

De nouvelles perspectives en **thérapie** antivasculaire

Pourquoi faire compliquer quand on peut faire simple ?

Mouad Alami est directeur de recherche au Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) à la faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry¹ et responsable de l'équipe Conception et Synthèse de Molécules d'Intérêt Thérapeutique (CoSMIT).

Ce chapitre a pour objectif de présenter l'apport de la chimie de synthèse dans les récents résultats de l'équipe CoSMIT (**Figure 1**) obtenus dans le domaine de l'oncologie, avec la conception de nouveaux agents en thérapie antivasculaire.

Il n'est pas inutile de brosser, en quelques lignes, l'évolution de l'innovation thérapeutique en rappelant quelques dates historiques traçant les innovations dans le domaine de l'oncologie (**Figure 2**).

Deux périodes peuvent être distinguées, avant et après 2001. La période avant 2001, faisant appel à de la chimiothérapie dite *conventionnelle*,

est caractérisée par l'utilisation d'agents alkylants, dont le premier fut le gaz moutarde dès les années 1940. À partir des années 1960, le bénéfice des polychimiothérapies fondées sur des associations d'agents alkylants tels que le protocole MOPP a été mis en avant. Quant aux années 1990, elles ont été marquées par l'arrivée des dérivés de taxanes (Taxol® et Taxotère®), composés issus de produits naturels et agissant comme des antimétabolites² par inhibition de la dépolymérisation des microtubules. Avec l'avènement de l'immunothérapie,

2. Antimétabolite : inhibiteur de la mitose (division cellulaire) empêchant la prolifération cellulaire.

1. www.biocis.u-psud.fr



Figure 1

L'équipe Conception et Synthèse de Molécules d'Intérêt Thérapeutique (CoSMIT) est une des quatre équipes des laboratoires BioCIS (Biomolécules : Conception, Isolement, Synthèse), une Unité Mixte de Recherche CNRS/Université Paris-Sud.

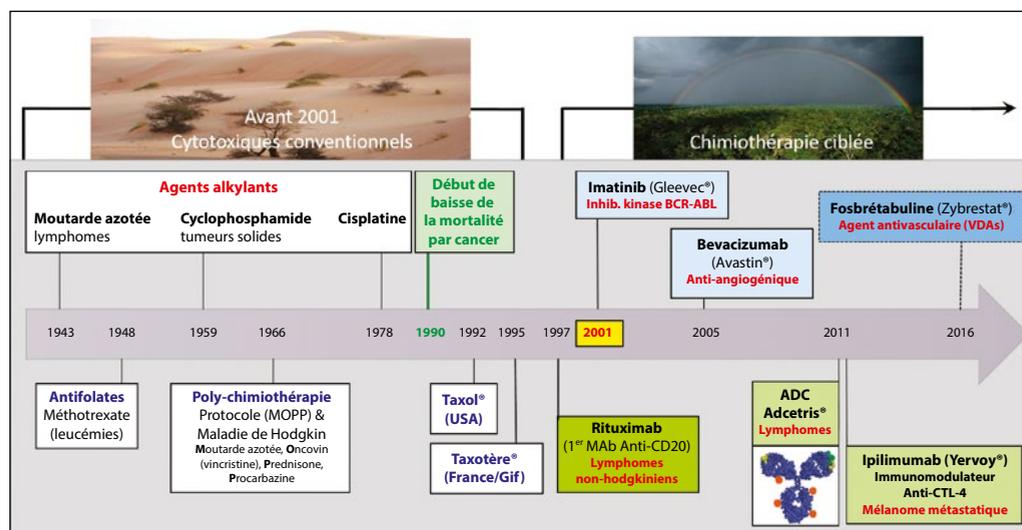


Figure 2

Une petite histoire des anticancéreux.

le rituximab fut le premier anticorps monoclonal³ approuvé par la « *Food and Drug Administration* » (FDA) en 1997 pour le traitement des lymphomes non-Hodgkiniens.⁴ À partir de 2001,

3. Anticorps monoclonal : anticorps issu d'une même souche de lymphocyte.

4. Lymphome non-Hodgkinien : cancer du système lymphatique le plus commun, caractérisé par la présence de grosses cellules atypiques et par la formation d'un néoplasme (tissu anormal nouvellement formé).

avec les connaissances acquises sur les mécanismes de développement tumoral, commence alors l'ère de la chimiothérapie dite *ciblée* ; le premier médicament mis sur le marché est un inhibiteur de kinases⁵, l'imatinib (Glivec®). Quelques années après en 2005, nous assistons à la mise sur le marché du premier anticorps monoclonal anti-angiogénique, l'Avastin®. L'année

5. Kinase : enzyme de premier plan catalysant une réaction de phosphorylation.

2011 est une date marquante car la FDA a agréé l'Adce-tris®, le premier médicament *immuno-conjugué* ou ADC (« *Antibody-Drug Conjugates* ») combinant un anticorps monoclonal lié de façon covalente à un agent cytotoxique indiqué pour le traitement de lymphomes. C'est en 2016 que la fosbrétabuline, chef de file des agents antivasculaires, a reçu le statut de médicament orphelin aux États-Unis et en Europe pour le traitement de tumeurs neuro-endocrines et du glioblastome multiforme.

L'année 2011 est également une autre date marquante révolutionnant l'histoire de l'innovation thérapeutique en oncologie avec l'arrivée d'*anticorps monoclonaux immunomodulateurs*, qui vont renforcer et stimuler le système immunitaire des patients pour aller combattre les cellules tumorales, contrairement aux traitements classiques (chimiothérapies *conventionnelle* et *ciblée*), qui agissent en détruisant les cellules tumorales.

1 Stratégies antitumorales anti-angiogénique et antivasculaire

1.1. Stratégie anti-angiogénique

La stratégie anti-angiogénique se caractérise par trois phases tenant compte de l'évolution pathologique (**Figure 3**). Durant la première phase dite *dormante ou avasculaire*, il y a un équilibre entre les phénomènes de prolifération et de mort des cellules

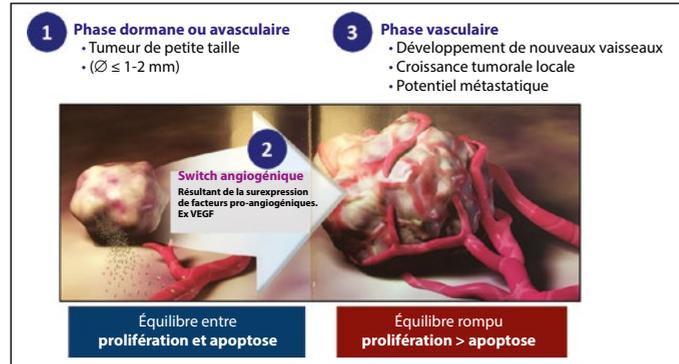


Figure 3

Les trois phases de développement de la tumeur ciblées dans la stratégie anti-angiogénique.

Source : Folkman J. (1971). *N. Engl. J. Med.*, 285 : 1182.

cancéreuses (apoptose⁶), alors que durant la dernière phase (phase 3), cet équilibre est rompu et les phénomènes de prolifération sont largement dominants par rapport à l'apoptose.

Le passage de la phase 1 à la phase 3, un événement clé de la tumorigenèse, est appelé le *switch* angiogénique, avec la surexpression de facteurs de croissance pro-angiogéniques comme notamment le VEGF (« *Vascular endothelial growth factor* »), qui est le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire⁷. Depuis son identification, le VEGF est devenu une cible de choix dans le cadre de cette stratégie thérapeutique utilisant le blocage de l'angiogénèse.

6. Apoptose : processus naturel de mort cellulaire programmée, assurant alors l'autodestruction des cellules et en limitant donc la prolifération.

7. Endothélium vasculaire : couche la plus interne des vaisseaux sanguins, en contact direct avec le sang.



Figure 4

Judah Folkman (1933-2008) a été le premier à imaginer une stratégie anti-angiogénique en 1971.

Bien que cette stratégie anti-angiogénique ait été émise la première fois par le médecin biologiste Judah Folkman en 1971 (Figure 4), il a fallu attendre quasiment trente-cinq ans pour apporter la preuve de concept en thérapie humaine avec la mise sur le marché d'un anticorps monoclonal humanisé, le bevacizumab (Avastin®). Depuis 2005, plusieurs petites molécules issues de la synthèse organique inhibitrices des récepteurs tyrosine-kinases VEGFR ont reçu également l'autorisation de mise sur le marché (sunitinib, sorafenib, pazopanib, etc).

1.2. Stratégie anti-vasculaire

Contrairement à la stratégie anti-angiogénique ciblant le VEGF et prévenant la formation de néo-vaisseaux, la stratégie antivasculaire cible la néo-vascularisation antitumorale (Figure 5). Cette stratégie a été rendue possible par l'identification de molécules capables de détruire sélectivement cette

néo-vascularisation en vue de réduire rapidement le flux sanguin et inhiber la croissance tumorale par nécrose, plutôt que par apoptose comme cela est le cas lors d'une stratégie anti-angiogénique.

Il est clair que cette stratégie antivasculaire n'a de réalité qu'à partir du moment où ces molécules dites antivasculaires sont capables de distinguer entre le réseau vasculaire normal (Figure 6A) et le réseau vasculaire autour de la tumeur (Figure 6B) qu'est cette néo-angiogenèse.

Il a été effectivement montré qu'il existe des différences constitutives entre réseaux vasculaire normal et tumoral : le premier est organisé, stable, peu perméable, et caractérisé avec un endothélium en équilibre, des cellules péricytes⁸ organisées et une perméabilité contrôlée assurant ainsi un flux sanguin régulé. Quant au second, il

8. Cellules péricytes : cellules murales entourant l'endothélium vasculaire pour les protéger.

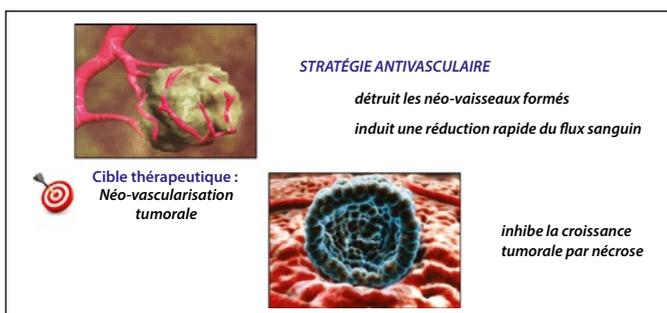


Figure 5

La stratégie antivasculaire détruit les néo-vaisseaux qui irriguent la tumeur, menant à la nécrose de celle-ci.

Sources : Denekamp J. et coll. (1982), *Br. J. Cancer*, 46 : 711 ; Siemann D.W. et coll. (2017), *Cancer investigation*, 35 : 519.

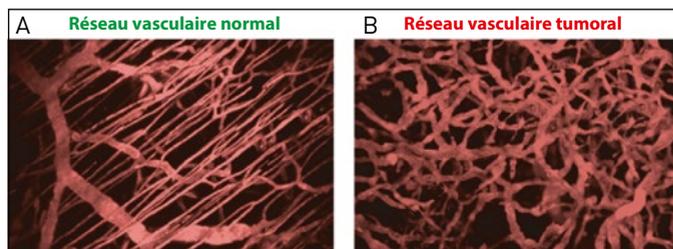


Figure 6

Néo-angiogenèse tumorale : A) observation d'un réseau vasculaire normal ; B) observation d'un réseau vasculaire tumoral.

est désorganisé, perméable, en remodelage permanent et caractérisé par l'absence de péricytes ainsi qu'une perméabilité accrue induisant un flux sanguin irrégulier au sein de la tumeur. Il est maintenant bien admis que ces différences sont à l'origine de la sélectivité observée avec les agents antivasculaires.

2 Une nouvelle classe thérapeutique de molécules antitumorales

2.1. La combrétastatine A-4

La combrétastatine A-4 (CA-4) a été isolée en 1989 des feuilles d'un arbre d'Afrique

du Sud, *Cambretum caffrum* (Figure 7A). Cette molécule possède deux noyaux aromatiques, A et B, portant quatre groupements méthoxyle (-OCH₃, noté -OMe) et un groupement hydroxyle (-OH). La structure cristallographique de ce stilbène de configuration Z révèle que la molécule n'est pas plane ; elle se présente sous la forme d'une pince à sucre où les deux noyaux aromatiques sont situés dans un même demi-espace ; les plans formés par les deux noyaux aromatiques A et B forment un angle dièdre de 53° (Figure 7B).

Les premières évaluations biologiques (Figure 8) ont

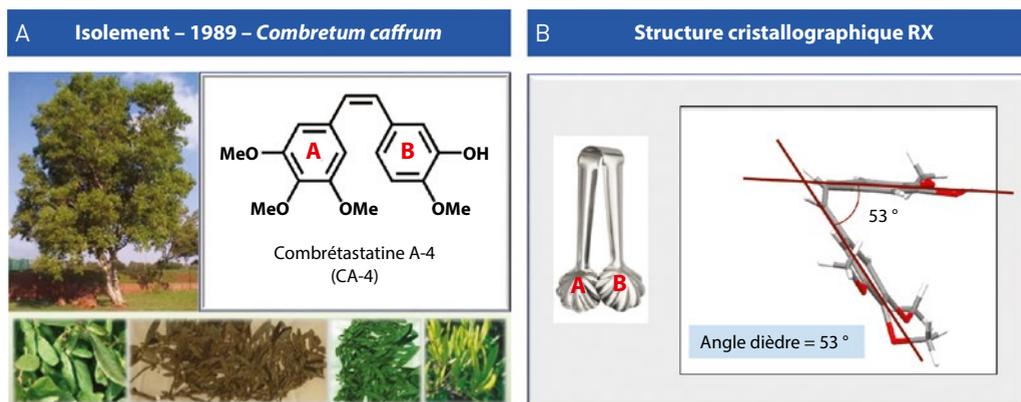


Figure 7

A) Structure chimique la combrétastatine A-4 (CA-4), isolée des feuilles d'un arbre Sud Africain ; B) structure cristallographique de la CA-4 en forme de pince à sucre.

Évaluation biologique	
	In vitro
	<ul style="list-style-type: none"> • Activité cytotoxique (nM) • Inhibition polymérisation de la tubuline (µM) • Activité antivasculaire
	In vivo
	<ul style="list-style-type: none"> • Faible efficacité antitumorale de la CA-4 • faible stabilité chimique • isomérisation de la double liaison Z en E • faible hydrosolubilité • mauvaise pharmacocinétique

Figure 8

Évaluation biologique de la combrétastatine A4

montré que la CA-4 possède des activités cytotoxiques à des concentrations nanomolaires (de l'ordre de 10^{-9} mol/L, ou nM) vis-à-vis de nombreuses lignées cellulaires tumorales. Elle a non seulement la capacité d'inhiber la polymérisation de la tubuline⁹ à des concentrations micromolaires en se fixant sur le site de la colchicine, mais le point le plus important est qu'elle possède des propriétés antivasculaires, contrairement aux antimétabolites classiques (taxanes et colchicine).

Malheureusement, dès les premières évaluations biologiques *in vivo*, la CA-4 s'est avérée inefficace du fait d'une instabilité chimique imputable à l'isomérisation de la double liaison Z conduisant à l'isomère inactif E, et sans doute aussi à cause de sa faible hydrosolubilité, à l'origine d'une mauvaise pharmacocinétique¹⁰.

Le problème de la faible hydrosolubilité de la CA-4 a été résolu *via* la préparation d'une prodrogue phosphate¹¹, appelée fosbrétabuline (Zybrestat[®], Figure 9), développée par Mateon Therapeutics aux États-Unis (Figure 9). Il s'agit de la première molécule disponible sur le marché avec ce type de mécanisme d'action (*first-in-class*). Le Zybrestat[®]

a reçu en 2016 le statut de médicament orphelin aux États-Unis et en Europe pour le traitement de tumeurs neuroendocrines¹² et de glioblastomes¹³ multifformes.

Depuis l'identification des propriétés antivasculaires de la combrétastatine A-4 en 1997, un fort intérêt a été porté à cette petite molécule de la part de la communauté scientifique académique mais également du milieu industriel, comme en témoignent les nombreuses publications et brevets parus sur ce sujet ; pas loin de trente-mille molécules ont été dénombrées par la base de données *Sci-Finder* comme analogues de la combrétastatine A-4 (Figure 10).

Les études de relation structure-activité ont montré que :

- les quatre groupements méthoxyle (-OMe) jouent un rôle important sur l'activité antivasculaire de la molécule ;
- le groupe hydroxyle (-OH) peut être modifié par des groupements bioisostériques¹⁴ mais constitue également une fonction importante pour la préparation de prodrogues.

Mais l'élément structural le plus important au maintien d'une cytotoxicité nanomolaire de la CA-4 est la configuration Z (« *cis* ») de la

9. Tubuline : protéine, principal constituant du cytosquelette (ensemble organisé de polymères biologiques contribuant aux propriétés architecturale et mécaniques des cellules).

10. Pharmacocinétique : devenir d'un médicament dans l'organisme.

11. Prodrogue : substance ou médicament qui va se transformer en principe actif après son administration au patient.

12. Neuroendocrine : qui se rapporte au système neuroendocrinien, un réseau de cellules nerveuses émettant des neurones et des signaux nerveux.

13. Glioblastome : tumeur du cerveau la plus courante chez l'être humain.

14. Bioisostérique : qui se rapporte à un bioisostère, composé possédant des propriétés (physiques, chimiques ou biochimiques) semblables à celles d'une biomolécule.

double liaison (**Figure 11**). Il faut signaler que l'isomère *E* est cent fois moins actif que l'isomère *Z*. Pour obtenir des analogues stables de la CA-4, les recherches de nombreuses équipes se sont focalisées à incorporer principalement



Figure 9

Zybrestat, prodrogue de la CA-4, est développée par Mateon Therapeutics pour diverses applications en oncologie.

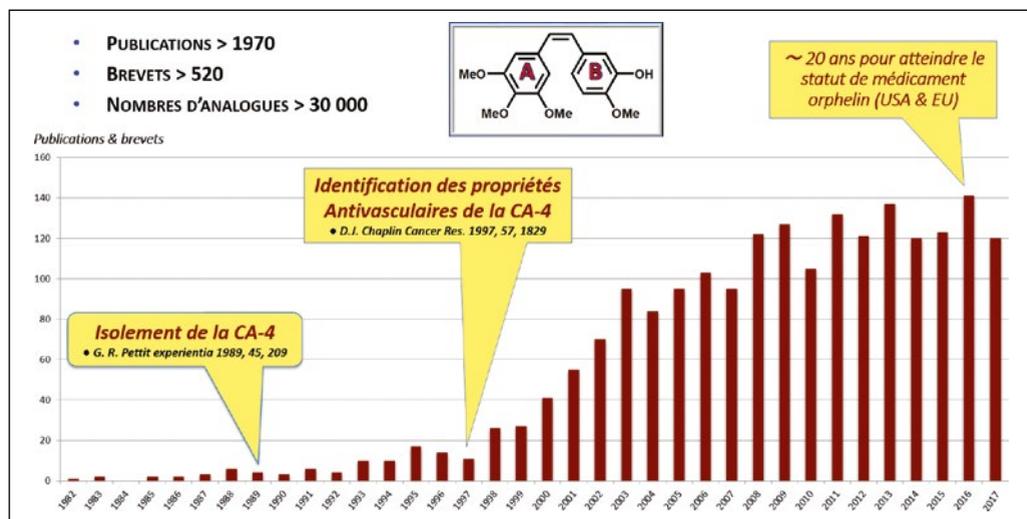


Figure 10

Augmentation de l'intérêt scientifique pour les analogues de la combrestatine A-4 au regard des publications et brevets.

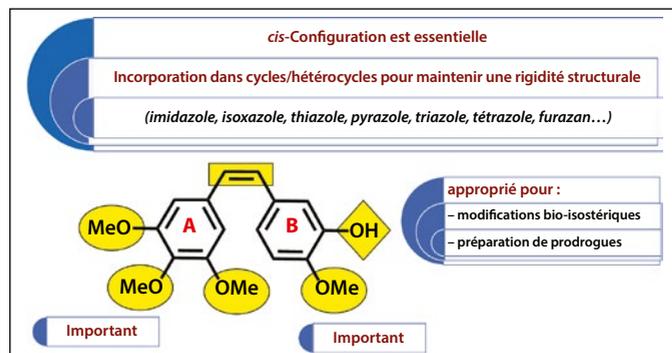


Figure 11

La configuration *cis* de la double liaison de la combrestatine A-4 est essentielle pour son activité antivasculaire.

cette double liaison dans un cycle ou un hétérocycle en vue de maintenir une rigidité structurale nécessaire à l'activité biologique. Cette contrainte a conduit à des molécules de plus en plus complexes, dont la synthèse est de plus en plus difficile.

2.2. L'isocombrétastatine A-4

Nous avons vu que la molécule naturelle CA-4 est de configuration Z et possède un angle dièdre de 53°. À titre d'exemple, cette molécule montre une activité cytotoxique nanomolaire sur la lignée HCT116 (cancer colorectal) et une capacité à inhiber la polymérisation de la tubuline à une concentration micromolaire (Figure 12).

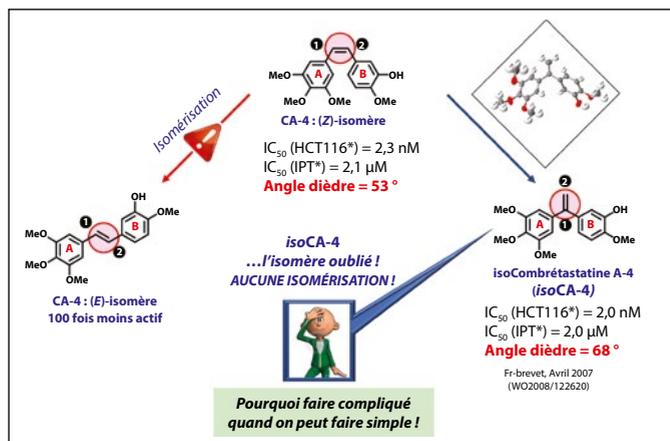
Sous l'effet de la lumière, de la chaleur ou du pH, la CA-4 s'isomériser facilement pour donner l'isomère E, thermodynamiquement le plus stable mais qui est cent fois moins actif (Figure 12). Bien que plus de trente mille molécules analogues de cette molécule aient été rapportées dans la

littérature scientifique, personne n'avait pensé et décrit l'isomère *oublié* où les deux noyaux aromatiques A et B sont sur le même carbone : l'isocombrétastatine A-4, ou isoCA-4 (Figure 12). Cette molécule, isomère non naturel de la CA-4, possède un profil biologique (cytotoxicité, inhibition de la polymérisation de la tubuline, induction de l'apoptose, etc.) rigoureusement identique à celui de la molécule naturelle, sans toutefois présenter le risque d'isomérisation. De plus, l'étude cristallographique de l'isoCA-4 révèle que cette molécule possède un angle dièdre voisin de celui de la molécule naturelle.

L'activité antiproliférative de l'isoCA-4 a été testée sur de nombreuses lignées cellulaires tumorales d'origine humaine (Tableau). Dans tous les cas étudiés, l'isoCA-4 s'est révélée extrêmement cytotoxique montrant une concentration inhibitrice IC₅₀ variant de 1 à 8 nanomolaires. Une autre propriété singulière et importante de l'isoCA-4 est son niveau d'activité à des

Figure 12

Il est intéressant d'étudier l'activité biologique de tous les isomères de la combrétastatine A-4 : E, Z et isocombrétastatine A-4.



Tableau

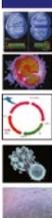
Concentrations inhibitrices des isoCA4 sur les lignées résistantes ou non : elles sont toutes du même ordre de grandeur.

Lignées cellulaires tumorales d'origine humaine		IC ₅₀ (nM)
B16F10	Mélanome	8
U87	Glioblastome	8
A549	Adénocarcinome alvéolaire basal épithélial	8
MDA-MB435	Cancer mammaire	3
MDA-MB231	Cancer mammaire hormona-dépendant	4
H1299	Cancer du poumon non à petites cellules	5
BL2-B95.8	Lymphome de Burkitt	2
BL41-B95.8	Lymphome de Burkitt infecté par EBV	2
MiaPaca2	Cancer du pancréas	5
LS174T	Cancer du colon vascularisé	6
K562	Leucémie myéloïde chronique	5
MCF7	Cancer du sein	8
HCT116	Carcinome coloréctal	2
HL60	Leucémie promyélocytaire	1
HUVEC	Cellules endothéliales	2
MCF7R	Cancer du sein résistant (Paclitaxel)	3
HCT15R	Carcinome coloréctal résistant (5-Fluorouracile)	2
HL60R	Leucémie promyélocytaire résistante (Doxorubicine)	4

concentrations nanomolaires sur des lignées résistantes, notamment sur les trois lignées résistantes décrites en bas du **Tableau** (cancer du sein, carcinome colorectal et leucémie promyélocytaire).

Dans le cadre d'un développement préclinique de l'isoCA4, les profils biologique *in vitro*, physico-chimique, ADMET (« *absorption, distribution, metabolism and excretion - toxicity* »), de sélectivité ainsi que la démonstration de la preuve de concept de son efficacité antitumorale *in vivo* ont été réalisés (**Figure 13**).

C'est dans le cadre de ces résultats très encourageants qu'est intervenue la labellisation par la Ligue contre le

<p>Profil biologique <i>in vitro</i></p>  <ul style="list-style-type: none"> • inhibition polymérisation tubuline • cytotoxicité (panel lignées tumorales) • apoptose • cycle cellulaire • activité antivasculaire 	<p>Profil physico-chimique</p> <ul style="list-style-type: none"> • stabilité & conservation • hydrosolubilité • synthèse multi-grammes <p>Profil ADMET</p> <ul style="list-style-type: none"> • stabilité & métabolisme • stabilité plasmatique • interaction protéines plasmatiques • dose maximale tolérée (MTD)
<p>EFFICACITÉ antitumorale <i>in vitro</i></p>  <ul style="list-style-type: none"> • activité antivasculaire (IRM) • efficacité antitumorale (comb. vs mono) 	<p>Profil de sélectivité</p> <ul style="list-style-type: none"> • profil pharmacologique • <i>off-targets</i> (effets indésirables)

Cancer de l'équipe CoSMIT à travers un programme de recherche en trois volets (**Figure 14**) : un premier volet pour « démontrer une efficacité antitumorale », le deuxième pour « rechercher des molécules de seconde génération hétérocycliques », et le

Figure 13

Éléments déterminants d'un profil biologique *in vitro*.

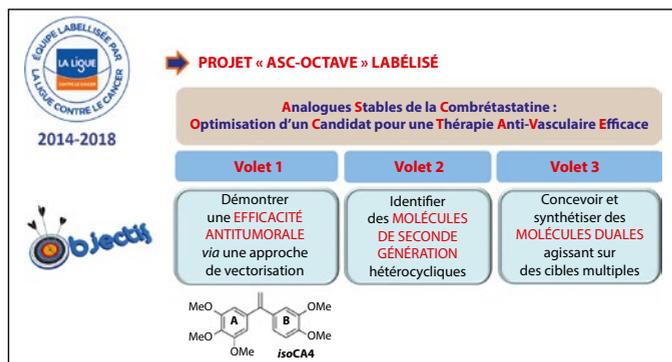


Figure 14

Labellisation de CoSMIT par La Ligue contre le cancer à travers le programme de recherche en trois volets intitulé « ASC-OCTAVE ».

dernier volet pour « concevoir des molécules duales », c'est-à-dire possédant deux pharmacophores¹⁵ agissant sur deux cibles différentes mais convergeant bien évidemment vers le même effet antitumoral. Seuls les deux premiers volets de ce programme de recherche seront présentés.

3 Efficacité antitumorale antivasculaire de l'isoCA-4

3.1. Test d'activité antivasculaire

La preuve du concept de l'activité antivasculaire de l'isoCA-4 a été réalisée sur un modèle de xénogreffe¹⁶ de tumeurs humaines sur souris *nude* (lignée LS-174T de tumeur humaine de colon hyper-vascularisée). La souris reçoit une seule injection intraveineuse de 10 % de la dose maximale tolérée de la prodrogue de l'isoCA-4 soluble dans

15. Pharmacophore : ensemble des parties médicalement actives d'une molécule.

16. Xénogreffe : transplantation d'un greffon où le donneur est d'une espèce différente de celle du receveur.

l'eau (Figure 15). Trois heures après, un agent de contraste, le Dotarem[®], est injecté puis la vascularisation autour de la tumeur est analysée par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) (Figure 16).

La Figure 16 représente les coupes des tumeurs de souris contrôle et traitées. Les coupes des souris traitées par l'isoCA-4P sont dans la partie inférieure de la figure. Les images obtenues après injection de l'agent de contraste (Dotarem[®]) sont à droite.

Dans le cas des souris non traitées (souris contrôle), trois heures après injection de l'agent de contraste, un rehaussement du signal autour de la tumeur est observé. Cela témoigne de la diffusion de l'agent de contraste autour de la tumeur via le réseau vasculaire.

Dans le cas des souris traitées par l'isoCA-4P (45 mg/kg), l'absence de rehaussement de signal signifie une absence de diffusion du Dotarem[®] au sein de la tumeur et démontre sans ambiguïté l'effet antivasculaire recherché à travers une destruction de la néo-vascularisation par l'isoCA-4P.

Ce résultat a été corroboré par l'examen anatomo-pathologique de la tumeur après autopsie des souris (Figure 17). L'histopathologie révèle une nécrose¹⁷ tumorale de plus de 90 % après traitement avec réduction de la densité vasculaire périphérique.

Après avoir montré les propriétés biologiques *in vitro* de l'isoCA-4 [cytotoxicité, inhibition de la polymérisation

17. Nécrose : mort d'un tissu vivant.

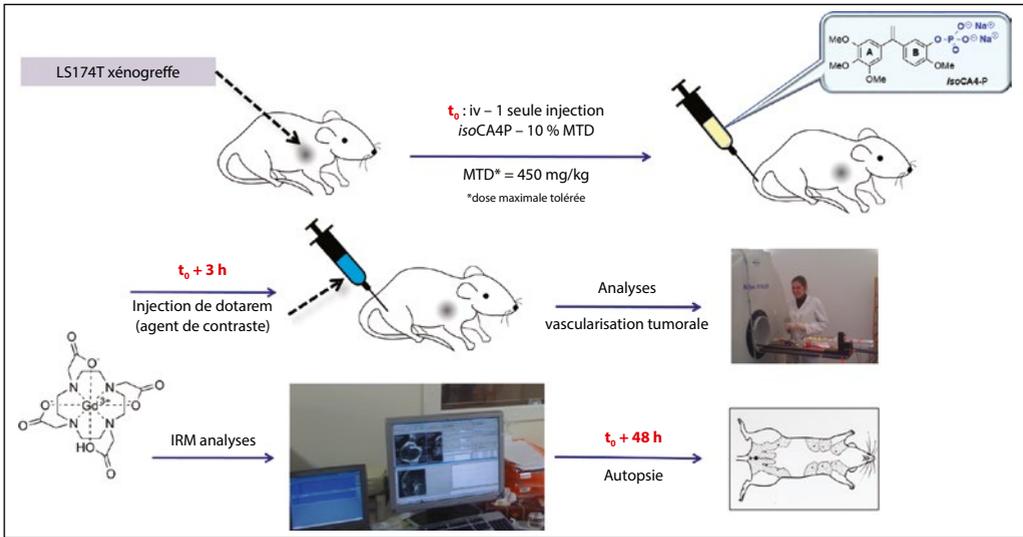


Figure 15

Protocole de test de l'activité antivasculaire in vivo de l'isoCA4.

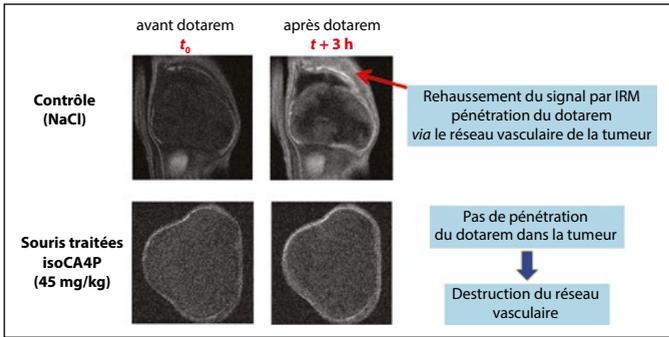


Figure 16

Étude de l'activité vasculaire in vivo de l'isoCA-4P par IRM : coupes des tumeurs avant (gauche) et après (droite) injection du Dotarem® pour une souris contrôle (haut) et une souris traitée (bas).

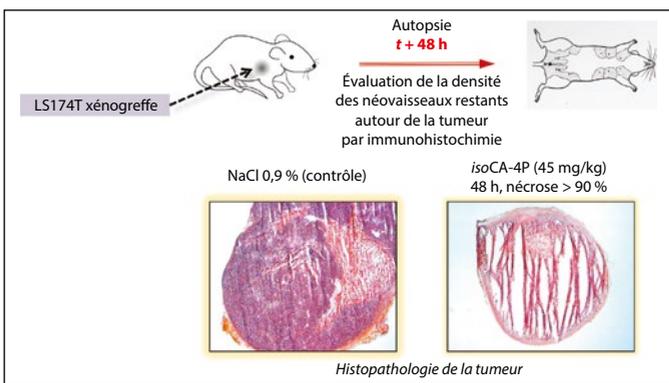


Figure 17

Histopathologie tumorale : observation d'une nécrose effective après traitement.

de la tubuline, apoptose, etc.) et apporté la preuve de concept de l'efficacité antivasculaire d'une prodrogue de

l'isoCA-4 par IRM, nous nous sommes attelés à démontrer une efficacité antitumorale in vivo sans avoir à préparer



Figure 18

Évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo* de l'isoCA-4 dans le cadre d'un développement préclinique.

une prodrogue de l'isoCA-4 (Figure 18). Dans ce contexte, un protocole en combinaison avec un autre agent de chimiothérapie conventionnelle a été privilégié. Il fait appel à une approche d'encapsulation et de vectorisation permettant un adressage spécifique du tissu tumoral et réduisant ainsi d'éventuels effets indésirables.

3.2. Vectorisation par squalénisation de l'isoCA-4

Le **Chapitre de P. Couvreur** dans cet ouvrage *Chimie et biologie de synthèse : les applications* (EDP Sciences 2019) a montré que la gemcitabine-squalène (Figure 19), un antimétabolique lié par une liaison covalente avec l'acide squalénique, forme des nanoparticules stables dans le milieu plasmatique et possède une meilleure pharmacocinétique que la gemcitabine libre. Ainsi, à une dose cinq fois inférieure

à celle de la gemcitabine libre (100 mg/kg), les nanoparticules Gem-SQ (20 mg/kg) montrent *in vivo* une activité antitumorale spectaculaire (modèle leucémie)¹⁸, liée à la diminution des mécanismes de résistance.

En vue d'une synergie antitumorale et tout en évitant la préparation de prodrogues de l'isoCA-4, notre stratégie a donc consisté à préparer des nanoparticules mixtes combinant à la fois la gemcitabine et l'isocombrétastatine A-4.

Nous avons montré que l'ajout de l'isoCA-4 à la particule gemcitabine-squalène (Gem-SQ) conduit à la formation d'une nouvelle nanoparticule Gem-SQ/isoCA-4 dans un ratio 1/1 (Figure 20). Dans ce cas, la nanoparticule est formée par inclusion de l'agent

18. Harivardhan-Reddy, L.; Marquet P.-E.; Dubernet, C. *et coll.* [2008]. *J. Pharm. Exp. Therapeut.* 325, 484-490.

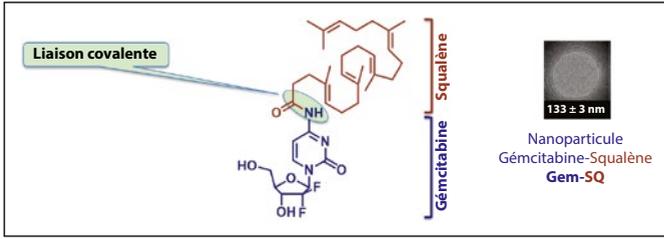


Figure 19

Structure de la gémcitabine-squalène formée par liaison covalente entre ses deux parties (à droite : observation de nanoparticules de gémcitabine-squalène).

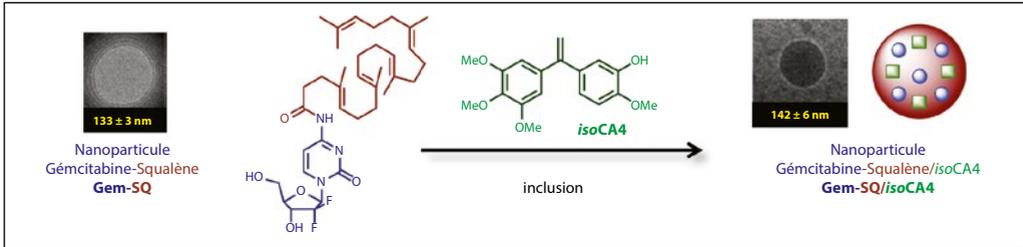


Figure 20

Formation de nanoparticules mixtes de Gem-SQ/isoCA-4 par inclusion.

antivasculaire hydrophobe, l'*isoCA-4*, la gémcitabine et l'acide squalénique étant liés par une liaison covalente (Figure 20). Cette technologie permet d'obtenir, pour la première fois, des nanoparticules Gem-SQ/*isoCA-4* contenant environ 60 % en poids de principe actif par nanoparticule (27 % Gem et 33 % *isoCA-4*), à comparer aux quelques pourcents seulement pour les autres nanovecteurs. Cette particularité permet une réduction importante des doses administrées. L'étude des propriétés de cette nanoparticule révèle que Gem-SQ/*isoCA-4* :

- est plus stable que Gem-SQ ;
- possède un temps de demi-vie plasmatique supérieur à celui de la Gem-SQ ;
- possède des activités anti-prolifératives similaires aux molécules libres *isoCA-4* ou Gem-SQ ;

- se délivre bien à l'intérieur de la cellule.

L'efficacité antitumorale de ces nanomédicaments Gem-SQ/*isoCA-4* contenant deux principes actifs antitumoraux ayant des mécanismes d'action différents a été évaluée *in vivo* sur un modèle de xéno-greffe de tumeurs humaines (LS-174T) sur des souris nude (Figure 21). Ainsi, à la dose de 21 $\mu\text{mol/kg}$, c'est-à-dire 5,5 mg de Gem-SQ et 6,5 mg/kg de l'*isoCA-4*, et en comparaison à différents contrôles, la nanoparticule Gem-SQ/*isoCA-4* a conduit à une quasi complète régression tumorale (93 %) chez la souris.

Il est important de souligner que ces résultats sont obtenus sans aucune toxicité apparente, car les souris qui ont reçu ces nanoparticules reprennent du poids au bout de quelques semaines (Figure 22, les deux courbes supérieures).

Figure 21

Efficacité tumorale des nanoparticules Gem-SQ/isoCA-4.

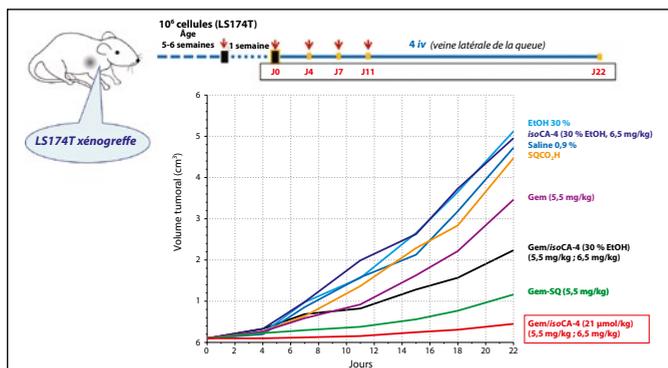


Figure 22

Test de Toxicité des nanoparticules Gem-SQ/isoCA-4 : variation temporelle (%) du poids corporel des individus où ceux traités à la Gem-SQ/isoCA-4 subissent la meilleure reprise de poids après trois semaines.

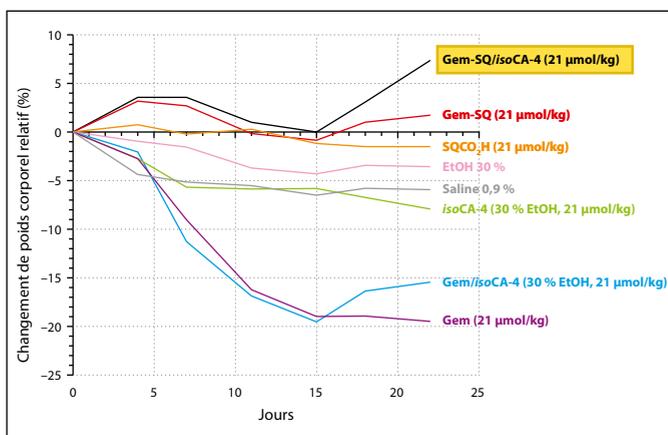


Figure 23

Labellisation par la Ligue contre le Cancer du projet ASC-OCTAVE.



PROJET « ASC-OCTAVE » LABELLISÉ

Analogues Stables de la Combrétastatine :
Optimisation d'un Candidat pour une Thérapie Anti-Vasculaire Efficace

Volet 1

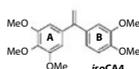
Démontrer une efficacité antitumorale via une approche de vectorisation

Volet 2

Identifier des **molécules de seconde génération** hétérocycliques

Volet 3

Concevoir et synthétiser des molécules duales agissant sur des cibles multiples



développer des outils chimiques appropriés

4 Molécules de seconde génération

Dans le cadre du programme ASC-OCTAVE labellisé par la Ligue contre le Cancer, après avoir démontré l'efficacité antitumorale de l'isoCA-4

(volet 1), nous nous sommes attelés à développer des molécules de seconde génération (volet 2) comportant un hétérocycle à la place du cycle Bet/ ou du cycle A (Figure 23). Pour atteindre nos objectifs, il est nécessaire de développer des outils de synthèse efficaces permettant d'obtenir les molécules cibles en un minimum de temps et d'étapes.

4.1. Stratégies de synthèse pour une chimie flexible

L'Encart « Des stratégies de synthèse pour les chimistes » montrent différentes voies de synthèse explorées pour obtenir l'isoCA-4.

DES STRATÉGIES DE SYNTHÈSE POUR LES CHIMISTES

Initialement, l'*isoCA-4* a été préparée par une réaction dite de Wittig (**Figure 24**, en haut à gauche) en transformant la fonction carbonyle en une double liaison, ou par condensation d'un organolithien (R-Li) sur une acétophénone suivie d'une réaction de déshydratation (**Figure 24**, en haut à droite). Mais bien que ces deux processus fonctionnent chimiquement bien, le premier n'est pas convergent, et le second n'est pas général.

Nous avons examiné d'autres voies de synthèse faisant appel à de la chimie organométallique et de la catalyse organométallique (**Figure 24**, en bas à droite) en réalisant le couplage d'organométalliques de dérivés de l'étain ou de Grignard en présence de différents types de catalyseurs métalliques et bimétalliques : palladium-cuivre ou fer-cuivre. Ces processus fonctionnent eux aussi très bien, mais nécessitent l'utilisation de réactifs organométalliques en quantité stœchiométrique.

Très récemment, nous avons développé un procédé purement catalytique utilisant la réaction des *N*-tosylhydrazones avec un halogénure aromatique, catalysée par un complexe de palladium, qui donne de meilleurs résultats (**Figure 24**, en bas à gauche).

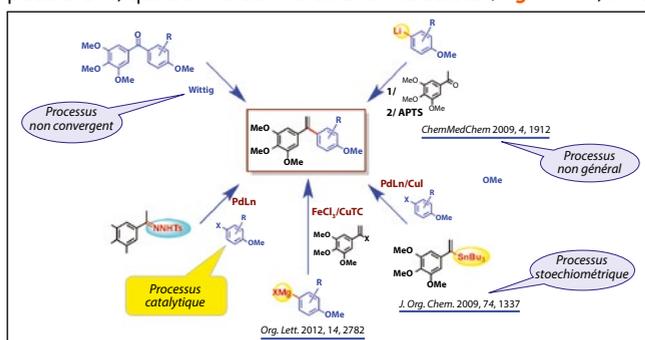


Figure 24

Différentes voies de synthèse de l'*isoCA-4*.

De plus, cette dernière stratégie de synthèse permet d'explorer successivement les espaces chimiques autour des cycles A et B et d'étudier leur importance sur l'activité antivasculaire. En une seule étape, il est possible d'explorer l'influence de l'espace chimique (aromatique ou hétéro-aromatique) du cycle B en utilisant une tosylhydrazone maintenant comme partenaire nucléophile pour le cycle A (**Figure 25A**). Inversement on peut explorer le cycle A (aromatique ou hétéro-aromatique) en inversant le processus ; cette fois-ci c'est le cycle A qui devient le partenaire électrophile variable, alors que le cycle B portant la *N*-tosylhydrazone est fixe (**Figure 25B**). Ces réactions en une seule étape sont convergentes ; elles ne requièrent ni la préparation ni l'utilisation de composés organométalliques stœchiométriques, l'accès aux dérivés *N*-tosylhydrazones, partenaires nucléophiles, est extrêmement facile, les conditions opératoires utilisées sont en outre généralement aisées, et les rendements obtenus sont élevés.

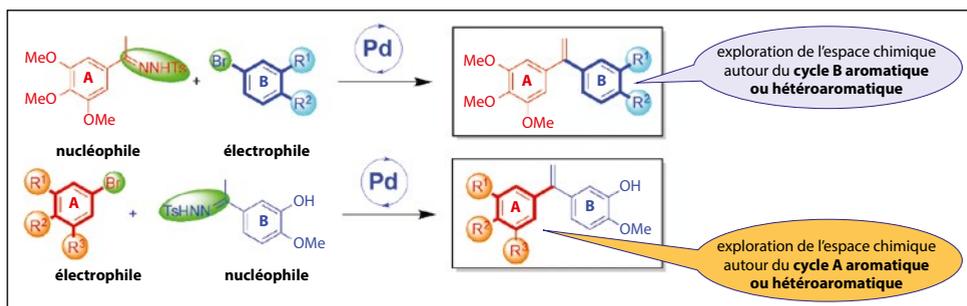


Figure 25

Stratégie de chimie flexible pour explorer l'espace chimique des cycles A et B de l'*isoCA-4* : A) réaction avec un partenaire nucléophile invariable (cycle A) pour analyser les effets de différents substituants sur le cycle B ; B) réaction avec partenaire nucléophile invariable (cycle B) pour analyser les effets de différents substituants sur le cycle A.

4.2. Diversité moléculaire des hétérocycles issus de la chimie de *N*-tosylhydrazones

L'isoaminocembrétastatine a été définie comme une cible (**Figure 26**) au sein de laquelle ont été intégrées différentes modifications moléculaires au niveau de l'atome d'azote de la fonction aminée. Dans ce contexte, des processus multi-composants ont été développés utilisant une *N*-tosylhydrazone, un iodochlorobenzène, une amine et une catalyse au palladium. Au cours de ce processus, en une seule étape, deux liaisons carbone-carbone et carbone-azote sont formées (**Figure 26A**).

La **Figure 26B** illustre bien le potentiel de ce processus multi-composants utilisant le même principe réactionnel. Ainsi le remplacement du composé iodochlorobenzène par un partenaire dihalogéné contenant une fonction imidate permet de former en une étape trois liaisons : deux liaisons carbone-azote et une liaison carbone-carbone.

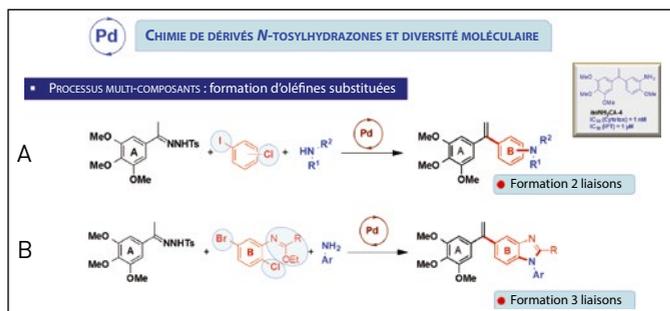


Figure 26

Chimie de dérivés *N*-tosylhydrazones et diversité moléculaire : A) formation de deux liaisons conduisant à des dérivés d'isoNH₂CA-4 en une seule étape à partir de trois réactifs dont une amine ; B) formation de trois liaisons conduisant à des dérivés isohétérocombrétastatine en une seule étape à partir de trois réactifs correctement fonctionnalisés.

À partir de la même stratégie faisant appel à de la chimie des *N*-tosylhydrazones et une catalyse au palladium, des composés 1,1-aryl-hétéro-aryléthylènes comportant un hétérocycle carbazole ont été obtenus. Dans ces conditions, il est nécessaire d'utiliser comme partenaire électrophile un dérivé halogéné contenant une liaison carbone-brome et une liaison carbone-nitro (**Figure 27A**). Les conditions opératoires permettent de former la double liaison carbone-carbone et d'induire de façon tandem une étape de réduction de la fonction nitro, suivie d'une cyclisation aboutissant à l'hétérocycle carbazole.

Lorsque les liaisons réactives carbone-brome et carbone-nitro sont placées dans un autre environnement sur la molécule, un processus tandem encore plus complexe a lieu dans lequel une liaison carbone-oxygène est rompue et trois nouvelles liaisons sont formées : deux liaisons carbone-azote et une liaison carbone-carbone (**Figure 27B**). À travers ce nouveau processus inédit, des dérivés indole présentant un grand intérêt en chimie médicinale ont été préparés.

4.3. Relation structure-activité des iso-hétérocombrétastatines

Nous avons testé la cytotoxicité des molécules de seconde génération ainsi que leur capacité à induire une inhibition de la polymérisation de la tubuline. Une sélection des meilleures molécules identifiées est résumée sur la **Figure 28**. À travers cette étude de relation structure-activité,

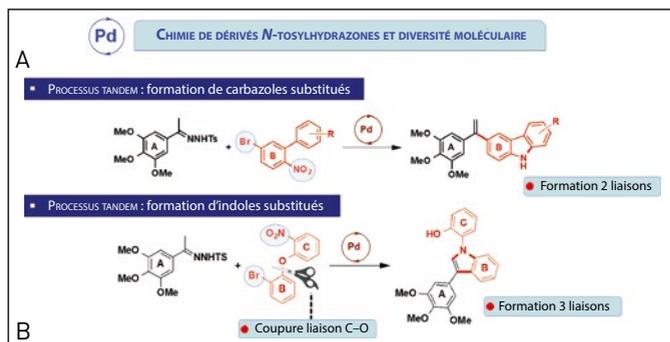


Figure 27

A) La boîte à outil développée dans ces travaux permet de former deux liaisons en une étape pour aboutir à des dérivés carbazoles et ; B) par coupure et formation de trois liaisons, cette boîte à outil permet même de former des indoles.

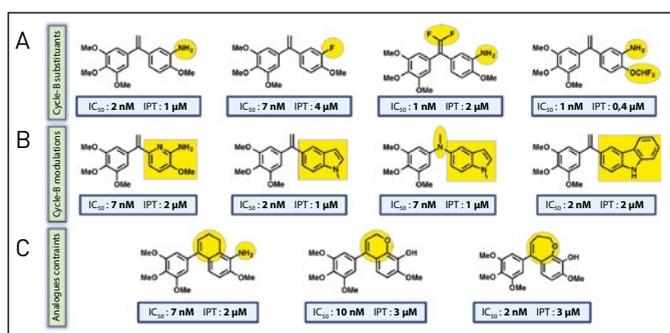


Figure 28

Relation structure-activité de dérivés de l'isoCA-4 concernant : A) la pharmacomodulation des substitués du cycle B ; B) la nature du cycle B hétéro-aromatique versus aromatique ; C) l'introduction de contraintes entre la double liaison et le cycle B. Sélection des meilleures molécules les plus actives en termes de cytotoxicité et Inhibition de la Polymérisation de la Tubuline (IPT).

nous avons montré qu'il est possible de modifier la nature du cycle aromatique B et de ses substitués, ainsi que la possibilité d'obtenir des molécules plus contraintes et où la double liaison et le cycle B sont fusionnés. Un panel de nouvelles molécules a été identifié montrant des activités antiprolifératives et d'inhibition de la polymérisation de la tubuline très intéressantes.

À partir de cette chimie très simple, en une étape, un travail de synthèse important a été réalisé permettant de définir des relations structure-activité (RSA) autour des molécules de seconde génération de la famille de l'isocombrétastatine A-4 (Figure 29). Les résultats des études de RSA ont révélé que :

- les atomes d'hydrogène sur la double liaison peuvent être

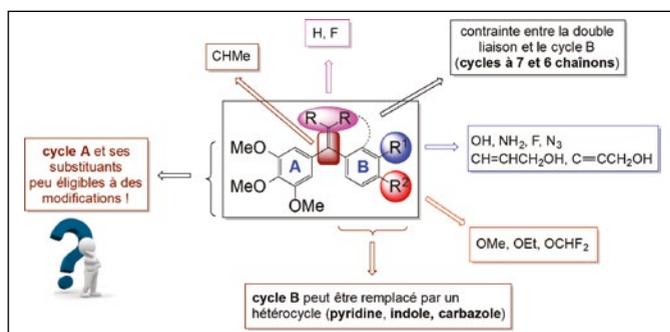


Figure 29

La relation structure/activité de l'isoCA4 a été définie complètement mais un a priori est resté sur les groupements méthoxyle du cycle A.

remplacés par un atome de fluor ;

- des contraintes conformationnelles sont tolérées à la condition de former des carbocycles ou hétérocycles à 6 ou 7 chaînons ;

- le substituant R^1 du cycle aromatique B peut être modifié par des groupements bioisostères appropriés tel qu'un atome de fluor, un groupement amino ($-NH_2$), un azoture ($-N_3$) ou une chaîne carbonée éthylénique ou acétylénique (**Figure 29**) ;

- le substituant R^2 du cycle aromatique B peut être également modifié par des groupements bioisostères ($-OEt$, $-OCHF_2$, etc.) ;

- le cycle aromatique B peut être remplacé par des noyaux hétérocycliques azotés de type pyridine, indole ou carbazole ;

- la double liaison peut être réduite.

Tous les composés rapportés dans la **Figure 29**, analogues biologiquement actifs de l'*isoCA-4*, possèdent des

activités antiprolifératives à des concentrations nanomolaires et une capacité à inhiber la polymérisation de la tubuline à des concentrations micromolaires (donc une bonne activité). La caractéristique structurale commune à ces composés est la présence du cycle A triméthoxyphényle, un élément structural indispensable à l'activité antitumorale et dont son remplacement et/ou la modification de ses substituants induit une perte d'activité biologique.

Très récemment, nos derniers travaux ont montré tout l'intérêt d'optimiser la structure chimique de l'*isoCA-4* en remplaçant le cycle 3,4,5-triméthoxyphényle (ou cycle A) par un noyau hétérocyclique de type quinazoline ou quinoléine, convenablement choisis sur la base du concept de « structures privilégiées ». Les molécules *isocombrétaquinazolines* appelées *isoCoQ* ou *isocombrétaquinoléines* appelées *isoCoQuines* (**Figure 30**) ont

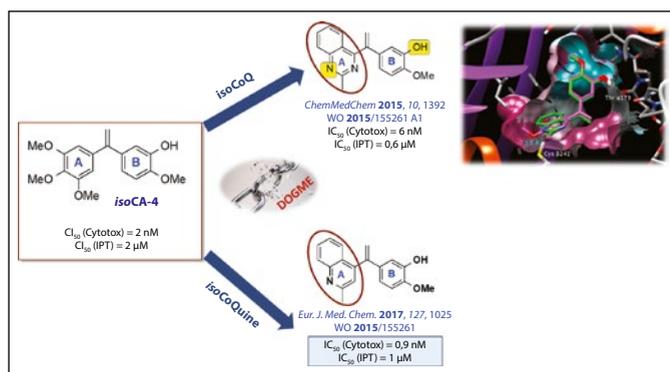


Figure 30

Structure de l'*isoCA-4* dont le cycle A a été modifié pour donner les dérivés *isoCoQ* et *isoCoQuine* possédant d'excellentes activités biologiques. À droite : représentation 3D des interactions entre la molécule *isoCoQ* avec la tubuline au sein du site actif de la colchicine.

montré d'excellentes activités prolifératives (gamme subnanomolaire pour *isoCoQuines*) et d'inhibition de la polymérisation de la tubuline (gamme submicromolaire pour *isoCoQ*).

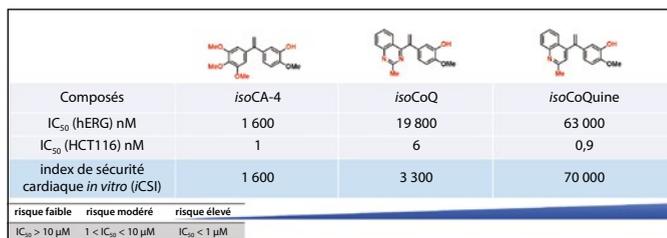
L'intérêt de ces hétérocycles pauvres en électrons, contrairement au noyau triméthoxyphényle, est leur aptitude à conduire à une faible métabolisation.

4.4. Pharmacologie de sécurité cardiaque

Dans le cadre d'un développement préclinique, nous avons examiné la capacité des molécules nouvellement identifiées (*isoCoQ* et *isoCoQuine*) à induire ou non des effets cardiotoxiques par rapport à celles comportant un noyau 3,4,5-triméthoxyphényle. La pharmacologie de sécurité cardiaque est particulièrement représentée par le test du hERG, canal potassique responsable de la repolarisation cardiaque et hautement impliqué dans les phénomènes de prolongation de l'intervalle QT de l'électrocardiogramme, à l'origine des arythmies cardiaques.

L' IC_{50} (concentration de la molécule à inhiber 50 % de l'effet sur hERG) a été déterminée en comparant l'*isoCA-4* aux molécules de seconde génération *isoCoQ* et *isoCoQuine*. En fonction de la valeur de cette IC_{50} , il est possible d'apprécier le risque de toxicité cardiaque ou arythmie cardiaque¹⁹ s'il est faible ou élevé

19. Arythmies cardiaques : troubles irréguliers de la fréquence cardiaque.



Composés	<i>isoCA-4</i>	<i>isoCoQ</i>	<i>isoCoQuine</i>
IC_{50} (hERG) nM	1 600	19 800	63 000
IC_{50} (HCT116) nM	1	6	0,9
index de sécurité cardiaque <i>in vitro</i> (iCSI)	1 600	3 300	70 000

risque faible	risque modéré	risque élevé
$IC_{50} > 10 \mu M$	$1 < IC_{50} < 10 \mu M$	$IC_{50} < 1 \mu M$

Figure 31

Calcul de l'ICSI pour l'*isoCA4* ainsi que les deux nouveaux composés à cycle A modifié.

(Figure 31). La détermination permet également d'apprécier un autre paramètre nommé index de sécurité cardiaque *in vitro* (iCSI). Celui-ci est défini comme étant le rapport des valeurs des IC_{50} d'inhibition de hERG et de l'activité antiproliférative sur une lignée cellulaire d'intérêt, ici HCT116. Les résultats de la Figure 31 montrent clairement que l'index de sécurité cardiaque de l'*isoCoQuine* est nettement supérieur à celui de l'*isoCA-4* et de l'*isoCoQ*, avec une valeur de iCSI atteignant 70 000, largement supérieur aux 5 000, définis par Novartis comme marge suffisante de sécurité cardiaque avant le début des études *in vivo* (Figure 31).

Nos récents travaux ont montré tout l'intérêt d'optimiser la structure chimique de l'*isoCA-4* en remplaçant le cycle triméthoxyphényle par un hétérocycle pour obtenir deux nouvelles générations de molécules, les *isoCoQ* et les *isoCoQuine* (Figure 32), potentiellement intéressantes en application thérapeutique. Signalons de plus qu'une nouvelle famille a très récemment été identifiée, montrant des activités antiprolifératives dans la gamme picomolaire.

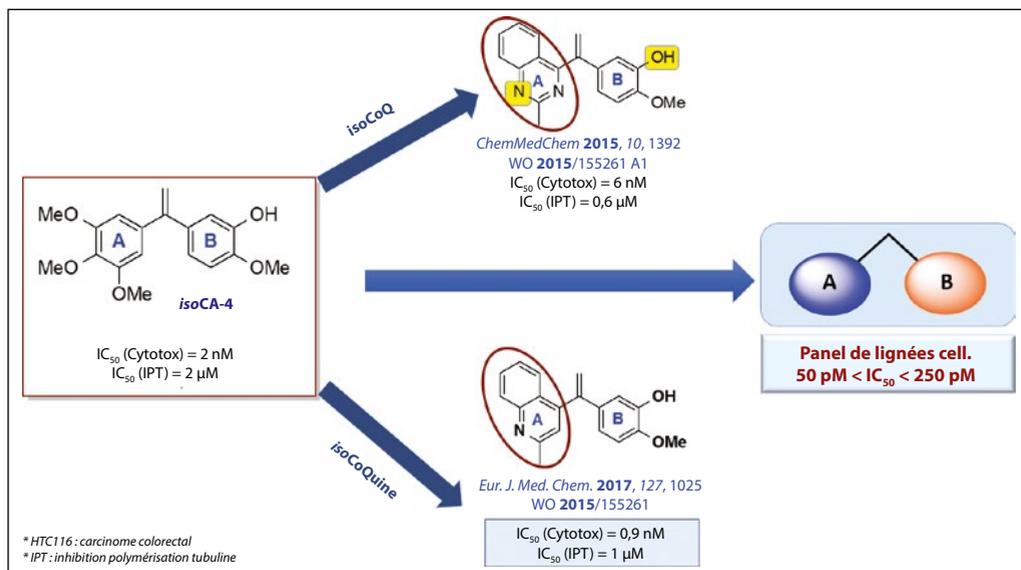


Figure 32

Structures de l'isoCA-4 et de la nouvelle génération des molécules isoCoQ et isoCoQuine.

5 La technologie des immunoconjugués

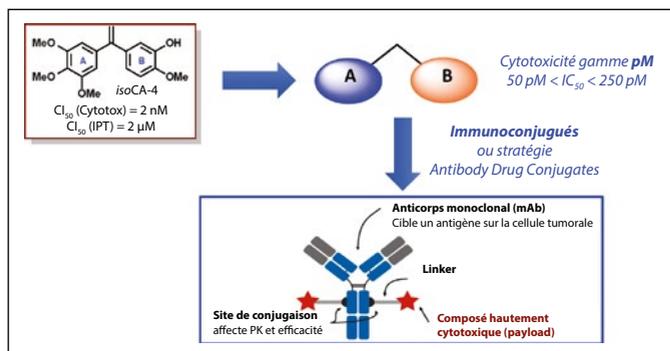
5.1. Principe de la stratégie ADC

En raison du niveau d'activité cytotoxique de ces nouvelles molécules, il est inconcevable d'imaginer une utilisation en thérapie sous un format libre car ce sont des bombes à retardement pouvant induire beaucoup d'effets indésirables. D'où tout l'intérêt de les associer dans une technologie dite immunoconjuguée ou stratégie ADC (« *Antibody Drug Conjugates* ») (Figure 33). Le principe consiste à greffer une molécule hautement cytotoxique à un anticorps monoclonal, sélectif d'un antigène surexprimé par une tumeur donnée, par l'intermédiaire d'un « linker » (ou espaceurs) afin d'obtenir un traitement efficace et ciblé vis-à-vis de différents types de cancers. L'intérêt de cette stratégie est de s'affranchir des limitations observées

avec les deux thérapies prises séparément.

À ce jour, trois ADC ont reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) : Adcetris® en 2011 (indication : lymphome de Hodgkin), Kadcyla® en 2013, (indication : cancer du sein HER-2 positif) et Besponsa® en 2017 (indication : leucémie aiguë lymphoblastique). Il est à noter que les cytotoxiques présents sur ces ADC ont des mécanismes d'actions très peu variés, visant la tubuline ou l'ADN. De plus, ils ont des structures chimiques complexes de poids moléculaire élevés, possèdent de nombreux carbones asymétriques, et leur synthèse n'est pas aisée. Par conséquent, il existe un réel besoin de disposer de nouveaux cytotoxiques simples avec des mécanismes d'actions différents.

Pour être éligible en tant que cytotoxique dans une stratégie ADC, les molécules devraient posséder en termes



chimique et biologique les caractéristiques résumées sur la **Figure 34**. L'examen des propriétés chimiques et biologiques des molécules isoCoQ et isoCoquine montre que ces cytotoxiques possèdent les caractéristiques requises pour être parfaitement éligibles à une stratégie ADC.

5.2. Immunoconjugués issus de l'isoCA-4

Les travaux de conjugaison des dérivés de l'isoCA-4 sont en cours. D'ores et déjà nous avons identifié de nouvelles conditions opératoires biocompatibles permettant le couplage d'une fonction thiol (-SH) d'un composé organique avec un halogène aromatique en présence d'un complexe de palladium de troisième génération. (**Figure 35**). Une application a été réalisée notamment pour coupler la fonction thiol d'une cystéine du trastuzumab avec un fluorophore, le TAMRA, pour obtenir donc un nouveau bioconjugué portant une liaison covalente carbone(sp²)-soufre stable en milieu plasmatique (**Figure 35**).

Cette technologie sera ensuite appliquée pour préparer cette fois-ci des bioconjugués en remplaçant le TAMRA par nos

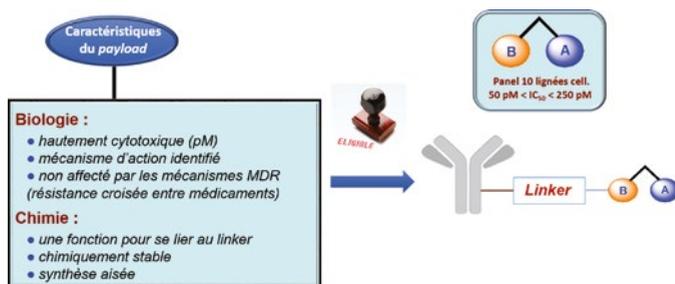


Figure 34

Caractéristiques des candidats « payloads » pour être éligibles à une stratégie ADC.

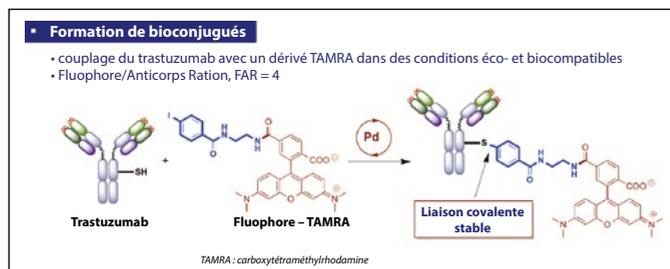


Figure 35

Liaison stable entre le Trastuzumab (anticorps) et le dérivé TAMRA.

familles de molécules dérivées de l'isoCA-4.

Les résultats de cette nouvelle technique de conjugaison seront comparés à ceux de la technique conventionnelle, générant une liaison carbone(sp³)-soufre (**Figure 36**), qui présente l'inconvénient d'être peu stable dans le milieu plasmatique.

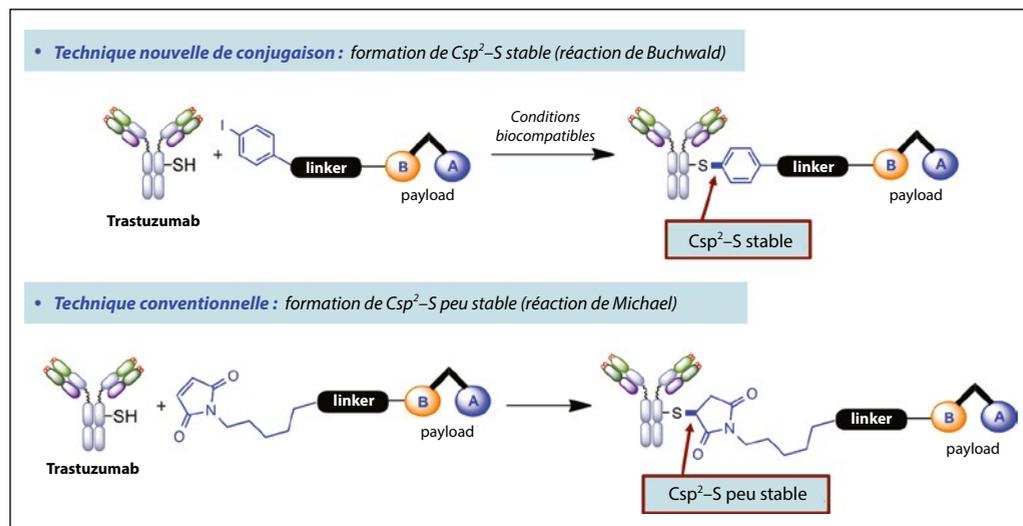


Figure 36

Nouveau bioconjugué avec liaison Csp^2-S stable.

La chimie, base de la diversité moléculaire pour créer de nouveaux cytotoxiques puissants

À partir de la chimie du *N*-tosylhydrazone – qui n'est pas un réactif nouveau – et d'un catalyseur approprié, le palladium, il a été possible de générer de nouvelles transformations et de créer une grande diversité moléculaire (**Figure 37**).

Cette diversité moléculaire est l'origine de l'identification d'une nouvelle classe de composés hautement cytotoxiques potentiellement intéressants dans le cadre d'une stratégie ADC. Par ailleurs, dans le contexte de la conception de biomolécules conjuguées nous avons été amenés à développer de nouvelles techniques de conjugaison biocompatibles pour former de nouveaux bioconjugués possédant de puissantes activités cytotoxiques (**Figure 38**).

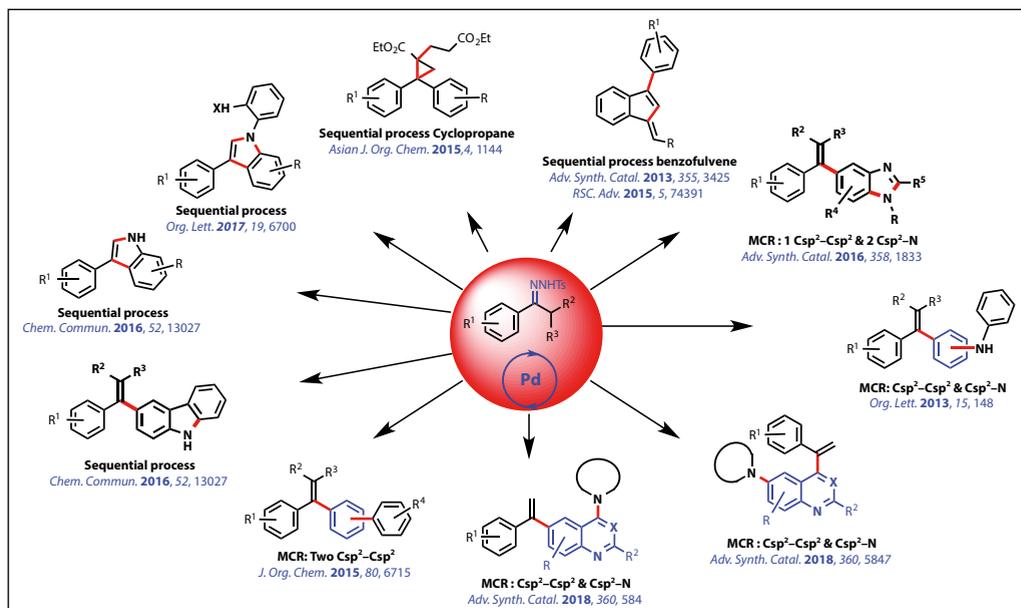


Figure 37

Génération d'une grande diversité moléculaire par l'utilisation de N-tosylhydrazones en présence d'une catalyse au palladium.

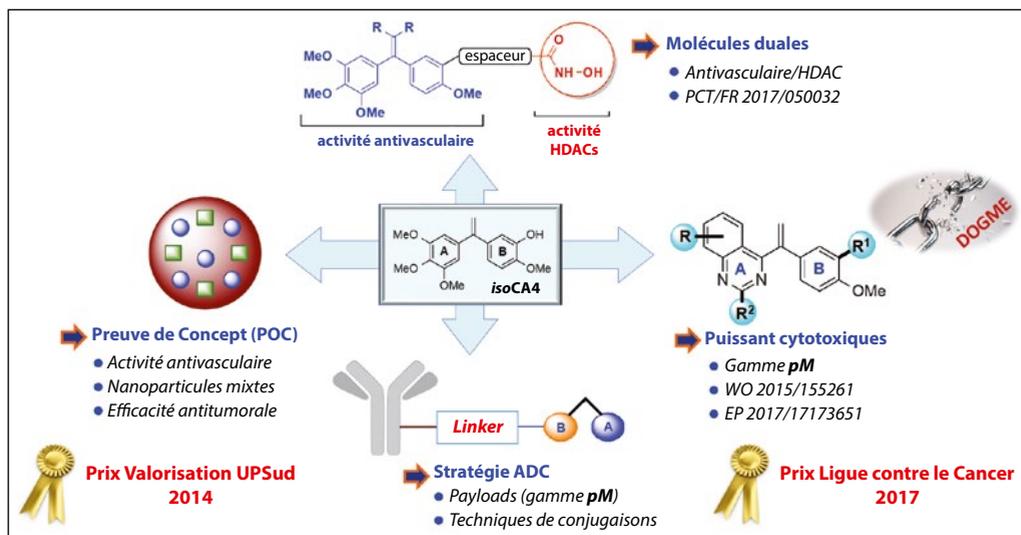


Figure 38

À partir de l'isoCA-4, les travaux ont permis d'apporter la preuve de concept d'une activité antitumorale, d'obtenir des molécules duales et de concevoir de puissants agents cytotoxiques qui ont été inclus dans une stratégie ADC.

Au cours de ces travaux, nous avons conforté les hypothèses formulées concernant tout l'intérêt de développer une seconde génération de molécules dépourvues du noyau aromatique

triméthoxyphényle. L'introduction d'un noyau hétéroaromatique convenablement choisi a permis :

- d'élargir, pour la première fois, le concept « nanomédicaments squalénisés » aux antivasculaires dans un but d'efficacité antitumorale accrue et d'effets indésirables réduits ;
- d'identifier des composés répondant au cahier des charges conservant l'activité anti-vasculaire recherchée et présentant un index de sécurité cardiaque *in vitro* élevé avant le début des études précliniques.

Ces travaux donc ont été conduits dans le cadre de la labellisation par la Ligue contre le Cancer. Ils ont reçu le prix de la valorisation de l'université Paris-Sud, ainsi que le prix de la Ligue contre le cancer.