spectre de masse de ce dernier indique un rapport m/z de 547, soit une augmentation de la masse moléculaire du TBTA de 16. Cela pourrait correspondre à une hydroxylation de ce dernier (M+16) au cours de la réaction de cycloaddition [3+2], potentiellement au niveau d'un de ses triazoles (TBTA-OH).

Un meilleur rendement a cependant été obtenu lors d'une optimisation ultérieure, en utilisant le THPTA comme ligand du cuivre (Figure 98-D). Ces conditions opératoires ont alors permis d'obtenir le trimère de cyclodextrines **100**, après une nuit de réaction puis purification par chromatographie en phase inverse, avec un rendement de 66 %. (Figure 100)

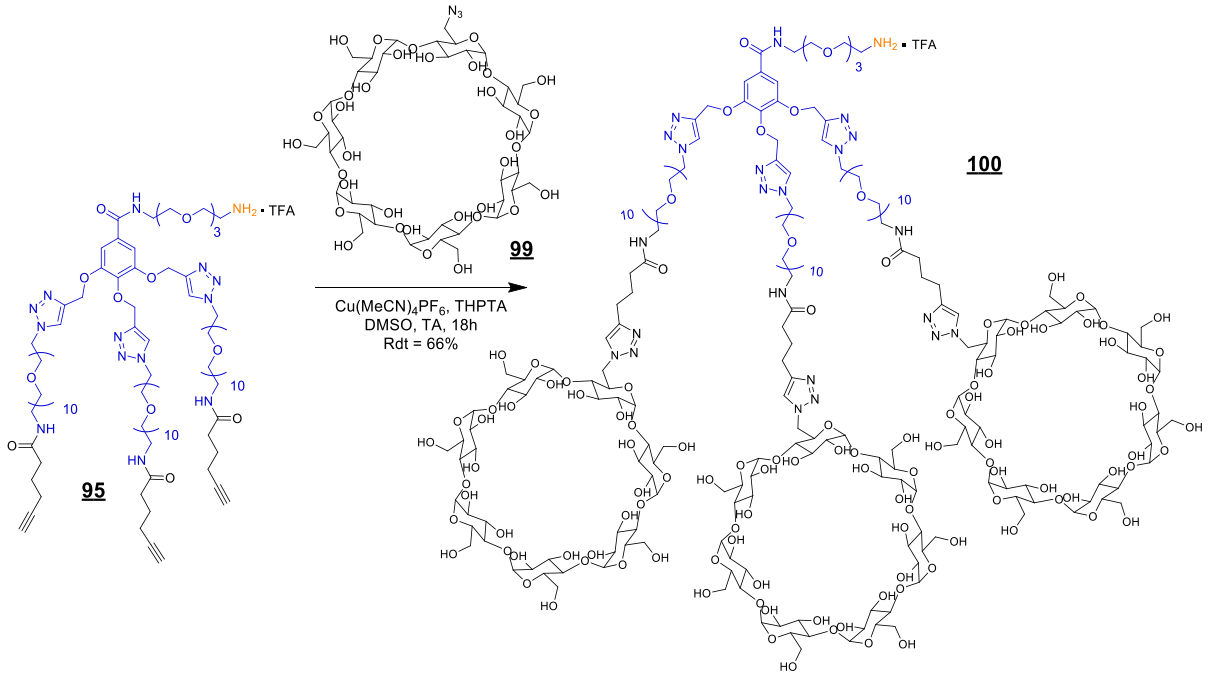


*Figure 100 : Conditions optimales pour la formation du trimère de cyclodextrine **100**.*

L'addition de l'amine **100** sur l'ester activé **63** a été réalisée dans le DMSO en présence de triéthylamine. (Figure 101) Cette réaction permet d'accéder au vecteur **89** en deux heures avec un rendement de 87 % après purification par chromatographie en phase inverse. La formation de ce dernier a été confirmée par HRMS indiquant un rapport m/z de 1498.6350 ($[M+4H]^{4+}$). L'insertion du motif maléimide a également été observée en RMN ^{1}H avec l'apparition d'un singulet (2H) à 6,82 ppm correspondant aux deux protons de l'alcène intracyclique.

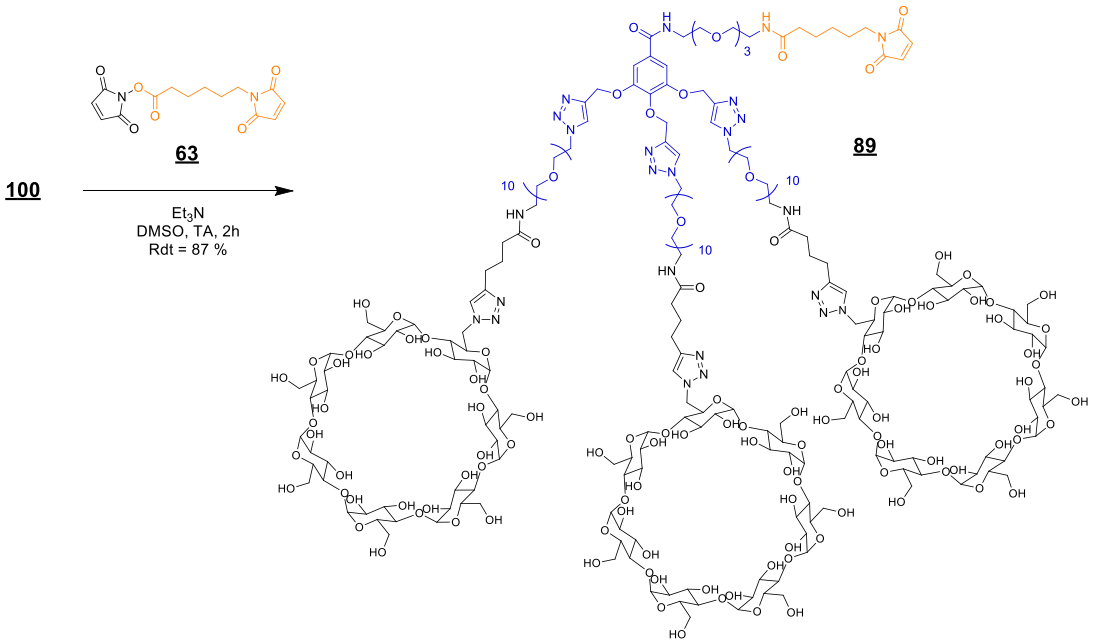


*Figure 101 : Synthèse du vecteur **89**.*

Cette stratégie de synthèse nous a donc permis d'obtenir le trimère de cyclodextrine **89** avec un rendement de 33 % en quatre étapes à partir de la triamine intermédiaire **47**.

3 Evaluation biologique du vecteur 89

3.1 Ligation à l'albumine

Nous avons étudié la réaction d'addition de Michael du thiol de l'albumine sur le motif maléimide du vecteur trimérique **89** (Figure 102). Cette étape étant cruciale au bon fonctionnement de la stratégie de vectorisation, il est nécessaire de s'assurer que le bioconjugué **90** se forme en présence d'albumine.

Le composé **89** (1 $mg.mL^{-1}$) a été incubé à 37 °C dans une solution aqueuse d'albumine humaine (4 équivalents) reconstituée à partir d'albumine lyophilisée solubilisée dans du tampon phosphate (0,02 M, pH = 7). L'évolution de la composition du mélange au cours du temps est suivie par HPLC (Figure 102-A). Dans ces conditions, on observe la disparition rapide du vecteur **89** (tr = 2,6 minutes). En effet, 80 % de la quantité de **89** initiale est consommée à l'issue des deux premières minutes d'incubation. La fin de la réaction est plus lente puisqu'après cinq heures de réaction, la présence de **89** est toujours observée (2,5%, Figure 102-B). Cette expérience montre que le maléimide du vecteur **89** est capable de réagir rapidement avec le thiol de l'albumine.

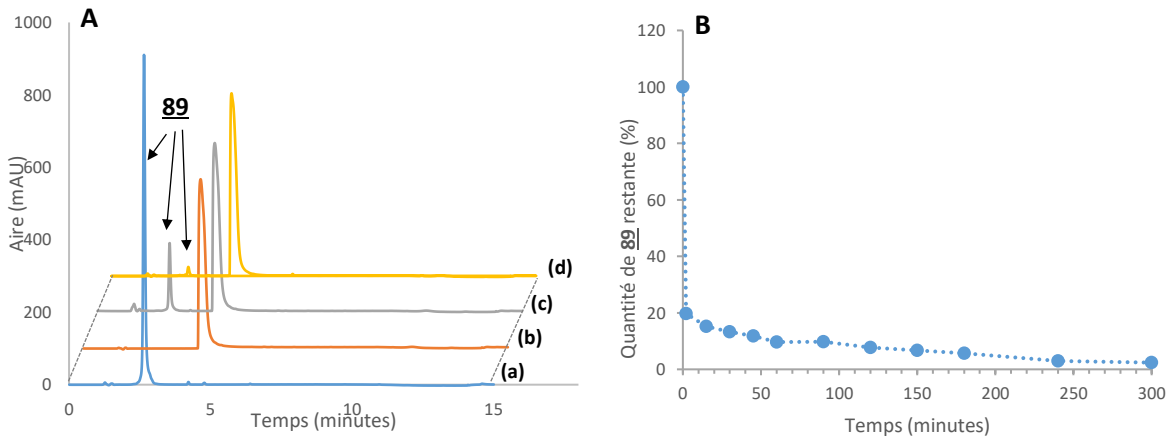


Figure 102 : A) Chromatogrammes HPLC de la ligation à l'albumine du vecteur 89 dans le PBS (0,02 M, pH = 7) à 37 °C (a : Vecteur 89 (1 $mg.mL^{-1}$) ; b : Albumine ; c : analyse après 2 minutes d'incubation ; d : analyse après cinq heures d'incubation). B) Suivi de la réaction au cours du temps.

3.2 Etude par fluorescence de l'encapsulation de la doxorubicine

La formation du complexe d'inclusion entre les cyclodextrines du vecteur **89** et la doxorubicine a été étudiée par spectroscopie de fluorescence, une technique largement utilisée dans la littérature pour évaluer ce processus.[271] Pour cela, le spectre d'émission de la doxorubicine a été mesuré dans le tampon phosphate (0,02 M, pH = 7) à une concentration de 1.10^{-5} M, ce qui permet d'obtenir un spectre de référence. Ensuite des solutions contenant de la doxorubicine (1.10^{-5} M) et le trimère de cyclodextrines **89** à différentes concentrations (de 4.10^{-6} M à 2.10^{-5} M) ont été réalisées et les spectres d'émission correspondants ont été mesurés. (Figure 103)

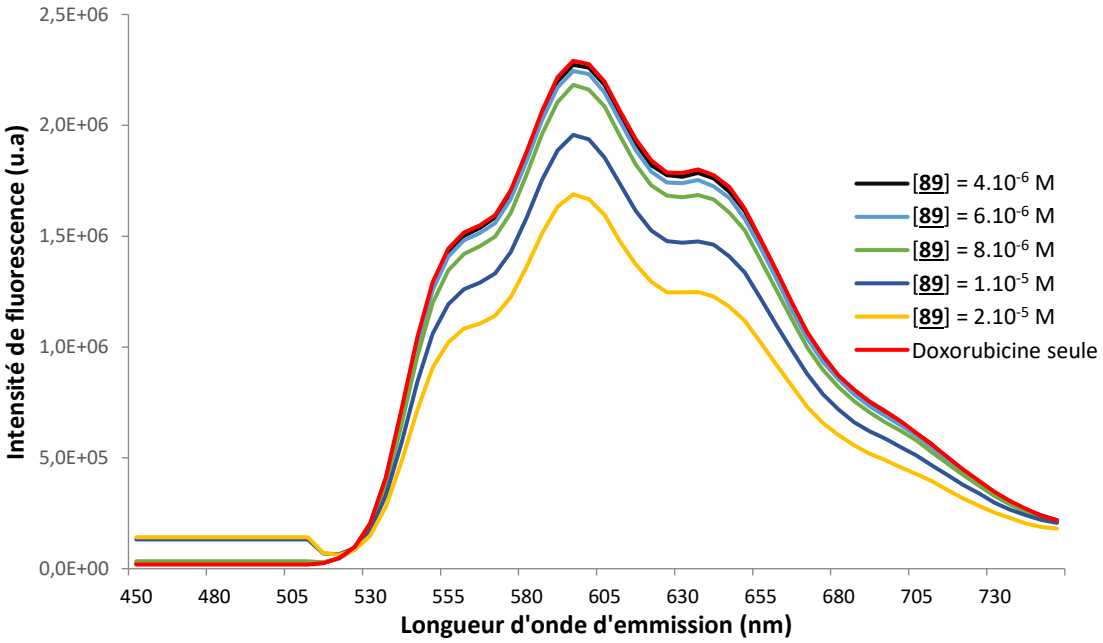


Figure 103 : Influence du trimère de cyclodextrine 89 sur le spectre de fluorescence de la Doxorubicine (PBS ; pH = 7 ; [doxorubicine] = 1.10^{-5} M ; λex = 500 nm).

On constate que la présence du trimère de cyclodextrine **89** a un impact sur le spectre de fluorescence de la doxorubicine. En effet, l'intensité de l'émission de la doxorubicine diminue lorsque la concentration de **89** augmente. Ce résultat atteste donc de l'interaction entre la doxorubicine et les cyclodextrines de **89** qui découle de la formation du complexe d'inclusion.

3.3 Evaluation de l'efficacité thérapeutique du vecteur in vivo

L'efficacité thérapeutique du vecteur **89** a été évaluée sur un modèle de tumeur pulmonaire murine de type LLC (Lung Lewis Carcinoma) implanté en sous-cutané chez la souris immunocompétente C57BL/6. Ce protocole comprenait quatre groupes d'animaux (n = 6) répartis de la façon suivante :

- Un premier groupe contrôle qui n'a pas reçu de traitement.
- Un second groupe traité par la doxorubicine à une dose non toxique de 5 mg.kg^{-1}, administré par voie intraveineuse une fois tous les sept jours durant deux semaines.
- Un troisième groupe traité avec le vecteur **89** à la dose de 38,8 mg.kg^{-1}, administré selon le même protocole que celui décrit pour la doxorubicine.
- Un quatrième groupe qui a reçu le traitement combiné associant l'adjuvant **89** (38,8 mg.kg^{-1}) et la doxorubicine (5 mg.kg^{-1}). Dans ce cas, le vecteur **89** a été injecté le premier, suivi de la doxorubicine, avec un délai de cinq heures entre les deux administrations.

Dans ces conditions, le vecteur **89** (38,8 mg.kg^{-1}, 6,47 µmol.kg^{-1}) est administré en quantité sub-stœchiométrique (0,75 équivalents) par rapport à la doxorubicine (5 mg.kg^{-1}, 8,62 µmol.kg^{-1}) (Tableau 8). En revanche, en raison de la ramification de la structure de **89**, la concentration de cyclodextrine est triplée (19,42 µmol.kg^{-1}) et représente une quantité 2,25 fois supérieure à celle de l'anthracycline.

Tableau 8 : Correspondance entre les doses du vecteur 89 et de la doxorubicine utilisées durant l'étude.

Vecteur 89 (38,80 mg.kg^{-1}, M = 5993,94 g.mol^{-1})		**Doxorubicine.HCl** (5 mg.kg^{-1}, M = 579,98 g.mol^{-1})	**Comparaison**	
Dose molaire (µmol.kg^{-1})	Equivalent molaire en cyclodextrine (µmol.kg^{-1})	Dose molaire (µmol.kg^{-1})	Ratio molaire **89**/doxorubicine	Equivalent molaire cyclodextrine/doxorubicine
6,47	19,42	8,62	0,75	2,25

Le vecteur **89** et la doxorubicine ont été injectés par voie intraveineuse par la veine caudale aux jours 4 et 11 après l'induction des tumeurs. Les volumes tumoraux et le poids des souris ont été mesurés durant les 17 jours de l'expérimentation (Figure 104).

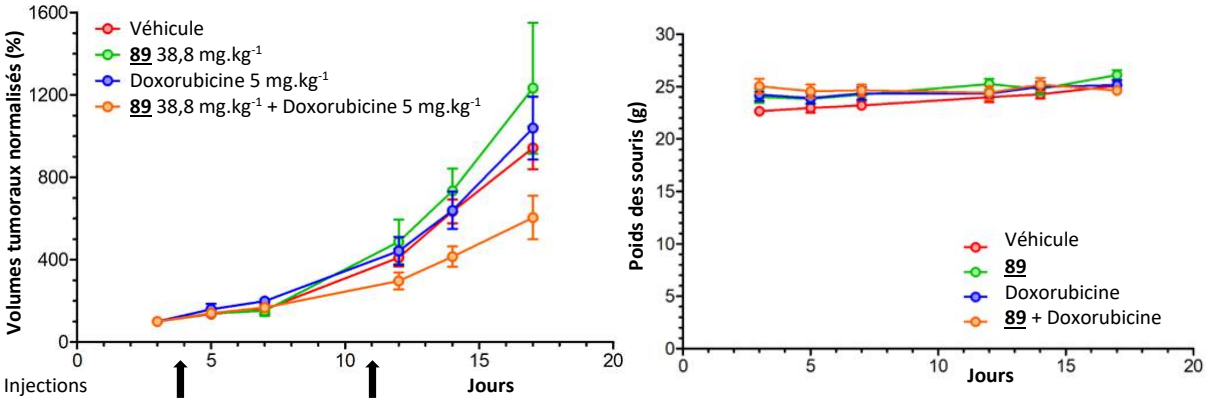


Figure 104 : Efficacité thérapeutique de la combinaison doxorubicine (5 mg.kg^{-1}) + 89 (38,8 mg.kg^{-1}) comparée à celles de la doxorubicine seule (5 mg.kg^{-1}) et du vecteur 89 seul (38,8 mg.kg^{-1}), administrés voie i.v. dans la veine caudale aux jours 4 et 11, sur un modèle de tumeur pulmonaire LLC chez la souris immunocompétente C57BL/6. Evolution du poids des souris au cours de l'étude.

Les résultats obtenus indiquent que la doxorubicine n'est pas efficace à la dose de 5 mg.kg^{-1} pour le traitement de ce type de tumeur chez la souris. En effet, aucune inhibition de la croissance tumorale n'est observée à la fin de l'étude (jour 17) par rapport au groupe contrôle. De même, le vecteur **89** administré seul, ne produit aucun bénéfice thérapeutique. En revanche, dans le groupe d'animaux traités avec la combinaison de l'adjuvant **89** et de la doxorubicine à ces mêmes doses, une inhibition de la croissance tumorale est observée à partir du jour 12 suivant l'implantation tumorale. A la fin du protocole (jour 17), les volumes tumoraux du groupe traité avec cette combinaison sont réduits de 40 % par rapport au groupe traité avec la doxorubicine. Le suivi pondéral des souris au cours de l'étude montre que tous les traitements ont été parfaitement bien supportés, puisqu'aucune perte de poids n'a été mesurée.

Ces résultats démontrent que l'association de l'adjuvant **89** à la doxorubicine contribue à l'augmentation de l'efficacité antitumorale de l'anthracycline. Cet effet peut être attribué à la formation d'un complexe d'inclusion entre la doxorubicine et les cyclodextrines du vecteur macromoléculaire **90** directement dans le flux sanguin conduisant à une augmentation de la concentration de la doxorubicine au niveau de la tumeur.

Afin de confirmer cette hypothèse, le dosage de la quantité de doxorubicine déposée dans les tissus malins a été réalisé sur les biopsies des tumeurs prélevés au jour 17. Dans le cadre de cette expérience, les groupes traités uniquement par la doxorubicine ainsi que ceux ayant reçu la combinaison **89** et doxorubicine ont été comparés (Figure 105).

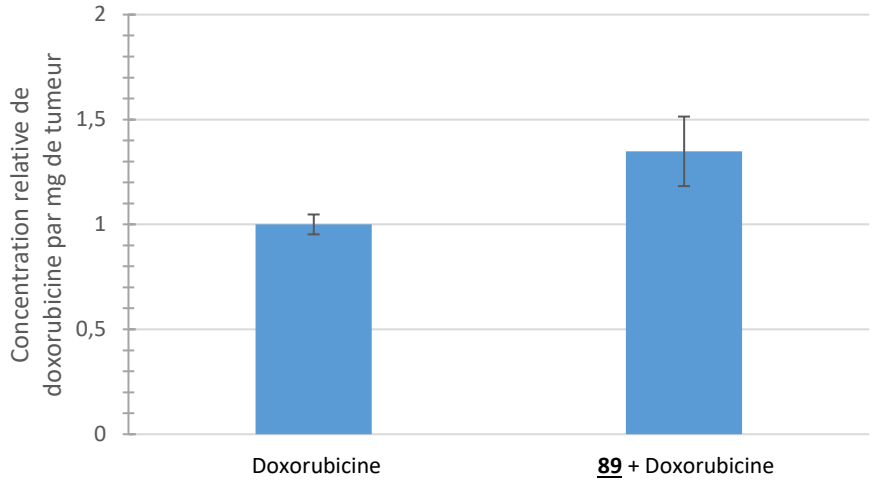


Figure 105 : Concentration relative de doxorubicine exprimée par le rapport entre l'aire de la doxorubicine, extraite des homogénats de tissus tumoraux, et la masse des tumeurs.

Cette expérience indique que la concentration de doxorubicine déposée au niveau des tumeurs est 35 % plus importante pour le groupe ayant reçu la combinaison doxorubicine et **89** par rapport au groupe traité par la doxorubicine seule. Ce résultat confirme donc que l'efficacité thérapeutique accrue obtenue lors du traitement combiné est bien la conséquence d'une accumulation plus importante de la doxorubicine au niveau de la tumeur.

4 Conclusion

Le but de cette étude était d'augmenter l'efficacité anticancéreuse de la doxorubicine, sans modifier sa structure, de manière supramoléculaire, grâce à l'utilisation de la plateforme **89** comme adjuvant thérapeutique. Cette dernière a été conçue pour se lier de manière covalente avec l'albumine plasmatique, afin d'augmenter artificiellement son affinité avec la doxorubicine, par la présence de trois cyclodextrines. Profitant du tropisme de l'albumine vers les tissus cancéreux, le vecteur **89** pourra contribuer à l'accumulation de la doxorubicine sélectivement au niveau de la tumeur augmentant ainsi son efficacité.

Au cours de cette étude, nous avons pu synthétiser le vecteur **89** et caractériser son interaction avec la doxorubicine par spectroscopie de fluorescence. Enfin, son évaluation biologique a été réalisée lors d'un protocole chimiothérapeutique sur un modèle de tumeur du poumon de type LLC implanté chez la souris immunocompétente. Ces essais ont démontré que l'association du vecteur **89** à la doxorubicine produisait une efficacité anticancéreuse plus importante que la doxorubicine seule. Cette observation a par la suite été confirmée par l'analyse des tissus cancéreux à la fin du protocole, indiquant une concentration de doxorubicine 35 % plus importante pour les souris du groupe ayant reçu la combinaison **89** et doxorubicine.

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 utilisées pour combattre le cancer parmi lesquelles la chirurgie, la radiothérapie ou la chimiothérapie. Bien que cette dernière reste la méthode de choix pour le traitement d'un grand nombre de pathologies malignes, le manque de sélectivité des agents anticancéreux utilisés dans ce cadre représente, encore à ce jour, un problème majeur. En effet, ces traitements provoquent généralement de lourds effets secondaires associés à une destruction importante des tissus sains. Par conséquent, le développement de nouvelles stratégies conçues pour détruire sélectivement les tumeurs sans affecter les autres organes représente un intérêt majeur dans la lutte contre le cancer. Parmi les différents concepts étudiés, l'utilisation de vecteurs capables de reconnaitre et d'interagir avec des spécificités propres à la tumeur constitue un des aspects les plus prometteurs du ciblage thérapeutique.

Dans ce cadre, l'utilisation de vecteurs glucuronylés est une stratégie particulièrement intéressante qui a conduit à des résultats très encourageants chez l'animal. Cependant, par leur nature, ces composés possèdent une faible demi-vie plasmatique, ce qui nécessite de les administrer à de fortes doses afin d'obtenir un effet thérapeutique significatif. Pour pallier ce problème, notre équipe a entrepris le développement de vecteurs glucuronylés d'agents cytotoxiques extrêmement puissants, tel que l'auristatine monométhyle E (MMAE), capable de se lier *in situ* à l'albumine plasmatique au moyen d'un groupement maléimide (vecteur **24**). Cette stratégie présente un double avantage puisqu'elle permet de cibler non seulement la β-glucuronidase surexprimée dans le microenvironnement mais aussi les défauts de vascularisation des tissus cancéreux par effet EPR. De plus, la conjugaison à l'albumine plasmatique contribue à l'augmentation de la demi-vie, passant de quelques minutes à plusieurs jours pour les vecteurs glucuronylés.

Afin d'augmenter l'efficacité des vecteurs glucuronylés capables de se lier à l'albumine plasmatique, nous avons synthétisé le vecteur glucuronylé trimérique de la MMAE **37**. Grâce à son architecture moléculaire, ce dernier est capable de former *in situ* un vecteur macromoléculaire possédant un DAlbR (Drug to Albumin Ratio) parfaitement contrôlé de trois, augmentant *de facto* l'efficacité de cette stratégie par rapport à l'utilisation du monomère correspondant. Les évaluations *in vitro* ont permis de démontrer que le vecteur trimérique **37** possédait une activité antiprolifération près de trois fois supérieure à celle du vecteur monomérique **24** sur des cultures de cellules tumorales KB et MIA PaCa-2. L'étude pharmacocinétique de **37** chez la souris a permis d'estimer sa demi-vie plasmatique à 28 heures, ce qui est proche de celle de l'albumine. Une étude comparative menée *in vivo* sur un modèle de tumeur du pancréas MIA PaCa-2 implantées en orthotopique chez la souris a démontré que le trimère **37** est plus efficace que le monomère **24**, même lorsqu'il est administré à une quantité sub-stœchiométrique. De plus, le vecteur **37** peut être injecté une fois toutes les deux semaines sans réduire son efficacité thérapeutique sur ce modèle tumoral. Dans la seconde partie de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'impact de la modification du maléimide sur la stabilité du bioconjugué à l'albumine. Dans ce cadre, **74-R** et **75-R**, deux analogues de **37**, ont été synthétisés et évalués *in vivo*. Une étude de toxicité aigüe chez la souris a permis de démontrer que la modification du maléimide impacte la toxicité de ces vecteurs de manière significative. Ainsi, le vecteur **75-R** s'est

montré 1,5 fois moins toxique que **37**, et **74-R** ne présentait aucune toxicité jusqu'à la dose maximale administrée chez les animaux. De plus, l'évaluation de ces vecteurs *in vivo*, sur un modèle de tumeur mammaire MDA-MB-231 implantée en orthotopique chez la souris, a démontré que la diminution de leur toxicité n'était pas accompagnée d'une baisse de l'efficacité thérapeutique. Ces travaux ont été valorisés par leur publication dans le journal international à comité de lecture *Journal of Controlled Release*. Un brevet d'invention a également été publié pour l'utilisation des vecteurs **37-R**, **74-R** et **75-R** dans le cadre du traitement des tumeurs solides. Ce brevet est actuellement licencié par l'entreprise Seekyo qui assure le transfert clinique de cette technologie.

La recherche et le ciblage de nouvelles spécificités associées à la malignité représentent un intérêt majeur pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce cadre, nous avons étudié le ciblage de la β-*N*-acétylglucosaminidase, une enzyme lysosomale surexprimée dans de nombreux cancers. Ainsi, nous avons développé le premier vecteur *N*-acétylglucosaminylé de la MMAE. L'efficacité de cette approche a été évaluée *in vivo* sur un modèle de tumeur mammaire MDA-MB-231 implantée chez la souris. Ces expériences démontrent que l'administration du vecteur *N*-acétylglucosaminylé **80** conduit à une activité antitumorale remarquable, comparable à celle obtenue avec le vecteur glucuronylé **37**. Cette preuve de concept élargit le spectre des enzymes pouvant être utilisées comme cibles dans le cadre d'un protocole de vectorisation thérapeutique. En outre, cette découverte permet d'envisager des polychimiothérapies sélectives avec l'administration d'un cocktail de vecteurs enzymo-sensibles pouvant être activés de façon sélective dans le microenvironnement tumoral.

Le développement de nouveaux médicaments toxiques pour les cellules cancéreuses est l'un des enjeux principaux de la recherche en oncologie. Cependant, les étapes précliniques puis cliniques réglementaires constituent un véritable obstacle pour la mise sur le marché de molécules originales. Afin de pallier ce problème, nous avons étudié une nouvelle stratégie de ciblage basée sur l'utilisation du vecteur **89** capable de se lier *in situ* avec l'albumine et de transporter des principes actifs via des interactions supramoléculaires. En associant un maléimide à trois molécules de β-cyclodextrines, cet adjuvant non toxique peut en effet augmenter artificiellement la capacité de transport de molécules hydrophobes de la protéine plasmatique. Après leur administration par voie intraveineuse, les principes actifs sont dans ce cas piégés directement dans le flux sanguin par les cyclodextrines grâce à la formation d'un complexe d'inclusion hôte-invité. Ce complexe d'inclusion macromoléculaire s'accumule alors au sein des tumeurs grâce au tropisme physiopathologique de l'albumine, augmentant ainsi la concentration tumorale de l'agent anticancéreux qui est alors libéré suite à la dissociation équilibrée du complexe d'inclusion. Afin de valider cette stratégie de ciblage, nous avons étudié la vectorisation de la doxorubicine employée comme agent cytotoxique modèle. La formation du complexe d'inclusion entre l'anthracycline et les cyclodextrines du vecteur **89** a été confirmée par fluorescence. L'efficacité de cette stratégie a ensuite été évaluée *in vivo* sur un modèle de tumeur murine du poumon de type LLC chez la souris immunocompétente. Les résultats obtenus démontrent que l'administration du vecteur **89**, suivie de celle de la doxorubicine, conduit à une inhibition de la croissance tumorale de 40 % supérieure à celle enregistrée avec la doxorubicine seule. En outre, nous avons confirmé que cette efficacité accrue est la conséquence de l'accumulation préférentielle de l'agent actif dans les tumeurs des souris ayant reçu la combinaison thérapeutique.

PARTIE EXPERIMENTALE

1 General information

1.1 Reagents and solvents

All reactions were performed under an argon atmosphere. Unless otherwise stated, solvents used were of HPLC quality. Chemicals were of analytical grade from commercial sources and were used without further purification.

1.2 Reaction monitoring and purification

The reaction progress was monitored either by liquid chromatography, liquid chromatography coupled mass spectroscopy or on precoated silica gel TLC plates MACHEREY-NAGEL ALUGRAM® SIL G/UV254. (0.2 mm silica gel 60). Spots were visualized under 254 nm UV light and/or by dipping the TLC plate into a solution of phosphomolybdic acid (3 g) in ethanol (100 mL) followed by heating with a heat gun.

Automatic chromatographies were performed with a COMBIFLASH® RF 200I TELEDYNE ISCO instrument equipped with UV and ESLD detector and using flash cartridges Interchim® silica 15 or 50 µm for normal phase chromatography and HP C18 RediSep® GOLD 4g or 15,5g for reverse phase chromatography.

1.3 Analytical part

1.3.1 NMR studies

^{1}H, ^{19}F and ^{13}C NMR spectra were recorded at 400 MHz, 376 MHz and 100 MHz respectively on a Bruker 400 Avance III instrument, equipped with an ultra-shielded magnet and a BBFO 5 mm broadband probe. For selected compound ^{1}H and ^{13}C NMR were recorded at 500 MHz and 126 MHz on a Bruker spectrometer equipped with a cryoprobe TXI ^{1}H-^{13}C-^{15}N (5mm) in the Prism platform at University of Rennes. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) from low to high field and referenced to residual solvent. Coupling constants (J) are reported in hertz (Hz).

1.3.2 HRMS studies

Accurate mass was determined for all derivatives through their infusion on high resolution ESI mass spectrometers in the CBM/ICOA FR2708, at the University of Orléans and in the Organic Analysis Center of IC2MP at University of Poitiers.

1.3.3 HPLC experiments

Analytical RP-HPLC was carried out on a Dionex Ultimate 3000 system equipped with a UV/Visible variable wavelength detector and with a reverse-phase column chromatography MACHEREY-NAGEL NUCLEOSHELL® (150/4.6, RP18, 5 µm) at 30°C and 1 $mL.min^{-1}$. Method **1** used a linear gradient composed of A (0.2% TFA in water) and B (CH_3CN) beginning with 20% of B and reaching 100% of B within 30 min. All chromatograms were recorded at 254 nm.

1.3.4 LC-MS experiments

Analytical LC-MS was performed on a Shimadzu LCMS-2020. A reverse-phase column chromatography MACHEREY-NAGEL NUCLEOSHELL® (150/4.6, RP18, 5 µm) at 40°C was used for chromatographic separation at a flow rate of 1 $mL.min^{-1}$. The column effluent was introduced into the electrospray ionization source (ESI) of the mass spectrometer. Analyses were performed in positive and negative ion mode. The electrospray voltage was set at 4.5 kV. The capillary and heater temperatures were 250°C and 400°C respectively. The drying gas (nitrogen) and nebulizing gas (nitrogen) flow were set at 15 $L.min^{-1}$ and 1.5 $L.min^{-1}$ respectively. Analysis of data was performed with LabSolutions software. LC/MS experiments were performed using a linear gradient composed of A (0.1% formic acid in water) and B (0.1% formic acid in CH_3CN) starting from:

- 20% of B and reaching 100% of B within 15 min. (Method **2**).
- 10% of B and reaching 100% of B within 15 min. (Method **3**).

2 Experimental procedures

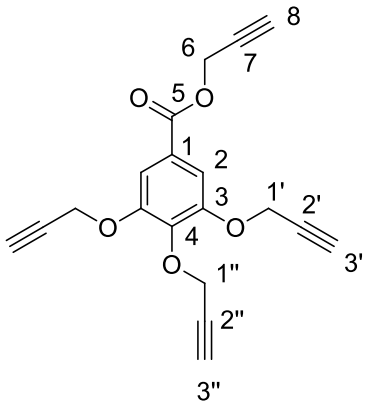
Synthesis of compound **41**

$C_{19}H_{14}O_5$

M = 322.32 g/mol

White off solid

Yield: 90%



K_2CO_3 (13 g, 94.048 mmol, 8 equiv.) and TBAI (217 mg, 0.296 mmol, 0.05 equiv.) were added to a solution of gallic acid (2g, 11.756 mmol, 1 equiv.) and propargyl bromide (80 wt.% in toluene, 8.38 mL, 75.234 mmol, 6.4 equiv.) in DMF (22 mL). The mixture was stirred for 5 hours at 100°C and then cooled to room temperature. Water (200 mL) was added to the mixture and the aqueous layer was extracted with AcOEt (3 x 200 mL). The combined organic layers were washed with water (3 x 200 mL), dried over $MgSO_4$ and concentrated. The crude residue was purified by chromatography on a silica gel column (PE/AcOEt 90/10 to 70/30) to give compound **41** (1.68 g, 90%) as a white off solid.

R_f: 0.83 (PE/AcOEt 70/30)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 7.48 (s,2H, H2), 4.94 (d, 2H, $^4J_{H6\text{-}H8}$ = 2.5 Hz, H6), 4.83 (d, 2H, $^4J_{H1''\text{-}H3''}$ = 2.5 Hz, H1"), 4.80 (d, 4H, $^4J_{H1'\text{-}H3'}$ = 2.5 Hz, H1'), 2.54 (t, 2H, $^4J_{H1'\text{-}H3'}$ = 2.5 Hz, H3'), 2.52 (t, 1H, $^4J_{H1''\text{-}H3''}$ = 2.5 Hz, H3"), 2.46 (t, 1H, $^4J_{H8\text{-}H6}$ = 2.5 Hz, H8).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm =165.1 (C5), 151.5 (C3), 141.6 (C4), 125.1 (C1), 110.3 (C2), 78.7 ($C_{2''}$), 78.0 ($C_{2'}$), 77.8 (C_7), 76.4 ($C_{3'}$), 75.8 ($C_{3''}$), 75.2 (C_8), 60.5 ($C_{1''}$), 57.3 ($C_{1'}$), 52.8 (C_6).

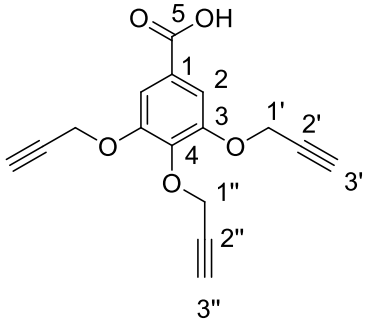
Synthesis of compound **42**

$C_{16}H_{12}O_5$

M = 284.27 g/mol

White solid

Yield: 77%



NaOH 2M solution (17 mL, 70.0 mmol, 6.6 equiv.) was added to a solution of propargyl ester **41** (3.40 g, 10.5 mmol, 1 equiv.) in MeOH (50 mL). The mixture was stirred for 16 hours at 60°C and then cooled to room temperature. The mixture was acidified with HCl 1M (80 mL) and the aqueous layer was extracted with AcOEt (3 x 100 mL). The combined organic layers were extracted with NaOH 2M (2 x 100 mL). The combined aqueous layers were acidified with HCl 1M until pH = 1. The white precipitate is then isolated by filtration to give compound **42** (2.31 g, 77%) as a white solid, without further purification.

R_f: 0.48 (CH_2Cl_2/MeOH 95/5)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 7.54 (s, 2H, H2), 4.85 (d, 2H, $^4J_{H1''\text{-}H3''}$ = 2.4 Hz, H1''), 4.83 (d, 4H, $^4J_{H1'\text{-}H3}$' = 2.4 Hz, H1'), 2.55 (t, 2H, $^4J_{H3'\text{-}H1'}$ = 2.4 Hz, H3'), 2.47 (t, 1H, $^4J_{H3''\text{-}H1''}$ = 2.4 Hz, H3'').

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 182.2 (C_5), 151.4 (C_3), 124.7 (C_4), 110.4 (C_2), 97.1 (C_1), 77.8 ($C_{2''}$), 77.2 ($C_{3'}$), 76.4 ($C_{2'}$), 75.7 ($C_{3''}$), 60.4 ($C_{1''}$), 56.9 ($C_{1'}$).

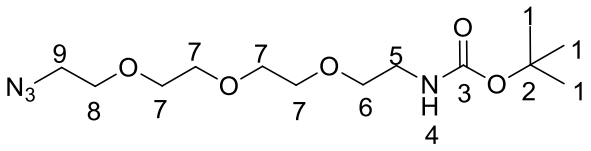
Synthesis of compound 43

$C_{13}H_{26}N_4O_5$

M = 318.27 g/mol

Colorless oil

Yield: 78 %



11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine (1.5 g, 6.87 mmol, 1 equiv.) and $(Boc)_2O$ were solubilized in absolute ethanol (15 mL) and stirred for 72 hours. Following total consumption of the starting material, monitored by TLC, the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was solubilized in CH_2Cl_2 (20 mL) and washed by H_2O (25 mL). The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 20 mL) and the combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and concentrated. The crude residue was purified by chromatography on a silica gel column (gradient elution PE/AcOEt 80/20 to 20/80) to give compound **43** (1.9 g, 78%) as a colorless oil.

R_f: 0,69 (PE/AcOEt : 30/70)

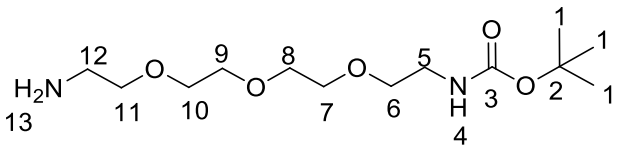
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 5.02 (bs, 1H, H_4), 3.69-3.64 (m, 8H, H_7), 3.62 (t, 2H, $^3J_{H6\text{-}H5}$= 5.0 Hz, H_8), 3.54 (t, 2H, $^3J_{H8\text{-}H9}$= 5.0 Hz, H_6), 3.39 (t, 2H, $^3J_{H5\text{-}H6}$= 5.0 Hz, H_9), 3.32 (t, 2H, $^3J_{H9\text{-}H8}$= 5.0 Hz, H_5), 1.44 (s, 9H, H_1).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 156.0 (C_3), 79.2 (C_2), 70.7-70.1 (C_6, C_7 and C_8), 50.7 (C_5), 40.4 (C_9), 28.4 (C_1).

Synthesis of compound **44**

$C_{13}H_{28}N_2O_5$

M = 292.38 g/mol



PPh_3 (730 mg, 2.78 mmol, 1.5 equiv.) was added to a solution of azide **43** (590 mg, 1.85 mmol, 1 equiv.) in THF (8 mL). The mixture was stirred for 20 hours at room temperature and 5 hours at 50°C. After completion, the mixture was cooled to room temperature and water (2.5 mL) was added. The mixture was stirred for 18 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the crude amine **44** was used in the next step without further purification.

Rf : 0,03 (PE/AcOEt : 40/60)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 5.28 (bs, 1H, H_4), 3.66-3.64 (m, 8H, H_7, H_8, H_9, H_{10}), 3.54 (m, 4H, H_6 and H_{11}), 3.32 (t, 2H, $^3J_{H6\text{-}H5}$ = 5.0 Hz, H_5), 2.88 (t, 2H, $^3J_{H9\text{-}H8}$ = 5.0 Hz, H_{12}), 1.60 (bs, 2H, H_{13}), 1.45 (s, 9H, H_1).

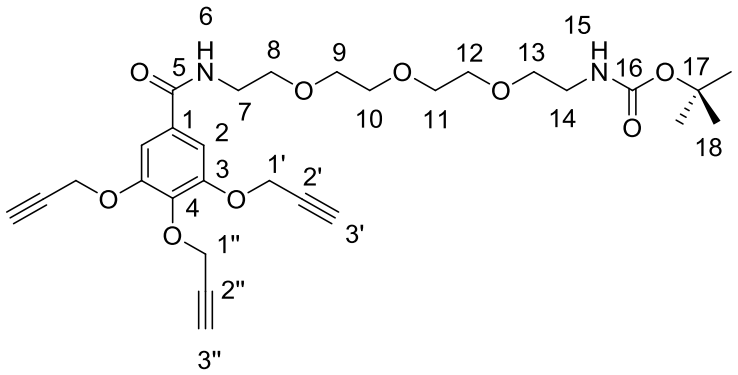
Synthesis of compound **45**

$C_{29}H_{38}N_2O_9$

M = 558.62 g/mol

White solid

Yield: 86%



To a cooled solution (0°C) of carboxylic acid **42** (455 mg, 1.60 mmol, 1 equiv.) and crude amine **44** (1.85 mmol, 1.15 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (8 mL) were added DMAP (215 mg, 1.76 mmol, 1.1 equiv.) and EDC.HCl (337 mg, 1.76 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred for 60 hours at room temperature and diluted with CH_2Cl_2 (40 mL). The organic layer was washed with HCl 1M (40 mL). The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 40 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and concentrated. The crude residue was purified by chromatography on a silica gel column (gradient elution CH_2Cl_2/Acetone 95/5 to 80/20) to give compound **45** (1.68 g, 86%) as a white solid.

R_f: 0.65 (CH_2Cl_2/MeOH 95/5)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.23 (s, 2H, H_2), 6.90 (bs, 1H, H_6), 4.98 (bs, 1H, H_{15}), 4.80 (d, $^4J_{H1'-H3'}$ = 2.3 Hz, 4H, $H_{1'}$), 4.79 (d, $^4J_{H1''-H3''}$ = 2.4 Hz, 2H, $H_{1''}$), 3.66 – 3.58 (m, 12H, H_7 - H_{12}), 3.49 (t, $^3J_{H13-H14}$ = 5.1 Hz, 2H, H_{13}), 3.25 (t, $^3J_{H13-H14}$ = 4.9 Hz, 2H, H_{14}), 2.55 (t, $^4J_{H3'-H1'}$ = 2.3 Hz, 2H, $H_{3'}$), 2.45 (t, $^4J_{H3''-H1''}$ = 2.4 Hz, 1H, $H_{3''}$), 1.42 (s, 9H, H_{18}).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 166.8 (C_5), 156.1 (C_{16}), 151.6 (C_3), 140.0 (C_4), 130.7 (C_1), 108.2 (C_2), 79.4 (C_{17}), 78.9 ($C_{2''}$), 78.3 ($C_{2'}$), 76.4 ($C_{3'}$), 75.7 ($C_{3''}$), 70.7 - 70.6 - 70.4 -70.3 - 70.3 (C_8 - C_{13}), 70.0, 60,5 ($C_{1''}$) ; 57,3 ($C_{1'}$), 57.4 ($C_{1'}$), 40.3 (C_{14}), 40.0 (C_7), 28.6 (C_{18}).

HRMS (ESI+): $[M+Na]^+$ calcd for $C_{29}H_{38}N_2NaO_9$: 581.2470 measured 581.2487; $[2M+Na]^+$ calcd for $C_{58}H_{76}N_4NaO_{18}$: 1139.5047 measured 1139.5085.

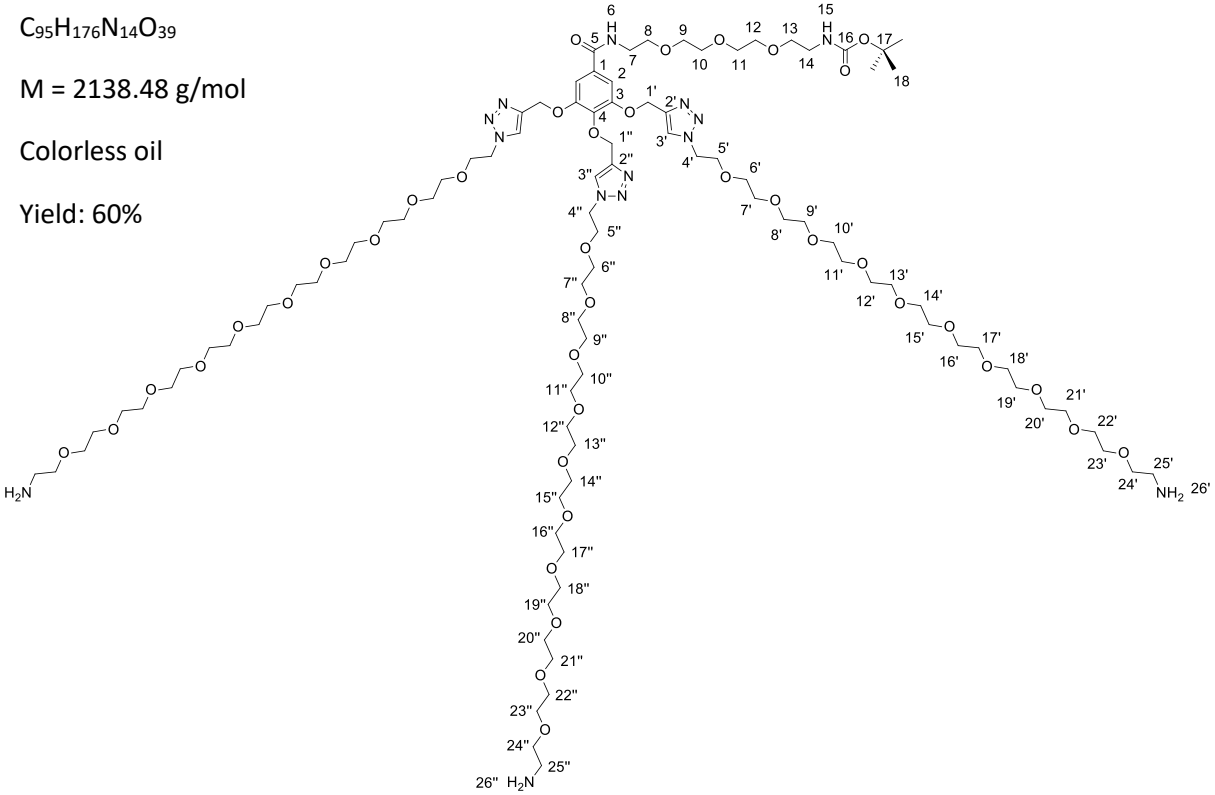
Synthesis of compound **47**

$C_{95}H_{176}N_{14}O_{39}$

M = 2138.48 g/mol

Colorless oil

Yield: 60%



$Cu(MeCN)_4PF_6$ (7.0 mg, 0.019 mmol, 0.12 equiv.) was added to a solution of alkyne **45** (89 mg, 0.159 mmol, 1 equiv.) and azido-PEG_{10}-amine **46** (285 mg, 0.541 mmol, 3.4 equiv.) in dry and degassed CH_2Cl_2 (2 mL). The mixture was stirred for 2 hours at room temperature under argon atmosphere. After completion monitored by LC-MS (Method **2**), the resin QuadraPure® IDA (200 mg) was added to the mixture to scavenge the copper, stirred for additional 2 hours and removed by filtration. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude was purified by reverse phase chromatography on C18 grafted silica (gradient elution MeCN/H_2O 10/90 to 50/50 over 30 minutes) to afford compound **47** (203 mg, 60%) as a colorless oil.

R_t: 5.72 min (Method **1**)

^{1}H NMR (400 MHz, Methanol-d_4): δ = 8.21 (s, 2H, $H_{3'}$), 7.94 (s, 1H, $H_{3''}$), 7.39 (s, 2H, H_2), 5.26 (s, 4H, $H_{1'}$), 5.14 (s, 2H, $H_{1''}$), 4.63 (t, $^3J_{H4'-H5'}$ = 5.0 Hz, 4H, $H_{4'}$), 4.54 (t, $^3J_{H4''-H5''}$ = 5.0 Hz, 2H, $H_{4''}$), 3.93 (t$^3J_{H4'-H5'}$ = 5.0 Hz, 4H, $H_{5'}$), 3.85 (t, $^3J_{H4''-H5''}$ = 5.0 Hz, 2H, $H_{4''}$), 3.82 – 3.47 (m, 126H, H_{PEG}), 3.47 (t, $^3J_{H13-H14}$ = 5.6 Hz, 2H, H_{13}), 3.19 (t, $^3J_{H13-H14}$ = 5.6 Hz, 2H, H_{14}), 2.87 (t, $^3J_{H24'(')-H25'(')}$ = 5.6 Hz, 6H, $H_{24'}$ and $H_{24''}$), 1.42 (s, 9H, H_{18}).

^{13}C NMR (100 MHz, Methanol-d_4): δ = 169.00 (C_5), 158.4 (C_{16}), 153.6 (C_3), 145.2 ($C_{2''}$), 144.5 ($C_{2'}$), 141.5 (C_4), 131.3 (C_1), 126.6 ($C_{3'}$), 126.5 ($C_{3''}$), 108.5 (C_2), 80.0 (C_2), 72.09, 71.53, 71.49, 71.45, 71.24, 71.13, 70.64, 70.34, 66.98 ($C_{1''}$), 63.78 ($C_{1'}$), 51.51 ($C_{4'}$), 51.38 ($C_{4''}$), 41.75 ($C_{25'}$), 41.26 ($C_{25''}$), 41.19 (C_{14}), 28.80 (C_{18}).

HRMS (ESI+): $[M+2H]^{2+}$ calcd for $C_{95}H_{178}N_{14}O_{39}$: 1069.6182 measured 1069.6170; $[M+3H]^{3+}$ calcd for $C_{95}H_{179}N_{14}O_{39}$: 713.4145 measured 713.4138; $[M+4H]^{4+}$ calcd for $C_{95}H_{180}N_{14}O_{39}$: 535.3127 measured 535.3125.

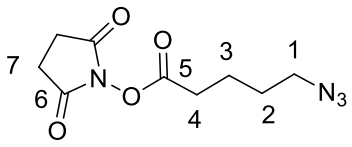
Synthesis of compound **49**

$C_9H_{12}N_4O_4$

M = 240.21 g/mol

translucent yellowish oil

Yield: 80%



EDC.HCl (134 mg, 0.7 mmol, 1 equiv.) was added to a solution of compound carboxylic acid **48** (100 mg, 0.7 mmol, 1 equiv.) and NHS (80 mg, 0.7 mmol, 1 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (4.6 mL) under Ar atmosphere. The mixture was stirred for 60 hours at room temperature and diluted by CH_2Cl_2 (10 mL). The organic layer was washed with water (10 mL) then with brine (10 mL) and dried over $MgSO_4$ and concentrated. The crude residue was purified by chromatography on a silica gel column (CH_2Cl_2/MeOH 100/0 to 99/1) to give compound **49** (135 mg, 80%) as a translucent yellowish oil.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 3.29 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H_1), 2.78 (s, 4H, H_7), 2.61 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H_4), 2.02 – 1.42 (m, 4H, H_2 and H_3).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 169.24 (C_6), 168.22 (C_5), 50.74 (C_1), 30.33 (C_4), 27.79 (C_2), 25.53 (C_7), 21.75 (C_3).

HRMS (ESI+): $[M+H]^+$ calcd for $C_9H_{13}N_4O_4$: 241.0931 measured 241.0936 ; $[M+Na]^+$ calcd for $C_9H_{12}N_4NaO_4$: 263.0751 measured 263.0756 ; $[2M+Na]^+$ calcd for $C_{18}H_{24}N_8NaO_8$: 503.1609 measured 503.1618.

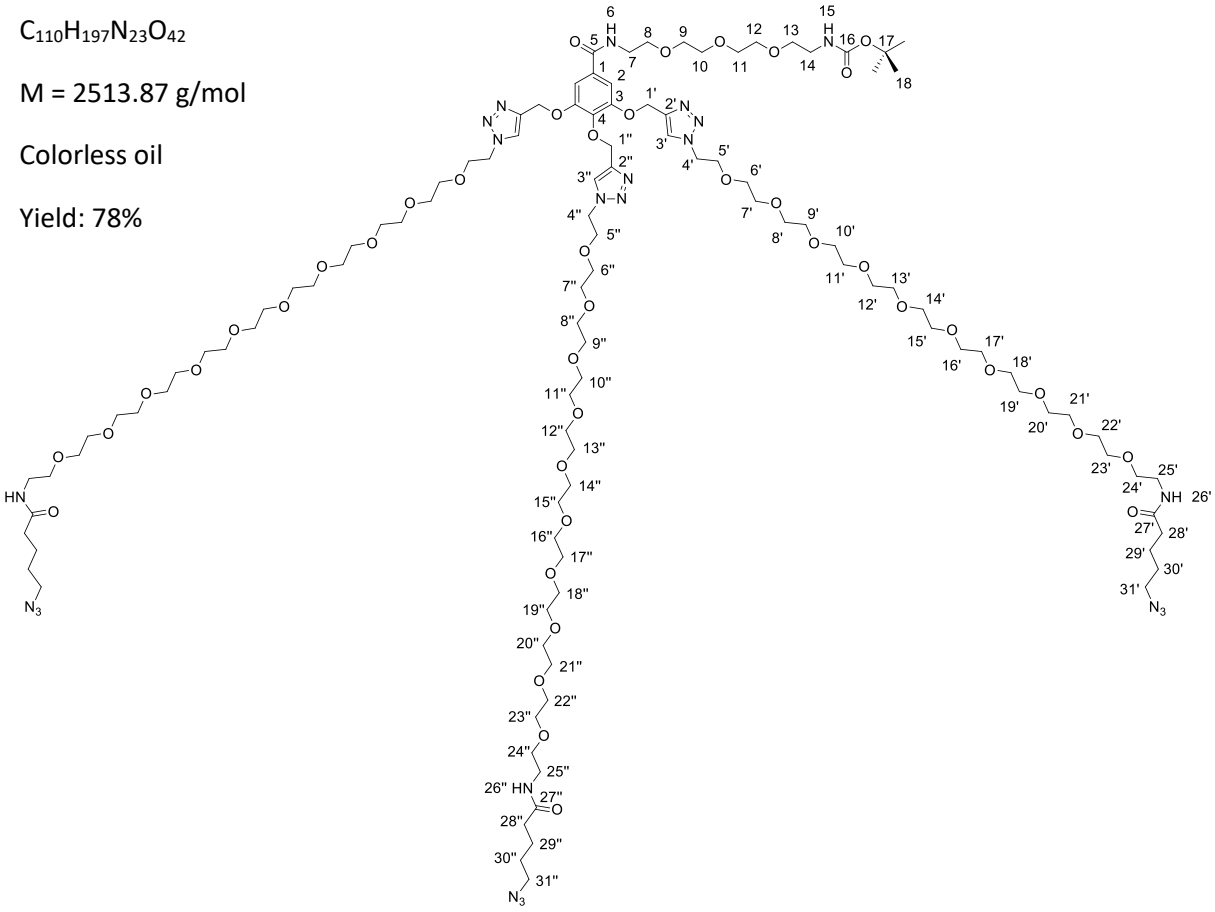
Synthesis of compound **50**

$C_{110}H_{197}N_{23}O_{42}$

M = 2513.87 g/mol

Colorless oil

Yield: 78%



Et_3N (13.7 µL, 0.098 mmol, 3.5 equiv.) was added to a solution of triamine **47** (60 mg, 0.028 mmol, 1 equiv.) and NHS ester **49** (23.6 mg, 0.098 mmol, 3.5 equiv.) in dry DMF (1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 4 hours. After completion monitored by LC-MS (Method **2**), the solvent was removed under reduced pressure and the crude residue was purified by chromatography on a silica gel column (gradient elution CH_2Cl_2/MeOH 95/5 to 75/25) to afford compound **50** (54.8 mg, 78%) as a colorless oil.

R_t: 11.00 min (Method **1**)

^{1}H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2, 298K): δ ppm = 7.97 (s, 2H, $H_{3'}$), 7.84 (s, 1H, $H_{3''}$), 7.28 (s, 2H, H_2), 7.15 (bs, 1H, H_6), 6.32 (bs, 3H, $H_{26'}$ and $H_{26''}$), 5.22 (s, 4H, $H_{1'}$), 5.13 (s, 2H, $H_{1''}$), 4.55 (t, $^3J_{4'\text{-}5'}$ = 5.1 Hz, 4H, $H_{4'}$), 4.49 (t, $^3J_{4''\text{-}5''}$ = 5.2 Hz, 2H, $H_{4''}$), 3.88 (t, $^3J_{5'\text{-}4'}$ = 5.1 Hz, 4H, $H_{5'}$), 3.84 (t, $^3J_{5''\text{-}4''}$ = 5.3 Hz, 2H, $H_{5''}$), 3.64 – 3.49 (m, 126H, H_{PEG}), 3.47 – 3.43 (m, 2H, H_7), 3.37 (m, 6H, $H_{25'}$ and $H_{25''}$), 3.27 (t,^{3} $J_{31'\text{-}30'}$ = 6.6 Hz, 6H, $H_{31'}$ and $H_{31''}$), 3.21 (m, 2H, H_{14}), 2.60 (bs, 1H, H_{15}), 2.17 (t, $^3J_{28'\text{-}29'}$ = 7.1 Hz, 6H, $H_{28'}$ and $H_{28''}$), 1.73 – 1.53 (m, 12H, $H_{29'}$, $H_{29''}$, $H_{30'}$, $H_{30''}$), 1.39 (s, 9H, H_{18}).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2): δ = 172.65 ($C_{27'}$ and $C_{27''}$), 166.88 (C_5), 156.34 (C_{16}), 152.62 (C_3), 144.47 ($C_{2''}$), 143.71 ($C_{2'}$), 140.52 (C_4), 130.84 (C_1), 125.18 ($C_{3''}$), 125.01 ($C_{3'}$), 107.46 (C_2), 79.23 (C_{17}), 71.35, 71.00, 70.95, 70.89, 70.84, 70.79, 70.71, 70.67, 70.55, 70.32, 69.88, 69.81, 66.70 ($C_{1''}$), 63.41 ($C_{1'}$), 51.74 ($C_{31'}$ and $C_{31''}$), 50.77($C_{4'}$), 50.54 ($C_{4''}$), 40.84 (C_{17}), 40.50, 39.65 ($C_{25'}$ and $C_{25''}$), 36.12 ($C_{28'}$ and $C_{28''}$), 28.87 ($C_{30'}$ and $C_{30''}$), 28.63 (C_{18}), 23.26 ($C_{29'}$ and $C_{29''}$).

HRMS (ESI+): $[M+Na]^+$ calcd for $C_{110}H_{197}N_{23}O_{42}Na$: 2535.3879 measured 2535.3893; $[M+2Na]^{2+}$ calcd for $C_{110}H_{197}N_{23}O_{42}Na_2$: 1279.1885 measured 1279.1877; $[M+3Na]^{3+}$ calcd for $C_{110}H_{197}N_{23}O_{42}Na_3$: 860.4554 measured 860.4543; $[M+4Na]^{4+}$ calcd for $C_{110}H_{197}N_{23}O_{42}Na_4$: 651.0889 measured 651.0888.

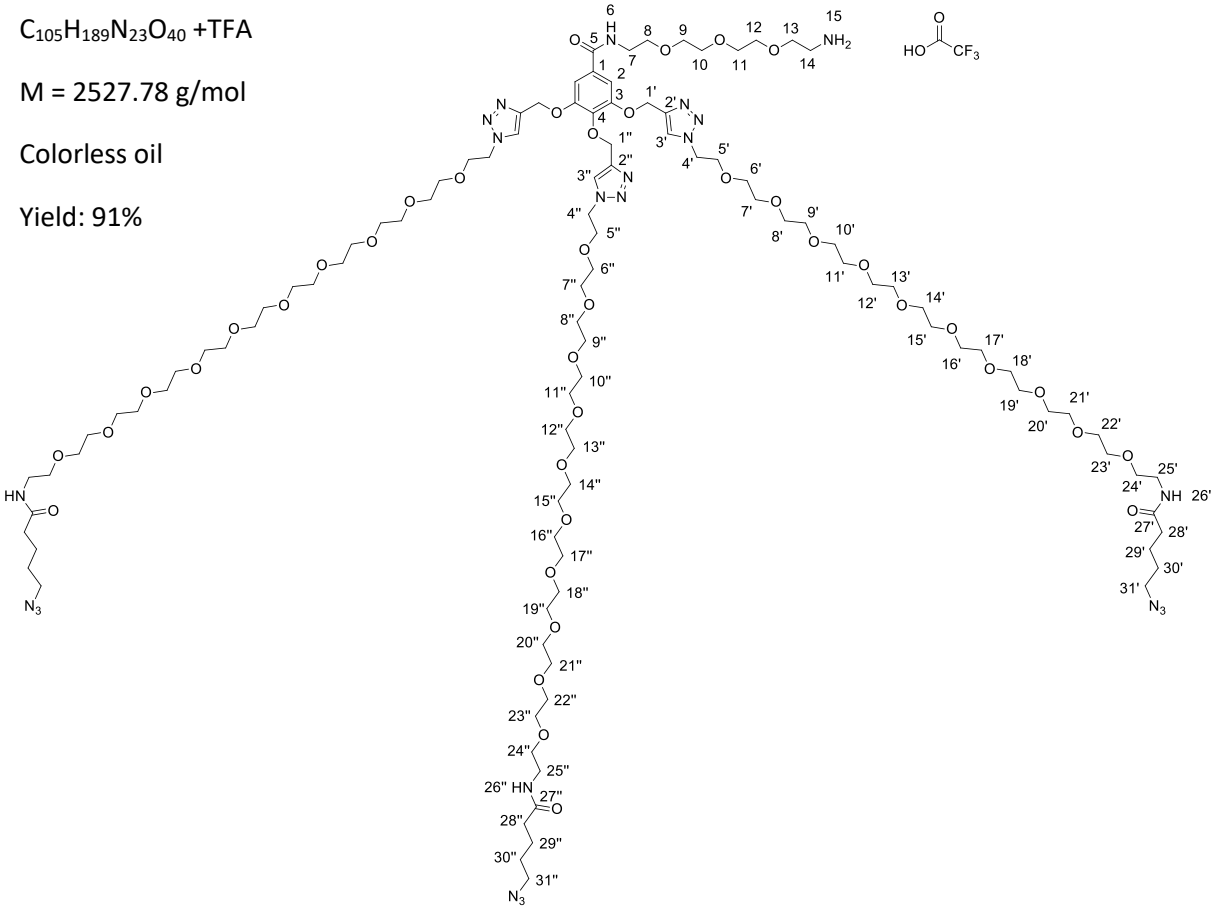
Synthesis of compound **40**

$C_{105}H_{189}N_{23}O_{40}$ +TFA

M = 2527.78 g/mol

Colorless oil

Yield: 91%



TFA (160 µL) was added to a cooled (0°C) solution of carbamate **50** (70 mg, 0.02788 mmol, 1 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (700 µL). The mixture was stirred at 0°C for 30 minutes and at room temperature for additional 30 minutes. After completion monitored by LC-MS (Method **2**), the solvent was evaporated under reduced pressure and the crude mixture was purified by reverse phase chromatography on C18 grafted silica (gradient elution MeCN/H_2O (0.05% TFA) 20/80 to 100/0 over 30 minutes) to give compound **40** (65.5 mg, 91%) as a colorless oil.

R_t: 8.66 min (Method **1**)

^{1}H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ = 8.07 (bs, 3H), 7.99 (bs, 2H, $H_{3'}$), 7.87 (s, 1H, $H_{3''}$), 7.35 (s, 2H, H_2), 6.50 (bs, 3H, $H_{26'}$ and $H_{26''}$), 5.21 (s, 4H, $H_{1'}$), 5.14 (s, 2H, $H_{1''}$), 4.55 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H, $H_{4'}$), 4.50 (bs, 2H, $H_{4''}$), 3.88 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H, $H_{5'}$), 3.84 (bs, 2H, $H_{5''}$), 3.80 – 3.47 (m, 128H, H_{PEG}), 3.44 – 3.33 (m, 6H, $H_{25'}$ and $H_{25''}$), 3.27 (t, *J* = 6.2 Hz, 6H, $H_{31'}$ and $H_{31''}$), 3.14 (bs, 2H, H_{14}), 2.18 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, $H_{28'}$ and $H_{28''}$), 1.71 – 1.54 (m, 12H, $H_{29'}$, $H_{29''}$, $H_{30'}$, $H_{30''}$).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2): δ = 172.89 ($C_{27'}$ and $C_{27''}$), 167.28 (C_5), 152.54 (C_3), 144.38 ($C_{2''}$), 143.77 ($C_{2'}$), 140.32 (C_4), 130.68 (C_1), 125.39 ($C_{3''}$), 125.19 ($C_{3'}$), 107.65 (C_2), 71.00, 70.92, 70.83, 70.81, 70.69, 70.47, 70.39, 69.85, 69.79, 67.40, 66.41 ($C_{1''}$), 63.19 ($C_{1'}$), 51.76 ($C_{31'}$ and $C_{31''}$), 50.85 ($C_{4'}$), 50.62 ($C_{4''}$), 40.47, 40.25, 39.67 ($C_{25'}$ and $_{25''}$), 36.12 ($C_{28'}$ and $C_{28''}$), 28.89 ($C_{30'}$ and $C_{30''}$), 23.30 ($C_{29'}$ and $C_{29''}$).

^{19}F NMR (376 MHz, CD_2Cl_2): δ -75.63.

HRMS (ESI+): $[M+H]^+$ calcd for $C_{105}H_{189}N_{23}O_{40}H$: 2413.3535 found 2413.3482; $[M+2Na]^{2+}$ calcd for $C_{105}H_{189}N_{23}O_{40}Na_2$: 1229.1623 found 1229.1575; ; $[M+2H]^{2+}$ calcd for $C_{105}H_{189}N_{23}O_{40}H_2$: 1207.1804 found 1207.1776; $[M+H+Na]^{2+}$ calcd for $C_{105}H_{189}N_{23}O_{40}HNa$: 1218.1714 found 1218.1685; $[M+3H]^{3+}$ calcd for $C_{105}H_{189}N_{23}O_{40}H_3$: 805.1227 found 805.1186; $[M+3Na]^{3+}$ calcd for $C_{105}H_{189}N_{23}O_{40}Na_3$: 827.1046 found 827.1007; $[M+H+2Na]^{3+}$ calcd for $C_{105}H_{189}N_{23}O_{40}HNa_2$: 812.4500 found 812.4480; $[M+2H+Na]^{3+}$ calcd for $C_{105}H_{189}N_{23}O_{40}H_2Na$: 819.7773 found 819.7746.

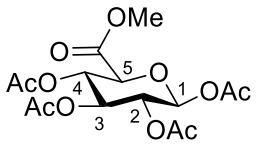
Synthesis of compound 52

$C_{15}H_{20}O_{11}$

M = 376.31 g/mol

White solid

Yield: 19%



D-(+)-glucuronolactone (50 g, 284 mmol, 1 equiv.) was suspended in methanol (285 mL). MeONa (422 mg, 7.81 mmol, 0.0275 equiv.) was added and the mixture was stirred for 2 hours at room temperature. Then, the solvent was removed under reduced pressure and the crude product was solubilized in acetic anhydride (200 mL). The mixture was cooled to 0°C and a solution of perchloric acid (0.9 mL) in acetic anhydride (28 mL) was added dropwise. The mixture was allowed to warm at room temperature and stirred for 4 hours then stored at 4°C for 18 hours. The precipitate was filtered off and washed with diethyl ether (100 mL) to afford the glucuronide **52** (20.7 g, 19%) as a white solid.

Rf = 0,7 (EP/AcOEt 70/30)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 5.77 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_1), 5.30 (m, 3H, H_2, H_3, H_4), 4.17 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H_5), 3.74 (s, 3H, H_{COOMe}), 2.12 (s, 3H, H_{CH3COO}), 2.09 (s, 3H, H_{CH3COO}), 2.07 (s, 3H, H_{CH3COO}), 2.04 (s, 3H, H_{CH3COO}).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 169.6 - 169.2 - 168.9 - 168.5 ($4C_{CO\ acetate}$), 166.7 ($C_{CO\ ester}$), 91.3 (C_1), 72.9 - 71.7 - 70.1 - 68.8 (C_2, C_3, C_4, C_5), 52.7 (C_{COOCH3}), 20.5 - 20.3 - 20.2 ($4C_{CH3COO}$).

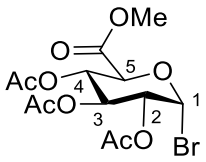
Synthesis of compound **53**

$C_{13}H_{17}BrO_9$

M = 397.17 g/mol

White off solid

Yield: 91%



Compound **52** (17.9 g, 48 mmol, 1 equiv.) was suspended in a solution of HBr (33%) in acetic acid and stirred at room temperature. Following total consumption of the starting material (4 hours), the mixture was poured into a water and ice bath and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 three times. The organic layer was neutralized with saturated $NaHCO_3$, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. Absolute ethanol (3 mL) was added to the crude product and the mixture was stored overnight at 4°C. The precipitate was filtered off and washed with petroleum ether to afford the glucuronide **53** (17.4 g, 91%) as a white off solid.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 6.64 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz, H_1), 5.60 (t, 1H, *J* = 10.0 Hz, H_3), 5.20 (t, 1H, *J* = 10.0 Hz, H_4), 4.90 (dd, 1H, *J* = 10.0 Hz, *J* = 4.0 Hz, H_2), 4.60 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz, H_5), 3.77 (s, 3H, H_{COOMe}), 2.11 (s, 3H, H_{CH3COO}), 2.09 (s, 3H, H_{CH3COO}), 2.07 (s, 3H, H_{CH3COO}).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 169.9 - 169.2 - 169.1 ($3C_{CO\ acetate}$), 167.1 ($C_{CO\ ester}$), 96.5 (C_1), 72.5 - 72.0 - 70.8 - 69.2 (C_2, C_3, C_4, C_5), 52.8 (C_{COOMe}), 20.5 - 20.4 ($3C_{CH3COO}$).

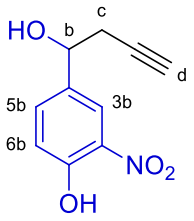
Synthesis of compound 55

$C_{10}H_9NO_4$

M = 207.18 g/mol

Dark brown oil

Yield: 94%



Aluminum powder (648 mg, 24 mmol, 6.25 equiv.) and anhydrous THF (2.5 mL) were placed in a three-neck round-bottom flask equipped with a condenser and dropping funnel. Catalytic amount of $HgCl_2$ was added and the mixture was stirred for 20 minutes. Few drops of a neat solution of propargyl bromide 80% in toluene were added in order to start the formation of the aluminic (dark solution with reflux of THF). Then propargyl bromide 80% in toluene (2.6 mL, 24 mmol, 6.25 equiv.) was diluted with anhydrous THF (5 mL) and was added dropwise. The reaction mixture was stirring for two hours at room temperature followed by 30 minutes at 65°C. After cooling down to room temperature, a solution of 4-hydroxy-3-nitrobenzaldehyde (650 mg, 3.84 mmol, 1 equiv.) in anhydrous THF (8 mL) was added dropwise and the reaction was stirred overnight. The crude mixture was cooled at 0°C, poured on ice and HCl 1N (10 mL) and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with H_2O, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting crude brown oil was purified by column chromatography over silica gel (petroleum ether/ethyl acetate 7/3) to give a yellow oil which was dissolved in CH_2Cl_2 and washed with a solution of NaOH 1N. The combined aqueous layers were acidified with concentrated HCl to pH 4 and extracted with chloroform. The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure to afford **55** (754 mg, 3.6 mmol, 94%) as a dark brown oil.

Rf = 0.56 (Eluant : EP/AcOEt 60/40)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 10.48 (bs, 1H, H_{phenol}), 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).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 298K): 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_{alkyne}), 72.1 (C_d), 70,9 (C_b), 30.0 (C_c).

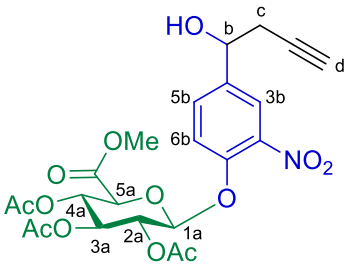
Synthesis of compound **56**

$C_{23}H_{25}NO_{13}$

M = 523.44 g/mol

Yellowish solid

Yield: 66%



A solution of 1,1,4,7,10,10-hexamethyltriethylenetetramine (HMTTA) (6.3 mL, 23.1 mmol, 1.05 equiv.) and Ag_2CO_3 (33.7 g, 122.3 mmol, 5,6 equiv.) in anhydrous CH_3CN (33 mL) was stirred during 2 hours at room temperature in the dark. Nitrophenol **55** (4.56 g, 22 mmol, 1 equiv.) and bromoglucuronide **53** (11.31 g, 33 mmol, 1.5 equiv.) were added at 0°C, and the solution mixture was stirred for 4 hours at room temperature. The reaction was quenched with water and extracted with ethyl acetate (3 x 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 (PE/AcOEt 6/4, 5/5, 4/6) to afford **56** (7.62 g, 0.84 mmol, 66%) as a mixture of two diastereoisomers (yellow solid).

Rf = 0.56 (PE/AcOEt 50/50).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 7.87 (2d, 1H, *J* = 2.1 Hz, H_{3b}), 7.60 (m, 1H, H_{5b}), 7.34 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H_{6b}), 5.25–5.32 (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, H_{COOMe}), 3.38 (bs, 1H, H_{OH}), 2.62 (m, 2H), 2.13 (s, 3H, H_{CH3COO}), 2.11 (t, 1H, *J* = 2.6 Hz, H_d), 2.06 (s, 3H, H_{COOMe}), 2.04 (s, 3H, H_{COOMe}).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 170,1 - 169,5 ($3C_{CO\ acetate}$), 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_{alkyne}), 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 ($3C_{CH3COO}$).

HRMS (ESI): $[M+Na]^+$ m/z 546.1228 (calcd for $C_{23}H_{25}NO_{13}Na$: 546.1224); $[M+K]^+$ m/z 562.0997 (calcd for $C_{23}H_{25}NO_{13}K$: 562.0963)

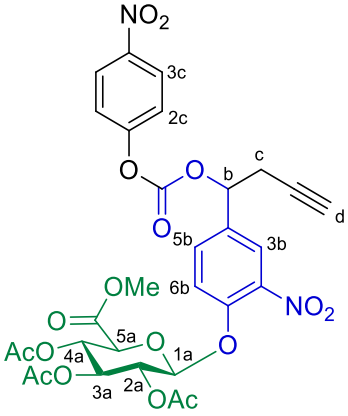
Synthesis of compound **57**

$C_{30}H_{28}N_2O_{17}$

M = 688.55 g/mol

White solid

Yield: quantitative



To a solution of **56** (180 mg, 0.34 mmol) and 4-nitrophenyl chloroformate (140 mg, 0.68 mmol) in dry dichloromethane (3.5 mL) was added pyridine (77 µL, 0.87 mmol) at 0°C. The mixture was stirred 1 hour at room temperature, hydrolyzed with saturated aqueous $NaHCO_3$. The mixture was extracted three times with dichloromethane and the combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtrated and concentrated in *vacuo*. Purification by column chromatography over silica gel (petroleum ether/ethyl acetate 6/4) afforded **57** (235 mg, 0.343 mmol, quantitative yield) as a mixture of two diastereoisomers (white solid).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 8.28 (d, 2H, *J* = 9.1 Hz, $2H_{3c}$), 7.93 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, H_{3b}), 7.65 (dd, 1H, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.2 Hz, H_{5b}), 7.43 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, H_{6b}), 7.38 (d, 2H, *J* = 9.1 Hz, H_{2c}), 5.81 (t, 1H, *J* = 6.5 Hz, H_b), 5.4-5.25 (m, 4H, H_{1a}, H_{2a}, H_{3a}, H_{4a}), 4.24 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H_{5a}), 3.74 (s, 3H, H_{COOMe}), 2.98-2.83 (m, 2H, H_c), 2.10 (s, 3H, H_{CH3COO}), 2.09 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, H_d), 2.07 (s, 3H, H_{CH3COO}), 2.06 (s, 3H, H_{CH3COO}).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 170.1 - 169.5 - 169.3 ($3C_{CO\ acetate}$), 166.8 ($C_{CO\ ester}$), 155.3 ($C_{CO\ carbonate}$), 151,7 (C_{1c}), 149.6 (C_{1b}), 145.7 (C_{4c}), 141.1 (C_{2b}), 133.4 (C_{4b}), 132.4-132.3 (C_{5b}), 125.5 (C_{3c}), 123.8 (C_{3b}), 121.8 (C_{2c}), 119.9 (C_{6b}), 99.4 (C_{1a}), 77.2 (C_b), 72.6 (C_d), 71.5 (C_{5a}), 71.0 - 70.2- 68.7 (C_{2a}, C_{3a}, C_{4a}), 53.2 (C_{COOMe}), 26.1 (C_c), 20.4 ($3C_{CH3COO}$).

HRMS (ESI): m/z 711.1280 (calcd. for $C_{30}H_{28}O_{17}N_2Na$ 711.1286 $[M+Na]^+$).

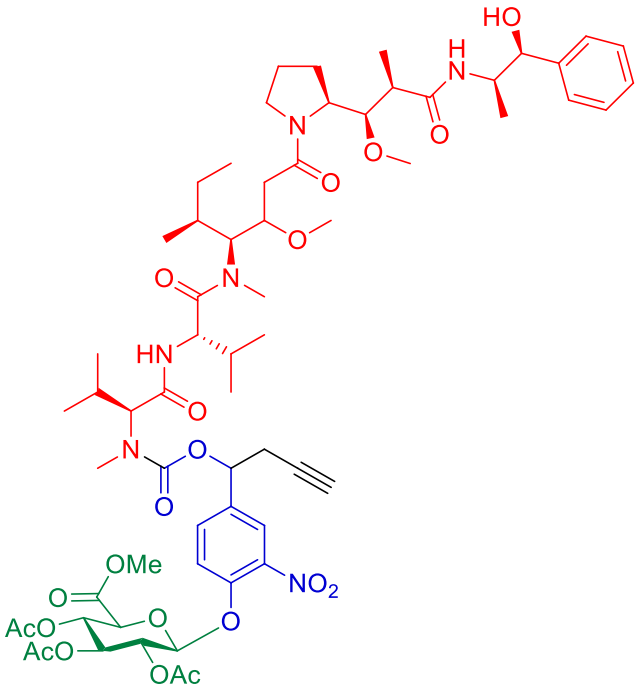
Synthesis of compound 58

$C_{63}H_{90}N_6O_{21}$

M = 1267.42 g/mol

White solid

Yield: 94%



Carbonate **57** (57.5 mg, 0.0835 mmol) and MMAE (60 mg, 1 equiv.) were dissolved in dry DMF (1.6 mL) and pyridine (0.4 mL). HOBt (11.3 mg, 0.0835 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature for 16 hours. Solvents were removed under reduced pressure and crude material was purified by column chromatography over silica gel (gradient elution 2% to 5% MeOH in CH_2Cl_2) to give **58** (99 mg, 0.078 mmol, 94%) as a white solid.

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 7.75 (m, 1H), 7.49 (m, 1H), 7.30-7.16 (m, 6H), 6.48-6.32 (m, 1H), 5.72 (m, 1H), 5.26-5.12 (m, 4H), 4.88 (s, 1H), 4.68-4.52 (m, 1H), 4.19-3.97 (m, 6H), 3.78 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.45 (m, 1H), 3.33-3.22 (m, 7H), 3.05-2.67 (m, 8H), 2.42-2.29 (m, 2H), 2.2-2.12 (m, 1H), 2.05-1.93 (m, 16H), 1.78 (m, 3H), 1.26-1.15 (m, 5H), 0.96-0.73 (m, 19H), 0.59 (m, 1H), 0.51 (m, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 174.7, 173.0, 172.9, 170.7, 170.1, 169.7, 169.6, 169.4, 169.3, 166.8, 156.0, 155.9, 149.0, 141.4, 141.3, 141.1, 135.9, 135.7, 132.2, 132.0, 128.4, 128.1, 127.4, 126.4, 126.3, 123.2, 119.9, 119.8, 99.9, 99.7, 82.3, 82.1, 78.9, 78.6, 78.4, 75.9, 73.3, 73.2, 72.6, 71.9, 71.2, 70.3, 68.8, 65.6, 65.4, 65.2, 61.0, 60.3, 60.2, 58.1, 54.0, 53.9, 53.2, 51.7, 47.9, 45.0, 37.7, 33.5, 29.8, 29.7, 29.5, 26.7, 26.3, 26.2, 25.8, 25.1, 25.0, 20.7, 20.6, 19.5, 19.4, 18.6, 16.1, 14.5, 14.4, 14.0, 11.0.

HRMS (ESI): m/z 1289.6051 (calcd. for $C_{63}H_{90}N_6O_{21}Na$ 1289,6057 $[M+Na]^+$).

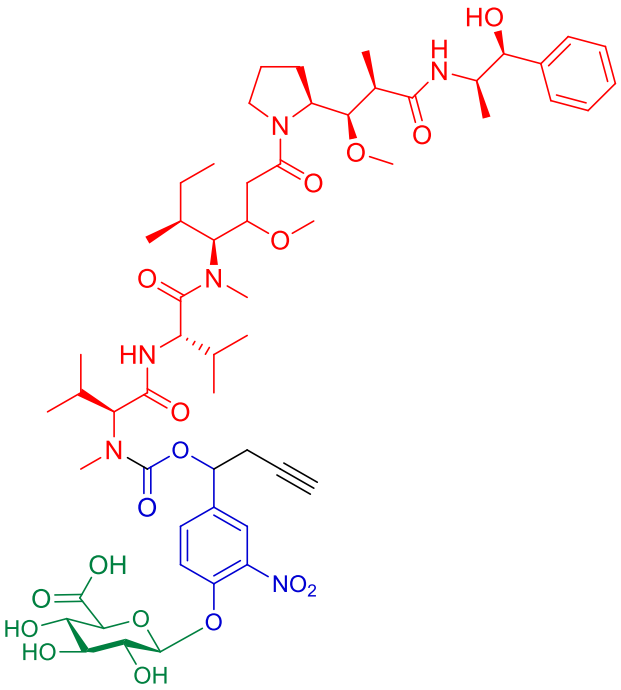
Synthesis of compound 59

$C_{56}H_{82}N_6O_{18}$

M = 1127.28 g/mol

White solid

Yield: 72%



A cooled solution (5°C) of $LiOH.H_2O$ (31.6 mg, 0.75 mmol, 8.75 equiv.) in H_2O (6 mL) was added dropwise to a cooled solution (-5°C) of the protected glucuronide derivative **58** (109 mg, 0.086 mmol, 1 equiv.) in MeOH (6 mL). The mixture was stirred at -5°C until disappearance of starting material (30 min) monitored by LC-MS. Then hydrolysis was performed with IRC-50 acidic resin. After filtration, the solvents were removed under reduced pressure and the crude was purified by reverse phase chromatography on C18 grafted silica (gradient elution MeCN/H_2O (0.05% TFA) 20/80 to 80/20 over 30 minutes) to afford compound **59** (70 mg, 72%) as a white solid.

Rt: 11.49-11.80 min (Method **1**)

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 8.60 (dd, *J* = 20.9, 8.2 Hz, 0.25H), 8.27 (d, *J* = 8.4 Hz, 0.25H), 8.18 – 7.97 (m, 1H), 7.97 – 7.83 (m, 1H), 7.80 – 7.62 (m, 1H), 7.43 (d, *J* = 7.3 Hz, 0.5H), 7.37 – 7.22 (m, 4H), 7.18 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.87 – 5.54 (m, 1H), 5.39 – 5.14 (m, 1H), 4.86 – 4.54 (m, 1H), 4.56 – 4.38 (m, 2H), 4.38 – 4.09 (m, 0.5H), 4.09 – 3.87 (m, 3H), 3.79 (d, *J* = 9.4 Hz, 0.5H), 3.67 – 3.53 (m, 1H), 3.53 – 3.45 (m, 0.5H), 3.41 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.37 – 2.92 (m, 14.5H), 2.92 – 2.60 (m, 5H), 2.48 – 2.35 (m, 1H), 2.35 – 2.20 (m, 1H), 2.20 – 1.91 (m, 3H), 1.91 – 1.64 (m, 3H), 1.63 – 1.41 (m, 2H), 1.39 – 1.20 (m, 1H), 1.18 – 0.50 (m, 27H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ = 172.38, 172.32, 169.92, 169.86, 169.78, 169.76, 169.65, 168.74, 168.71, 158.52, 158.14, 154.56, 154.54, 154.38, 148.76, 148.68, 143.67, 139.84, 134.20, 132.63, 127.81, 127.74, 126.74, 126.66, 126.48, 126.41, 122.90, 116.19, 100.11, 85.45, 81.64, 77.68, 75.82, 75.43, 74.79, 73.36, 72.74, 71.16, 63.20, 62.88, 60.93, 60.29, 58.67, 58.17, 57.16, 54.15, 49.76, 49.17, 47.22, 46.25, 43.76, 43.21, 31.58, 30.09, 29.70, 29.49, 25.91, 25.37, 24.34, 23.12, 18.89, 18.85, 18.77, 18.60, 18.57, 18.37, 15.46, 15.28, 15.00, 10.42, 10.36, 10.32.

HRMS (ESI+): $[M+Na]^+$ calcd for $C_{56}H_{82}N_4NaO_{18}$: 1149.5578 found 1149.5635.

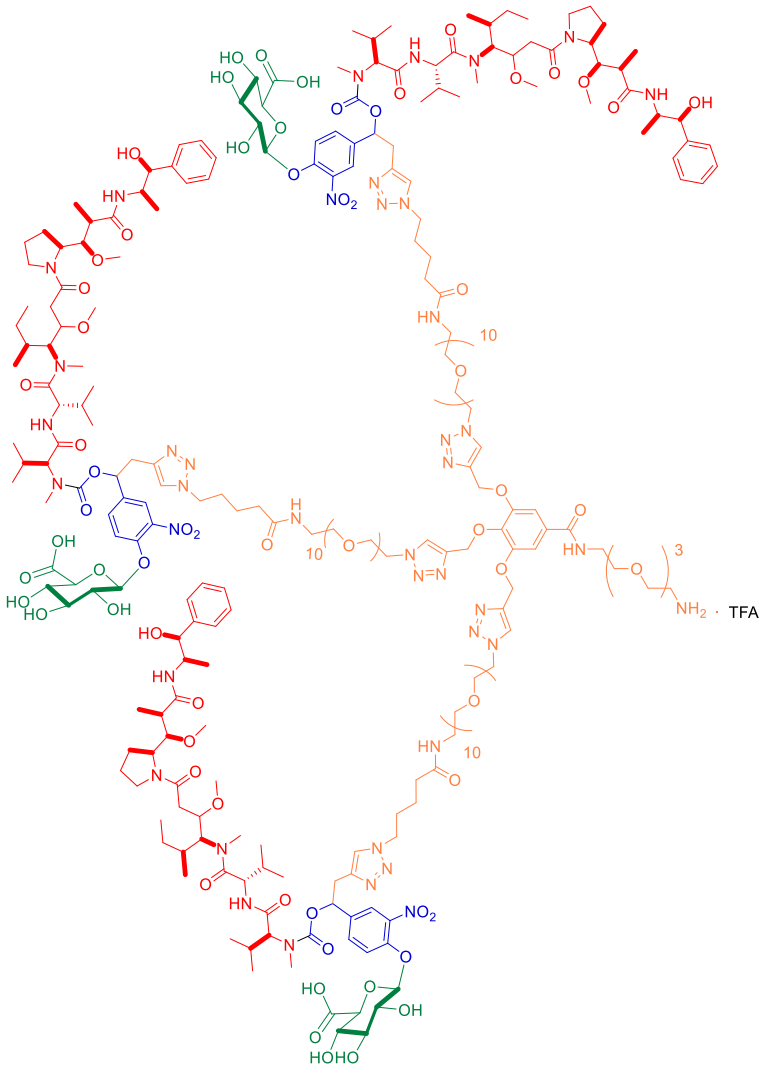
Synthesis of compound **39**

$C_{273}H_{435}N_{41}O_{94}$ + TFA

M = 5909.62 g/mol

White solid

Yield: 82%



$CuSO_4$ (8.8 mg, 0.055 mmol, 3.5 equiv.), sodium ascorbate (10.9 mg, 0.055 mmol, 3.5 equiv.) and THPTA (23.9 mg, 0.055 mmol, 3.5 equiv.) were added to a solution of alkyne **59** (71 mg, 0.063 mmol, 4 equiv.) and azide **40** (39.8 mg, 0.0157 mmol, 1 equiv.) in a degassed mixture of *t*-BuOH (10.3 mL) / H_2O (6 mL). The mixture was stirred for 2 hours at room temperature under argon atmosphere. After completion monitored by LC-MS (Method **2**), the resin QuadraPure® IDA (350 mg) was added to the mixture to scavenge the copper, stirred for additional 3 hours and removed by filtration. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude residue was purified by reverse phase chromatography on C18 grafted silica (gradient elution MeCN/H_2O (0.05% TFA) 20/80 to 60/40 over 30 minutes) to give compound **39** (75 mg, 82%) as a white solid.

R_t: 11.97-12.09 min (Method **1**)

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 8.73 – 8.54 (m, 1H), 8.54 – 8.39 (m, 2H), 8.20 (s, 2H), 8.17 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.10 – 7.98 (m, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.93 – 7.81 (m, 7H), 7.81 – 7.66 (m, 8H), 7.66 – 7.50 (m, 3H), 7.49 – 7.41 (m, 1H), 7.41 – 7.34 (m, 3H), 7.33 – 7.20 (m, 14H), 7.20 – 7.07 (m, 3H), 5.98 – 5.73 (m, 3H), 5.33 – 5.22 (m, 2H), 5.18 (s, 5H), 5.03 (s, 2H), 4.84 – 4.62 (m, 2H), 4.56 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H), 4.50 – 4.36 (m, 7H), 4.33 – 4.09 (m, 10H), 4.04 – 3.90 (m, 9H), 3.83 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H), 3.78 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.60 – 3.35 (m, 148H), 3.34 – 3.10 (m, 41H), 3.09 – 2.69 (m, 13H), 2.43 – 2.35 (m, 2H), 2.31 – 2.20 (m,

2H), 2.16 – 1.94 (m, 14H), 1.88 – 1.63 (m, 16H), 1.59 – 1.12 (m, 17H), 1.07 – 0.57 (m, 81H), 0.44 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ = 172.36, 172.29, 171.75, 169.89, 169.85, 168.72, 165.47, 158.27, 157.92, 151.61, 148.60, 143.65, 143.22, 142.50, 139.24, 129.64, 127.80, 127.73, 126.73, 126.64, 126.44, 126.39, 126.35, 124.78, 124.70, 123.01, 122.63, 106.84, 99.65, 85.42, 81.62, 75.81, 75.43, 74.78, 72.72, 71.13, 69.76, 69.61, 69.55, 69.15, 69.05, 68.68, 66.68, 65.54, 62.41, 60.92, 60.27, 58.65, 58.14, 57.14, 54.99, 54.18, 49.74, 49.47, 49.31, 48.92, 47.20, 46.23, 43.74, 43.19, 38.65, 38.46, 34.41, 31.57, 29.41, 29.28, 25.35, 24.33, 23.11, 22.13, 22.00, 18.71, 18.59, 17.97, 15.61, 15.44, 15.27, 15.00, 10.39, 10.34.

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6): δ = -74.53.

HRMS (ESI+): $[M+7H]^{7+}$ calcd for $C_{273}H_{442}N_{41}O_{94}$: 828.4417 measured 828.4419; $[M+6H]^{6+}$ calcd for $C_{273}H_{441}N_{41}O_{94}$: 966.3475 measured 966.3468; $[M+5H]^{5+}$ calcd for $C_{273}H_{440}N_{41}O_{94}$: 1159.4155 measured 1159.4154.

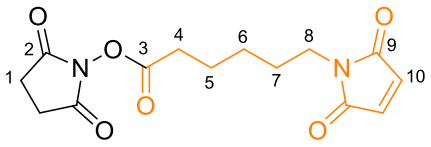
Synthesis of compound 63

$C_{14}H_{16}N_2O_6$

M = 308.29 g/mol

White solid

Yield: 63%



Anhydride maleic (800 mg, 8.16 mmol, 1 equiv.) was added to a solution of 6-aminohexanoic acid (1.07 g, 8.16 mmol, 1 equiv.) in DMF (10 mL) and stirred at room temperature. After 2 hours, the mixture was cooled to 0°C, *N*-hydroxysuccinimide (1.13 g, 9.79 mmol, 1.2 equiv.) and EDC.HCl (3.91 g, 20.4 mmol, 2.5 equiv.) were added, then heated up to 35°C for 12 hours. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with CH_2Cl_2 (200 mL), washed with saturated $NaHCO_3$, water and brine. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was puridfied by column chromatography over silica gel (AcOEt/PE 60/40) to give **63** (1.53 mg, 63%) as a white solid.

Rf : 0,41 (AcOEt/EP 60/40)

RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 6.67 (s, 2H, H_{10}), 3.50 (t, 2H, *J* = 7.17 Hz, H_8), 2.81 (sl, 4H, H_1), 2.58 (t, 2H, *J* = 7.40 Hz, H_4), 1.75 (m, 2H, H_7), 1.61 (m, 2H, H_5), 1.39 (m, 2H, H_6).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 170.8 (C_9), 169.1 (C_2), 168.3 (C_3), 134.0 (C_{10}), 37.4 (C_8), 30.8 (C_4), 28.0 (C_7), 25.8 (C_6), 25.6 (C_1), 24.1 (C_5).

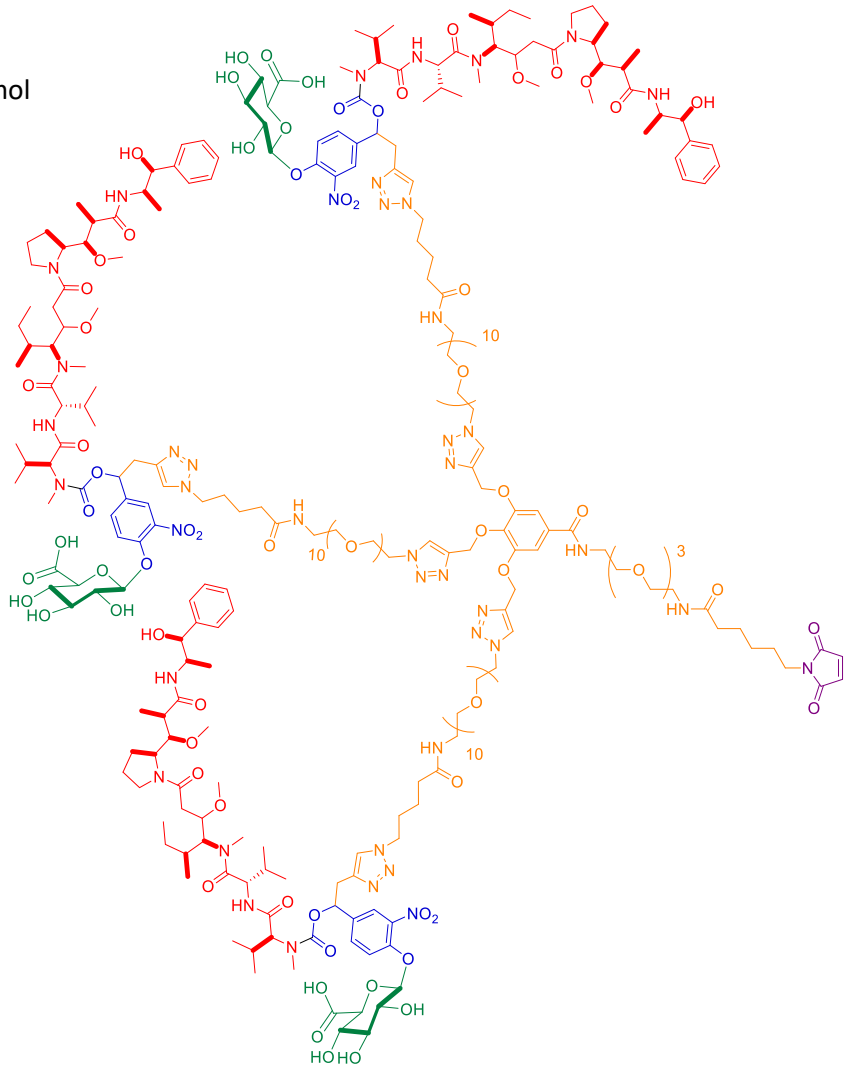
Synthesis of compound **37**

$C_{283}H_{446}N_{42}O_{97}$

M = 5988.79 g/mol

White solid

Yield: 98%



Et_3N (0.94 µL, 0.00677 mmol, 4 equiv.) was added to a solution of amine **39** (10 mg, 0.00169 mmol, 1 equiv.) and NHS ester **63** (0.57 mg, 0.00186 mmol, 1.1 equiv.) in dry DMSO (1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 7 hours. After completion monitored by LC-MS (Method **2**), the solvent was evaporated under reduced pressure and the crude residue was purified by reverse phase chromatography on C18 grafted silica (gradient elution MeCN/H_2O (0.05% TFA) 20/80 to 80/20 over 30 minutes) to afford **37** (9.9 mg, 98%, purity > 98%, mixture of 6 diastereomers) as a white solid.

R_t: 12.80-12.92 min (Method **1**)

^{1}H NMR (500 MHz, Methanol-d_4): δ = 8.20 (s, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.77 – 7.63 (m, 4H), 7.58 – 7.46 (m, 3H), 7.44 – 7.36 (m, 12H), 7.36 – 7.26 (m, 6H), 7.26 – 7.15 (m, 3H), 6.79 (s, 2H), 6.11 – 5.81 (m, 3H), 5.25 (s, 4H), 5.22 – 5.15 (m, 3H), 5.14 (s, 3H), 4.62 (t, *J* = 5.0 Hz, 5H), 4.53 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H), 4.35 (s, 6H), 4.27 – 3.98 (m, 12H), 3.92 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H), 3.88 – 3.80 (m, 3H), 3.74 – 3.70 (m, 2H), 3.69 – 3.64 (m, 9H), 3.62 – 3.49 (m, 135H), 3.47 (dd, *J* = 13.7, 6.4 Hz, 6H), 3.40 – 3.33 (m, 23H), 3.29 – 3.26 (m, 7H), 3.22 (s, 2H), 3.15 (s, 1H), 3.11 (s, 2H), 3.04 (d, *J* = 7.6 Hz, 3H), 3.00 (d, *J* = 5.6 Hz, 3H), 2.96 (s, 1H), 2.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 2.89 (s, 1H), 2.87 (s, 1H), 2.84 (s, 1H), 2.59 – 2.39 (m, 6H), 2.27 – 2.07 (m, 15H), 1.99 (s, 1H), 1.97 – 1.74 (m, 16H), 1.74 – 1.64 (m, 2H), 1.63 – 1.47 (m,

14H), 1.46 – 1.32 (m, 4H), 1.31 – 1.22 (m, 3H), 1.21 – 1.10 (m, 19H), 1.03 – 0.91 (m, 23H), 0.90 – 0.81 (m, 19H), 0.80 – 0.69 (m, 9H), 0.64 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 0.53 (dd, *J* = 6.4, 4.8 Hz, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, Methanol-d_4): δ = 176.01, 175.70, 175.41, 172.59, 171.83, 168.98, 163.37, 163.09, 162.82, 157.60, 153.54, 150.78, 150.72, 145.18, 144.45, 143.89, 141.49, 135.40, 131.30, 129.59, 129.26, 128.65, 128.42, 128.12, 128.02, 127.92, 126.61, 124.76, 124.40, 108.48, 86.66, 83.48, 77.34, 77.25, 76.63, 74.35, 72.68, 71.54, 71.51, 71.44, 71.34, 71.24, 70.57, 70.35, 66.96, 63.78, 62.02, 61.57, 60.78, 60.58, 58.64, 58.39, 51.54, 51.40, 50.91, 49.85, 49.63, 49.45, 48.08, 45.87, 45.51, 41.20, 40.40, 40.32, 38.42, 36.80, 36.05, 30.75, 29.30, 27.34, 26.47, 25.87, 25.65, 24.47, 23.63, 19.63, 19.02, 15.99, 15.83, 15.04, 10.90.

HRMS (ESI+): $[M+6H]^{6+}$ calcd for $C_{283}H_{452}N_{42}O_{97}$: 998.5263 measured 998.5261; $[M+5H]^{5+}$ calcd for $C_{283}H_{451}N_{42}O_{97}$: 1198.0301 measured 1198.0306; $[M+4H]^{4+}$ calcd for $C_{283}H_{450}N_{42}O_{97}$: 1497.2858 measured 1497.2857.

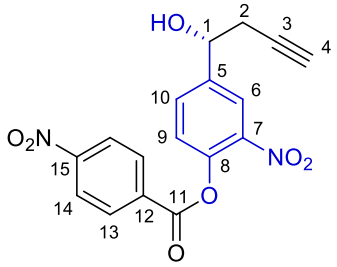
Synthesis of compound 67-(*R*)

$C_{17}H_{12}N_2O_7$

M = 356.29 g/mol

White solid

Yield: 60%



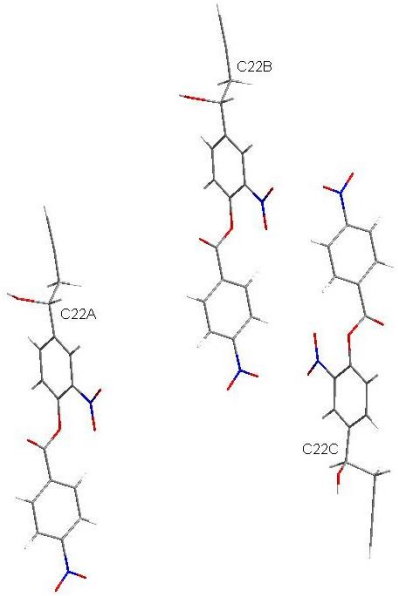
To a cooled (0°C) solution of dextrogyre phenol **55-(*R*)** (59.1 mg, 0.285 mmol, 1 equiv.) in dry THF (1.9 mL) was added Et_3N (79.3 µL, 0.569 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred at 0°C for 5 minutes then a solution of 4-nitrobenzoyl chloride (82.6 mg, 0.445 mmol, 1.5 equiv.) in dry THF (1.9 mL) was added dropwise. The reactional mixture was stirred for additional 30 minutes until total consumption of the starting material and hydrolyzed with water (4 mL) and diluted with AcOEt (4 mL).The organic layer was separated, washed with brine (15 mL) and dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent removed under reduced pressure. Purification of the crude product by column chromatography over silica gel (eluent PE/AcOEt : 100/0 to 60/40 over 30 minutes) yielded ester **67-(*R*)** (61 mg, 60%) as a white solid.

^{1}H NMR (CDCl$_3$, 500 MHz, 289K): δ (ppm) = 8.38 (s,1H, H_{13} and H_{14}), 8.25 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_6), 7.79 (dd, ^3J = 8.4 Hz, ^4J = 2.1 Hz, H_{10}), 7.40 (d, *J* = 8.4 Hz, H_9), 5.04 - 4.99 (m, 1H, H_1), 2.74 (ddd, ^2J = 16.8 Hz, ^3J = 5.4 Hz, ^4J = 2.6 Hz, 1H, H_2), 2.68 (ddd, ^2J = 16.8 Hz, ^3J = 7.1 Hz, ^4J = 2.6 Hz, 1H, H_2), 2.15 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H_4).

^{13}C NMR (CDCl$_3$, 126 MHz, 289K): δ (ppm) = 162.90 (C_{11}), 151.28 (C_{15}), 143.25 (C_5), 142.40 (C_8), 141.36 (C_7), 133.85 (C_{12}), 132.44 (C_{10}), 131.82 (C_{13}), 125.28 (C_9), 124.01 (C_{14}), 123.71 (C_6), 79.30 (C_3), 72.44 (C_4), 70.81 (C_1), 29.65 (C_{12}).

HRMS (ESI) : m/z 379.0547 $[M+Na]^+$ (calculated for $C_{17}H_{12}N_2NaO_7$: m/z 379.0537).

X-Ray structure:



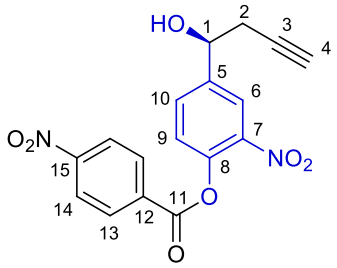
Synthesis of compound 67-(*S*)

$C_{17}H_{12}N_2O_7$

M = 356.29 g/mol

White solid

Yield: 61%



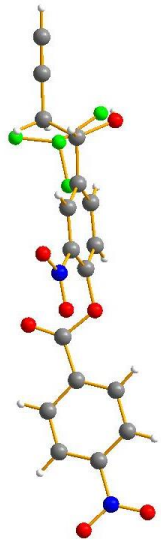
To a cooled (0°C) solution of levrogyre phenol **55-(*S*)** (31.3 mg, 0.151 mmol, 1 equiv.) in dry THF (1.1 mL) was added Et_3N (42 µL, 0.302 mmol, 2 equiv.). The mixture was stirred at 0°C for 5 minutes then a solution of 4-nitrobenzoyl chloride (42 mg, 0.227 mmol, 1.5 equiv.) in dry THF (1.1 mL) was added dropwise. The reactional mixture was stirred for additional 30 minutes until total consumption of the starting material and hydrolyzed with water (4 mL) and diluted with AcOEt (4 mL).The organic layer was separated, washed with brine (15 mL) and dried over $MgSO_4$, filtered and the solvent removed under reduced pressure. Purification of the crude product by column chromatography over silica gel (eluent PE/AcOEt : 100/0 to 60/40 over 30 minutes) yielded ester **67-(*S*)** (32.4 mg, 61%) as a white solid.

^{1}H NMR (CDCl$_3$, 500 MHz, 289K): δ (ppm) = 8.38 (s,1H, H_{13} and H_{14}), 8.25 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H_6), 7.79 (dd, ^3J = 8.4 Hz, ^4J = 2.1 Hz, H_{10}), 7.40 (d, *J* = 8.4 Hz, H_9), 5.04 - 4.99 (m, 1H, H_1), 2.74 (ddd, ^2J = 16.8 Hz, ^3J = 5.4 Hz, ^4J = 2.6 Hz, 1H, H_2), 2.68 (ddd, ^2J = 16.8 Hz, ^3J = 7.1 Hz, ^4J = 2.6 Hz, 1H, H_2), 2.15 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H_4).

^{13}C NMR (CDCl$_3$, 126 MHz, 289K): δ (ppm) = 162.90 (C_{11}), 151.28 (C_{15}), 143.25 (C_5), 142.40 (C_8), 141.36 (C_7), 133.85 (C_{12}), 132.44 (C_{10}), 131.82 (C_{13}), 125.28 (C_9), 124.01 (C_{14}), 123.71 (C_6), 79.30 (C_3), 72.44 (C_4), 70.81 (C_1), 29.65 (C_{12}).

HRMS (ESI) : m/z 379.0539 $[M+Na]^+$ (calculated for $C_{17}H_{12}N_2NaO_7$: m/z 379.0537).

X-Ray structure:



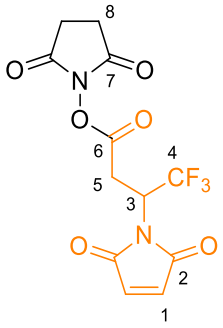
Synthesis of compound 72

$C_{12}H_9F_3N_2O_6$

M = 334.20 g/mol

White solid

Yield: 62%



To a stirred suspension of 3-amino-4,4,4-trifluorobutanoic acid (501 mg, 3.19 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (3.0 mL) was added maleic anhydride (317 mg, 3.23 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was stirred during 1 hour at room temperature. Then *N*-hydroxysuccinimide (743 mg, 6.57 mmol, 2 equiv.) and EDC.HCl (1.26 g, 6.57 mmol, 2 equiv.) were successively added to the reaction mixture. The resulting solution was stirred at room temperature for 18 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was taken up in CH_2Cl_2 (50 mL) and washed with HCl 0.1 M (3 x 20 mL). The organic layer was washed with water (3 x 20 mL) dried over $MgSO_4$, filtrated and evaporated under reduced pressure to give a pink solid. The crude was purified using silica gel column flash chromatography (eluent: CH_2Cl_2/AcOEt, 80/20) to yield the activated ester **72** as a white solid (466 mg, 62%).

^{1}H NMR (CD_3CN, 500 MHz, 289K): δ ppm = 6.88 (s, 2H, H_1), 5.22 – 5.06 (m, 1H, H_3), 3.90 (dd, 1H, $^2J_{H\text{-}H}$ = 17.2, $^3J_{H\text{-}H}$ = 11.4 Hz, H_5), 3.39 (dd, 1H, $^2J_{H\text{-}H}$ = 17.2, $^3J_{H\text{-}H}$ = 4.5 Hz, H_5), 2.73 (s, 4H, H_8).

^{13}C NMR (CD_3CN, 126 MHz, 289K): δ ppm = 170.56 (C_2), 170.49 (C_7), 166.15 (C_6), 135.77 (C_1), 124.71 (q, $^1J_{C\text{-}F}$ = 282.0 Hz, C_4), 48.91 (q, $^2J_{C\text{-}F}$ = 33.8 Hz, C_3), 27.96 (d, $^3J_{C\text{-}F}$ =1.4 Hz, C_5), 26.29 (C_8).

^{19}F NMR ($CDCl_3$, 376 MHz, 289K): δ ppm = -73.83 (reference: hexafluorobenzene 1 % in DMSO-d_6).

HRMS (ESI) : m/z 357.0308 $[M+Na]^+$ (calculated for $C_{12}H_9F_3N_2NaO_6$: m/z 357.0305).

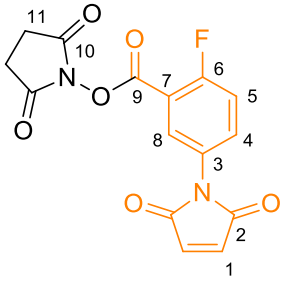
Synthesis of compound 73

$C_{15}H_9FN_2O_6$

M = 332.24 g/mol

Yellowish solid

Yield: 54%



To a stirred solution of 5-amino-2-fluorobenzoic acid (181 mg, 1.18 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (2.0 mL) was added maleic anhydride (117 mg, 1.19 mmol, 1 equiv.). The reaction mixture was stirred during 1 hour at room temperature. Then *N*-hydroxysuccinimide (273 mg, 2.37 mmol, 2 equiv.) and EDC.HCl (453 mg, 2.36 mmol, 2 equiv.) were successively added to the reaction mixture. The resulting solution was stirred at room temperature for 22 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was taken up in CH_2Cl_2 (20 mL), washed with saturated $NaHCO_3$ (50 mL) and water (75 mL). The organic layer was dried on $MgSO_4$, filtrated and evaporated under reduced pressure to give a black oil. The crude was purified using silica gel column flash chromatography (gradient: PE/AcOEt, 100/0 to 40/60) to yield the activated ester **73** as a yellowish solid (204 mg, 54%).

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, 298K): δ ppm = 8.11 (dd, 1H, $^4J_{H\text{-}F}$ = 5.9 Hz, $^4J_{H\text{-}H}$ = 2.7 Hz, H_8), 7,70 (ddd, 1H, $^3J_{H\text{-}H}$ = 8,8 Hz, $^4J_{H\text{-}F}$ = 3.9 Hz, $^4J_{H\text{-}H}$ = 2.7 Hz, H_4), 7.34 (t, 1H, ^3J = 9.4 Hz, H_5), 6.89 (s, 2H, H_1), 2.91 (bs, 4H, C_{11}).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 126 MHz, 298K): δ ppm = 148.12, 143.20 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 7.5 Hz), 128.38, 124.16, 66.26 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 4.0 Hz), 49.61 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 4.6 Hz), 42.38, 168.97, 168.86, 161.25 (d, $^1J_{C\text{-}F}$ = 266.3 Hz, C_6), 158.74 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 4.6 Hz, 134.54, 134.12 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 9.6 Hz), 129.90, 127.87 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 3.5 Hz), 118.46 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 23.2 Hz), 114.64 (d, $J_{C\text{-}F}$ = 11.4 Hz), 25.78.

^{19}F NMR ($CDCl_3$, 376 MHz, 298K): δ (ppm) = -105.88 (reference hexafluorobenzene 1 % in DMSO-d_6).

HRMS (ESI) : m/z 355.0345 $[M+Na]^+$ (calculated for $C_{15}H_9FN_2NaO_6$: m/z 355.0337).

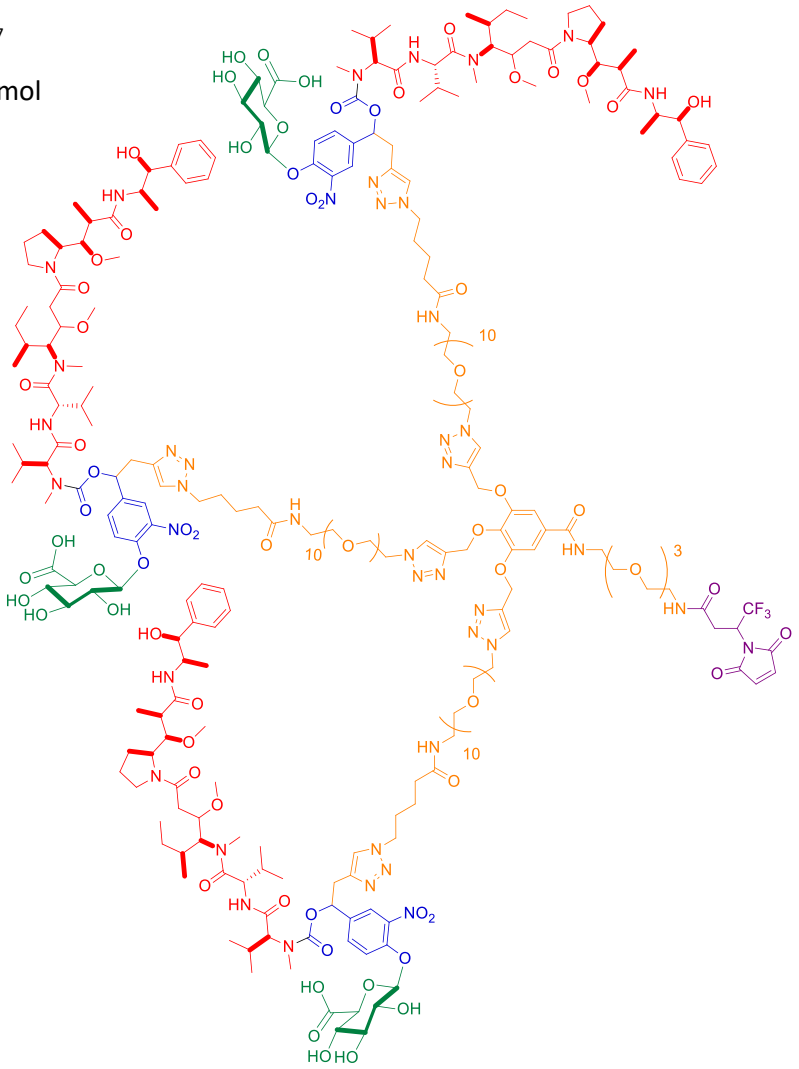
Synthesis of compound 74-R

$C_{281}H_{439}F_3N_{42}O_{97}$

M = 6014.71 g/mol

White solid

Yield: 60%



To solution of compound **59-R** (10.5 mg, 1.78 µmol, 1 equiv.) in dry DMSO (2 mL) were added *N*-Hydroxysuccinimide ester **72** (1.8 mg, 5.33 µmol, 3 equiv.) and Et_3N (1.5 µL, 10.8 µmol, 6 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product purified by reverse phase chromatography on C18 grafted silica (gradient elution MeCN/H_2O (0.05% TFA) 10/90 to 60/40 over 30 minutes) to afford compound **74-R** as a white solid (6.4 mg, 60%).

HRMS (ESI): m/z $[M+3Na]^{3+}$ calculated 2026.6780 found 2026,6743, m/z $[M+4Na]^{4+}$ calculated 1525.7558 found 1525,7564, m/z $[M+5Na]^{5+}$ calculated 1225.2025 found 1225.2028, m/z $[M+6Na]^{6+}$ calculated 1024.8336 found 1024.8337.

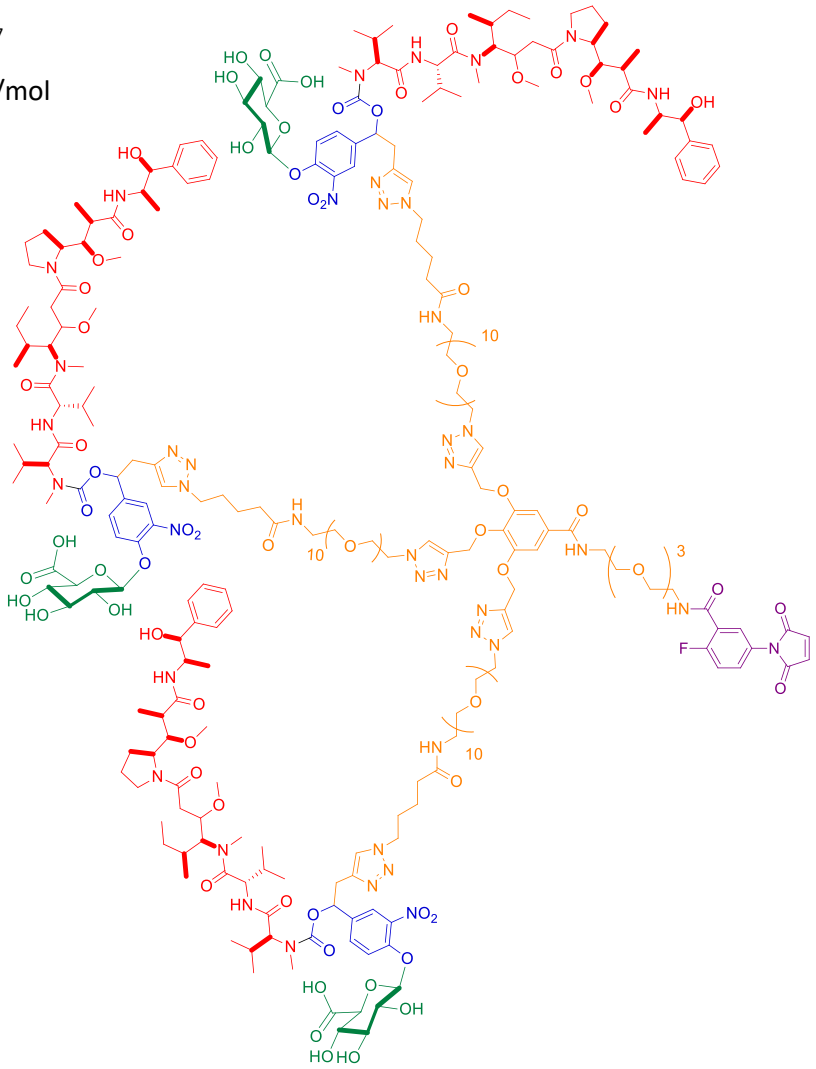
Synthesis of compound 75-R

$C_{284}H_{439}FN_{42}O_{97}$

M = 6012.75 g/mol

White solid

Yield: 48%



To solution of compound **59-R** (10.3 mg, 1.78 µmol, 1 equiv.) in dry DMSO (2 mL) were added *N*-Hydroxysuccinimide ester **73** (1.8 mg, 5.33 µmol, 3 equiv.) and Et_3N (1.5 µL, 10.8 µmol, 6 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product purified by reverse phase chromatography on C18 grafted silica (gradient elution MeCN/H_2O (0.05% TFA) 10/90 to 60/40 over 30 minutes) to afford compound **75-R** as a white solid (5.1 mg, 48%).

HRMS (ESI): m/z $[M+4Na]^{4+}$ calculated 1525.2566 found 1525,2611, m/z $[M+5Na]^{5+}$ calculated 1224.8031 found 1224,8078, m/z $[M+6Na]^{6+}$ calculated 1024.5008 found 1024.5047, m/z $[M+7Na]^{7+}$ calculated 881.4277 found 881.4298.

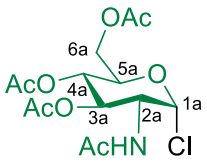
Synthesis of compound **83**

$C_{14}H_{20}ClNO_8$

M = 365.76 g/mol

White solid

Yield: 61%



N-acetylglucosamine (3.0 g, 13.5 mmol, 1 equiv.) was solubilized in acetyl chloride (13.5 mL, 190 mmol, 14 equiv.) and the solution was stirred for 72 hours at room temperature. After completion, the mixture solution was hydrolyzed by addition of ice water (150 mL), stirred for 5 minutes and CH_2Cl_2 (60 mL) was added. The organic layer was separated, washed with saturated $NaHCO_3$ (2 x 60 mL) and brine (60 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtrated and concentrated in *vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on a silica gel column (PE/AcOEt 50/50 to 0/100 over 20 minutes) to give compound **83** (3.0 g, 61%) as a white solid.

R_f: 0,37 (PE/AcOEt 40/60)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 6.19 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H1a), 5.77 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, HNH), 5.32 (dd, *J* = 14.6, 5.5 Hz, 1H), 5.22 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H), 4.53 (ddd, *J* = 10.6, 8.8, 3.8 Hz, 1H, H2a), 4.37 - 4,23 (m, 2H), 4.14 (dd, *J* = 13.1, 2.7 Hz, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.99 (s, 3H).

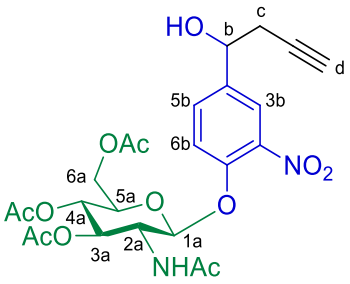
Synthesis of compound **84**

$C_{24}H_{28}N_2O_{12}$

M = 536.49 g/mol

White solid

Yield: 68%



To a solution of phenol **55** (169 mg, 0.82 mmol, 1.5 equiv.) solubilized in a mixture of CH_2Cl_2 (2 mL) and aqueous $NaHCO_3$ (1M, 1.4 mL) was added tetrabutylammonium iodide (176 mg, 0.54 mmol, 1 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 15 minutes. Then, a solution of compound **83** (200 mg, 0.54 mmol, 1 equiv.) in CH_2Cl_2 (1 mL) was added and the mixture was stirred until total consumption of the chlorinated compound **83**. After 5h30, the organic layer was separated, washed with water (5 mL), brine (5 mL), dried over $MgSO_4$, filtrated and concentrated in *vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on a silica gel column (PE/AcOEt 100/0 to 0/100 over 20 minutes) to give compound **84** (200 mg, 68%) as a white solid.

R_f: 0,31 (CH_2Cl_2/MeOH 95/5)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 7.85 (2d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H_{3b}), 7.62 – 7.43 (m, 1H, H_{5b}), 7.36 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H_{6b}), 5.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{NH}), 5.59 (dd, *J* = 10.4, 9.1 Hz, 1H, H_{3a}), 5.50 (dd, *J* = 8.2, 1.1 Hz, 1H, H_{1a}), 5.13 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H_{4a}), 4.97 – 4.84 (m, 1H, H_b), 4.34 – 4.15 (m, 2H, H_{6a}), 3.97 – 3.81 (m, 2H, H_{2a} and H_{5a}), 2.73 – 2.57 (m, 2H, H_c), 2.11 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, H_d), 2.09 (s, 3H, $H_{acetate}$), 2.06 (s, 3H, $H_{acetate}$), 2.05 (s, 3H, $H_{acetate}$), 1.99 (s, 3H, $H_{acetamide}$).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 171.28, 170.71, 170.61, 169.63, 148.86, 138.91, 131.29, 122.65, 121.20, 121.14, 99.71, 79.53, 77.41, 77.16, 76.91, 72.37, 72.20, 71.28, 70.83, 68.59, 62.04, 55.48, 29.62, 23.50, 20.91, 20.85, 20.81.

HRMS (ESI): $[M+Na]^+$ calcd for $C_{24}H_{28}N_2NaO_{12}$: 559.1534 found 559.1521.

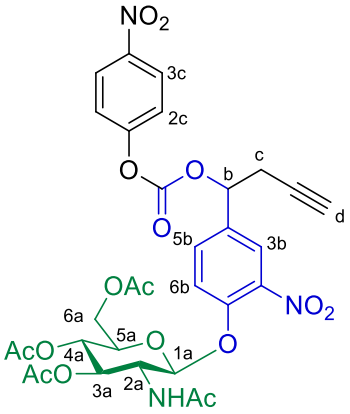
Synthesis of compound **85**

$C_{31}H_{31}N_3O_{16}$

M = 701.59 g/mol

White solid

Yield: 72%



To a solution of phenol **84** (200 mg, 0.37 mmol, 1 equiv.) solubilized in CH_2Cl_2 (4 mL) was added 4-nitrophenyl chloroformate (150 mg, 0.75 mmol, 2 equiv.) at room temperature. The mixture was cooled to 0°C and pyridine (75.2 µL, 0.93 mmol, 2.5 equiv.) was added. The mixture was stirred at 0°C for 20 minutes and allowed to warm to room temperature for 3 hours. After completion, the mixture was hydrolyzed with saturated $NaHCO_3$ (4 mL) and stirred for 5 minutes. Then, the organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (4 mL). The combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over $MgSO_4$, filtrated and concentrated in *vacuo*. The crude residue was purified by chromatography on a silica gel column (CH_2Cl_2/MeOH 100/0 to 95/5 over 30 minutes) to give compound **85** (188 mg, 72%) as a white solid.

R_f: 0,17 (CH_2Cl_2/MeOH 98/2)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 8.28 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, H_{3c}), 7.91 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H, H_{3b}), 7.62 (dt, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, H_{5b}), 7.43 – 7.30 (m, 3H, H_{6b} and H_{2c}), 5.91 – 5.72 (m, 2H, H_b and H_{NH}), 5.72 – 5.54 (m, 2H, H_{3a} and H_{1a}), 5.13 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, H_{4a}), 4.35 – 4.17 (m, 2H, H_{6a}), 3.99 – 3.88 (m, 1H, H_{5a}), 3.88 – 3.79 (m, 1H, H_{2a}), 3.01 – 2.78 (m, 2H, H_c), 2.12 – 2.08 (m, 4H, H_d and $H_{acetate}$), 2.07 (s, 3H, $H_{acetate}$), 2.05 (s, 3H, $H_{acetate}$), 1.98 (s, 3H, $H_{acetamide}$).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 171.35, 171.31, 170.66, 170.52, 169.61, 155.27, 151.62, 149.92, 145.70, 141.44, 141.30, 133.46, 133.41, 132.46, 132.26, 125.52, 123.76, 123.57, 121.85, 121.83, 120.79, 120.65, 99.31, 99.18, 72.61, 72.41, 71.02, 70.98, 68.54, 61.99, 60.56, 55.69, 55.62, 26.37, 23.50, 21.22, 20.89, 20.83, 20.80, 14.33.

HRMS (ESI): $[M+Na]^+$ calcd for $C_{31}H_{31}N_3NaO_{16}$: 724.1597 found 724.1604.

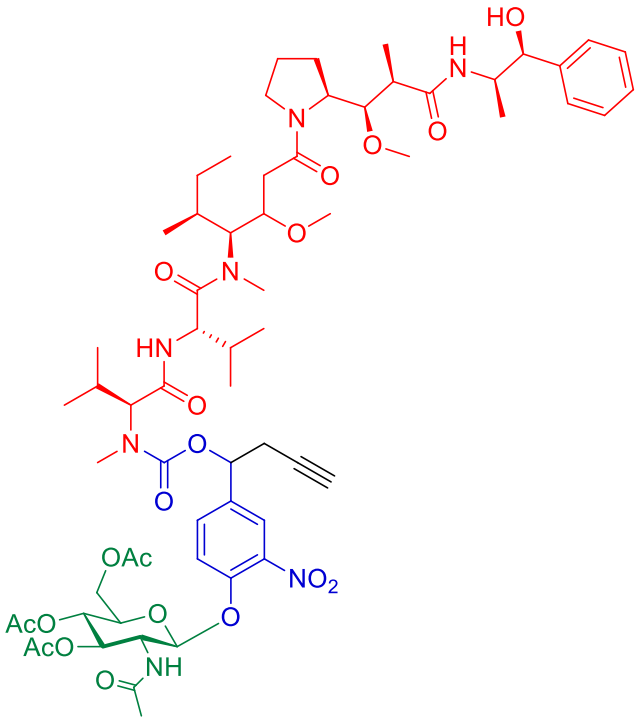
Synthesis of compound 86

$C_{64}H_{93}N_7O_{20}$

M = 1280.48 g/mol

White solid

Yield: 93%



To a solution of carbonate **85** (98 mg, 0.139 mmol, 1 equiv.) solubilized in dry DMF (3 mL) were added MMAE (100 mg, 0.139 mmol, 1 equiv.) and HOBt (19 mg, 0.139 mmol, 1 equiv.). The mixture was stirred at room temperature and pyridine (0.7 mL) was added. The mixture was stirred at room temperature for 24 hours. After completion, the solvents were evaporated under reduced pressure and the crude residue was purified by chromatography on a silica gel column (CH_2Cl_2/MeOH 100/0 to 90/10 over 30 minutes) to afford compound **86** (166 mg, 93%) as a white solid.

Rt = 10.20 min (Method 2)

MS (ESI): $[M+H]^+$ calcd for $C_{64}H_{94}N_7O_{20}$: 1280.6 found 1280.9 ; $[M+2H]^{2+}$ calcd for $C_{64}H_{95}N_7O_{20}$: 640.8 found 641.3.

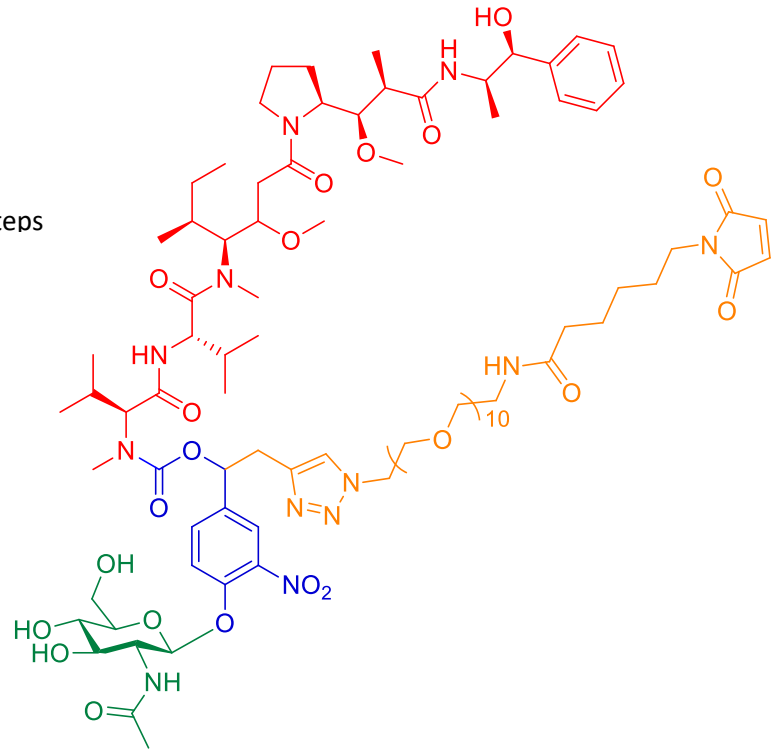
Synthesis of compound **80**

$C_{90}H_{144}N_{12}O_{30}$

M = 1874.20 g/mol

White solid

Yield: 24% over 3 steps



The prodrug **80** was prepared from compound **86** in 3 steps without intermediates purifications.

Firstly, to a solution of alkyne **86** (70 mg, 0.055 mmol, 1 equiv.) and azido-PEG_{10}-amine **46** (32 mg, 0.060 mmol, 1.1 equiv.) in degassed CH_2Cl_2 (2 mL) under argon atmosphere was added $Cu(MeCN)_4PF_6$ (20 mg, 0.055 mmol, 1 equiv.). The mixture was stirred at room temperature until completion. After 3 hours, the resin QuadraPure® IDA (300 mg) was added to the mixture to scavenge the copper, stirred for additional 3 hours and removed by filtration. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude was used immediately for the next step without further purification.

Secondly, the crude compound **87** was solubilized in MeOH (2 mL). Then, sodium methoxide (0.44 mg, 0.008 mmol, 0.15 equiv.) was added and the mixture was stirred at room temperature for 5 hours. After completion, the resin IR-120 (300 mg) was added until neutral pH. The solvent was evaporated under reduced pressure. The crude was used immediately for the next step without further purification.

Finally, Et_3N (23 µL, 0.164 mmol, 3 equiv.) was added to a solution of the crude amine **88** and NHS ester **63** (18.5 mg, 0.060 mmol, 1.1 equiv.) in dry DMSO (2 mL). The mixture was stirred at room temperature for 1 hour. After completion monitored by LC-MS (Method **2**), the solvent was evaporated under reduced pressure and the crude residue was purified by reverse phase chromatography on C18 grafted silica (gradient elution $MeCN/H_2O$ (0.05% TFA) 20/80 to 80/20 over 30 minutes) to afford **80** (25 mg, 24% over 3 steps) as a white solid.

Rt = 7.33 min (Method 2)

HRMS (ESI): $[M+Na]^+$ calcd for $C_{90}H_{144}N_{12}NaO_{30}$: 1896.0004 found 1895.9952.

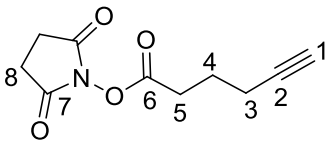
Synthesis of compound **93**

$C_{10}H_{11}NO_4$

M = 209.07 g/mol

yellowish oil

Yield: 86%



To a solution of hexanoic acid (500 mg, 4.462 mmol, 1 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (29 mL) were added EDC.HCl (860 mg, 4.462 mmol, 1 equiv.) and *N*-hydroxysuccinimide (510 mg, 4.462 mmol, 1 equiv.). The mixture was stirred overnight at room temperature. After total consumption of the starting material, the mixture was diluted with CH_2Cl_2 (65 mL), washed with water (65 mL) and brine (65 mL). The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column (PE/AcOEt : 100/0 to 55/45) to afford compound **93** (798 mg, 86%) as a yellowish oil.

Rf : 0.32 (PE/AcOEt : 70/30)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 2.84 (bs, 4H, H_8), 2.77 (t, 2H, $^3J_{H5-H4}$ = 7.6 Hz, H_5), 2.35 (td, 2H, $^3J_{H3-H4}$ = 7.2 Hz, $^4J_{H3-H1}$ = 2.8 Hz, H_3), 2.01 (t, 1H, $^4J_{H1-H3}$ = 2.8 Hz, H_1), 1.96 (quint, 2H, $^3J_{H4-H3/H5}$ = 7.2 Hz, H_4).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 169.1 (C_7), 168.2 (C_6), 82.4 (C_2), 69.6 (C_1), 29.5 (C_5), 25.6 (C_8), 23.3 (C_4), 17.4 (C_3).

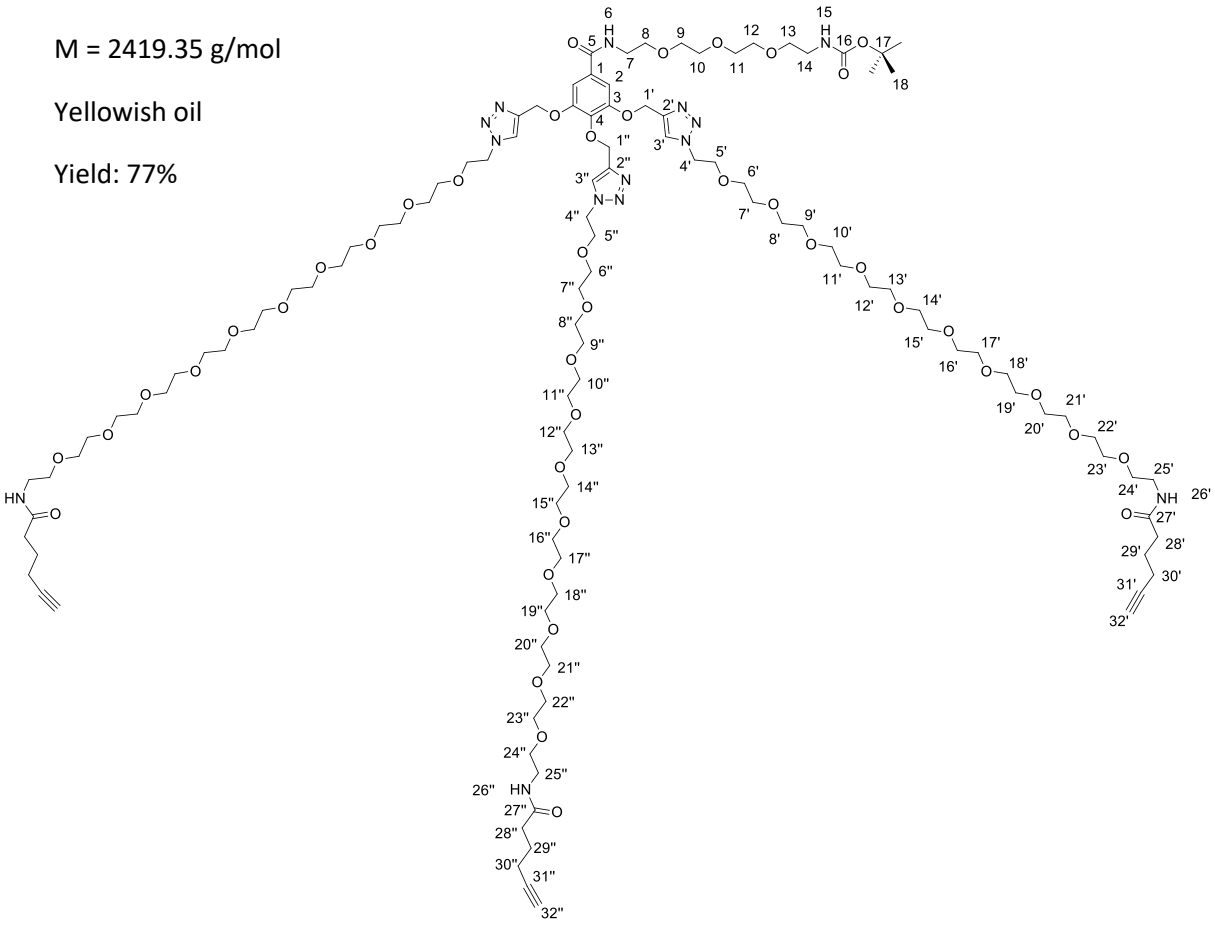
Synthesis of compound **94**

$C_{113}H_{194}N_{14}O_{42}$

M = 2419.35 g/mol

Yellowish oil

Yield: 77%



To a solution of compound **47** (622 mg, 0.291 mmol, 1 equiv.) in dry DMSO (3.5 mL) was added *N*-hydroxysuccinimide ester **93** (213 mg, 1.02 mmol, 3.5 equiv.) and Et_3N (122 µL, 0.870 mmol, 3 equiv.). The mixture was stirred overnight at room temperature. After completion of the reaction, the solvent was removed in vacuo and the crude purified by reverse phase chromatography on C18 grafted silica (gradient elution MeCN/H_2O (0.05% TFA) 10/90 to 50/50 over 30 minutes) to afford compound **94** (540 mg, 77%) as a yellowish oil.

Rf : 0.63 (CH_2Cl_2/MeOH : 90/10)

Rt = 7.33 min (Method **2**)

^{1}H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2, 298K): δ ppm = 7.96 (s, 2H, $H_{3'}$), 7.83 (s, 1H, $H_{3''}$), 7.28 (s, 2H, H_2), 6.38 (bs, 3H, $H_{26'}$ and $H_{26''}$), 5.21 (s, 4H, $H_{1'}$), 5.12 (s, 2H, $H_{1''}$), 4.54 (t, $^3J_{H4'-H5'}$ = 5.1 Hz, 4H, $H_{4'}$), 4.47 (t, $^3J_{H4''-H5''}$ = 5.3 Hz, 2H, $H_{4''}$), 3.87 (t, $^3J_{H5'-H4'}$ = 5.1 Hz, 4H, $H_{5'}$), 3.82 (t, $^3J_{H5''-H4''}$ = 5.3 Hz, 2H, $H_{5''}$), 3.61-3.47 (m, 127H, H_{PEG}), 3.46 (t, *J* = 5.3 Hz, 3H, H_{13}), 3.38 (m, 6H, $H_{25'}$ and $H_{25''}$), 3.21 (m, 2H, H_{14}), 2.24 (t, $^3J_{H28-H29}$ = 7.4 Hz, 6H, $H_{28'}$ and $H_{28''}$), 2.19 (td, $^3J_{H30-H29}$ = 7.1 Hz, $^4J_{H30-H32}$ = 2.4 Hz, 6H, $H_{30'}$ and $H_{30''}$), 2.03 (t, $^4J_{H32-H30}$ = 2.4 Hz, 3H, $H_{32'}$ and $H_{32''}$), 1.77 (m, 6H, $H_{29'}$ and $H_{29''}$), 1.37 (s, 9H, H_{18}).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2, 298K): δ ppm = 172.23 ($C_{27'}$ and $C_{27''}$), 166.71 (C_5), 156.16 (C_{16}), 152.48 (C_3), 144.31 ($C_{2''}$), 143.54 ($C_{2'}$), 140.39 (C_4), 130.70 (C_1), 125.00 ($C_{3'}$), 124.82 ($C_{3''}$), 107.31 (C_2), 84.07, 70.81, 70.77, 70.74, 70.69, 70.65, 70.58, 70.53, 70.39, 70.12, 69.72, 69.65, 69.16 (C32' and C32''),

66.55, 63.30, 54.38, 54.11, 53.84, 53.57, 53.30, 50.61, 50.38, 39.49, 35.20 (C28' and C28''), 28.47, 24.69 (C29' and C29''), 18.14 (C30' and C30'').

HRMS (ESI+): m/z 1232.664308 (calcd. for $C_{113}H_{194}N_{14}Na_2O_{42}$ 1232.662974 $[M+2Na]^{2+}$); m/z 1248.637450 (calcd. for $C_{113}H_{194}K_2N_{14}O_{42}$ 1232.636911 $[M+2K]^{2+}$).

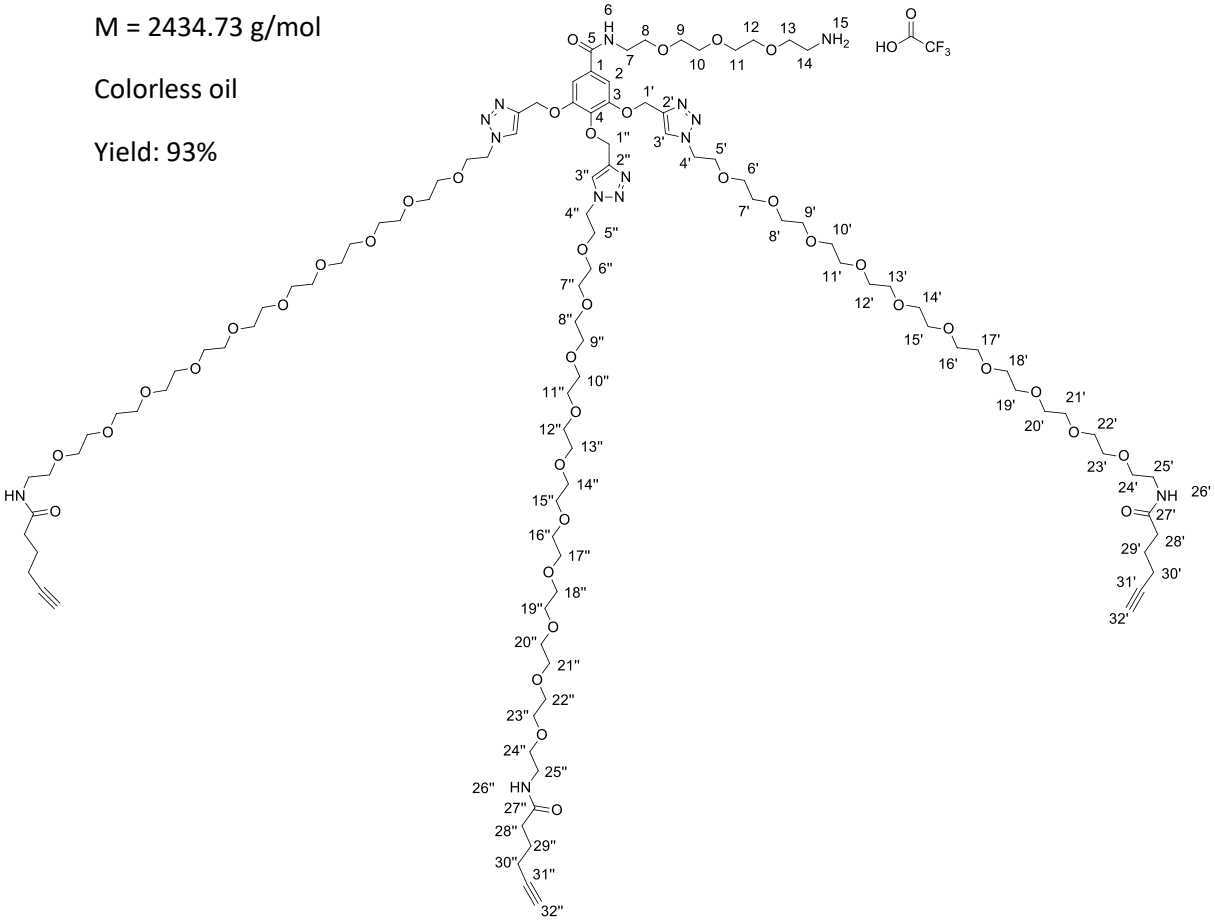
Synthesis of compound **95**

$C_{108}H_{186}N_{14}O_{40}$ + TFA

M = 2434.73 g/mol

Colorless oil

Yield: 93%



To a cooled solution (0°C) of compound **94** (200 mg (0.0827 mmol, 1 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (2 mL) was added trifluoroacetic acid (0.5 mL). The mixture was stirred at 0°C until completion of the reaction. After 3 hours, the solvents were evaporated under reduced pressure and the crude purified by reverse phase chromatography on C18 grafted silica (gradient elution MeCN/H_2O (0.05% TFA) 10/90 to 50/50 over 30 minutes) to afford **95** (187 mg, 93%) as a colorless oil.

Tr : 5.32 min (method 2)

^{1}H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2, 298K): δ ppm = 8.01 (s, 2H, $H_{3'}$), 7.91 (s, 1H, $H_{3''}$), 7.76 (bs, 1H, H_6), 7.67 (bs, 3H, H_{15}), 7.33 (s, 2H, H_2), 6.56 (bs, 3H, $H_{26'}$ and $H_{26''}$), 5.22 (s, 4H, $H_{1'}$), 5.17 (s, 2H, $H_{1''}$), 4.57 (t, $^3J_{H4'-H5'}$ = 5.1 Hz, 4H, $H_{4'}$), 4.52 (t, $^3J_{H4''-H5''}$ = 5.3 Hz, 2H, $H_{4''}$), 3.88 (t, $^3J_{H5'-H4'}$ = 5,1 Hz, 4H, $H_{5'}$), 3.84 (t, $^3J_{H5''-H4''}$ = 5.3 Hz, 2H, $H_{5''}$), 3.63-3.51 (m, 134H, H_{PEG}), 3.40 (m, 6H, $H_{25'}$ and $H_{25''}$), 3.13 (bs, 2H, H_{14}), 2.30 (t, $^3J_{H28-H29}$ = 7.4 Hz, 6H, $H_{28'}$ and $H_{28''}$), 2.21 (td, $^3J_{H30-H29}$ = 7.1 Hz, $^4J_{H30-H32}$ = 2.4 Hz, 6H, $H_{30'}$ and $H_{30''}$), 2.03 (t, $^4J_{H32-H30}$ = 2.4 Hz, 3H, $H_{32'}$ and $H_{32''}$), 1.79 (m, 6H, $H_{29'}$ and $H_{29''}$).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2, 298K): δ ppm = 172.51, 152.31, 144.11, 143.55, 139.87, 130.60, 125.37, 125.10, 107.41, 84.13, 70.81, 70.73, 70.63, 70.61, 70.53, 70.50, 70.25, 70.20, 69.66, 69.61, 69.14, 67.18, 66.01, 62.88, 50.69, 50.47, 40.31, 40.08, 39.48, 35.18, 24.73, 18.15.

HRMS (ESI+): m/z 2320.308699 (calcd. for $C_{108}H_{187}N_{14}NaO_{40}$ 2320.302353 $[M+H]^+$); m/z 2342.289855 (calcd. for $C_{108}H_{186}N_{14}O_{40}$ 2342.284298 $[M+Na]^+$); m/z 2358.268514 (calcd. for $C_{108}H_{186}KN_{14}O_{40}$ 2358.258235 $[M+K]^+$).

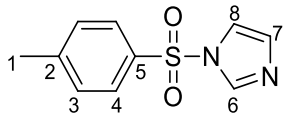
Synthesis of compound 96

$C_{10}H_{10}N_2O_2S$

M = 222.26 g/mol

White solid

Yield: 92%



Imidazole (7.20 g, 105.88 mmol, 4 equiv.) was added to a solution of *p*-toluenesulfonyl chloride (5.09 g, 26.80 mmol, 1 equiv.) in CH_2Cl_2 (50 mL). The mixture was stirred for 2 hours at room temperature and diluted with CH_2Cl_2 (50 mL). The organic layer was separated, washed with water (3 x 100 mL), dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated *in vacuo* to afford compound **96** (5.39 g, 92%) as a white solid.

Rf : 0.60 (DCM/MeOH : 90/10)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 7.99 (s, 1H, H_6), 7.80 (d, 2H, $^3J_{H4\text{-}H3}$ = 8.4 Hz, H_4), 7.34 (d, 2H, $^3J_{H3\text{-}H4}$ = 8.4 Hz, H_3), 7.28 (s, 1H, H_8), 7.06 (s, 1H, H_7), 2.42 (s, 3H, H_1).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 146.4 (C_2), 136.7 (C_6), 135.0 (C_5), 131.5 (C_7), 130.5 (C_3), 127.4 (C_4), 117.5 (C_8), 21.8 (C_1).

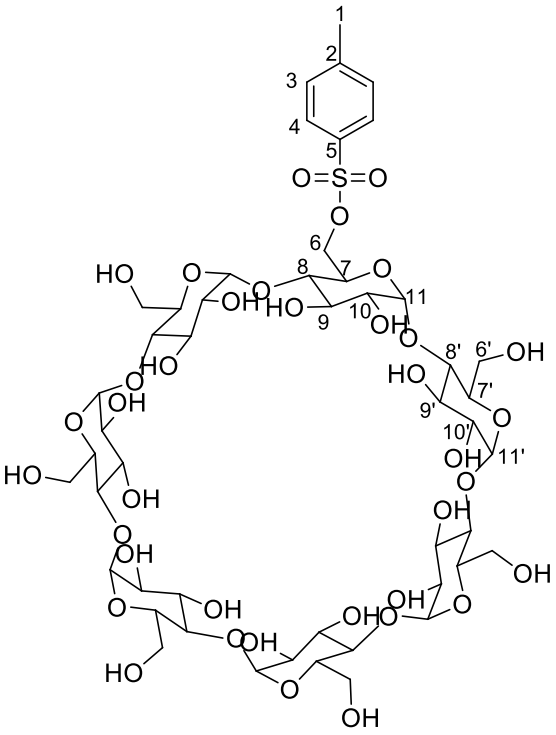
Synthesis of compound **98**

$C_{49}H_{76}O_{37}S$

M = 1289.17 g/mol

White solid

Yield: 40%



NaOH (1.76 g, 44 mmol, 8.8 equiv.) was added to a suspension of β-cyclodextrin (5.00 g, 4.40 mmol, 1 equiv.) **97** in water (100 mL). The mixture was stirred at room temperature for 2 hours and neutralized with HCl 2M (25 mL) until pH 5-6. The precipitate was filtered off and lyophilized to afford compound **98** (2.27 g, 40%) as a white solid.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6, 298K): δ ppm = 7.74 (d, 2H, $^{3}J_{H4\text{-}H3}$ = 8.0 Hz, H_4), 7.42 (d, 2H, $^{3}J_{H3\text{-}H4}$ = 8.0 Hz, H_3), 5.87-5.58 (m, 14H, OH_9, OH_{10}), 4.82-4.76 (m, 7H, H_{11} and $H_{11'}$), 4.53-4.15 (m, 8H, H_6 and $OH_{6'}$), 3.64-3.20 (m, 40H, H_7-H_8-H_9-H_{10}-$H_{6'}$-$H_{7'}$-$H_{8'}$-$H_{9'}$ and $H_{10'}$), 2.42 (s,3H, H_1).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6, 298K): δ ppm = 144.9 (C_5), 132.8 (C_2), 129.8 (C_4), 127.8 (C_3), 102.1 (C_{11}), 81.8 (C_8), 73.3-71.4 (C_7, C_9, C_{10}, $C_{7'}$, $C_{9'}$ and $C_{10'}$), 59.5 (C_6 and $C_{6'}$), 22.0 (C_1).

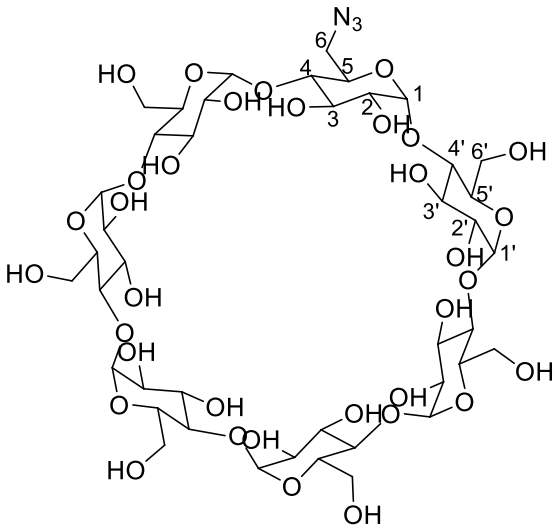
Synthesis of compound 99

$C_{42}H_{69}N_3O_{37}$

M = 1160.00 g/mol

White solid

Yield: 54%



Compound **98** (1.18 g, 0.92 mmol, 1 equiv.) and sodium azide (0.072 g, 1.10 mmol, 1.2 equiv.) were solubilized in dry DMF (5 mL). The mixture was heated up to 110°C and stirred. After 2 hours, the solution was allowed to cool to room temperature and acetone (10 mL) was added. The precipitate was filtered off and purified by recrystallization (water/acetone : 2/8) to afford compound **99** (0.57 g, 54%) as a white solid.

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6, 298K): δ ppm = 5.80-5.63 (m, 14H, OH_2, OH_3), 4.88-4.83 (m, 7H, H_1), 4.54-4.45 (m, 6H, $OH_{6'}$), 3.64-3.20 (m, 42H, H_2-H_3-H_4-H_5-H_6-$H_{2'}$-$H_{3'}$-$H_{4'}$-$H_{5'}$ and $H_{6'}$).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6, 298K): δ ppm = 101.9 (C_1 and $C_{1'}$), 81.5 (C_4 and $C_{4'}$), 73.0-71.9 (C_2, C_3, C_5, $C_{2'}$, $C_{3'}$, $C_{5'}$), 59.9 (C_6 et $C_{6'}$).

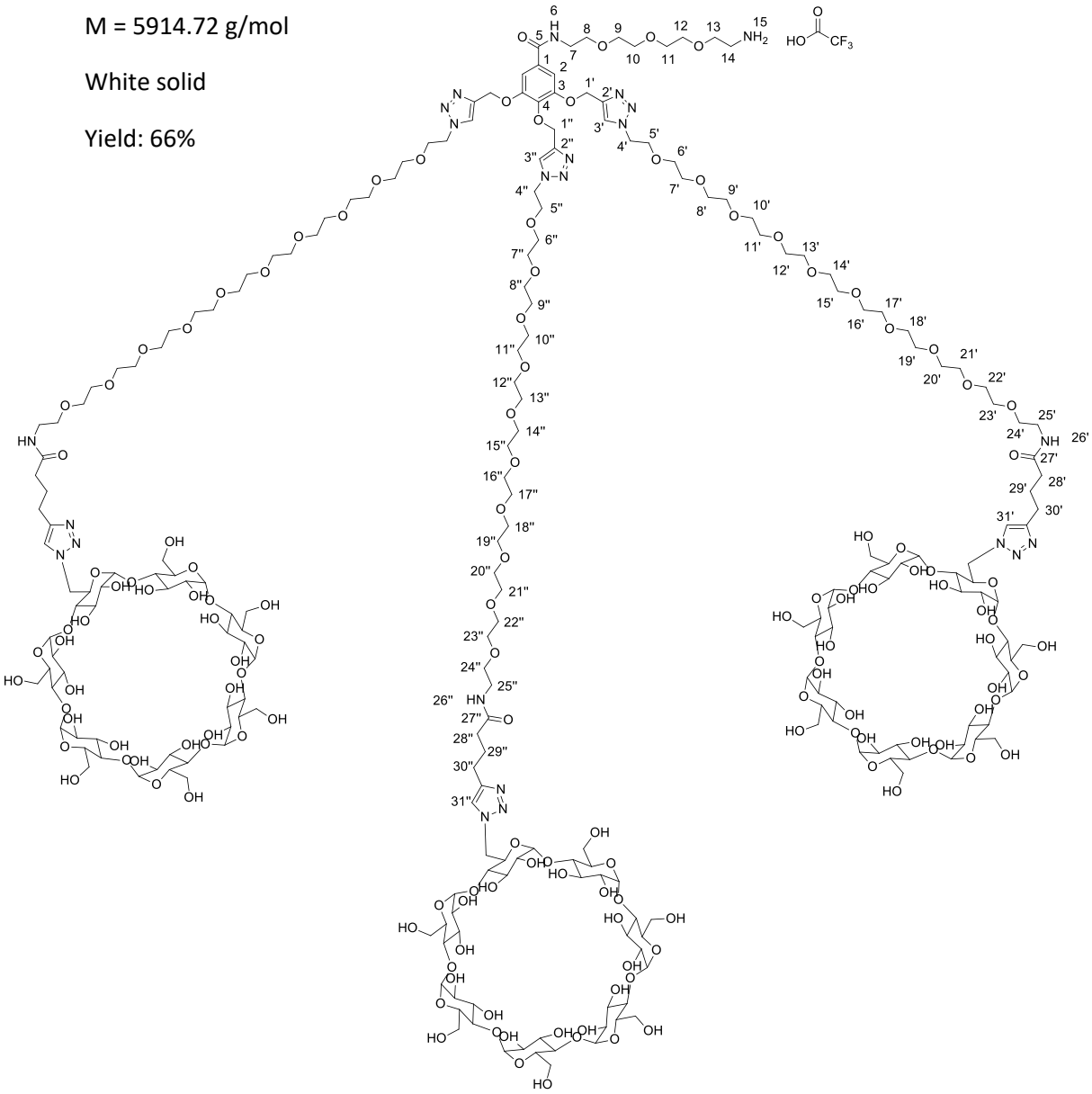
Synthesis of compound 100

$C_{234}H_{393}N_{23}O_{142}$ + TFA

M = 5914.72 g/mol

White solid

Yield: 66%



6-monoazido-6-monodeoxy-β-cyclodextrin **99** (192 mg, 0.166 mmol, 4 equiv.) and deprotected compound **95** (101 mg, 0.0415 mmol, 1 equiv.) were dissolved in dry DMSO (3 mL). Then the mixture was degassed under argon atmosphere. THPTA (53.9 mg, 0.124 mmol, 3 equiv.) followed by $Cu(MeCN)_4PF_6$ (46.4 mg, 0.124 mmol, 3 equiv.) were added and the mixture was stirred for overnight at room temperature. The reaction was monitored by LC/MS. After completion, 700 mg of resin QuadraPure® IDA was added to the mixture which was allowed to stir for 2 additional hours. The solvent was then removed under reduced pressure and the crude material was purified by reverse phase chromatography on C18 grafted silica (gradient elution H_2O (0.05 % TFA)/MeCN: 90/10 to 50/50) to give compound **100** (160.8 mg, 66%) as a white solid.

Tr : 4.54 min (method **3**)

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD, 298K): δ ppm = 8.24 (s, 2H, $H_{3'}$), 7.98 (s, 1H, $H_{3''}$), 7.85 (s, 3H, $H_{32'}$ and $H_{32''}$), 7.40 (s, 2H, H_2), 5.28 (s, 4H, $H_{1'}$), 5.18 (s, 2H, $H_{1''}$), 5.14 (d, ^{3}J= 3.4 Hz, 2H, $H_{33'}$), 5.07-4.84 (m, 292H, H_{CD} and H_{PEG}), 4.66 (t, $^{3}J_{H4'-H5'}$ = 5.1 Hz, 4H, $H_{4'}$), 4.62 (t, $^{3}J_{H4''-H5''}$ = 5.3 Hz, 2H, $H_{4''}$), 4.57 (t, $^{3}J_{H5'-H4'}$ = 5.1 Hz, 4H, $H_{5'}$), 4.12 – 3.41 (m, $H_{PEG\ masked\ with\ residual\ water}$), 3.38 (t, *J* = 5.1 Hz, 6H, $H_{25'}$ and $H_{25''}$), 3.14-3.07 (m, 4H, H_{13} and H_{14}), 2.76 (t, $^{3}J_{H30-H29}$ = 7.1 Hz, 6H, $H_{30'}$ and $H_{30''}$), 2.31 (t, $^{3}J_{H28-H29}$ = 7.4 Hz, 6H, $H_{28'}$ and $H_{28''}$), 2.00 (m, 6H, $H_{29'}$ and $H_{29''}$).

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD, 298K): δ ppm = 174.2, 167.5, 158.9, 152.2, 146.8, 143.0, 140.0, 129.8, 125.3, 124.1, 107.1, 102.6, 102.5, 101.9, 83.7, 81.8, 81.6, 81.4, 81.2, 73.4, 73.4, 73.3, 73.1, 72.8, 72.7, 72.5, 72.3, 72.0, 70.7, 70.1, 70.1, 70.0, 69.9, 69.8, 69.2, 68.9, 66.6, 62.4, 60.4, 59.6, 50.9, 50.1, 39.4, 39.0, 35.0, 25.3, 24.4.

HRMS (ESI+): m/z 1160.4954 (calcd. for $C_{234}H_{397}N_{23}O_{142}$ 1160.4920 $[M+5H]^{5+}$).

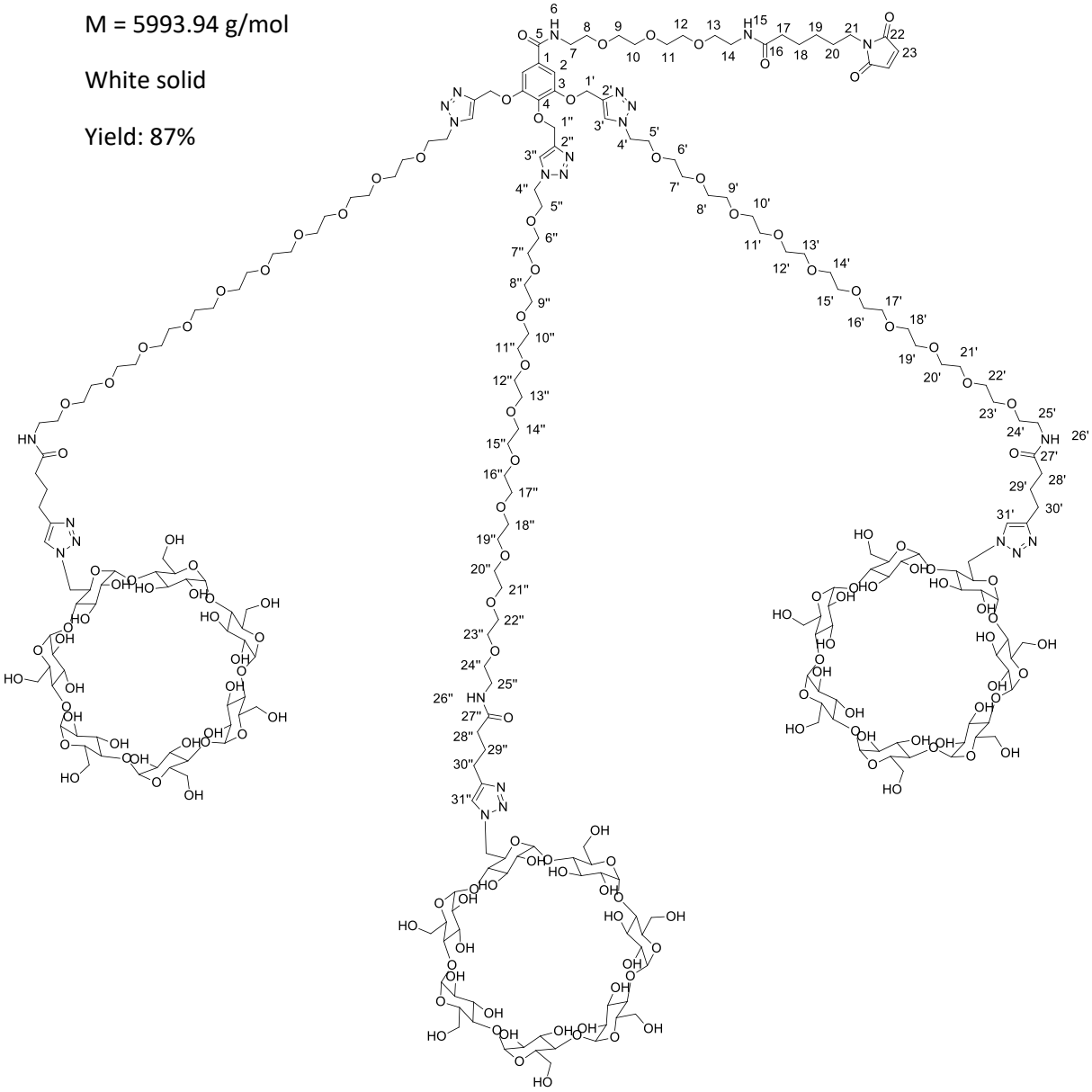
Synthesis of compound **89**

$C_{244}H_{404}N_{24}O_{145}$

M = 5993.94 g/mol

White solid

Yield: 87%



To a solution of compound **100** (50 mg, 0.085 mmol, 1 equiv.) in dry DMSO (3 mL) were added *N*-hydroxysuccinimide ester **63** (5 mg, 0.0169 mmol, 2 equiv.) and Et_3N (5.9 µL, 0.042 mmol, 5 equiv.). the mixture was stirred at room temperature until total consumption of the starting material. After 2 hours, the solvent was removed *in vacuo* and the crude product purified by reverse phase chromatography on C18 grafted silica (gradient elution H_2O (0.05 % TFA)/MeCN: 90/10 to 50/50) to give compound **89** (44 mg, 87%) as a white solid.

Tr : 5.47 min (method **3**)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 8.23 (s, 2H, $H_{3'}$), 7.97 (s, 1H, $H_{3''}$), 7.87 (s, 3H, $H_{32'}$ and $H_{32''}$), 7.41 (s, 2H, H_2), 6.82 (s, 4H, H_{23}), 5.28 (s, 4H, $H_{1'}$), 5.15 (s, 2H, $H_{1''}$), 5.13 (d, ^3J = 3.4 Hz, 2H, $H_{33'}$), 4.65 (t, $^3J_{H4'\text{-}H5'}$ = 5.1 Hz, 4H, $H_{4'}$), 4.60 (t, $^3J_{H4''\text{-}H5''}$ = 5.3 Hz, 2H, $H_{4''}$), 4.56 (t, $^3J_{H5'\text{-}H4'}$ = 5.1 Hz, 4H, $H_{5'}$), 4.13 (t, $^3J_{H5''\text{-}H4''}$ = 5.3 Hz, 2H, $H_{5''}$), 3,98-3,25 (m, 307H, H_{PEG}), 2.76 (t, $^3J_{H30\text{-}H29}$ = 7.1 Hz, 6H, $H_{30'}$ and $H_{30''}$), 2.30

(t, $^{3}J_{H28\text{-}H29}$ = 7.4 Hz, 6H, $H_{28'}$ and $H_{28''}$), 2.20 (t, 2H, H_{17}), 2.00 (m, $H_{29'}$ and $H_{29''}$), 1.60 (m, 6H, H_{18}, H_{19} and H_{20}).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, 298K): δ ppm = 172.10, 171.17, 165.47, 151.63, 146.40, 143.29, 142.53, 139.15, 134.51, 129.70, 124.89, 124.78, 122.86, 106.75, 102.26, 102.08, 101.94, 101.17, 83.59, 82.10, 81.60, 81.44, 80.73, 73.26, 73.20, 73.06, 72.98, 72.60, 72.53, 72.37, 72.30, 72.23, 72.13, 71.84, 70.03, 69.80, 69.66, 69.61, 69.59, 69.18, 68.74, 65.58, 62.35, 60.19, 59.88, 58.82, 50.31, 49.51, 49.36, 38.52, 38.45, 37.02, 35.10, 34.96, 27.84, 25.82, 25.21, 24.81, 24.66.

HRMS (ESI+) : m/z 1498.6350 (calcd. for $C_{234}H_{397}N_{23}O_{142}$ 1498.6317 $[M+4H]^{4+}$).

BIBLIOGRAPHIE

1. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalite par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 – Synthèse des résultats, *Santé publique France*, **2018**. Disponible à partir de l'URL https://www.santepubliquefrance.fr page consultée le 25/06/2020.
2. Cancer : les traitements et les soins de support - Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. Disponible à partir de l'URL https://www.fondation-arc.org page consultée le 09/11/2020.
3. F. Kratz, I. A. Müller, C. Ryppa, A. Warnecke, *ChemMedChem,* **2008**, 3, 20 - 53.
4. A. Bikfalvi, *B. Cancer*, **2003**, 90, 449 - 458.
5. J. Fayette, J. -C. Soria, J. -P. Armand, *Pathologie Biologie,* **2006**, 54, 199 - 205.
6. D. J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga, L. Norton, *N. Engl. J. Med*., **2001**, 344, 783 - 792.
7. I. Smith, M. Procter, R. D. Gelber, S. Guillaume, A. Feyereislova, M. Dowsett, A. Goldhirsch, M. Untch, G. Mariani, J. Baselga, M. Kaufmann, D. Cameron, R. Bell, J. Bergh, R. Coleman, A. Wardley, N. Harbeck, R. I. Lopez, P. Mallmann, K. Gelmon, N. Wilcken, E. Wist, P. Sánchez Rovira, M. J. Piccart-Gebhart, *Lancet*, **2007**, 369, 29 - 36.
8. G. Casia, D. Neri, *J. Control. Release*, **2012**, 161, 422 - 428.
9. G. D. L. Phillips, G. Li, D. L. Dugger, L. M. Crocker, K. L. Parsons, E. Mai, W. A. Blättler , J. M. Lambert, R. V. J. Chari, R. J. Lutz, W. L. T. Wong, F. S. Jacobson, H. Koeppen, R. H. Schwall, S. R. Kenkare-Mitra, S. D. Spencer, M. X. Sliwkowski, *Cancer Res*., **2008**, 68, 9280 - 9290.
10. 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 - 84.
11. S. E. D'Souzaa, M. H. Ginsbergb, E. F. Plow, *TIBS*, **1991**, 16, 246-250.
12. S. Dissanayake, W. A. Denny, S. Gamage, V. Sarojini, *J. Control. Release*, **2017**, 250, 62 - 76.
13. E. C. Calvaresia, P. J. Hergenrother, *Chem. Sci*., **2013**, 4, 2319 - 2333.
14. P. P. Breitfeld, C. F. Simmons, G. J. A. M. Strous, H. J. Geuze, A. L. Schwartz, *International Review of Cytology*, **1985**, 97, 47 - 95.
15. B. Shi, M. Abrams, L. Sepp-Lorenzino, *J. Histochem. Cytochem*., **2013**, 61, 901 - 909.
16. S. D. Weitman, R. H. Lark, L. R. Coney, D. W. Fort, V. Frasca, V. R. Jr. Zurawski, B. A. Kamen, *Cancer Res*., **1992**, 52, 3396 - 3401.
17. P. S. Low, A. C. Antony, *Adv. Drug Deliver. Rev*., **2004**, 56, 1055 - 1058.
18. S. Santra, C. Kaittanis, O. J. Santiesteban, J. M. Perez, *J. Am. Chem. Soc*., **2011**, 133, 16680 - 16688.
19. W. A. Henne, D. D. Doorneweerd, A. R. Hilgenbrink, S. A. Kularatne, P. S. Low, *Bioorg. Med. Chem. Lett*., **2006**, 16, 5350 - 5355.
20. J. A. Reddy, R. Dorton, E. Westrick, A. Dawson, T. Smith, L.-C. Xu, M. Vetzel, P. Kleindl, I. R. Vlahov, and C. P. Leamon, *Cancer Res.,* **2007**, 67, 4434 - 4442.
21. I.-C. Sun, H. Y. Yoon, D.-K. Lim, K. Kim, *Bioconjugate Chem*., **2020**, 31, 1012 - 1024.
22. M. Thomas, J. Clarhaut, P.-O. Strale, I. Tranoy-Opalinski, J. Roche, S. Papot, *ChemMedChem*., **2011**, 6, 1006 - 1010.
23. T. Legigan, J. Clarhaut, I. Tranoy-Opalinski, A. Monvoisin, B. Renoux, M. Thomas, A. Le Pape, S. Lerondel, S. Papot, *Angew. Chem. Int. Ed*., **2012**, 51, 11606 - 11610.
24. S. K. Hobbs, W. L. Monsky, F. Yuan, W. G. Roberts, L. Griffith, V. P. Torchilin, R. K. Jain, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 4607 - 4612.

25. F. Yuan, M. Dellian, D.Fukumura, M.Leunig, D. A. Berk, V. P. Torchilin, R. K. Jain, *Cancer Res*., **1995**, 55, 3752 - 3756.
26. M. Bundgaard, *Ann. Rev. Physiol*., **1980**, 42, 325 - 336.
27. S. H. Jang, M. G. Wientjes, D. Lu, J. L.-S. Au, *Pharmaceut. Res*., **2003**, 20, 1337 – 1350.
28. J. Fang, H. Nakamura, H. Maeda, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2011**, 63, 136 - 151.
29. L. Bildstein, C. Dubernet, P. Couvreur, *Adv. Drug Discover. Rev*., **2011**, 63, 3 - 23.
30. R. Haag, F. Kratz, *Angew. Chem. Int. Edit*., **2006**, 45, 1198 - 1215.
31. D. Venturoli, B. Rippe, *Am. J. Physiol. - Renal*, **2005**, 288, 605 - 613.
32. S. Bisso, J. -C. Leroux, *Int. J. Pharm.*, **2020**, 578, 119098.
33. J. Patel, J. *Oncol. Pharm. Pract*., 1996, 2, 201 - 210.
34. I. F. Tannock, D. Rotin, *Cancer Res*., **1989**, 49, 4373 - 4384.
35. O. Warburg, *Science*, **1956**, 123, 309 - 314.
36. R. Jain, S. M. Standley, J. M. J. Fréchet, *Macromolecules*, **2007**, 40, 452 - 457.
37. M. J. Heffernan, N.Murthy, *Bioconjugate Chem*., **2005**, 16, 1340 - 1342.
38. R. Tomlinson, J. Heller, S. Brocchini, R. Duncan, *Bioconjugate Chem*., **2003**, 14, 1096 - 1106.
39. R. Tomlinson, M. Klee, S. Garett, J. Heller, R. Duncan, S. Brocchini, *Macromolecules*, **2002**, 35, 473 - 480.
40. C. C. Lee, *PNAS*, **2006**, 103, 16649 -16654.
41. J. M. Brown, W. R. Wilson, *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, 4, 437-447.
42. M. A. Naylor, P. Thomson, *Mini Rev. Med. Chem.*, **2001**, 1, 17 - 29.
43. W. A. Denny, *Eur. J. Med. Chem*. **2001**, 36, 577 - 595.
44. W. A. Denny, *Aust. J. Chem*., **2004**, 57, 821 - 828.
45. W. A. Denny, *Expert Opin. Ther. Pat.,* **2005**, 15, 635 - 646.
46. M. Rooseboom, J. N. M. Commandeur, N. P. E. Vermeulen, *Pharmacol. Rev*., **2004**, 56, 53 - 102.
47. Y.-H. Yang, H. Aloysius, D. Inoyama, Y. Chen, L.-Q. Hu, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **2011**, 1, 143 - 159.
48. M. Shahriari, M. Zahiri, K. Abnous, S. M. Taghdisi, M. Ramezani, M. Alibolandi, *J. Control. Release*, **2019**, 308, 172 - 189.
49. Q. Yao, L. Kou, Y. Tu, L. Zhu, *Trends in Pharmacological Sciences*, **2018**, 39, 766 - 781.
50. D. G. Vartak, R. A. Gemeinhart, *J. Drug. Target*., **2007,** 15, 1 - 20.
51. K. J. Isaacson, M. M. Jensen, N. B. Subrahmanyam, H. Ghandehari, *J. Control. Release*, **2017**, 259, 62 - 75.
52. M. Poreba, *FEBS J*., **2020**, 287, 1936 - 1969.
53. K. Kessenbrock, V. Plaks, Z. Werb, *Cell*, **2010**, 141, 52 - 67.
54. R. J. Bernacki, M. J. Niedbala, W. Korytnyk, *Cancer and Metastasis Reviews*, **1985**, 4, 81 - 102.
55. F. E. Brot, C. E. Bell, W. S. Sly, *Biochemistry*, **1978**, 17, 385 - 391.
56. B.F. Miller, T. Aiba, F.P. Keyes, P.W. Curreri, A.W. Branwood, *J. Atheroscler. Res.*, **1966**, 6, 352 - 358.
57. K. J. Ho, *Biochim. Biophys. Acta*, **1985**, 827, 197 - 206.
58. T. V. Zenser, V. M. Lakshmi, B. B. Davis, *Drug Metab. Dispos*. **1999**, 27, 1064-1067
59. M. de Graaf, E. Boven, H. W. Scheeren, H. J. Haisma, H. M. Pinedo, *Current Pharmaceutical Design*, **2002**, 8, 1391 - 1403.
60. W. H. Fishman, A. J. Anlyan, *Science*, **1947**, 106, 66 - 67.
61. T. A. Connors, M. E. Whisson, *Nature*, **1965**, 206, 689 - 691.
62. T. A. Connors. P. B. Farmer, A. B. Foster, A. M. Gilsenan, M. Jarman, M. J. Tisdale, *Biochemical Pharmacology*, **1973**, 22, 1971 - 1980.
63. C. Young, A. Yagoda, E. S. Bittar, S. W. Smith, H. Grabstald, W. Whitmore, *Cancer*, **1976**, 38, 1887 - 1895.

64. L. F. Tietze, R. Seele, B. Leiting, T. Krash, *Carbohydr. Res*., **1988**, 180, 253 - 262.
65. 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.
66. T.-Y. Juan, S. R. Roffler, H.-S. Hou, S.-M. Huang, K.-C. Chen, Y.-. Leu, Z. M. Prijovich, C.-P. Yu, C.-C. Wu, G.-H. Sun, T.-L. Cha, *Clin. Cancer Res*., **2009**, 15, 4600 - 4611.
67. I. Tranoy-Opalinski, T. Legigan, R. Barata, J. Clarhauta, M. Thomas, B. Renoux, S. Papot, *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, 74, 302 – 313.
68. Y. H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L.F. Liu, *J. Biol. Chem*. **1985,** 260, 4873 - 4878.
69. C. H. Takimoto, R. Thomas, *Ann. N. Y. Acad. Sci*., **2000**, 922, 224 - 236.
70. Y. Leu, S. R. Roffler, J. W. Chern, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 3623 - 3628.
71. Z. M. Prijovich, B.-M. Chen, Y.-L. Leu, J.-W. Chern, S. R. Roffler, *Brit. J. Cancer*, **2002**, 86, 1634 - 1638.
72. J.-C. Florent, X. Dong, G. Claudel, S. Mitaku, C. Monneret, J.-P. Gesson, J.-C. Jacquesy, M. Mondon, B. Renoux, S. Andrianomenjanahary, S. Michel, M. Koch, F. Tillequin, M. Gerken, J. Czech, R. Straub, K. Bosslet, *J. Med. Chem.,* **1998**, 41, 3572 - 3581.
73. R. Woessner, Z. An, X. Li, R. M. Hoffman, R. Dix, A. Bitonti, *Anticancer Res.*, **2000**, 20, 2289 - 2296.
74. T. Legigan, J. Clarhaut, B. Renoux, I. Tranoy-Opalinski, A. Monvoisin, C. Jayle, J. Alsarraf, M. Thomas, S. Papot, *Eur. J. Med. Chem*., **2013**, 67, 75 – 80.
75. B. Bhattacharyya, J. Wolff, *FEBS Letters*, **1977**, 75, 159 - 162.
76. E. M. Prokopiou, P. A. Cooper, G. R. Pettit, M. C. Bibby, S. D. Shnyder, *Mol. Med. Rep*., **2010**, 3, 309 - 313.
77. T. Demuth, M. E. Berens, *J. Neuro-oncol*., **2004**, 70, 217 - 228.
78. A. S. Kiselyov, *Anti-Canc. Agents Med. Chem*., **2006**, 6, 445 - 449.
79. A. S. Kiselov, S. E. Tkachenko, K. V. Balakin, A. V. Ivachtenko, *Expert Opin. Ther. Targets*, 2007, 11, 1087 - 1101.
80. M. Lauth, R. Toftgård, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **2007**, 8, 457 - 461.
81. E. E. Bar, A. Chaudhry, A. Lin, X. Fan, K. Schreck, W. Matsui, S. Piccirillo, A. L. Vescovi, F. DiMeco, A. Olivi, C. G. Eberhart, *Stem Cells*, **2007**, 10, 2524 - 2533.
82. V. Clement, P. Sanchez, N. de Tribolet, I. Radovanovic, A. Ruiz I Altaba, *Curr. Biol*., **2007**, 17, 165 - 172.
83. A. Kolterud, R. Toftgard, *Drug Discov. Today Ther. Strateg*., **2007**, 4, 229 - 235.
84. R. F. Keeler, D. C. Baker, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*., **1989**, 192, 153 - 156.
85. F. Hamonn, B. Renoux, C. Chadéneau, J.-M. Muller, S. Papot, *Eur. J. Med. Chem*., **2010**, 45, 1678 - 1682.
86. B. Renoux, T. Legigan, S. Bensalma, C. Chadéneau, J.-M. Muller, S. Papot, *Org. Biomol. Chem.,* **2011**, 9, 8459 - 8464.
87. A. Balbous, B. Renoux, U. Cortes, S. Milin, K. Guilloteau, T. Legigan, P. Rivet, O. Boissonnade, S. Martin, C. Tripiana, M. Wager, R. J. Bensadoun, S. Papot, L. Karayan-Tapon, *Mol. Cancer Ther*., **2014**, 13, 2159 - 2169.
88. S. Bensalma, C. Chadeneau, T. Legigan, B. Renoux, A. Gaillard, M. de Boisvilliers, C. Pinet-Charvet, S. Papot, J. M. Muller, *J. Mol. Neurosci*., **2015**, 55, 51 - 61.
89. R. J. Amir, N. Pessah, M. Shamis, D.Shabat, *Angew. Chem. Int. Ed*., **2003**, 42, 4494 - 4499.
90. K. Haba, M. Popkov, M. Shamis, R. A. Lerner, C. F. Barbas III, D. Shabat, *Angew. Chem. Int. Ed*., **2005**, 44, 716 - 720.
91. R. Erez, E. Segal, K. Miller, R. Satchi-Fainaro, D.Shabat, *Bioorg. Med. Chem*., **2009**, 17, 4327 - 4335.
92. M. Shamis, H. N. Lode, D. Shabat, *J. Am. Chem. Soc*., **2004**, 126, 1726 - 1731.

93. F. M. H. de Groot, C. Albrecht, R. Koekkoek, P. H. Beusker, H. W. Scheeren, *Ang. Chem. Int. Ed*., **2003**, 42, 4490 - 4494.
94. M. Grinda, J. Clarhaut, B. Renoux, I. Tranoy-Opalinski, S. Papot, *MedChemComm*, **2012**, 3, 68 - 70.
95. M. Grinda, J. Clarhaut, I. Tranoy-Opalinski, B. Renoux, A. Monvoisin, L. Cronier, S. Papot, *ChemMedChem*, **2011**, 6, 2137 - 2141.
96. K. Yamasaki, V. Tuan Giam Chuang, T. Maruyama, M. Otagiri, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2013**, 1830, 5435 - 5443.
97. G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, *Molecular Aspects of Medicine*, **2012**, 33, 209 - 290.
98. M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M Galliano, G Fanali, P Narciso, S. Notari, P. Ascenzi, *IUBMB Life*, **2005**, 57, 787 - 796.
99. K. Thibaudeau, R. Léger, X. Huang, M. Robitaille, O. Quraishi, C. Soucy, N. Bousquet-Gagnon, P. van Wyk, V. Paradis, J.-P. Castaigne, D. Bridon, *Bioconjugate Chem*. **2005**, 16, 1000 - 1008.
100. Y. Shechter, M. Mironchik, S. Rubinraut, A. Saul, H. Tsubery, M. Fridkin, *Bioconjugate Chem*. **2005**, 16, 913 - 920.
101. J. Morales, *Drugs*, **2007**, 67, 2557 - 2584.
102. T. Peters, All About Albumin, *Academic Press*, **1995**.
103. M.T. Larsen, M. Kuhlmann, M. L. Hvam and K. A. Howard, *Molecular and Cellular Therapies*, **2016**, 4, 3.
104. F. J. Dixon, P. H. Maurer, M. P. Deichmiller, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **1953**, 83, 287 -288.
105. A. M. Merlot, D. S. Kalinowski and D. R. Richardson, *Front. Physiol*. **2014**, 5, 299.
106. J. E. Schnitzer and J. Bravo, *The Journal of Biological Chemistry*, **1993**, 268, 7562-7570.
107. J. E. Schnitzer and P. Oh, *The Journal of Biological Chemistry*, **1994**, 269, 6072-6082.
108. K. Motamed, *Int. J. Biochem. Cell. Biol*., **1999,** 31, 1363 - 1366.
109. R. A. Brekken, E. H. Sage, *Matrix Biology*, **2000**, 19, 816 - 827.
110. S. E. Goldblum, X. Ding, S. E. Funk, E. H. Sage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 3448 - 3452.
111. K. M. K. Sand, M. Bern, J. Nilsen, H. T. Noordzij, I. Sandlie, J. T. Andersen, *Front. Immunol*., **2015**, 5, 682.
112. W. H. Lewis, *Am. J. Cancer*, **1937**, 29, 666 - 679.
113. W. Schubert, P. G. Frank, B. Razani, D. S. Park, C.- W. Chow, M. P. Lisanti, *J. Biol. Chem*., **2001**, 276, 48619 - 48622.
114. W. Palm, *Phil. Trans. R. Soc. B*., **2019**, 374, 20180285.
115. K. D. Ha, S. M. Bidlingmaier, B. Liu, *Front. Physiol*., **2016**, 7, 381.
116. C. Chaudhury, S. Mehnaz, J. M. Robinson, W. L. Hayton, D. K. Pearl, D. C. Roopenian, C. L Anderson, *J. Exp. Med.,* **2003,** 197, 315 - 322.
117. J. T. Sockoloskya, F. C. Szoka, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2015**, 91, 109 - 124.
118. C. Chaudhury, C. L. Brooks, D. C. Carter, J. M. Robinson, C. L. Anderson, *Bhemistry,* **2006**, 45, 4983 - 4990.
119. M. Pyzik, T. Rath, W. I. Lencer, K. Baker, R. S. Blumberg, *J. Immunol*., **2015**, 194, 4595 - 4603.
120. M. Pyzik, K. M. K. Sand, J. J. Hubbard, J. T. Andersen, I. Sandlie, R. S. Blumberg, *Front. Immunol*., **2019**, 10, 1540.
121. E. G. W. Schmidt, M. L. Hvam, F. Antunes, J. Cameron, D. Viuff, B. Andersen, N. N. Kristensen, K. A. Howard, *J. Biol. Chem*., **2017,** 292, 13312 - 13322.
122. J. T. Andersen, B. Dalhus, J. Cameron, M. B. Daba, A. Plumridge, L. Evans, S. O. Brennan, K. S. Gunnarsen, M. Bjørås, D. Sleep, I. Sandlie, *Nat. Commun*., **2012**, 3, 610.

123. K. M. K. Sand, M. Bern, J. Nilsen, H. T. Noordzij, I. Sandlie, J. T. Andersen, *Front. Immunol*., **2015**, 5, 682.
124. C. Heneweer, J. P. Holland, V. Divilov, S. Carlin, J. S. Lewis, *J. Nucl. Med*. **2011**, 52, 625 - 633.
125. H. Sinn, H. H. Schrenk, E. A. Friedrich, U. Schilling, W. Maier-Borst, *Nuc. Med. Biol*., **1990**, 17, 819 - 827.
126. U. Schilling, E. A. Friedrich, H. Sinn, H. H. Schrenk, J. H. Clorius, W. Maier-Borst, *Nuc. Med. Biol*., **1992**, 19, 685 - 659.
127. A. Wunder. G. Stehle, H. Sinn, H. H. Schrenk, D. Hoff-Biederbeck, F. Bader, E. A. Friedrich, P. Peschke, W. Maier-Borst, D. L. Heene, *Int. J. Oncol.,* **1997**, 11, 497 - 507.
128. X. Liu, J. Jiang, H. Meng, *Theranostics*, **2019**, 9, 8018 - 8025.
129. D. Gupta, C. G. Lis, *Nutrition Journal*, **2010**, 9, 69.
130. G. Stehle, H. Sinn, A. Wunder, H. H. Schrenk, J. C. M. Stewart, G. Hartung, W. Maier-Borst, D. L. Heene, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **1997**, 26, 77 - 100.
131. New aspects of amino acid metabolism in cancer - L. Vettore, R. L. Westbrook, D. A. Tennant, *Br. J. Cancer*, **2020**, 122, 150 - 156.
132. N. N. Pavlova, C. B. Thompson, *Cell Metabolism*, **2016**, 23, 27 - 47.
133. J. J. Kamphorst, M. Nofal, C. Commisso, S. R. Hackett, W. Lu,E. Grabocka, M. G. Vander Heiden, G. Miller, J. A. Drebin, D. Bar-Sagi, C. B. Thompson, J. D. Rabinowitz, *Cancer Res*., **2015**, 75, 544 - 553.
134. S. M. Davidson, O. Jonas, M. A. Keibler, H. W. Hou, A. Luengo, J. R. Mayers, J. Wyckoff, A. M. Del Rosario, M. Whitman, C. R. Chin, K. J. Condon, A. Lammers, K. A. Kellersberger, B. K. Stall, G. Stephanopoulos, D. Bar-Sagi, J. Han, J. D Rabinowitz, M. J. Cima, R. Langer, M. G. V. Heiden, *Nat. Med.*, **2017**, 23, 235 - 241.
135. M. C. Mendoza, E. E. Er, J. Blenis, *Trends in Biochemical Sciences*, **2011**, 36, 320 - 328.
136. S. Patra, V. Young, L. Llewellyn, J. N. Senapati, J. Mathew, *A. Pac. J. Canc. Prev*., **2017,** 18, 2209 - 2213.
137. R.-K. Kim, Y. Suh, K.-C. Yoo, Y.-H. Cui, H. Kim, M.-J. Kim, I. G. Kim, S.-J. Lee, *Exp Mol Med., **2015**,* 47, 137.
138. L. B. Eckert, G. A. Repasky, A. S. Ülkü , A. McFall, H. Zhou, C. I. Sartor, C. J. Der, *Cancer Res*., **2004**, 64, 4585 - 4592.
139. I. A. Prior, P. D. Lewis, C. Mattos, *Cancer Res*., **2012**, 72, 2457 - 2467.
140. C. Commisso, S. M. Davidson, R. G. Soydaner-Azeloglu, S. J. Parker, J. J. Kamphorst, S. Hackett, E. Grabocka, M. Nofal, J. A. Drebin, C. B. Thompson, J. D. Rabinowitz, C. M. Metallo, M. G. Vander Heiden, D. Bar-Sagi., *Nature*, **2013**, 497, 633 - 637.
141. E. Dalloneau, N. Baroukh, K. Mavridis, A. Maillet, F. Gueugnon, Y. Courty, A. Petit, T. Kryza, M. Del Rio, S. Guyetant, D. C. Cadena Castaneda, C. Dhommée, C. Arnoult, Andreas Scorilas, V. Gouilleux-Gruart, N. Heuzé-Vourc'h, *Oncotarget*. **2016**, 7, 54415 - 54429.
142. R. Swiercz, M. Mo, P. Khare, Z. Schneider, R. J. Ober, E. S. Ward, *Oncotarget*, **2017**, 8, 3528 - 3541.
143. B. Elsadek, F. Kratz, *Journal of Controlled Release*, **2012**, 157, 4 - 28.
144. A. Sparreboom, C.D. Scripture, V. Trieu, P. J. Williams, T. De, A. Yang, B. Beals, W. D. Figg, M. Hawkins, N. Desai, *Clin. Cancer Res*., **2005**, 11, 4136 - 4143.
145. E. Miele, G. P. Spinelli, E. Miele, F. Tomao, S. Tomao, *Int. J. Nanomedicine*, **2009**, 4, 99 - 105.
146. M. N. Kundranda, J. Niu, *Drug Des. Devel. Ther*., **2015**, 9, 3767 - 3777.
147. M. Chatterjee, E. Ben-Josef, R. Robb, M. Vedaie, S. Seum, K. Thirumoorthy, K. Palanichamy, M. Harbrecht, A. Chakravarti, T. M.Williams, *Cancer Res.,* **2017**, 77, 5925 - 5937.
148. S. A. Raja, S. T. A. Shah, A. Tariq, N. Bibi, K. Sughra, A. Yousuf, A. Khawaja, M. Nawaz, A. Mehmood, M. J. Khan, A. Hussain, *Oncol Lett*., **2019**, 18, 219 - 226.

149. S. A. Tahir, S. Kurosaka, R. Tanimoto, A. A. Goltsov, S. Park, Ti. C. Thompson, *Cancer Biol. Ther*., **2013**, 14, 117 - 26.
150. N. S. Demirci, M. Dogan, G. U. Erdem, S. Kacar, T. Turhan, S. Kilickap, L. C. Cigirgan, E. Kayacetin, Y. Bozkaya, N. Zengin, *Saudi J. Gastroenterol*., **2017**, 23, 183 - 189.
151. M. Chatterjee, E. Ben-Josef, D. G. Thomas, M. A. Morgan, M. M. Zalupski, G. Khan, C. A. Robinson, K. A. Griffith, C. -S. Chen, T. Ludwig, T. Bekaii-Saab, A. Chakravarti, T. M. Williamsa, *Sci. Rep*., **2015**, 5, 10867.
152. Y. Zhao, F. Lv, S. Chen, Z. Wang, J. Zhang, S. Zhang, J. Cao,L. Wang, E. Cao, B. Wang, X. Hu, *BMC Cancer*, **2018**, 18, 1019.
153. C. S. Wang, K. H. Lin, S. L. Chen, Y. F. Chan, S. Hsueh, *Br. J. Cancer*. **2004**, 91, 1924 - 1930.
154. J. Vaz, D. Ansari, A. Sasor, R. Andersson, *Pancreas,* **2015**, 44, 1024 - 1035.
155. J. L. Lindner, S. Loibl, C. Denkert, B. Ataseven, P. A. Fasching, B. M. Pfitzner, B. Gerber, S. Gade, S. Darb-Esfahani, B. V. Sinn, J. Huober, K. Engels, H. Tesch, T. Karn, F. Pommerenke, C. Liedtke, M. Untch, V. Müller, B. Rack, C. Schem, G. von Minckwitz, *Annals of Oncology*, **2015**, 26, 95 - 100.
156. N. Desai, V. Trieu, B. Damascelli, P. Soon-Shiong, *Transl. Oncol.*, **2009**, 2, 59 - 64.
157. H. Shao, H. Tang, O. E. Salavaggione, C. Yu, B. Hylander, W. Tan, E. Repasky, A. A. Adjei, G. K. Dy, *Journal of Thoracic Oncology*, **2011**, 6, 998 - 1005.
158. A. Neesse, K. K. Frese, D. S. Chan, T. E. Bapiro, W. J. Howat, F. M. Richards, V. Ellenrieder, D. I. Jodrell, D. A. Tuveson, *Gut*, **2014**, 63, 974 - 983.
159. G. Stehle, H. Sinn, A. Wunder, H. H. Schrenk, S. Schütt, W. Maier-Borst, D. L. Heene, *Anticancer Drugs*, **1997**, 8, 677 - 685.
160. K. Wosikowski, E. Biedermann, B. Rattel, N. Breiter, P. Jank, R. Löser, G. Jansen, G. J. Peters, *Clin. Cancer Res*., **2003**, 9, 1917 - 1926.
161. G. Stehle, A. Wunder, H. Sinn, H. H. Schrenk, S. Schütt, E. Frei, G. Hartung, W. Maier-Borst, D. L. Heene, *Anticancer Drugs*, **1997**, 8, 835 - 844.
162. A. Wunder, G. Stehle, H. H. Schrenk, G. Hartung, D. L. Heene, W. Maier-Borst, H. Sinn, *Int. J. Cancer*, **1998**, 76, 884 - 890.
163. A. M. Burger, G. Hartung, G. Stehle, H. Sinn, H. H.Fiebig, *Int. J. Cancer*, **2001**, 92, 718 - 724.
164. G. Hartung, G. Stehle, H. Sinn, A. Wunder, H. H. Schrenk, S. Heeger, M. Kränzle, L. Edler, E. Frei, H. H. Fiebig, D. L. Heene, W. Maier-Borst, W. Queisser, *Clin. Cancer Res*., **1999**, 5, 753 - 759.
165. A. N. Vis, A. van der Gaast, B. W. van Rhijn, T. K. Catsburg, C. Schmidt, G. H. Mickisch, *Cancer Chemother. Pharmacol*., **2002**, 49, 342 - 345.
166. H. Liu, M. Sun, Z. Liu, C. Kong, W. Kong, J. Ye, J. Gong, D. C. S. Huang, F. Qian, *Journal of Controlled Release*, **2019,** 296, 40 - 53.
167. F. Kratz, R. Müller-Driver, I. Hofmann, J. Drevs, C. Unger, *J. Med. Chem*., **2000**, 43, 1253 - 1256.
168. F. Kratz, A. Warnecke, K. Scheuermann, C. Stockmar, J. Schwab, P. Lazar, P. Drückes, N. Esser, J. Drevs, D. Rognan, C. Bissantz, C. Hinderling, G. Folkers, I. Fichtner, C. Unger, *J. Med. Chem*., **2002**, 45, 5523 - 5533.
169. L. D. Cranmer, *Onco Targets Ther*., **2019**, 12, 2047 - 2062.
170. S. Daum, J. P. Magnusson, L. Pes, J. Garcia Fernandez, S. Chercheja, F. Medda, F. I. Nollmann, S. D. Koester, P. Perez Galan, A. Warnecke, K. Abu Ajaj, F. Kratz, *Nucl. Med. Mol. Imaging,* **2019**, 53, 189 - 198.
171. B. Schmid, D. -E. Chung, A. Warnecke, I. Fichtner, F. Kratz, *Bioconjugate Chem*., **2007**, 18, 702 - 716.
172. K. Abu Ajaj, R. Graeser, I. Fichtner, F. Kratz, *Cancer Chemother. Pharmacol*., **2009**, 64, 413 - 418.
173. A. M. Mansour, J. Drevs, N. Esser, F. M. Hamada, O. A. Badary, C. Unger, I. Fichtner, F. Kratz, *Cancer Research,* **2003**, 63, 4062 - 4066.

174. A. Warnecke, I. Fichtner, G. Saß, F. Kratz, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*., **2007**, 340, 389 - 395.
175. B. Elsadek, R. Graeser, A. Warnecke, C. Unger, T. Saleem, N. El-Melegy, H. Madkor, F. Kratz, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 234 - 238.
176. B. Elsadek, R. Graeser, N. Esser, C. Schäfer-Obodozie, K. Abu Ajaj, C. Unger, A. Warnecke, T. Saleem, N. El-Melegy, H. Madkor, F. Kratz, *Eur. J. Cancer*, **2010**, 46, 3434 - 3444.
177. R. Graeser, D.-E. Chung, N. Esser, S. Moor, C. Schächtele, C. Unger, F. Kratz, *Int. J. Cancer*, **2008**, 122, 1145 - 1154.
178. D. -E. Chung, F. Kratz, *Bioorg. Med. Chem. Lett*., **2006**, 16, 5157 - 5163.
179. H. Zhang, K. Wang, K. Na, D. Li, Z. Li, D. Zhao, L. Zhong, M. Wang, L. Kou, C. Luo, H. Zhang, Q. Kan, H. Ding, Z. He, J. Sun, *J. Med. Chem*., **2018**, 61, 11, 4904 - 4917.
180. J. Yang, Q. Lv, W. Wei, Z. Yanga, J. Dong, R. Zhang, Q. Kan, Z. He, Y. Xu, *Drug Deliv*., **2018**, 25, 807 - 814.
181. H. Zhang, Z. Sun, K. Wang, N. Li, H. Chen, X. Tan, L. Li, Z. He, J. Sun, *Bioconjugate Chem*., **2018**, 29, 1852 - 1858.
182. 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.
183. G. Compain, N. Oumata, J. Clarhaut, E. Péraudeau, B. Renoux, H. Galons, S. Papot, *Eur. J. Med. Chem*., **2018**, 158, 1 - 6.
184. B. Renoux, F. Raes, T. Legigan, E. Péraudeau, B. Eddhif, P. Poinot, I. Tranoy-Opalinski, J. Alsarraf, O. Koniev, S. Kolodych, S. Lerondel, A. Le Pape, J. Clarhaut, S. Papot, *Chem. Sci.,* **2017**, 8, 3427 - 3433.
185. N. J. Wheate, S. Walker, G. E. Craig, R. Oun, *Dalton Trans*., **2010**, 39, 8113 - 8127.
186. A. Warnecke, I. Fichtner, D. Garmann, U. Jaehde, F. Kratz, *Bioconjugate Chem*., **2004**, 15, 1349 - 1359.
187. D. Garmann, A. Warnecke, G. V. Kalayda, F. Kratz, U. Jaehde, *J. Control. Release*, **2008**, 131, 100 - 106.
188. H. Choy, C. Park, M. Yao, *Clin. Cancer Res*., **2008**, 14, 1633 - 1638.
189. V. Pichler, J. Mayr, P. Heffeter, O. Domotor, E. A. Enyedy, G. Hermann, D. Groza, G. Kollensperger, M. Galanksi, W. Berger, B. K. Keppler and C. R. Kowol, *Chem. Commun*., **2013**, 49, 2249 - 2251.
190. J. Mayr, P. Heffeter, D. Groza, L. Galvez, G. Koellensperger, A. Roller, B. Alte, M. Haider, W. Berger, C. R. Kowol, B. K. Keppler, *Chem. Sci*., **2017**, 8, 2241 - 2250.
191. Y. -R. Zheng, K. Suntharalingam, T. C. Johnstone, H. Yoo, W. Lin, J. G. Brooks, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc*., **2014**, 136, 8790 - 8798.
192. J. Ma, Q. Wang, Z. Huang, X. Yang, Q. Nie, W. Hao, P. G. Wang, X. Wang, *J. Med. Chem*., **2017**, 60, 5736 - 5748.
193. M. T. J. Olesen, R. Walther, P. P. Poier, F. Dagnæs-Hansen, A. N. Zelikin, *Angew. Chem. Int. Ed*. **2020**, 59, 7390 - 7396.
194. X. Liu, R. P. Mohanty, E. Y. Maier, X. Peng, S. Wulfe, A. P. Looney, K. L. Aung, D. Ghosh, *Journal of Controlled Release*, **2020**, 328, 1 - 12.
195. K. K. Schelde, K. Nicholls, F. Dagnæs-Hansen, K. Bunting, H. Rawsthorne, B. Andersen, C. J. A. Finnis, M. Williamson, J. Cameron, K. A. Howard, *J. Biol. Chem*., **2019**, 294, 3735 - 3743.
196. K. Abu Ajaj, M. L. Biniossek, F. Kratz, *Bioconjugate Chem*., **2009**, 20, 390 - 396.
197. K. Abu Ajaj, F. Kratz, *Bioorg. Med. Chem. Lett*., **2009**, 19, 995 - 1000.
198. B. Renoux, L. Fangous, C. Hötten, E. Péraudeau, B. Eddhif, P. Poinot, J. Clarhautau, S. Papot, *Med.Chem.Commun.*, **2018**, 9, 2068-2071.
199. R. Châtre, J. Lange, E. Péraudeau, P. Poinot, S. Lerondel, A. Le Pape, J. Clarhaut, B. Renoux, S. Papot, *J. Controll. Release*, **2020**, 327, 19 - 25.

200. K. Shioe, S. Ishikura, Y. Horino, H. Abe, *Chem. Pha. Bull.* **2013**, 61, 1308 - 1314.
201. T. Fricke, R. J. Mart, C. L. Watkins, M. Wiltshire, R. J. Errington, P. J. Smith, A. T. Jones, R. K. Allemann, *Bioconjugate Chem*., **2011**, 22, 1763 - 1767.
202. G. N. Bollenback, J. W. Long, D. G. Benjamin, J. A. Lindquist, *J. Am. Chem. Soc.,* **1995**, 77, 3310-3315.
203. M. Thomas, J. Clarhaut, P.-O. Strale, I. Tranoy-Opalinski, J. Roche, S. Papot, *ChemMedChem*, **2011**, 6, 1006-1010.
204. F. Stazi, G. Palmisano, M. Turconi, S. Clini, M. Santagostino, *J. Org. Chem*., **2004**, 69, 1097 - 1103.
205. X. Chen, G. N. Khairallah, R. A. J. O'Hair, S. J. Williams, *Tetrahedron Letters*, **2011**, 52, 2750 - 2753.
206. H. Y. Song, M. H. Ngai, Z. Y. Song, P. A. MacAry, J. Hobley, M. J. Lear, *Org. Biomol. Chem*., **2009**, 7, 3400 - 3406.
207. L. F. Tietze, T. Herzig, T. Feuerstein, I. Schuberth, *Eur. J. Org. Chem*. **2002**, 10, 1634 - 1645.
208. D. Viuff, F. Antunes, L. Evans, J. Cameron, H. Dyrnesli, B. T. Ravn, M. Stougaard, K. Thiam, B. Andersen, S. Kjærulff, K. A. Howard, *Journal of Controlled Release*, **2016**, 223, 22 - 30.
209. Y. Leblanc, M. Berger, A. Seifert, N. Bihoreau, G. Chevreux, *Protein Science*. **2019**, 28, 1982 - 1992.
210. S. S. Petersen, E. Kläning, M. F. Ebbesen, B. Andersen, J. Cameron, E. S. Sørensen, K. A. Howard, *Mol. Pharmaceutics*, **2016**, 13, 677 - 682.
211. M. B Caspersen, M. Kuhlmann, K. Nicholls, M. J. Saxton, B. Andersen, K. Bunting, J. Cameron, K. A. Howard, *Ther. Deliv*., **2017**, 8, 511 - 519.
212. J. F. Ponte, X. Sun, N. C. Yoder, N. Fishkin, R. Laleau, J. Coccia, L. Lanieri, M. Bogalhas, L. Wang, S. Wilhelm, W. Widdison, J. Pinkas, T. A. Keating, R. Chari, H. K. Erickson, J. M. Lambert, *Bioconjugate Chem*., **2016**, 27, 1588 - 1598.
213. L. N. Tumey, M. Charati, T. He, E. Sousa, D. Ma, X. Han, T. Clark, J. Casavant, F. Loganzo, F. Barletta, J. Lucas, E. I. Graziani, *Bioconjugate Chem*., **2014**, 25, 1871 - 1880.
214. J. M. J. M. Ravasco, H. Faustino, A. Trindade, P. M. P. Gois, *Chem. Eur.* J., **2019**, 25, 43 - 59.
215. S. D. Fontaine, R. Reid, L. Robinson, G. W. Ashley, D. V. Santi, *Bioconjugate Chem*. **2015**, 26, 145−152.
216. E. Tobaldi, I. Dovgan, M. Mosser, J.-M. Becht, A. Wagner, *Org. Biomol. Chem*., **2017**, 15, 9305 - 9310.
217. R. Christie, R. Fleming, B. Bezabeh, R. Woods, S. Mao, J. Harper, A. Joseph, Q. Wang, Z.-Q. Xu, H. Wu, C. Gao, N. Dimasi, *J. Controll. Release*, **2015**, 220, 660 - 670.
218. R. P. Lyon, J. R. Setter, T. D. Bovee, S. O. Doronina, J. H. Hunter, M. E. Anderson, C. L. Balasubramanian, S. M. Duniho, C. I. Leiske, F. Li, P. D. Senter, *Nat. Biotechnol*., **2014**, 32, 1059 - 1062.
219. W. Viricel, G. Fournet, S. Beaumel, E. Perrial, S. Papot, C. Dumontet, B. Joseph, *Chem. Sci*., **2019**, 10, 4048 - 4053.
220. WO 2020/225323 A1.
221. A. Peixoto, M. Relvas-Santos, R. Azevedo, L. L. Santos, J. A. Ferreira, *Front. Oncol*., **2019**, 9, 380.
222. H. Nie, H. Ju, J. Fan, X. Shi, Y. Cheng, X. Cang, Z. Zheng, X. Duan, W. Yi, *Nat. Commun*. **2020**, 11, 36.
223. R. Muniz de Queiroz, R. Madan, J. Chien, W. B. Dias, C. Slawson, *JBC*, **2016**, 291, 18897 - 18914.
224. Z. Ma, K. Vosseller, *JBC*, **2014**, 289, 34457 - 34465.
225. J. A. Hanover, W. Chen, M. R. Bond, *J. Bioenerg. Biomembr*., **2018**, 50, 155 - 173.
226. H. Harada, M. Takahashi, *JBC*, **2007**, 282, 5597 - 5607.
227. R. Stern, Hyaluronidases in Cancer Biology, *Academic Press*, **2008**, Chapitre 12, 207 - 220.
228. P. Bertrand, N. Girard, C. Duval, J. D'Anjou, C. Chauzy, J.-F. Ménard, B. Delpech, *Int. J. Cancer,* **1997**, 73, 327 - 331.

229. C. O. McAtee, A. R. Berkebile, C. G. Elowsky, T. Fangman, J. J. Barycki, J. K. Wahl III, O. Khalimonchuk, N. Naslavsky, S. Caplan, M. A. Simpson, *JBC*, **2015**, 290, 13144 - 13156.
230. H. Bouga, I. Tsouros, D. Bounias, D. Kyriakopoulou, M. S. Stavropoulos, N. Papageorgakopoulou, D. A. Theocharis, D. H. Vynios, *BMC Cancer*, **2010**, 10, 499.
231. Caitlin O. McAtee, Joseph J. Barycki, Melanie A. Simpson, *Adv. Cancer Res*., **2014**, 123, 1 - 34.
232. C. J. Whatcott, H. Han, R. G. Posner, G. Hostetter, D. Von Hoff, *Cancer Discov*., **2011**, 1, 291 - 296.
233. C. Peng, M. Wallwiener, A. Rudolph, K. Cuk, U. Eilber, M. Celik, C. Modugno, A. Trumpp, J. Heil, F. Marmé, D. Madhavan, J. Nees, S. Riethdorf, S. Schott, C. Sohn, K. Pantel, A. Schneeweiss, J. Chang-Claude, R. Yang, B. Burwinkel, *Int. J. Cancer*, **2016**, 138, 2499 - 2509.
234. S. Balasubramanian, B.Nagarajan, S.Govindasamy, *Cancer Letters*, **1996**, 101, 9 - 14.
235. B. Woynarowska, H. Wikiel, R. J. Bernacki, *Cancer, Res*., **1989**, 49, 5598 - 5604.
236. C. Slawson, J. Pidala, R. Potter, *Biochim. Biophys. Acta*, **2001**, 1537, 147 - 157.
237. K. T. Ramessur, P. Greenwell, R. Nash, M. V. Dwek, *British Journal of Biomedical Science*, **2010**, 67, 189 - 196.
238. L. C. Meagher, J. S. Savill, A. Baker, R. W. Fuller, C. Haslett, *J. Leukoc. Biol*., **1992**, 52, 269 - 273.
239. R. Bourbouze, F. Raffi, G. Dameron, H. Hali-Miraftab, F. Loko, J. L. Vilde, *Clin. Chim. Acta*, **1991**, 199, 185 - 94.
240. J. Borooah, D. H. Leaback A P. G. Walker, *Biochem. J*., **1961**, 78, 106 - 110.
241. L. Dong, S. Shen, H. Lu, S. Jin, J. Zhang, *ACS Sensors*, **2019**, 4, 1222 - 1229.
242. K. Miura, Y. Aoyama, Y. Natsu, R. Koyama, T. Hirano, T. Nishio, W. Hakamata, *Chem. Pharm. Bull*. **2020**, 68, 526 - 533.
243. F. Yan, X. Tian, Z. Luan, L. Feng, X. Ma, T. D. James, *Chem. Commun*., **2019**, 55, 1955 - 1958.
244. C. A. Valdez, J. E. Saavedra, B. M. Showalter, K. M. Davies, T. C. Wilde, M. L. Citro, J. J. Barchi, J. R. Deschamps, D. Parrish, S. El-Gayar, U. Schleicher, C. Bogdan, L. K. Keefer, *J. Med. Chem*. **2008**, 51, 3961 - 3970.
245. R. S. Nandurdikar, A. E. Maciag, S. Y. Hong, H. Chakrapani, M. L. Citro, L. K. Keefer, J. E. Saavedra, *Org. Lett*., **2010**, 12, 56 - 59.
246. WO 2008/153394.
247. N. Floyd, B. Vijayakrishnan, J. R. Koeppe, B. G. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed*., **2009**, 48, 7798 - 7802.
248. R. Roy, F. D. Tropper, *Can. J. Chem*., **1991**, 69, 817 - 821.
249. WO 2008/153394 A2.
250. E.M. Martin Del Valle, *Process Biochemistry*, **2004**, 39, 1033 - 1046.
251. R. Singh, N. Bharti, J. Madan, S. N. Hiremath, *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, **2010**, 2, 171-183.
252. S. B. Carneiro, F. Í. Costa Duarte, L. Heimfarth, J. S. Siqueira Quintans, L. J. Quintans-Júnior, V. F. Veiga Jr, Á. A. Neves de Lima, *Int. J. Mol. Sci*., **2019**, 20, 642.
253. F. N. S. Al-Heibshy, E. Başaran, N. Öztürk, M. Demirel, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **2020**, 46, 1495 - 1506.
254. K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie*, Chem. Rev*., **1998**, 98, 2045 - 2076.
255. C. Di Donato, M. Lavorgna, R. Fattorusso, C. Isernia, M. Isidori, G. Malgieri, C. Piscitelli, C. Russo, L. Russo, R. Iacovino, *Molecules*, **2016**, 21, 1644.
256. B. Gidwani, A. Vyas, *Biomed. Res. Int*., **2015**, 2015, 198268.
257. J. Zhang, P. X. Ma, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2013**, 65, 1215 - 1233.
258. D. Zhang, P. Lv, C. Zhou, Y. Zhao, X. Liao, B. Yang, *Materials Science and Engineering: C*, **2019**, 96, 872 - 886.
259. J. Wankar, N. G. Kotla, S. Gera, S. Rasala, A. Pandit, Y. A. Rochev, *Adv. Funct. Mater*. **2020**, 1909049.

260. O. Bekers, J. H. Beijnen, M. Otagiri, A. Bult, W. J. M. Underberg, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1990**, 8, 671 - 674.
261. N. Husain, T. T. Ndou, A. Munoz De La Pena, I. M. Warner, *Applied Spectroscopy*, **1992**, 46, 652 - 658.
262. O. Swiech, A. Mieczkowska, K. Chmurski, R. Bilewicz, *J. Phys. Chem. B*, **2012**, 116, 1765 - 1771.
263. N. Mohammad, S. Vikram Singh, P. Malvi, B. Chaube, D. Athavale, M. Vanuopadath, S. S. Nair, B. Nair, M. K. Bhat, *Sci. Rep*., **2015**, 5, 11853.
264. O. Swiech, P. Dutkiewicz, K. E. Wójciuk, K. Z. Chmurski, M. Kruszewski, R. Bilewicz, *J. Phys. Chem. B*, **2013**, 117, 13444 - 13450.
265. M.-X. Zhao, B.-J. Zhu, W.-J. Yao, D.-F. Chen, C. Wang, *Chem. Biol. Drug. Des*., **2018**, 91, 285 - 293.
266. E. C. da S. Santosa, A. Watanabea, M. D. Vargasa , M. N. Tanaka, F. Garciab , C. M. Ronconi, *New J. Chem*., **2018**, 42, 671 - 680.
267. A. Kowalczyk, A. Kasprzak, M. Poplawska, M. Ruzycka, I. P. Grudzinski, A. M. Nowicka, *Int. J. Mol. Sci*., **2020**, 21, 5832.
268. R. Anand, F. Manoli, I. Manet, S. Daoud-Mahammed, V. Agostoni, R. Gref, S. Monti, *Photochem. Photobiol. Sci*., **2012**, 11, 1285 - 1292.
269. L. Y. Qiu, R. J. Wang, C. Zheng, Y. Jin, L. Q. Jin, *Nanomedicine*, **2010**, 5, 193 - 208.
270. T. Yousef, N. Hassan, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem*., **2017**, 87, 105 - 115.
271. A. Okamatsu, K. Motoyama, R. Onodera, T. Higashi, T. Koshigoe, Y. Shimada, K. Hattori, T. Takeuchi, H. Arima, *Bioconjugate Chem*., **2013**, 24, 724 - 733.
272. S. Salmaso, A. Semenzato, P. Caliceti, *Bioconjugate Chem*., **2004**, 15, 997 - 1004.
273. C. Bertolla, S. Rolin, B. Evrard, L. Pochet, B. Masereel, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, 18, 1855 - 1858.