

**THÈSE** présentée par :

**Julien MOST**

soutenue le : **4 mai 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie

**Développement d'anticorps mono- ou bi-conjugués  
innovants pour le ciblage des cancers du sein triple  
négatifs**

**THÈSE dirigée par :**

**M. WAGNER Alain**

Directeur de recherche, Université de Strasbourg

**M. CHAUBET Guilhem**

Chargé de recherche, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme. ALLARD-VANNIER Emilie**

Professeure, Université de Tours

**M. DENAT Franck**

Professeur, Université de Bourgogne

**EXAMINATEURS :**

**M. DETAPPE Alexandre**

Professeur, Université de Strasbourg

**M. BOUCHARD Hervé**

Docteur, Sanofi-Aventis



## Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'équipe Chimie Biofonctionnelle, équipe faisant partie du laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives localisé dans la faculté de pharmacie d'Illkirch-Graffenstaden. Cette thèse a été financée par l'Institut du Médicament de Strasbourg (IMS), plus particulièrement grâce au Challenge DDD. C'est pourquoi je tiens à remercier en premier lieu l'IMS et toutes les personnes impliquées. Je tiens surtout à remercier Jean-Christophe Peter, Laurence Sabatier et Ghislain Auclair pour votre grande implication durant ces dernières années.

Maintenant, j'aimerais remercier la Pr. Emilie Allard-Vannier, le Pr. Franck Denat, le Pr. Alexandre Detappe et le Dr Hervé Bouchard d'avoir accepté d'évaluer mes travaux en tant que membres de jury. Je tiens également à remercier le Dr Dominique Bonnet et le Dr Alexandre Specht d'avoir acceptés de faire partie, deux fois, de mon jury de comité de suivi de thèse, notamment pour votre bienveillance et pour l'intérêt que vous aviez eu pour mes travaux.

Alain, Guilhem, je ne pourrai jamais assez vous remercier. Pour m'avoir accepté en tant que stagiaire dans votre laboratoire, pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir suivi durant ces quatre années. Grâce à vous j'ai pu devenir le chimiste que je suis aujourd'hui, et on est parti de loin ! Merci de m'avoir challenger, de m'avoir toujours pousser à aller plus loin et d'avoir toujours été là.

Il me semble naturel maintenant de remercier Agathe Boos, ma binôme avec qui nous avons remportés la première édition du Challenge DDD en avril 2019. Je ne pourrai jamais assez te remercier pour ces quatre dernières années lors de cette thèse en collaboration. Tu as été une binôme et amie exceptionnelle. Merci d'avoir été là pendant les gros moments de doutes, merci d'avoir été d'une extrême patience avec moi quand il fallait me faire comprendre la biologie (et c'était pas gagné, mais grâce à toi j'ai appris que la culture cellulaire ne se faisait pas dans du PBS haha), merci pour toutes nos conversions scientifiques ou non scientifiques, merci pour tous les tests biologiques que tu as fait, souvent dans le rush. Bref, merci pour tout, mais surtout merci pour ton soutien ! Si cette thèse a pu être ce qu'elle est, c'est grâce à toi.

Françoise, Maria, je vous remercie énormément d'avoir participer à cette thèse. Cette collaboration était exceptionnelle, j'ai appris tellement de choses grâce à vous, plus particulièrement en biologie grâce à votre intérêt pour PARP.

Il est temps maintenant de remercier tous les membres de BFC que j'ai pu côtoyé durant ces dernières années. Tout d'abord, Charlotte, merci de t'être occupée de moi lors de mon stage. Merci d'avoir toujours été là quand j'en avais besoin, notamment de m'avoir accompagné le jour du challenge DDD. Merci d'avoir été ma maman du labo. Merci pour tous ces moments passés ensemble. Tu as été et tu resteras une rencontre exceptionnelle. Juste merci pour TOUT.

Tony, merci pour tout ce que tu as fait. Merci pour ta bonne humeur, pour m'avoir soutenu, pour m'avoir enseigné l'art de l'oligo. Nous avons passé tellement de bons moments ensemble ! En même temps, on était pratiquement les mêmes gars. Nos passions communes pour les jeux vidéo, le métal (merci ENORMEMENT de m'avoir soutenu sur ce point), les bières, le gras, etc. Tu m'as appris énormément. Et je ne pourrai jamais assez te remercier pour avoir autant défoncé relu ma (notre ?) thèse ! Nos séances Buenos étaient quelques choses d'exceptionnelles. Petite aparté, t'es aussi un gars grave chelou, mais c'est peut-être pour ça qu'on s'est si bien entendu.

Victor, merci pour tout. Pour tous les moments passés ensemble, nos conversions sur tout et n'importe quoi, les délires qu'on a eu. Tu m'as appris énormément de choses et c'était un plaisir de discuter avec quelqu'un comme toi. Je suis un peu triste qu'on ait jamais pu se faire de parties de CS:GO ensemble, mais bon, t'as jamais voulu jouer à LOL avec moi donc on est quitte. Je suis également heureux d'avoir partagé avec toi la passion de Lilly and the magic potatoes. J'ai adoré passé tous ces moments avec toi, merci pour tout.

Enes, mon frère, merci pour ces trois dernières années. Tu as été mon turc, j'ai été ton chinois. Ces moments au laboratoire étaient juste magiques. Nos « batailles » de musique (en vrai je suis content de plus avoir à supporter tes musiques bizarres), nos délires à la paillasse, tout ça. Merci d'avoir fait vivre notre labo, je n'oublierai jamais les bons moments passés ensemble. J'ai toujours adoré discuter avec toi mais je suis un peu triste qu'on n'ait jamais partagé de bières ensembles (bon, on va dire que partager un café et une bière fera l'affaire) ! Quand tu veux on se retrouve pour un Doydoy ou un kunefe ! Par contre, n'oublie pas de faire attention à tes chats, je risque d'arriver à n'importe quel moment pour les manger. Et surtout... J'EN PEEEEEEEEEEEEEEUX PLUS DE TOI !

Charlotte, Tony, Victor et Enes, je tiens à vous remercier encore une fois pour tous les moments qu'on a passé ensemble. Vous resterez pour toujours de précieux amis.

Je remercie également Fabien et David, deux anciens post-doc du labo. Merci Fabien pour ta bonne humeur et pour avoir toujours répondu à mes questions. J'aurai apprécié te connaître un peu plus. Merci David, mon chaton, pour tous nos délires et pour m'avoir appris beaucoup de choses sur le monde de la moto quand je m'y suis lancé.

Je remercie aussi tous les permanents du laboratoire, Michel, Isabelle et Marc. Merci Michel pour toutes les discussions diverses et variées que nous avons eu ensemble, notamment sur la mécanique, les voitures et les motos. Merci Isabelle pour tout ce que tu as fait pour nous. Merci Marc de m'avoir accepté dans ta salle culture, pour m'avoir enseigné les bonnes pratiques de nettoyage et de manipulation d'un PSM, et merci pour nos discussions sur les groupes de rock et sur la bière (et surtout n'oublie plus le picon !).

C'est maintenant le moment de remercier nos amis startupeurs de MicroOmix et de Syndivia. Kitty, merci pour ton sourire et ta présence au sein du laboratoire. Même si tu n'as pas toujours compris ce qu'on faisait (n'oublie pas que le Fmoc c'est mieux que le Boc !), c'était un plaisir de papoter ensemble autour de ta station microfluidique. Je remercie Sasha, Sergii et Igor, nos amis ukrainiens de Syndivia pour leur sympathie, pour m'avoir donné des tips très intéressants lorsque je préparais le Challenge DDD et pour les quelques bières qu'on a pu partager ensemble.

Je remercie tous les doctorants de l'équipe arrivés après moi, pour les deux années qu'on a passées tous ensemble. Valentine, je te remercie tout particulièrement pour tous nos moments au laboratoire et en dehors. Tu as été une collègue exceptionnelle. Merci de m'avoir supporté, merci pour toutes nos conversations sur tout et n'importe quoi, merci pour tous nos fous rires, merci pour toutes ces bières qu'on a partagées ensemble, merci pour nos sessions karaoké, merci pour nos éternels débats, merci pour tout. Maintenant que mon départ est amorcé, je peux enfin te considérer comme une amie et non plus comme une simple collègue. Comme pour les quatre autres thésards partis avant moi, tu resteras une précieuse amie et j'espère qu'on aura encore l'occasion de partager ensemble des parties de Danish, des bières et des fous rires.

Lorenzo, Ilias, I thank you so much for your presence in the lab. Thank you Lorenzo for being my fumehood neighbourhood, my darling and I was really happy to share with you my knowledge, my experiences and my computer's skills (I hope that you will find someone else to help when I will be gone). Thank you Ilias for your behaviour, for our discussions about life, cars, motorbike and kebab. Together we win the first, and only, retrosynthetic challenge, your enthusiasm was really appreciable and you was always here to share your knowledge, your stuff or your food. Moreover, thank you both of you to help me to improve my english skills and to learn me few words in your native language (pizza, dio cane, el Bastardo, cazo, moussaka, malaka, ade ramisu re malaka, scasere !).

Jessica et Richard (Robin), merci d'avoir fait partie de notre équipe et merci pour nos discussions. Merci Jessica pour les moments partagés en tant que voisin de table et pour nos discussions sur notre passion commune qu'est la moto. Merci Richard pour avoir partagé avec moi tes connaissances en médecine et en épicerie (même si des fois tu allais juste chercher les infos sur internet), et n'oublie pas, je vais te casser la gueule Richard.

Héloïse, notre ~~post-doc~~ stagiaire, je te remercie pour tous nos délires, plus particulièrement sur la bouffe. Tu as été ma collègue trou noir, team IMC +++++, et toi-même tu sais qu'on va détruire le monde avec notre super densité ! Et n'oublie de me rejoindre dans le sous-sol de la fac pour notre danse enflammée de haute densité.

Safae et Indréalie, la relève du laboratoire, je vous remercie d'avoir apporté un vent de fraîcheur et de jeunesse (?). Safaeuh, ton énergie (peut-être même trop plein d'énergie) était quelque chose de très appréciable au quotidien. Merci pour ta gentillesse. J'ai été ravi d'avoir pu t'aider dans tes débuts au laboratoire, mais arrête de me proposer tes boules de coke d'énergie. Et surtout, réinvite moi à manger un tajine ! 2-dréalie, merci de ta présence au laboratoire et pour tes cookies, je suis content d'avoir pu te connaître. Et bonne chance avec le site du labo, je te remercie également d'être la relève sur ce point. Par contre, je comprends toujours rien à ce que tu racontes sur les plantes et je maintiens que un chili con carne c'est bien mieux qu'un chili sin carne !

Louis, le petit nouveau du labo né en 2000, merci pour ces quelques mois passés ensemble et merci pour avoir continué mes travaux avec la vérubuline. Rien qu'en quelques mois on a passé de très bons moments ensemble et j'aurai aimé pouvoir en partager d'avantage. Nos discussions, sur nos passions commune pour les véhicules motorisés et pour les jeux vidéo comme The legend of Zelda, me manqueront. Par contre pas merci pour avoir instauré au laboratoire mon appellation Rulian. Et bonne chance avec les galères de machines, avant de partir je t'adouberai chevalier des maintenances HPLC et tu pourras alors officiellement devenir ma relève.

Léa, ma fille, tu n'étais que membre de BFC par intérim mais on a passé quelques mois ensemble inoubliables ! C'était cool de pouvoir partager quelques moments à la paillasse avec toi (sauf quand tu me mettais tes produits qui puent sous le nez, ça c'était nul). Je te remercie pour tout et j'espère pouvoir te rendre visite une fois à Londres. Par contre fait attention, j'essaierai encore de te mettre dans une poubelle.

Merci à Françoise, notre gestionnaire administrative, pour son travail toujours très carré et efficace et merci pour tous ces codes Nacres.

Maintenant que les remerciements des membres BFC sont achevés, il est temps de remercier les non-BFC qui étaient présents lors de cette thèse. Tout d'abord, je tiens à remercier Stéphane et tes

chefs, Sarah et Oscar, pour toutes les analyses de masses. Ces dernières n'ont énormément aidées pendant ma thèse, donc merci Stéphane d'avoir été si professionnel avec moi et merci pour nos discussions sur les motos, c'est un plaisir de découvrir qu'il y a autant de motards ou d'anciens motards dans notre entourage.

Un grand merci à Florence, Momo, Benoit, Célian et Karim ! Merci Florence pour ta gentillesse, tu as été la première personne hors BFC à m'avoir accueilli quand je suis arrivé en stage. Merci à Momo pour tous nos délires et pour ta bienveillance. Merci à Benoit pour nos quelques bières échangées et pour nos délires. Merci à Célian pour nos délires et conversations. Merci à Karim pour ta bonne humeur et pour tous nos délires.

Je remercie maintenant le PACSI, Delphine, Estefania et Cheng pour m'avoir permis d'analyser un grand nombre de molécules et d'avoir été là pour m'aider quand j'en avais besoin.

Il est temps maintenant de sortir un peu de la fac de pharma. Tout d'abord, je tiens à remercier l'IUT Robert Schuman car c'est ici que j'ai fait mes premiers pas post-bac en tant que chimiste. Je remercie Sylvie Lobstein pour m'avoir accepté en stage lors de ma L2. Je remercie Catherine Jeunesse de m'avoir donné la chance de pouvoir faire du monitorat lors de ma première année de thèse.

Toujours par rapport au personnel de l'IUT, je remercie tout particulièrement Sébastien. D'abord pour m'avoir pris sous son aile pour mon stage de L2 (et d'avoir gardé mes paramètres sur l'ATG-ATD) et pour m'avoir accompagné et aidé lors de mes semaines de monitorat. C'est toujours un plaisir de repasser à l'IUT pour discuter un peu ensemble. Merci également pour m'avoir donné pas mal de conseil et d'avoir toujours répondu présent quand j'en avais besoin lors de mon stage, de mon monitorat et même lors de ma thèse. Tu es une personne génial.

Je n'oublie pas Julien (et son magnifique prénom au passage) et je te remercie pour nos moments et délires, tu es aussi quelqu'un d'extraordinaire avec qui on peut rire de tout et n'importe quoi. On s'est tout de suite bien entendu et c'était un vrai plaisir de pouvoir travailler avec toi.

Un grand merci également à Pascal. Quand j'étais étudiant à l'IUT, tu étais pour moi un peu mystérieux quand on te voyait passer avec ta blouse volant au vent. Mais quand j'ai appris à te connaître, j'ai vu à quel point tu es quelqu'un d'attentionné et j'ai adoré nos nombreuses conversations et nos nombreux délires.

C'est le moment de quitter un peu le monde professionnel pour remercier tous les amis que je me suis fait. D'abord, mes amis d'avant Strasbourg. Avant toutes choses, ~~remerciez-moi de vous avoir supporté~~ je vous remercie tous de m'avoir supporté pendant toutes ces années !

Alex (et un peu Martine aussi), je ne vais pas m'étendre sur le sujet car j'aurai besoin d'une thèse entière. Ca va faire bientôt 25 ans qu'on se connaît (qui peut se vanter d'avoir une amitié ayant durée aussi longtemps à notre âge ?!). On a vécu tellement de choses ensemble, que ce soit les jeux vidéo (#LOL), le skate, les feux de camps, l'exploration de Kingersheim et de Wittenheim, les toits, la moto, les bières, les lucioles, les kongs, pour ne citer que ça. Tu as toujours été là pour écouter mes aventures au laboratoire (même si tu n'as pas toujours compris), rien que pour ça je te remercie. Merci d'avoir partagé avec moi toutes ces années et les nombreuses années à venir. Merci pour tout.

Micka, on a passé beaucoup de temps ensemble, et grâce à toi les années lycée étaient quelque chose d'inoubliables (tellement qu'on y retourne ensemble pour les journées portes ouvertes haha).

Merci pour tout. Tu es un super pote et même si on passe un certain temps sans se parler, tu n'es pas le genre de personne qu'on oublie facilement et je ne t'oublierai jamais, tu auras toujours ta place à mes côtés. En même temps, rien ne pourra enlever tout ce qu'on a vécu ensemble, même si tu n'arriveras jamais à dépasser le record d'Alex, tu es juste derrière !

Renaus, merci pour toutes nos conversations, que ce soit sur les jeux vidéo, la science, l'actualité, avec toi on peut parler de tout et de rien. Merci aussi pour avoir hébergé nos innombrables soirées (on se rappellera toujours du feu de camp dans ton jardin haha). Par contre pas merci d'être trop fort aux blind tests, tellement qu'on est obligé de te mettre des malus, mais merci de les avoir respectés. C'est toujours un plaisir de se retrouver autour d'une bière et d'une partie de poker.

Morgane, mine de rien il me semble que tu es ma plus vieille amie avec qui je garde réellement contact et que je vois régulièrement (?) et rien que pour ça, merci. Merci d'être la fille de la bande (on verra qui aura la ref) et de supporter nos délires de mecs. Par contre, essaie de moins partir en vacances steuplait.

Joé, l'hurluberlu de la bande qui ne connaît pas la ponctualité. Merci de me faire autant rire, et d'être toujours là quand il faut faire des conneries et ça c'est cool ! C'est toujours un plaisir de partager une bière avec toi mais pas d'être ton passager en voiture. Tu auras toujours une place dans mon ~~€\*\*~~ à mes côtés ! Par contre la prochaine fois essaie de prévoir en avance un meilleur moyen de locomotion pour déplacer un canapé.

Aujourd'hui, vous êtes tous les cinq comme mes frères et ma sœur et c'est toujours un plaisir de se retrouver dans le Haut-Rhin. Malheureusement ces moments ne sont pas assez nombreux, mais en même temps Morgane tu es tout le temps en vacances.

Je vais maintenant remercier tous les amis que j'ai rencontré depuis que je suis sur Strasbourg. Clément, tu as été la première personne que j'ai rencontré au début de notre aventure de chimiste, pendant plus de 8 ans nos parcours étaient proches, nous permettant ainsi de ne pas se perdre de vue, merci pour ton amitié et tous nos délires. Merci à Thomas, pour les bières échangés en même temps que nos discussions sur les jeux vidéo et les mangas, même si en ce moment on ne se voit qu'une fois par an. Merci à Alessandro pour ta gentillesse.

Morgan, dit Pablo mon chéri et mère de notre enfant, merci pour ton amitié durant toutes ces années. Nos soirées et nos après-midis jeux sont toujours de bons moments. Tu fais partie des personnes toujours prêtes à faire des conneries et on sait que ça énerve nos demoiselles ! Tu es toujours là quand on a besoin de toi (bon après on était aussi là quand tu en as eu besoin, comme pour ton déménagement à l'arrache sous la pluie prévenue à la dernière seconde) et merci pour ça. Et encore merci pour ta relecture de mon manuscrit à la dernière minute. Oui, j'adore les « ainsi » et les « afin ». J'en profite pour remercier Alicia, dit Antonio, toujours prête pour nos session jeux et nos soirée (surtout quand le mot nem est mentionné).

Quentin, je me souviendrai toujours de notre première rencontre lors de ce TP en L2 de chimie orga, quand tu t'amusais à plonger tes mains dans le bain d'acide. Je te remercie pour tous les moments qu'on a passés ensemble, toutes les bières, les heures sur LOL (ça me manque ça, revient jouer steuplait), toutes les soirées, toutes nos conneries. Je te remercie également pour les concerts qu'on a fait ensemble et qu'on fera, merci d'avoir été avec moi pour mon premier voyage en avion pour aller voir Slash et Myles Kennedy à Toulouse. Et surtout, merci pour ces moments de musique

qu'on a passé ces derniers temps, pouvoir jouer avec toi est un plaisir et ça m'a beaucoup aidé lors de la rédaction de ce manuscrit, ça m'a permis de m'évader. Je remercie aussi Charlène pour nos délires et notre passion pour les Dorelei et la nourriture de Quentin. Par contre, je ne suis pas chancelier ! Enfin peut être que si, qui sait...

PA, mon cher et tendre, merci pour ton amour et pour tous ces moments avec toi. Les moments de folie avec toi en chantant Never gonna give you up et Blue (version de Jonathan Young bien entendu) sont inoubliables, comme notre passion pour les tacos. J'aimerais tellement qu'on se retrouve chez LE tacos avec Quentin autour d'une coupe de champagne, malheureusement LE tacos a dû mettre la clé sous la porte, malgré les clients réguliers que nous étions.

Nathan, fiston, du haut de tes 11 ans, on se soutient depuis la licence. Merci d'avoir été là, en tant que binôme en TP, pour tous les fou rires en cours, pour toutes les heures de révisions, surtout en master, pour les p'tites bières à la cafet, pour les moments posés avec des bonbons, pour s'être soutenu de la licence jusqu'à maintenant encore, merci. Bon, t'étais un peu le fils pas voulu mais je suis quand même content de t'avoir à mes côtés. On peut le dire, tu auras été le meilleur binôme que j'ai eu durant toutes ces années d'études. On a été sacrément cons tous les deux et c'est ce qui a rendu ces années d'études si précieuses. Bien-sûr on n'oublie pas nos deux autres camarades de master (leur tour arrivera juste après) avec qui on s'est tellement amusé et surtout soutenu. Merci pour tout.

Damla, la maman de notre petit quatuor de master, je te remercie pour ces deux années de master passés avec toi et pour ces quelques moments où on s'est vu lors de nos thèses (fallait pas partir à Orléans hein). T'as été forte d'avoir réussi à supporter les trois énergumènes qu'on est, merci encore. T'as été une super binôme, et j'ai adoré ces moments avec toi. Merci pour tout. Par contre, on attends toujours avec Nathan et Arnaud de se partager ce fameux kebab tous ensemble.

Arnaud, à l'origine je ne t'aimais pas, mais c'était avant de te connaître réellement. J'ai adoré tous les moments passés ensemble, en master, en stage et nos quelques soirées qu'on a réussi à caser dans ton agenda overbooké. Merci pour tout mon Arnaud.

Nathan, Damla, Arnaud, merci d'avoir là, surtout pendant les deux ans de master, ça n'aurait pas été pareil sans vous.

Je remercie maintenant Catherine pour m'avoir accepté en stage de M1, et pour m'avoir appris beaucoup de choses, ce qui m'a permis de découvrir les joies d'un laboratoire universitaire. Je remercie Didier pour son éternelle bonne humeur ainsi que pour toutes ses histoires. Je remercie également Laurianne et Yannick, mes camarades de stage avec qui j'ai passé de superbes moments au laboratoire.

Pierre, ou Petrus, je te remercie pour tous les moments qu'on a eu ensemble. J'adore rencontrer des personnes partant au quart de tour dans les mêmes délires que moi et tu t'es toujours prêté au jeu.

Charlotte, merci d'avoir été ma camarade IPI. Tu as permis de rendre ces longues journées de formation beaucoup plus dynamiques. On oubliera pas nos rendez-vous à la boulangerie Hanss pour récupérer notre déjeuner et surtout nos desserts. Et ne t'en fait pas, j'irai un jour chez Starling Burger et je te ferai un compte-rendu détaillé !

Merci à Quentin de la roue libre pour m'avoir proposé tant de bonnes bières à boire. C'est toujours un plaisir de découvrir de nouvelles cervoises dans ton bar.

Merci à Valentin, un ancien petit stagiaire. On s'est bien amusé pendant tes quelques mois au laboratoire. N'oublie pas, je suis ton capitaine et tu es mon moussaillon ! Et c'est toujours un plaisir d'échanger quelques bières ensemble lorsqu'on arrive à caser ça dans mon emploi du temps.

Merci à Honda et à ECF, enfin surtout au monde de la moto, de m'avoir permis d'exercer cette magnifique passion qui m'a permis de m'évader quand j'en avais besoin.

On arrive à la fin de mes remerciements, maintenant je tiens à remercier mes parents qui ont toujours été là pour me soutenir et sans qui je n'aurai jamais pu aller aussi loin dans la vie. Merci de m'avoir toujours fait confiance.

Pour conclure, il ne manque qu'une personne. Je ne vais pas m'étendre, au risque de devoir écrire encore une autre thèse. Merci à toi Joséphine. Merci d'être à mes côtés, merci pour ta présence, merci de m'avoir supporté, merci pour ton amour. Juste, merci.

Pour résumer, merci à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer, j'en ai sûrement oublié ici mais il est temps de s'arrêter. Si j'ai pu arriver là où je suis aujourd'hui c'est un peu grâce à vous tous donc :

# MERCI !

## Liste d'abréviations

ABF : 4-azidobenzoyl fluoride	DoC : Degree of conjugation
AcBut : Acide 4-(4-acetylphenoxy)butanoïque	DTT : Dithiothréitol
ACN : Acétonitrile	EMA : European medicines agency
AcOH : Acide acétique	EDCI : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyle)
ADC : Antibody-drug conjugate	EDTA : Ethylènediaminetétraacétique
ADN : Acide désoxyribonucléique	ER : Estrogen receptor
AOC : Antibody oligonucleotide conjugate	EtOAc : Acétate d'éthyle
ARN : Acide ribonucléique	FDA : Food and drug administration
BCA : Bicinchoninic acid	Fmoc : Fluorénylméthoxycarbonyle
BCMA (récepteur) : B-cell maturation antigen	Fr $\alpha$ : Folate receptor $\alpha$
BCN : bicyclo[6.1.0]non-4-yne	HATU : Hexafluorophosphate de (diméthylamine)- <i>N,N</i> -diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridine-3-yloxy)méthaniminium
Boc : tert-butoxycarbonyl	HCl : Acide chlorhydrique
BOP : Benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate	HER2 : Human epidermal growth factor receptor-2
BRCA1/2 : Breast cancer associated 1/2	HPLC : High performance liquid chromatography
CDXX (récepteur) : Cluster of differentiation	HRMS : High Resolution mass spectroscopy
CDR : Complementarity-determining region	IC <sub>50</sub> : Half maximal inhibitory concentration
Ces1c : Carboxylesterase 1c	IgG/E/D/M/A : Immunoglobuline G/E/D/M/A
CH : Constant heavy chain	IMS : Institut du médicament de Strasbourg
CL : Constant light chain	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> : Carbonate de potassium
DAR : Drug to antibody ratio	LC-MS : Liquid chromatography – mass spectroscopy
DBU : 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène	LiOH : Hydroxyde de lithium
DCM : Dichlorométhane	LRMS : Low resolution mass spectroscopy
DIAD : Diisopropylazodicarboxylate	KOH : Hydroxyde de potassium
DIPEA : <i>N,N</i> -diisopropyléthylamine	mAb : Monoclonal antibody
DMAP : 4-diméthylaminopyridine	
DMF : <i>N,N</i> -diméthylformamide	
DMSO : Diméthylsulfoxyde	

MC : *N*-succinimidyl 6-maleimidocaproate

MeOH : Méthanol

MMAE : Monométhylauristatine E

MMAF : Monométhylauristatine F

Mp : Melting point

mRNA : Messenger ribonucleic acid

MsCl : Chlorure de mésyle

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Sulfate de sodium

NAD<sup>+</sup> : Nicotinamide adénine dinucléotide

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : Dihydrogénophosphate de sodium

NH<sub>4</sub>OH : Hydroxyde d'ammonium

NaHCO<sub>3</sub> : Bicarbonate de soude

NaOH : Hydroxyde de sodium

NaOMe : Méthanolate de sodium

NH<sub>4</sub>Cl : Chlorure d'ammonium

NHS : *N*-hydroxysuccinimide

NOESY : Nuclear overhauser effect spectroscopy

ORR : Overall Response Rate

PAB : *p*-aminobenzyle

PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase

PBD : Pyrrolobenzodiazépine

PBS : Phosphate-buffered saline

PEG : Polyéthylène glycol

PFP : Pentafluorophénol

PNP : *p*-nitrophénol

POCl<sub>3</sub> : Trichlorure de phosphoryle

PPh<sub>3</sub> : Triphénylphosphine

PR : Progesteron receptor

PROTAC : Proteolysis-targeting chimera

Rf : Rapport Frontal

RISC : RNA-Induced silencing complex

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RP-HPLC : Reverse phase – high performance liquid chromatography

SEC-ESI : Size exclusion chromatography – electrospray ionization

siRNA : Small interfering ribonucleic acid

SMCC : *N*-succinimidyl 4-(maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate

SOCl<sub>2</sub> : Chlorure de thionyle

SPAAC : Strain-promoted alkyne-azide cycloaddition

SPDB : *N*-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butanoate

TBAI : Tetra-*N*-butylammonium iodide

TCEP : Tris(2-carboxyéthyl)phosphine

TEA : Triéthylamine

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

TLC : Thin layer chromatography

TNBC : Triple negative breast cancer

TNF $\alpha$  : Tumor necrosis factor  $\alpha$

Topo I/II : Topoisomérase I/II

Trop-2 : Trophoblast cell surface antigen 2

TsCl : Chlorure de tosyle

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VH : Variable heavy chain

WST-1 : Water soluble tetrazolium

## Avant-propos

Ce projet de thèse a pu voir le jour grâce au *Challenge DDD* organisé par l'IMS (Institut du Médicament de Strasbourg). Ce challenge consiste à créer un projet de recherche avec un potentiel de valorisation afin de répondre à un besoin médical non-satisfait. Deux étudiants de master 2 de disciplines différentes peuvent, grâce à l'encadrement de leurs responsables respectifs et à des coachs industriels et académiques, réunir les expertises de leur laboratoire d'accueil afin d'écrire et de défendre un projet. Les deux lauréats pourront alors bénéficier d'une bourse de thèse chacun afin de développer ce nouvel outil thérapeutique innovant.

C'est ainsi que Agathe Boos (doctorante en 4<sup>ème</sup> année dans le laboratoire du Dr Françoise Dantzer) et moi-même avons obtenu nos financements de thèse, après avoir remporté la première édition du *Challenge DDD* en avril 2019. Mon équipe et moi-même gérons la partie chimie/bioconjugaison de ce projet (synthèse des linkers, modification des composés d'intérêts, modification d'anticorps). Agathe Boos et son équipe gèrent la partie biologie (évaluation *in vitro* et *in vivo* des composés, identification d'un marqueur de surface pertinent, culture cellulaire). C'est donc elle qui a réalisé toutes les expériences biologiques présentées dans ce manuscrit.

Les conjugués anticorps-médicaments (ou ADC pour *Antibody-Drug Conjugates*) représentent une classe émergente d'agents thérapeutiques permettant la délivrance de molécules cytotoxiques, aussi appelées charges thérapeutiques, via leur conjugaison sur un anticorps capable de cibler spécifiquement des tumeurs. En 2000, le premier ADC a été approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour une utilisation en thérapie anticancéreuse. S'en est suivie l'approbation de trois autres ADCs jusqu'à 2017. C'est à partir de 2019 que ce type de thérapie a vu sa croissance fortement augmenter avec l'approbation de neuf autres ADCs en trois ans, montrant l'engouement autour de ces traitements ciblés tout comme leur efficacité.

Cependant, l'efficacité des ADCs est limitée par la faible quantité de composés atteignant leur cible. Afin de pallier ce problème, il est nécessaire d'utiliser des molécules hautement cytotoxiques, avec une efficacité de l'ordre du subnanomolaire voire picomolaire. Par conséquent, les charges thérapeutiques majoritairement utilisées sont des molécules ciblant le fuseau mitotique ou provoquant des dommages dans l'ADN. Cependant, l'apparition de phénomènes de résistances envers ces molécules indique un besoin de développer de nouvelles familles de charges thérapeutiques. Une autre possibilité serait d'utiliser des composés en combinaison permettant une synergie, ce qui contribuerait à l'optimisation des effets cytotoxiques et au développement de traitements plus efficaces. L'une des cibles pouvant potentiellement permettre ce type de synergie est PARP3, une enzyme jouant un rôle dans la progression mitotique ainsi que dans la réparation de l'ADN.

Cette thèse est dédiée à l'élaboration d'ADCs équipés de charges thérapeutiques inédites afin d'explorer de nouvelles stratégies permettant d'optimiser les effets cytotoxiques des ADCs. Ainsi, dans un premier projet, des anticorps conjugués à des molécules inhibant PARP3 seront produits, permettant de fragiliser les cellules cancéreuses résistantes et de créer un potentiel effet synergique avec une autre molécule cytotoxique. Ce travail mènera alors au développement d'anticorps bi-conjugués afin de délivrer les deux molécules en même temps.

Dans un second projet, nous allons nous atteler au développement de dérivés conjugables de la vérubuline, un poison mitotique ayant échoué en phase clinique, afin de permettre sa délivrance spécifique et de limiter ses effets secondaires.

Ce manuscrit sera composé de trois chapitres. Le premier traitera de généralités autour des cancers du sein ainsi que des traitements déjà existants, avec une focalisation sur les ADCs. Nous détaillerons leurs utilités et leurs limites dans la lutte contre le cancer ainsi que leur construction, avec une partie détaillée sur les charges thérapeutiques utilisées en clinique. Dans l'intention d'optimiser la cytotoxicité de ces composés, une nouvelle cible thérapeutique intracellulaire, PARP3, sera présentée afin de comprendre l'intérêt de son ciblage pour les thérapies anticancéreuses.

Suivant cette introduction, le premier projet de cette thèse sera présenté. Il porte sur le développement d'anticorps conjugués permettant le ciblage de PARP3, en vue d'explorer de potentielles synergies avec des molécules cytotoxiques. Les stratégies de synthèse chimique des composés, leur fonctionnalisation et les méthodes de conjugaison utilisées seront détaillées et l'efficacité des conjugués produits sera évaluée *in vitro*. Enfin, ces méthodes seront appliquées de façon successive afin de générer un anticorps bi-conjugué final contenant la vincristine et un ARN interférant ciblant PARP3.

Le dernier chapitre portera sur le développement de dérivés de la vérubuline pour y incorporer un linker. Plusieurs méthodes ont été envisagées, notamment la modification directe de la vérubuline par une stratégie d'alkylation sous forme d'ammonium quaternaire, ou la synthèse d'analogues nucléophiles facilement fonctionnalisables afin de produire les premiers ADC-vérubuline et d'évaluer leur activité.

## Table des matières

Remerciements .....	i
Liste d'abréviations .....	viii
Avant-propos .....	1
Introduction.....	5
Généralités sur les cancers.....	5
Traitements actuels pour le cancer du sein .....	5
Chirurgie .....	5
Chimiothérapie .....	6
Radiothérapie .....	6
Traitements ciblés .....	7
Hormonothérapie.....	7
Anticorps monoclonaux ciblant le récepteur HER2.....	7
Généralités et historique sur les anticorps monoclonaux .....	8
Concept de « balle magique » .....	8
Généralités sur les anticorps monoclonaux .....	8
Les différentes classes d'anticorps monoclonaux .....	9
Diversification des anticorps monoclonaux en thérapie.....	11
Conjugués anticorps-médicaments .....	11
Généralités sur les ADCs.....	11
Mécanisme d'action général des ADCs .....	12
ADCs approuvés par la FDA .....	13
Méthodes de bioconjugaison .....	16
Linkers .....	16
Charge thérapeutique .....	21
Les oligonucléotides .....	40
Limitations des ADCs .....	41
Utilisation d'ADCs dans le ciblage de cancers résistants.....	42
Cancer du sein triple négatif .....	42
Vers le développement d'outils thérapeutiques contre les cancers résistants .....	43
Famille des PARPs et leur intérêt dans la recherche contre le cancer .....	43
Ciblage de PARP3 à l'aide d'une combinaison synergique.....	47
Objectifs de thèse.....	49
Projet 1 : Développement d'anticorps bi-conjugués porteurs d'agents ciblant PARP3 et de molécules cytotoxiques pour le ciblage des cancers du sein triple négatif .....	49

Projet 2 : Développement de nouveaux ADCs conjugués à la vérubuline, une nouvelle charge thérapeutique.....	50
Développement d'anticorps bi-conjugués porteurs d'agents ciblant PARP3 et de molécules cytotoxiques pour le ciblage des cancers du sein triple négatifs .....	51
Introduction.....	51
Résultats et discussions.....	55
Combinaison de l'inhibiteur Me0328 <b>49</b> et de l'étoposide <b>50</b> .....	55
Evaluation de la combinaison entre le siPARP3 <b>53</b> et l'étoposide <b>50</b> sur les cellules SKBR3.....	57
Evaluation de la combinaison entre le siPARP3 <b>53</b> et la vincristine <b>22</b> .....	58
Bioconjugaison du siPARP3 <b>53</b> .....	60
Bioconjugaison de la vincristine <b>22</b> .....	66
Evaluation des conjugués <i>in vivo</i> sur des modèles de souris xénotransplantées .....	76
Utilisation d'un linker non-clivable.....	84
Double-conjugaison séquentielle .....	87
Conclusion .....	91
Partie expérimentale.....	93
Développement de nouveaux ADCs conjugués à la vérubuline, une nouvelle classe de charge thérapeutique.....	123
Introduction.....	123
Résultats et discussions.....	124
Synthèse de la vérubuline <b>28</b> .....	124
Evaluation des potentiels sites de modification de la vérubuline <b>28</b> .....	125
Bioconjugaison de la vérubuline-CH <sub>2</sub> -OH <b>135</b> .....	131
Conclusion .....	134
Partie expérimentale.....	135
Conclusion Générale.....	145
Projet 1 : Développement d'anticorps bi-conjugués porteurs d'agents ciblant PARP3 et de molécules cytotoxiques pour le ciblage des cancers du sein triple négatif .....	145
Projet 2 : Développement de nouveaux ADCs conjugués à la vérubuline, une nouvelle classe de charge thérapeutique.....	146
Références.....	147

# Introduction

## Généralités sur les cancers

À l'heure actuelle, les cancers représentent la seconde cause de mortalité dans le monde. Ces maladies ont causé environ 10 millions de décès en 2020 sur la planète.<sup>1</sup> Ils sont caractérisés par une division rapide et surtout incontrôlée de cellules, menant à la formation de tumeurs pouvant toucher tous les organes.<sup>2</sup> Ces tumeurs peuvent avoir une certaine hétérogénéité, favorisant ainsi la formation d'une grande diversité de cancers avec différents types de cellules cancéreuses.<sup>3</sup> Cette grande diversité complique davantage le traitement car chaque cancer aura des propriétés qui lui sont propres. De plus, l'apparition de métastases peut également rendre les cellules cancéreuses plus résistantes et plus dures à cibler. Les métastases sont des tumeurs dites secondaires qui se sont propagées dans d'autres parties du corps, à partir d'une tumeur initiale, en traversant les vaisseaux sanguins ou lymphatiques.<sup>4</sup> Les cancers peuvent être classifiés en différents stades d'évolution<sup>5</sup> :

- Stade 1 : Petite tumeur (2 cm ou moins) locale.
- Stade 2 : Taille plus importante (entre 2 et 5 cm) avec pas ou peu d'expansion (de 1 à 3 ganglions lymphatiques).
- Stade 3 : Taille plus importante (plus de 5 cm) et expansion accrue (jusqu'à 10 ganglions lymphatiques).
- Stade 4 : Propagation à d'autres parties du corps (apparition de métastases).

Etant donné la grande diversité des cancers, ce chapitre va être focalisé en particulier sur une famille de cancer avec une incidence très élevée : les cancers du sein.

Ces cancers sont les plus répandus au niveau mondial avec 2,26 millions de nouveaux cas en 2020, ce qui représente 11,7% des cancers diagnostiqués cette même année.<sup>1</sup> Malgré leur incidence élevée, les thérapies actuelles permettent d'augmenter les chances de rémission totale pour 70 à 80% des patients si la maladie est détectée assez tôt et qu'il n'y a pas d'apparition de métastases. Cependant, dans le cas où le cancer est détecté tardivement à un stade avancé, la maladie est considérée comme incurable avec les traitements actuels, montrant l'importance de trouver de nouvelles voies thérapeutiques.<sup>3</sup>

## Traitements actuels pour le cancer du sein

Dans le cas d'un cancer du sein localisé, il existe plusieurs types de traitements classiques considérés comme curatifs : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie.<sup>6</sup> En plus de ces thérapies, il existe des traitements permettant de toucher préférentiellement les cellules cancéreuses, comme l'hormonothérapie et l'immunothérapie.<sup>7</sup> Ces traitements peuvent être utilisés seuls ou combinés.

### Chirurgie

La chirurgie est l'un des principaux traitements utilisés en cas de cancer du sein localisé. Il existe plusieurs types de chirurgies possibles et dépendantes de l'évolution de la tumeur.<sup>8</sup> Dans le cas d'une tumeur de taille minime (jusqu'à un quart du volume du sein), il est possible de procéder à une

chirurgie conservatrice, consistant en la simple ablation de la tumeur et d'une petite partie des tissus sains avoisinant. La chirurgie conservatrice représente 75 à 85% des opérations.<sup>9</sup> Dans le cas d'une tumeur plus volumineuse (à partir du stade 2), ou si le cancer a touché plusieurs zones du sein, il est nécessaire de procéder à une mastectomie, à savoir l'ablation totale du sein.<sup>10</sup> Par la suite, il est possible de procéder à une chirurgie reconstructrice afin de retrouver une certaine intégrité physique.<sup>11</sup>

Cependant, les chirurgies peuvent présenter certains inconvénients tels que des douleurs suite à l'opération, de la fatigue, des problèmes lymphatiques, des infections ou des changements physiques pouvant dégrader l'état de santé mentale des patientes.<sup>12</sup>

## Chimiothérapie

La chimiothérapie consiste en l'utilisation de petites molécules ayant pour but de détruire les cellules cancéreuses ou d'empêcher leur prolifération en stoppant leur croissance.<sup>13</sup> Les cellules cancéreuses ont la capacité de se diviser rapidement et ont donc un métabolisme plus important. Ainsi, ces cellules se retrouvent avec des quantités plus importantes de molécules cytotoxiques que les cellules ne se divisant pas ou peu. Cependant, certaines cellules saines telles que les follicules pileux se divisent également rapidement, et peuvent métaboliser les molécules de chimiothérapie. En touchant les cellules saines, la chimiothérapie peut provoquer des effets néfastes comme de la fatigue, de la douleur, des saignements, de l'infertilité, un risque plus élevé d'infection, des problèmes dans le système nerveux ou des problèmes pouvant toucher le cœur.<sup>14</sup>

Ces molécules sont généralement utilisées en combinaison afin d'accroître leur efficacité.<sup>13</sup> Il existe deux cas où la chimiothérapie est utilisée en combinaison avec la chirurgie : la chimiothérapie adjuvante et néo-adjuvante. Dans le cas d'une chimiothérapie dite adjuvante, des molécules sont utilisées après la chirurgie afin de limiter la croissance d'une nouvelle tumeur, et ainsi augmenter le taux de survie et diminuer le risque de récurrence.<sup>15</sup> Dans le cas d'une chimiothérapie dite néo-adjuvante, les patients vont utiliser ces molécules avant la chirurgie pour diminuer la taille des tumeurs afin de faciliter l'intervention, voire de permettre une chirurgie conservatrice.<sup>16</sup>

Parmi les molécules utilisées en chimiothérapie, une grande partie sont de la famille des inhibiteurs de kinases, des enzymes impliquées dans de nombreux processus biologiques, dont la croissance tumorale.<sup>17</sup> Ainsi, les molécules agissant sur les kinases sont généralement des inhibiteurs compétitifs de l'adénosine triphosphate mais manquent de sélectivité car les sites actifs de ces enzymes possèdent un domaine très conservé.<sup>18</sup> Le développement de tels inhibiteurs est actuellement en plein essor dans la lutte contre le cancer mais ceux-ci ne seront pas détaillés dans cette thèse.

## Radiothérapie

La radiothérapie consiste en l'utilisation de radiations ionisantes (telles que des rayons X ou des rayons gamma) dans le but de traiter les cellules cancéreuses détectées dans les premières phases de développement de la maladie.<sup>19</sup> Ce type de traitement, en complément d'autres, permet de diminuer le risque de récurrence dans le cas d'un cancer localisé.<sup>20</sup>

Certains effets néfastes peuvent apparaître suite à un traitement par radiothérapie. Ainsi, les radiations peuvent provoquer des dommages dans les nerfs des bras pouvant entraîner douleurs, difficultés de mouvement, dégâts et sensibilité cutanés, voir des problèmes sanguins ou cardiaques.<sup>21</sup> De plus, certains problèmes peuvent apparaître plusieurs mois à plusieurs années après la thérapie.<sup>22</sup>

Les traitements classiquement utilisés que sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie possèdent donc un certain nombre d'effets secondaires plus ou moins néfastes. Dans le but de les éviter, ou au moins de les limiter, des efforts colossaux ont été engagés au cours des dernières décennies en vue de développer des thérapies ciblées, visant sélectivement les cellules tumorales et préservant les cellules saines.

## Traitements ciblés

Le principe de ces nouvelles thérapies repose essentiellement sur le ciblage de protéines surexprimées – voire uniquement exprimées – dans les cellules cancéreuses du sein. Elles sont classiquement réparties en deux grandes familles : l'hormonothérapie et l'immunothérapie. Cette dernière comprend l'utilisation d'anticorps monoclonaux et de conjugués anticorps-médicament. Au cours de ce manuscrit, ce dernier type de traitement sera tout particulièrement détaillé.

### Hormonothérapie

Environ 70% des cancers du sein sont dépendants de production d'hormones afin de pouvoir proliférer car ces hormones, notamment l'œstrogène et la progestérone, sont impliquées dans la croissance et le développement cellulaire.<sup>23</sup> Ainsi, ces cellules cancéreuses possèdent des récepteurs hormonaux spécifiques, les récepteurs des œstrogènes (ou ER pour *estrogen receptor*) et les récepteurs de la progestérone (ou PR pour *progesteron receptor*). Il est possible de traiter ces cellules à l'aide de composés pouvant bloquer ces récepteurs.<sup>24</sup> Ces molécules peuvent agir en tant qu'inhibiteur compétitif et ainsi couper l'alimentation en hormones des cellules cancéreuses, afin d'empêcher leur prolifération.<sup>23</sup> L'hormonothérapie est en général utilisée en complément de la chirurgie et sur de longues périodes. Elle peut être effectuée après l'opération afin de réduire le risque de récurrence, ou avant afin de réduire la taille de la tumeur avant l'opération.<sup>25</sup> Ainsi, l'hormonothérapie permet de limiter la taille des tumeurs, leur propagation et leur transformation en métastases.<sup>26</sup>

### Anticorps monoclonaux ciblant le récepteur HER2

Certains cancers peuvent exprimer certains récepteurs liés à l'agressivité tumorale. Ainsi, entre 20 et 25% des cancers du sein invasifs possèdent une surexpression du récepteur HER2 (pour *Human Epidermal growth factor Receptor-2*),<sup>27</sup> ce qui est souvent synonyme d'une prolifération importante des cellules cancéreuses et de l'augmentation du risque d'apparition de métastases.<sup>28</sup> Cependant, il est possible de cibler ce récepteur à l'aide d'anticorps monoclonaux, entraînant son internalisation et sa dégradation. De plus, le ciblage de ces cellules par l'anticorps peut également permettre le recrutement de cellules immunitaires (macrophages ou cellules *Natural Killer*) afin de détruire les cellules cancéreuses. Plusieurs anticorps ciblant HER2 ont été approuvés par la FDA, comme le trastuzumab en 1998 (premier anticorps monoclonal approuvé ciblant le récepteur HER2), le pertuzumab en 2017 ou le margetuximab en 2020.<sup>29-31</sup>

Dans le cadre de cette thèse, nous nous concentrerons tout particulièrement sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux dans les traitements anticancéreux. Ainsi, seules ces thérapies seront développées par la suite.

## Généralités et historique sur les anticorps monoclonaux

### Concept de « balle magique »

Paul Ehrlich, lauréat du prix Nobel de physiologie et de médecine en 1908, est le premier scientifique à raisonner sur le concept de « balle magique » au début du XX<sup>ème</sup> siècle. Ce concept repose sur l'idée de trouver un moyen pour que les médicaments atteignent directement leurs cibles cellulaires sans affecter les cellules saines.<sup>32</sup>

Plusieurs décennies plus tard, cette idée a pu se concrétiser grâce à l'utilisation d'anticorps et notamment grâce à l'avènement des anticorps monoclonaux (ou mAb pour *monoclonal Antibody*).

### Généralités sur les anticorps monoclonaux

Un anticorps monoclonal est une glycoprotéine ayant une forte spécificité pour un seul antigène correspondant. Il existe différents types d'anticorps, aussi appelés immunoglobulines (Ig), ayant chacun leur propre spécificité, avec cinq classes différentes, ou isotypes (IgG, IgE, IgD, IgM ou IgA). Les IgG sont la classe d'anticorps la plus abondante et peuvent être séparées en quatre sous-classes (IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4). Parmi tous les anticorps, nous allons uniquement développer ici la classe des IgG1, classe la plus utilisée.<sup>33</sup>

D'un point de vue structurel, les IgG1 sont des protéines homodimériques ayant une forme de Y. Ils sont constitués de deux chaînes lourdes (composées de plusieurs domaines appelés CH<sub>1</sub>, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> et VH) et de deux chaînes légères (composées de domaines CL et VL). Ces chaînes sont maintenues entre elles de manière covalente grâce à quatre ponts disulfures, deux entre les chaînes lourdes et deux faisant la liaison entre une chaîne lourde et une chaîne variable (Figure 1).<sup>34</sup>

Les IgG1 sont composés de deux fragments distincts, le fragment variable et le fragment conservé. C'est le fragment variable qui va permettre la reconnaissance entre un anticorps et sa cible, et est donc responsable de la grande affinité entre eux ( $K_D$  fragment variable/antigène =  $10^{-9}$ - $10^{-12}$  M) (Figure 1).<sup>35,36</sup> Cette partie variable est composée de la région déterminant la complémentarité (ou CDR pour *complementarity-determining region*). Les CDRs permettent la reconnaissance entre un anticorps et l'antigène correspondant et forment le paratope. Le fragment conservé est essentiel pour la stabilité des anticorps dans la circulation, afin d'augmenter le temps de demi-vie, et pour la reconnaissance par les cellules immunitaires car c'est ce fragment qui sera reconnu par les récepteurs Fcγ présents sur les cellules immunitaires ( $K_D$  Fc/FcγR =  $10^{-9}$  M).<sup>37</sup>

Ce fragment comporte un motif glycosidique, situé sur l'asparagine 297, en partie responsable de l'affinité entre le fragment conservé et les récepteurs Fcγ, et dont la structure et l'affinité diffèrent selon le type d'IgG (Figure 1).<sup>38,39</sup>

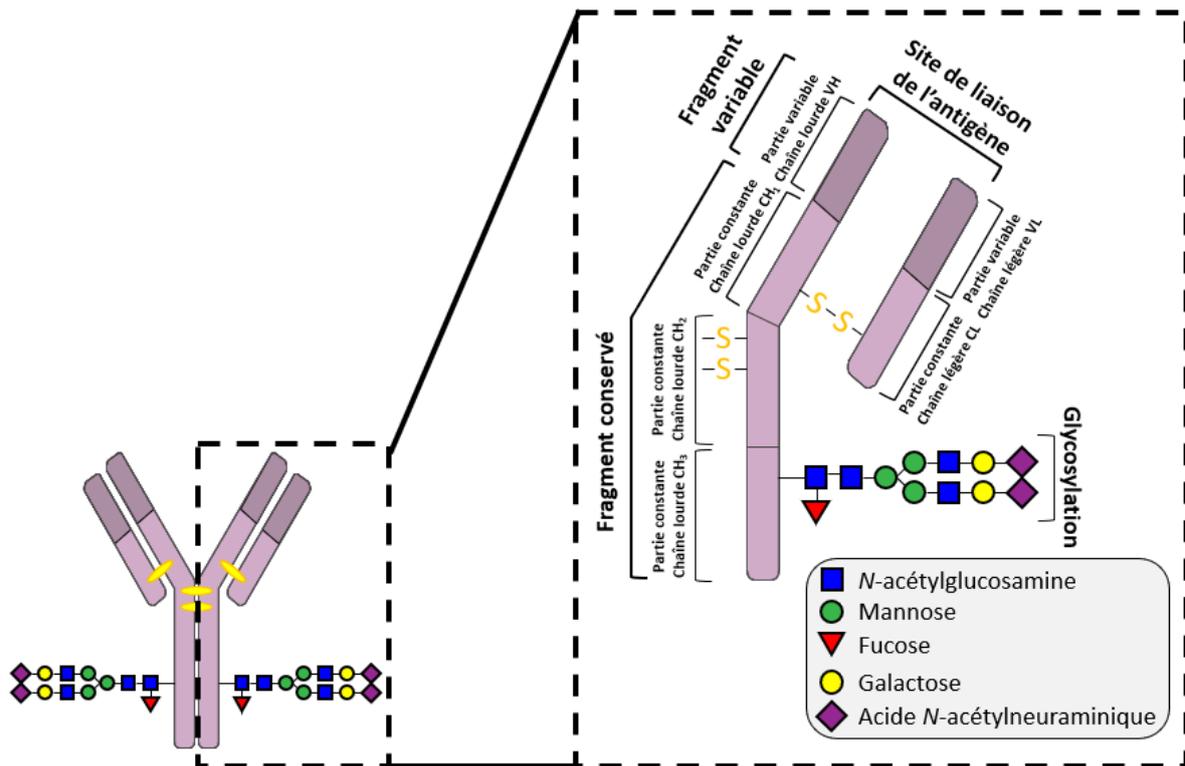


Figure 1 : Structure d'un anticorps monoclonal (IgG1)

Les différentes classes d'anticorps monoclonaux

### Les anticorps monoclonaux murins

En 1975, les chercheurs Georges J. F. Köhler et César Milstein (lauréats du prix Nobel de médecine en 1984) ont décrit un processus de production *in vitro* d'anticorps monoclonaux murins à partir d'hybridomes.<sup>40</sup> Ce processus a permis une production à large échelle d'anticorps avec une excellente pureté. Il faudra attendre 1986 pour que le premier anticorps monoclonal soit approuvé par la FDA pour être administré chez l'humain, l'anticorps monoclonal murin Muromonab-CD3.<sup>41</sup> Cet anticorps a pour cible le récepteur CD3 présent sur la surface des lymphocytes T et est utilisé lors de greffes rénales afin de diminuer les risques de rejet.<sup>42</sup> Cette avancée a été le point de départ du développement d'anticorps monoclonaux pour la thérapie ciblée contre les cancers.<sup>43</sup>

Malheureusement, les anticorps monoclonaux murins ne se sont pas révélés être les « balles magiques » par excellence notamment dû au fait qu'ils sont immunogènes : le corps humain peut donc sécréter des anticorps les ciblant. De plus, les anticorps murins sont caractérisés par une clairance rapide de la circulation (entre 19 et 42 h) par rapport à des anticorps monoclonaux humains (~ 20 jours).<sup>44,45</sup> Il était alors nécessaire de développer des anticorps monoclonaux ayant une meilleure compatibilité avec l'organisme afin de diminuer les risques de clairance.

### *Les anticorps monoclonaux chimériques*

Dans ce but, la FDA a approuvé en 1994 le premier anticorps chimérique, abciximab, utilisé pour empêcher l'agrégation des plaquettes humaines pouvant survenir lors de maladies cardiovasculaires en ciblant le récepteur des glycoprotéines IIb/IIIa.<sup>46</sup> Un anticorps chimérique est un anticorps modifié par ingénierie génétique en remplaçant la partie constante des anticorps murins par celle d'anticorps humains, dans le but d'augmenter le temps de circulation dans l'organisme et de réduire l'immunogénicité. Les anticorps chimériques sont donc composés de régions variables (ou paratopes) murins et de partie constante d'anticorps d'origine humaine (Figure 2). Ainsi, les anticorps monoclonaux chimériques peuvent être considérés humain à environ 75%.<sup>47</sup> En 1997, la FDA approuva le premier anticorps monoclonal chimérique destiné à une utilisation en oncologie, le rituximab. Cet anticorps est utilisé dans le traitement du lymphome non-hodgkinien et a pour cible le récepteur CD20, une phosphoprotéine transmembranaire glycosylée exprimée à la surface des lymphocytes B.<sup>48</sup>

### *Les anticorps monoclonaux humanisés*

En parallèle de son approbation du rituximab, la FDA approuva en 1997 le premier anticorps monoclonal humanisé, le daclizumab utilisé pour diminuer le rejet des greffes rénales. Cet anticorps a pour cible l'antigène CD25, présent sur la sous-unité alpha du récepteur interleukine II, lui-même présent sur les lymphocytes T.<sup>49</sup> Un anticorps humanisé est un anticorps humain sur lequel ont été transplantés les CDR d'un anticorps murin (Figure 2). Ainsi, un anticorps humanisé peut être considéré humain à 90%.<sup>50,51</sup> Malgré le fait que le daclizumab ne soit plus utilisé en cas de greffe depuis 2009, il a trouvé une autre indication, à savoir le traitement de la sclérose en plaque pour les patients atteints de récurrence de la maladie.<sup>52</sup>

### *Les anticorps monoclonaux humains*

En 1990, le chercheur Sir Gregory P. Winter mit au point une méthode permettant la découverte de nouveaux anticorps monoclonaux humains, la technique de criblage Phage Display, qui lui valut l'obtention du prix Nobel de chimie en 2018.<sup>53</sup> Cette méthode est basée sur l'utilisation de bactériophages, des virus ne pouvant infecter que des bactéries.<sup>54</sup> Brièvement, en incorporant différents gènes exogènes humains dans des bactériophages filamenteux, ces gènes pouvaient générer, à la surface des bactériophages, un peptide ou une protéine possédant une séquence humaine.<sup>55</sup> Ces derniers, pouvant être un ligand, un fragment d'anticorps ou un anticorps complet, étaient alors mis en présence d'une cible d'intérêt, comme un antigène.<sup>53</sup> Si un complexe bactériophage-protéine montrait une interaction avec la cible d'intérêt, il était isolé et amplifié afin de déterminer la séquence de la protéine, permettant son identification.<sup>56</sup> Ainsi, grâce à l'utilisation de gènes codant pour différents fragments d'anticorps humains, il était alors possible de cribler et de sélectionner efficacement de nouveaux anticorps monoclonaux humains reconnaissant spécifiquement un antigène d'intérêt.<sup>57</sup> La FDA approuva en 2002 le premier anticorps monoclonal humain identifié à l'aide de cette méthode, l'adalimumab. Cet anticorps cible le récepteur TNF- $\alpha$  (pour *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) et est utilisé pour traiter la polyarthrite rhumatoïde.<sup>58</sup>

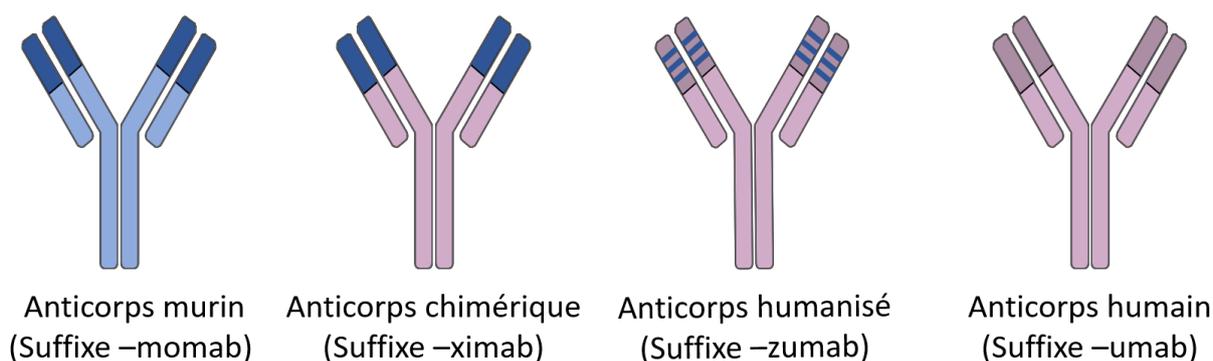


Figure 2 : Représentation schématique des différences entre les types d'anticorps monoclonaux et leurs suffixes

## Diversification des anticorps monoclonaux en thérapie

Depuis l'approbation du premier anticorps monoclonal en 1986, plus d'une centaine d'anticorps monoclonaux (murins, chimérique, humanisés ou humains) ont été approuvés par la FDA, montrant l'essor de ce type de thérapie ciblée.<sup>59</sup> Ces anticorps n'ont pas uniquement des indications en oncologie, comme le montrent par exemple leur utilisation lors de greffes (avec le Muromonab-CD3 ou le daclizumab, approuvés respectivement en 1986 et en 1997), ou encore le traitement de la maladie de Crohn (infliximab, approuvé en 1998<sup>60</sup>), du psoriasis (secukinumab, approuvé en 2015<sup>61</sup>) ou de l'asthme (reslizumab, approuvé en 2016<sup>62</sup>). Ceci démontre l'utilisation très diverse que peuvent avoir les anticorps monoclonaux en thérapie aujourd'hui.<sup>63</sup>

Bien que le concept de balles magiques d'Ehrlich ait pu devenir une réalité grâce aux anticorps monoclonaux, ces derniers manquent d'efficacité face à certains cancers. Certains environnements tumoraux peuvent être riches en cellules immunitaires, auquel cas les anticorps monoclonaux sont suffisamment efficaces en traitement anticancéreux. Cependant, dans le cas d'un environnement tumoral pauvre en cellules immunitaires, les anticorps perdent énormément en efficacité.<sup>64</sup> Afin d'outrepasser ce problème, un nouveau concept a vu le jour, celui d'équiper les anticorps monoclonaux de molécules cytotoxiques.<sup>65</sup> Les anticorps étant des protéines, ils possèdent donc un grand nombre de fonctions chimiques différentes à leur surface sur lesquels des molécules à effets thérapeutiques peuvent être conjuguées, formant ainsi un nouveau type de thérapie : les conjugués anticorps-médicaments (ou ADC, pour *Antibody-Drug Conjugate*). Ce type de thérapie combine les propriétés de ciblage sélectif des anticorps et la cytotoxicité d'une molécule anticancéreuse.

## Conjugués anticorps-médicaments

### Généralités sur les ADCs

Les ADCs représentent une classe d'outils thérapeutiques utilisant des anticorps monoclonaux comme vecteurs pour la délivrance de molécules à effets thérapeutiques, comme des molécules anticancéreuses.<sup>66</sup> Ces molécules thérapeutiques, aussi appelées charges thérapeutiques, sont accrochées sur les acides aminés des anticorps. On qualifie alors le nombre moyen de molécules thérapeutiques (ou drogue) par anticorps grâce à l'abréviation DAR (*Drug to Antibody Ratio*,

ratio anticorps-drogue) désignée plus généralement par le degré moyen de conjugaison (DoC, *Degree of Conjugation*) de l'anticorps.<sup>67</sup>

De façon générale, la molécule à accrocher doit être préalablement modifiée afin d'y incorporer un groupement électrophile permettant la réaction avec les acides aminés nucléophiles présents en abondance sur les anticorps. En règle générale, ce groupement électrophile est séparé du pharmacophore à l'aide d'un composé chimique appelé bras espaceur ou linker et qui modifie drastiquement les propriétés physico-chimiques de la drogue. Ces linkers peuvent être clivables ou non-clivables (Figure 3),<sup>68</sup> ce paramètre influençant directement la structure chimique de la molécule libérée et l'efficacité de l'ADC. De plus, il est possible d'optimiser ces linkers afin de les rendre stables dans la circulation et ainsi éviter un relargage prématuré.

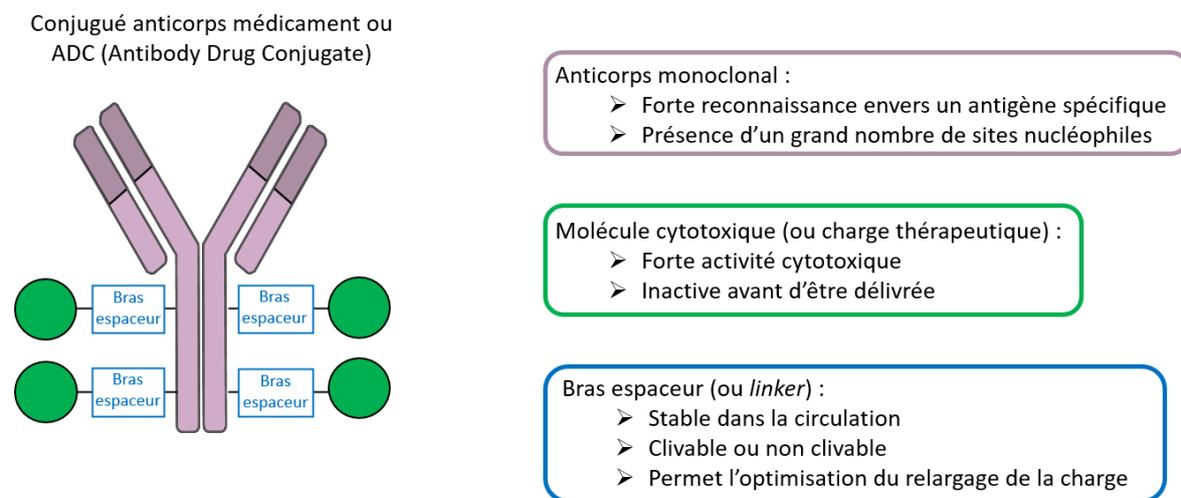


Figure 3 : Structure d'un ADC mettant en avant les différentes parties nécessaires à sa construction : l'anticorps, la charge thérapeutique et le bras espaceur

## Mécanisme d'action général des ADCs

Le mécanisme d'action des ADCs repose dans un premier temps sur leur transport vers l'environnement tumoral puis leur liaison avec le récepteur correspondant. Cette liaison va permettre d'induire une voie de signalisation qui aura pour but d'internaliser le complexe ADC-récepteur par endocytose. Une fois dans la cellule, les ADCs peuvent être dégradés par des protéases dans le lysosome, libérant ainsi les molécules thérapeutiques qui pourront agir sur leur cible respective en fonction de leur mécanisme d'action. Ces molécules peuvent être soit sous forme native (utilisation d'un linker clivable) soit sous forme de métabolite comprenant le linker non-clivable et l'acide aminé utilisés pour l'étape de conjugaison. Une fois dans le cytoplasme, les molécules cytotoxiques vont agir sur leur cible respective, menant à la mort de la cellule (Figure 4).<sup>69,70</sup>

Enfin, il existe un autre phénomène pouvant intervenir dans le mécanisme d'action des ADCs : l'effet bystander.<sup>71</sup> Après relargage des charges thérapeutiques dans la cellule, un certain nombre d'entre-elles peuvent rejoindre l'environnement extracellulaire et diffuser au sein de cellules voisines, entraînant la mort de cellules n'ayant pas été initialement ciblées par l'ADC. Ce phénomène peut aussi apparaître dans le cas où les composés cytotoxiques sont libérés, notamment en employant des linkers peu stables, dans la circulation, avant l'internalisation de l'anticorps dans sa cellule cible. L'efficacité

de l'ADC approuvé Trodelvy® **39** repose sur ce mécanisme de libération extracellulaire en utilisant un motif carbonate, facilement hydrolysable.<sup>72</sup> L'effet bystander possède un fort intérêt pour le ciblage de tumeurs solides car les charges thérapeutiques libérées pourront agir efficacement sur la masse tumorale adjacente. A l'inverse, dans le cas de tumeurs hématopoïétiques, ou tumeurs liquides, les composés cytotoxiques libérés suite à la mort cellulaire rejoindront la circulation sanguine, menant à une diffusion dans l'organisme pouvant ainsi affecter un certain nombre de cellules saines. De ce fait, le choix de la charge thérapeutique est très important afin d'obtenir ou non un effet bystander en fonction du type de tumeur ciblée.

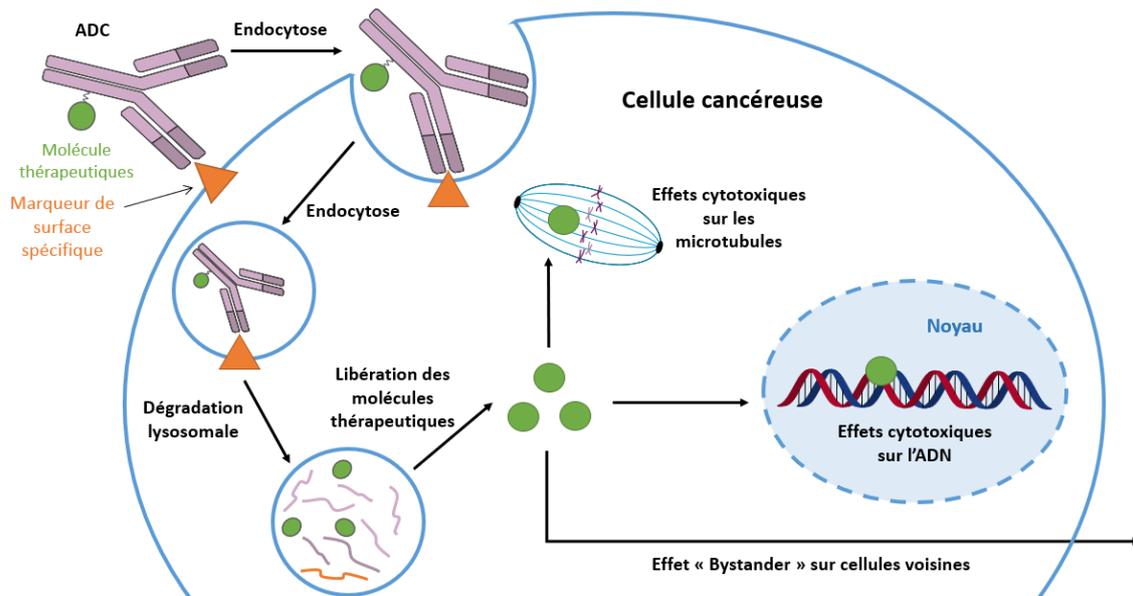
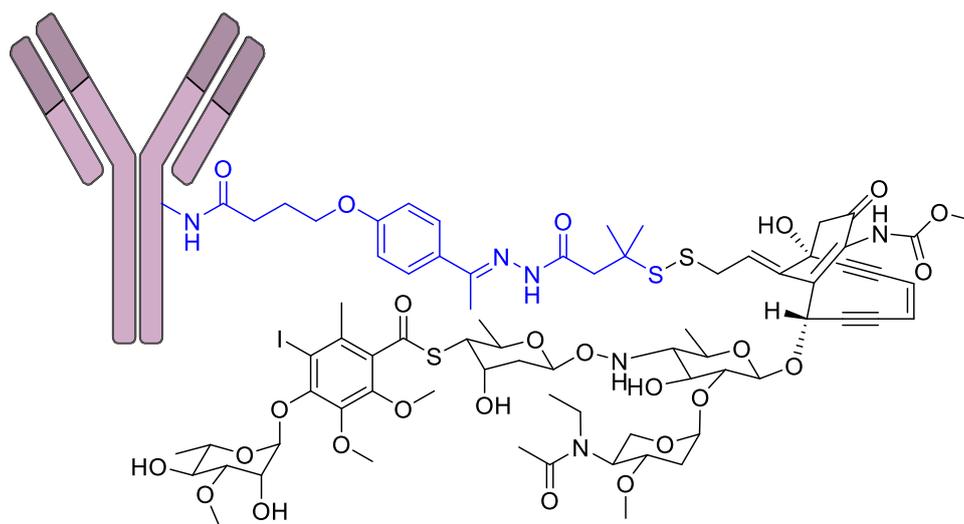


Figure 4 : Mécanisme d'action général des ADCs. Les immunoconjugués seront internalisés par endocytose après leur liaison aux antigènes. Ils seront ensuite dégradés par les protéases dans le lysosome permettant leur libération dans les cellules. Les charges thérapeutiques pourront alors exercer leur mécanisme d'action (soit en ciblant les microtubules, soit l'ADN) et/ou l'effet bystander sur les cellules voisines.

#### ADCs approuvés par la FDA

C'est en 2000 que le premier ADC fut approuvé par la FDA : le Mylotarg® **1** (ou gemtuzumab ozogamicin), un ADC utilisé pour traiter les leucémies aiguës myéloïdes récidivantes, souvent très hétérogènes.<sup>73</sup> Cet ADC est composé d'un anticorps monoclonal humanisé (le gemtuzumab) conjugué à une molécule cytotoxique (la calichéamicine **29**) à l'aide d'un linker acido-clivable hydrazone (Figure 5).<sup>74</sup> L'anticorps gemtuzumab a pour cible le récepteur CD33 qui est exprimé sur des cellules cancéreuses de leucémie blastique.<sup>75</sup>



Mylotarg<sup>®</sup> 1

Figure 5 : Structure du Mylotarg<sup>®</sup> 1 composé de l'anticorps monoclonal humanisé gemtuzumab, de la molécule cytotoxique calichéamicine 29 (en noir) et du linker clivable hydrazone (en bleu)

Depuis le Mylotarg<sup>®</sup> 1, pas moins de 11 ADCs ont été approuvés par la FDA (Tableau 1). Parmi eux, neuf ont été approuvés entre 2017 et 2022, montrant l'intérêt récent de ce type de thérapie contre le cancer.<sup>76,77</sup> Cependant, certains d'entre eux ont été retirés de la commercialisation comme le Mylotarg<sup>®</sup> 1 en 2010 et le Blenrep<sup>®</sup> 18 en 2022. Le premier a été retiré car, lors d'un essai clinique aléatoire de phase III, l'index thérapeutique n'était pas aussi bon que prévu.<sup>78,79</sup> De façon surprenante, le Mylotarg<sup>®</sup> 1 a été resoumis à une étude clinique en 2017, lui octroyant une nouvelle approbation par la FDA et permettant une nouvelle fois sa commercialisation. Cela a pu être permis en optimisant le traitement, notamment en diminuant les doses et en augmentant les délais entre plusieurs administrations.<sup>80</sup> Le second a été retiré du marché car il ne respectait pas les exigences du règlement d'approbation accélérée de la FDA, mais reste utilisé en clinique sur le marché européen, l'EMA considérant que les bénéfices de ce médicament sont plus importants que les risques.<sup>81</sup>

Tableau 1 : Récapitulatif des ADCs approuvés par la FDA<sup>76,77,82</sup>

ADC	Année d'approbation par la FDA	Indication	Anticorps	Récepteur	Drogue	Linker	DAR
Mylotarg®	2000/2017	Leucémie myéloïde aiguë récidivante	gemtuzumab	CD33	Calichéamicine	Disulfure (sensible au glutathion)	1,5
Adcetris®	2011	Lymphome Hodgkien récidivant et lymphome systémique récidivant	brentuximab	CD30	MMAE	MC-ValCit-PAB (clivage enzymatique)	4
Kadcyla®	2013	Cancer du sein métastatique HER2 positif	trastuzumab	HER2	DM1	SMCC (non-clivable)	3,5
Besponsa®	2017	Leucémie lymphoblastique aiguë récidivante	inotuzumab	CD22	Calichéamicine	Disulfure (sensible au glutathion)	6
Polivy®	2019	Lymphome diffus à grandes cellules B récidivant	polatuzumab	CD79b	MMAE	MC-ValCit-PAB (clivage enzymatique)	3,5
Padcev®	2019	Carcinome urothélial localement avancé ou métastatique	enfortumab	Nectin-4	MMAE	MC-ValCit-PAB (clivage enzymatique)	3,8
Enhertu®	2019	Cancer du sein HER2 positif non résécable ou métastatique	trastuzumab	HER2	DXd	MC-GlyGlyPheGly (clivage enzymatique)	8
Trodely®	2020	Cancer du sein triple négatif métastatique	sacituzumab	Trop-2	SN38	SMCC-PEG <sub>8</sub> -Lys-PAB (acido-labile)	7,6
Blenrep®	2020	Myélome multiple récidivant	belantamab	BCMA	MMAF	MC (non-clivable)	4
Zynlonta®	2021	Lymphome à grande cellules B	loncastuximab	CD19	Dimère de PBD	Mal-PEG8-ValAla-PAB (clivage enzymatique)	2,3
Tivdak®	2021	Cancer du col de l'utérus métastatique	tisotumab	Facteur tissulaire	MMAE	MC-ValCit-PAB (clivage enzymatique)	4
Elahere®	2022	Cancer des ovaires résistant aux traitements à base de platine	mirvetuximab	FR $\alpha$	DM4	Sulfo-SPDB(sensible au glutathion)	3-4

## Méthodes de bioconjugaison

Les anticorps étant des protéines, il est possible de toucher sélectivement certains acides aminés nucléophiles à l'aide de molécules électrophiles. Cette étape s'appelle la bioconjugaison, et est responsable de la quantité de charges thérapeutiques par anticorps, le DAR.<sup>83</sup> Il est important de bien maîtriser cette étape afin que tous les anticorps du milieu réactionnel soient convertis en ADC et ainsi limiter la présence d'anticorps non conjugués. Les principaux résidus nucléophiles utilisés sont les lysines et les cystéines.<sup>84</sup> Seuls ces deux acides aminés seront présentés ici.

### Lysine

Les lysines sont les acides aminés les plus présents sur les protéines, les anticorps en étant composés d'environ 90. Cependant, elle ne sont pas toutes conjuguables ni exposées au solvant.<sup>85</sup> Leur chaîne latérale est composée d'une amine primaire pouvant être ciblée par une molécule électrophile. Les groupements fonctionnels les plus utilisés pour les bioconjugaisons sur les lysines sont les esters activés, permettant de former une liaison amide stable en milieu biologique.<sup>83</sup> Cependant, il n'est pas possible de contrôler le site de liaison et le nombre de lysines touchées avec des méthodes standards.<sup>86</sup> De ce fait, la conjugaison lysine entraînera, dans la grande majorité des cas, la formation d'un mélange très hétérogène pouvant influencer les paramètres pharmacocinétiques des ADCs.<sup>87</sup> Mais il est possible d'influencer le degré de conjugaison en modifiant les quantités de réactifs utilisées pour tendre vers des DAR entre 3 et 4, afin de ne pas avoir une conjugaison trop élevée, ce qui diminuera l'hétérogénéité tout en convertissant totalement les anticorps.

Quatre ADCs approuvés par la FDA ont été fonctionnalisés en utilisant une étape de bioconjugaison lysine : Mylotarg® **1**, Kadcyla® **11**, Besponsa® **30** et Elahere® **13**.

### Cystéine

Seules 32 cystéines sont présentes sur les anticorps.<sup>83</sup> De plus, uniquement 8 d'entre elles sont accessibles, celles présentes sous forme de pont disulfure. Il est donc nécessaire de passer par une première étape de réduction à l'aide d'agents réducteurs tels que le TCEP (tris(2-carboxyéthyl)phosphine) ou le DTT (dithiothréitol)<sup>83</sup> afin de libérer les thiols, deux par deux, menant à une distribution plus homogène que les conjugaisons lysines. Le thiol de leur chaîne latérale peut facilement réagir avec des molécules électrophiles fonctionnalisées notamment avec des accepteurs de Michael.<sup>88</sup> Ainsi, afin de permettre une addition 1-4 avec ces thiols, le groupement le plus utilisé en bioconjugaison est le maléimide, formant un lien thio-éther.<sup>89</sup>

Huit ADCs construits à l'aide d'une bioconjugaison cystéine ont été approuvés par la FDA : Adcetris® **4**, Polivy® **5**, Padcev® **6**, Enhertu® **37**, Trodelvy® **39**, Blenrep® **18**, Zynlonta® **44** et Tivdak® **7**.

### Linkers

Afin de pouvoir accrocher une charge thérapeutique sur un anticorps, il est possible d'utiliser un bras espaceur ou linker.<sup>90</sup> Celui-ci est aussi responsable de l'étape de bioconjugaison et de l'étape de relargage de la charge thérapeutique. Ainsi, les linkers doivent être bifonctionnalisés afin de

comprendre un motif permettant l'incorporation de la drogue et un motif permettant de cibler les acide-aminés.<sup>83</sup> De plus, un linker peut être clivable ou non-clivable, ce paramètre permettant d'optimiser l'étape de relargage de la charge thérapeutique lorsque celle-ci a atteint sa cible.<sup>91</sup> Un linker clivable permet le relargage de la charge thérapeutique après une rupture contrôlée pouvant libérer la drogue de façon native. Un linker non-clivable libère quant à lui le composé sous une forme modifiée.<sup>91</sup>

### Motifs non-clivables

Après la dégradation lysosomale, les composés sont libérés sous forme de métabolites chargés comportant le linker et l'acide aminé utilisé pour l'étape de bioconjugaison. Ainsi, les molécules libérées dans les cellules verront leur caractère hydrophile accru, les empêchant d'être diffusées au travers des membranes cellulaires. Ce phénomène a pour effet de supprimer l'effet bystander et surtout d'empêcher l'élimination des drogues par les pompes d'efflux.<sup>92</sup> Cependant, il est nécessaire que la modification apportée par le linker ne diminue pas l'effet cytotoxique de la charge thérapeutique. Il est donc primordial de l'accrocher sur une fonction de la drogue ne faisant pas partie du pharmacophore.<sup>93</sup>

Il existe deux linkers non-clivables communément utilisés pour l'élaboration d'ADC : le linker SMCC **2** et le linker MC **3**. Ces linkers sont utilisés sur deux ADCs approuvés par la FDA : le premier est utilisé sur le Kadcyra® **1** pour accrocher la drogue DM1 **9**, et le second sur le Blenrep® **18** pour accrocher la drogue MMAF **16**.

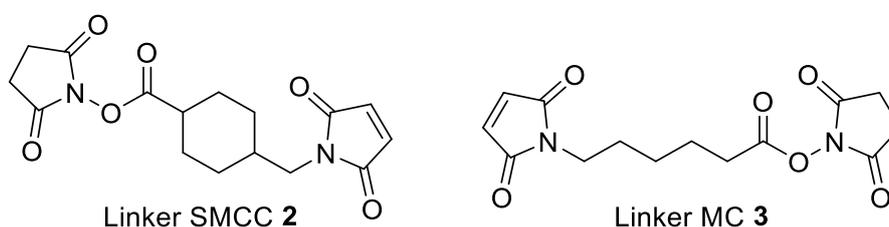


Figure 6 : Structures des linkers non-clivables, à gauche le linker SMCC **2**, à droite le linker MC **3**

### Motifs clivables

Les linkers clivables sont des molécules bifonctionnalisées plus complexes que les linkers non-clivables afin de permettre la libération sous forme native des drogues en fonction de différences dans l'environnement cellulaire.<sup>92</sup> De ce fait, la fonction de la charge thérapeutique utilisée peut être n'importe quelle partie de la molécule, pharmacophore ou non. De plus, comme les molécules cytotoxiques sont sous leur forme native, si elles sont assez hydrophobes pour traverser les membranes cellulaires, l'effet bystander peut s'appliquer et les molécules cytotoxiques pourront alors toucher les cellules voisines.<sup>94</sup>

Il existe plusieurs familles de linkers clivables dont le mécanisme de libération va varier en fonction de l'environnement cellulaire : les linkers permettant un clivage enzymatique, un clivage sous conditions réductrices et un clivage sous conditions acides.

## Clivage enzymatique

Les linkers clivables de façon enzymatique sont de petits peptides (entre deux et quatre acide-aminés) sensibles à certaines enzymes présentes dans le lysosome, les cathépsines.<sup>94</sup> Le compartiment lysosomal présent dans les cellules cancéreuses présente une grande quantité de protéases, dont différentes cathépsines, qui vont reconnaître ce type de linker et les cliver après l'acide-aminé présent sur la position C-terminale. Il existe trois motifs peptidiques utilisés par des ADCs en clinique permettant la libération des composés à l'aide d'un clivage enzymatique en présence de cathépsines. Ces motifs sont le motif ValCit, le motif GlyGlyPheGly et le motif ValAla.<sup>95</sup> Ce changement d'acide-aminés permet notamment de moduler l'hydrophobicité et le taux de clivage.<sup>96</sup>

Il est également nécessaire d'utiliser un bras espaceur. Si la drogue est accrochée directement sur l'acide-aminé en position C-terminal, la gêne stérique ainsi formée va gêner l'accès à l'enzyme, menant à un clivage médiocre. De plus, ces bras-espaceurs doivent être également auto-immolables, permettant leur élimination et la libération de la drogue de façon native afin de conserver son activité cytotoxique.<sup>97</sup>

Ces groupements auto-immolables peuvent être des groupement *p*-aminobenzyle (ou PAB) ou amino-méthylène. Un PAB, une fois séparé du corps peptidique, va provoquer une élimination 1-6 permettant la libération de la drogue.<sup>94,98,99</sup> Un amino-méthylène quant à lui va libérer la drogue après une étape d'élimination 1,2 (Figure 7).<sup>100</sup>

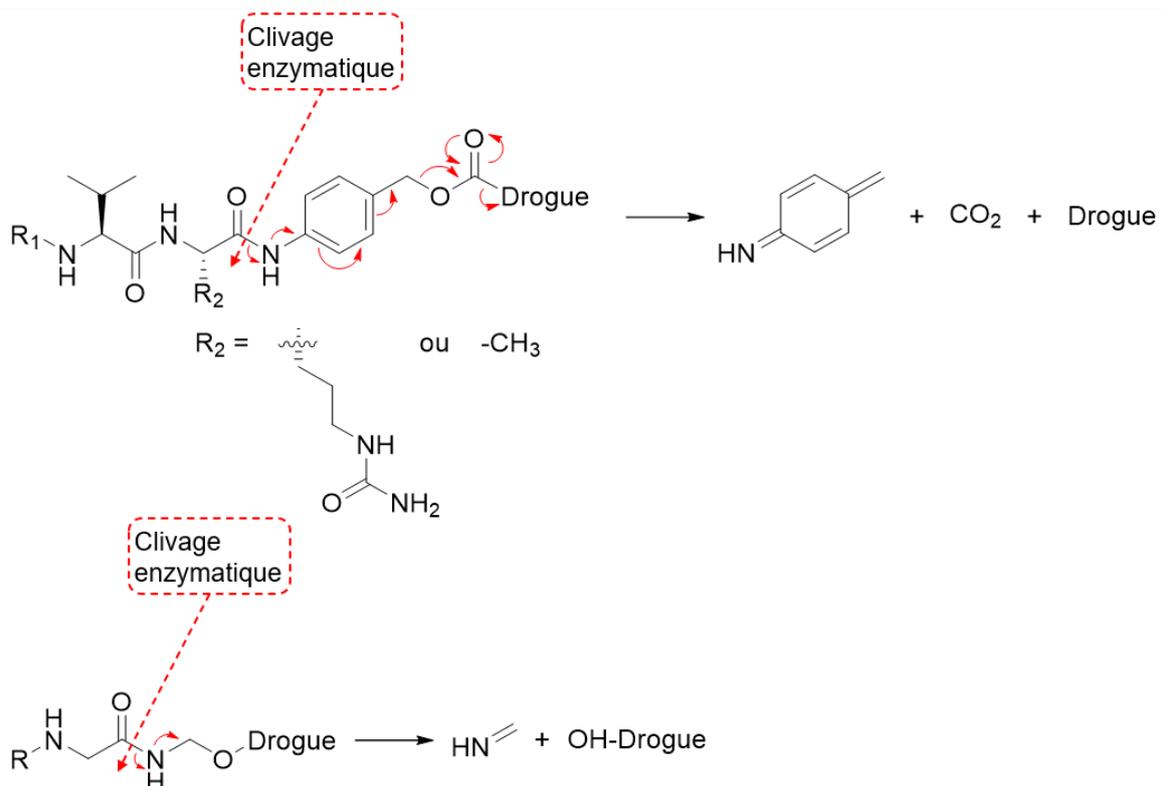


Figure 7 : Mécanisme de libération des drogues à l'aide d'un clivage enzymatique et d'un bras espaceur auto-immolable

Parmi ces trois linkers, le motif ValCit est le motif clivable le plus utilisé, tant en recherche qu'en clinique.<sup>101</sup> En effet, parmi les ADCs approuvés par la FDA, quatre d'entre eux utilisent un motif

ValCit (l'Adcetris® **4**, le Polivy® **5**, le Padcev® **6** et le Tivdak® **7**). De plus, ces quatre ADCs utilisent ce motif afin de libérer la MMAE **15** (Figure 8).<sup>99</sup>

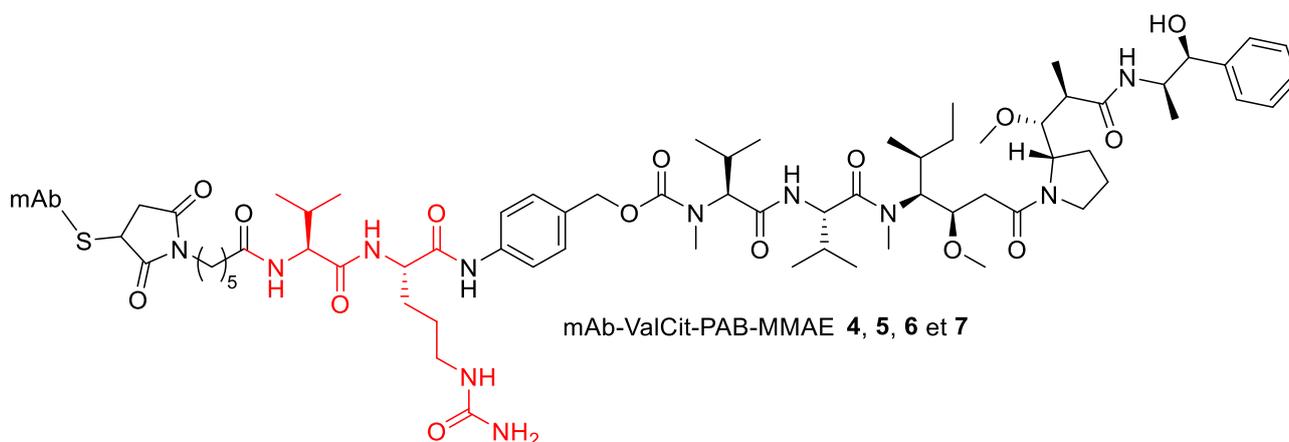


Figure 8 : Structure des ADCs comportant le motif ValCit (en rouge) permettant le relargage de la MMAE **15**

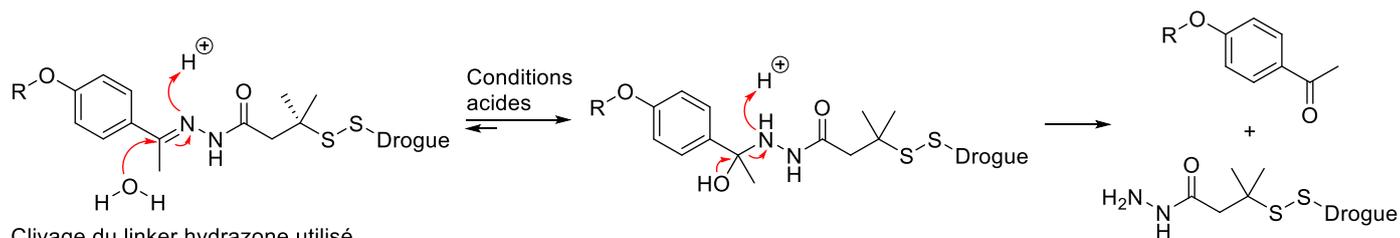
Deux autres ADCs approuvés sont également composés d'un linker clivable de façon enzymatique, l'Enhertu® **37** et le Zynlonta® **44**. L'Enhertu® **37** est composé de la drogue DXd **32** sur laquelle est greffé un motif tetrapeptidique GlyGlyPheGly. Le Zynlonta® **44** quant à lui est composé de la drogue tesirine **41** sur laquelle est greffé un linker dipeptidique ValAla.

#### Clivage acide

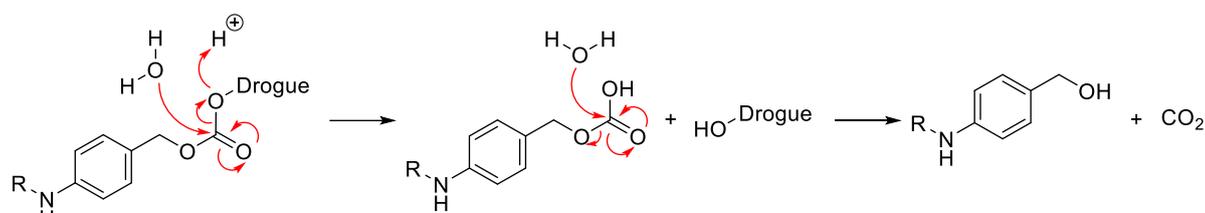
Tout en étant stables à pH physiologique, certains linkers sont sensibles à un environnement acide (pH entre 4 et 5) présent dans certains compartiments cellulaires.<sup>102</sup> C'est le cas notamment des compartiments lysosomal et endosomal, respectivement avec un pH de 4,8 et de 5-6.<sup>94,98</sup> Ainsi, ces linkers, construits avec une liaison sensible à une hydrolyse acide, permettent le relargage de leurs charges thérapeutiques avant ou après internalisation lorsqu'elles traversent l'environnement acide des cellules cancéreuses.

Il existe trois ADCs approuvés et construits avec un linker acido-labile, le Mylotarg® **1**, le Besponsa® **30** et le Trodelvy® **39**. Le Mylotarg® **1** et le Besponsa® **30** sont tous deux conjugués avec la même drogue, la calichéamicine **29**, et le même linker, un linker acido-clivable hydrazone. De plus, le linker utilisé pour ces ADCs est également composé d'un pont disulfure, motif sensible aux réductions en présence de glutathion, permettant la libération sous forme native de la drogue après l'étape d'hydrolyse acide (Figure 9).

Le Trodelvy® **39** quant à lui est conjugué avec la drogue SN38 **33** et le linker acido-labile SMCC-PEG<sub>8</sub>-Lys-PAB-PNP **38** permettant un clivable extra- et intra-cellulaire (Figure 9).



Clivage du linker hydrazone utilisé pour le Mylotarg® **1** et le Besponsa® **30**



Clivage du linker carbonate utilisé pour le Trodelvy® **39**

Figure 9 : Mécanismes de clivage acide

### Clivage sous conditions réductrices

Certains linkers peuvent être clivés sous conditions réductrices, notamment en présence de glutathion, une molécule capable d'effectuer des échanges de thiols et donc de réduire les ponts disulfures. Cette molécule est un pseudo-tripeptide composé d'un acide glutamique (Glu), une cystéine (Cys) et d'une glycine (Gly) (Figure 10).

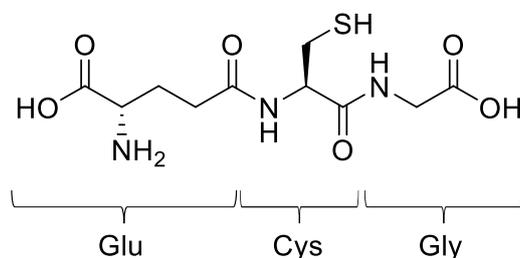


Figure 10 : Structure du glutathion

La présence de la cystéine est responsable de la réduction des ponts disulfures (Figure 11). Le glutathion est très majoritairement présent dans le milieu intra-cellulaire (concentration intra-cellulaire d'environ 1 mM contre 1  $\mu$ M en extra-cellulaire).<sup>103</sup> De plus, la concentration en glutathion est beaucoup plus élevée dans les cellules cancéreuses que dans les cellules saines car cette molécule est nécessaire dans le développement des tumeurs et leur prolifération et est corrélée avec l'augmentation du niveau de stress oxydatif dans ce type de cellules.<sup>104,105</sup> De ce fait, il est possible d'utiliser des linkers sensibles au glutathion dans le but de provoquer un clivage intracellulaire majoritairement dans les cellules cancéreuses par réaction d'échange de thiols libérant les drogues de façons natives.<sup>94,98</sup>

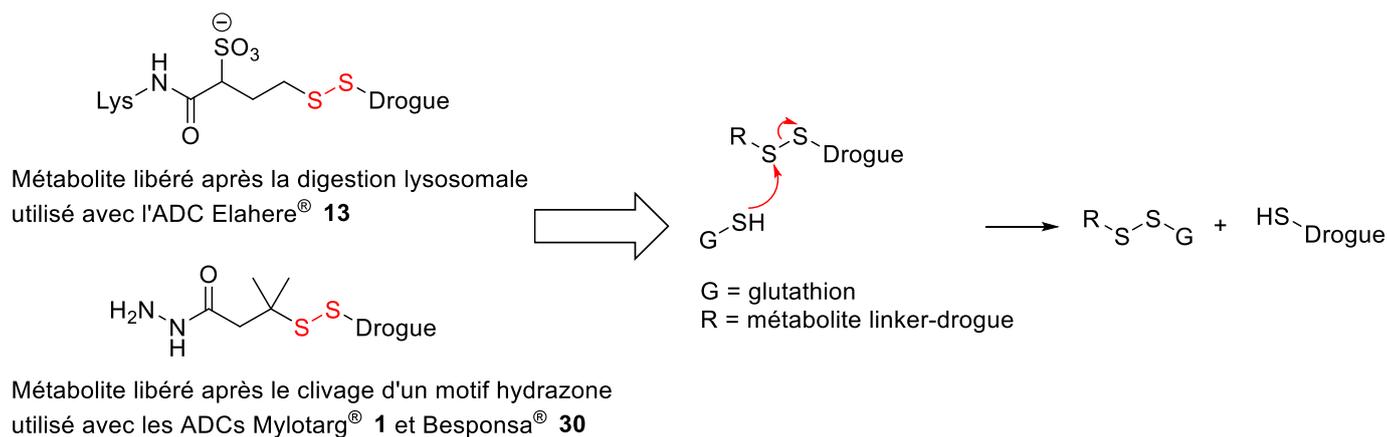


Figure 11 : Mécanisme de clivage des linkers sensibles au glutathion

Trois ADCs utilisant un linker sensible au glutathion ont été approuvés et sont utilisés en thérapie : le Mylotarg® **1**, le Besponsa® **30** et le Elahere® **13**.

### Charge thérapeutique

L'action cytotoxique des ADCs repose sur leur capacité à délivrer efficacement leur charge thérapeutique.<sup>106</sup> Cependant, seul un faible pourcentage (entre 0,001 et 0,01%) de ces conjugués atteignent leur cible et sont internalisés, menant à une faible délivrance des charges thérapeutiques.<sup>98</sup> Etant donné cette faible quantité de molécules délivrées par un ADC, celles-ci doivent avoir une très forte activité cytotoxique pour être efficace.<sup>107</sup>

Ainsi, à l'heure actuelle, les charges thérapeutiques utilisées pour les ADCs approuvés sont soit des inhibiteurs de microtubules, soit des molécules provoquant des dommages dans l'ADN.<sup>108</sup>

### Inhibiteur de microtubules

Les inhibiteurs de microtubules sont des molécules qui vont dérégler le cycle cellulaire en empêchant la transition de la phase G2 à la phase M (pour mitose).<sup>109</sup> Ainsi, la cellule en pleine division restera bloquée entre ces deux phases, empêchant la prolifération des cellules. De plus, les molécules, en se liant aux microtubules, vont modifier l'intégrité structurale de ces dernières, provoquant des altérations cellulaires conduisant à la mort de la cellule.<sup>110</sup> Ces inhibiteurs vont se lier directement sur la structure des microtubules, des fibres dimériques, composées de tubuline- $\alpha$  et  $\beta$ .<sup>111</sup> Ces molécules peuvent se lier sur différents sites de fixation présents généralement sur les sous-unités  $\beta$  : les sites de fixation des vinca-alcaloïdes, des taxanes, de la colchicine, des maytansines, du laulimalide.<sup>112</sup> Il existe également différents types d'inhibiteurs de microtubules, ceux qui vont inhiber la polymérisation des microtubules (favorisant donc la dépolymérisation et empêchant leur assemblage) et ceux qui vont inhiber la dépolymérisation (favorisant la stabilisation des microtubules et empêchant leur désassemblage). Dans ces deux cas, les microtubules se retrouveront figées dans un état leur empêchant d'agir pendant la division cellulaire (Figure 12).<sup>113</sup>

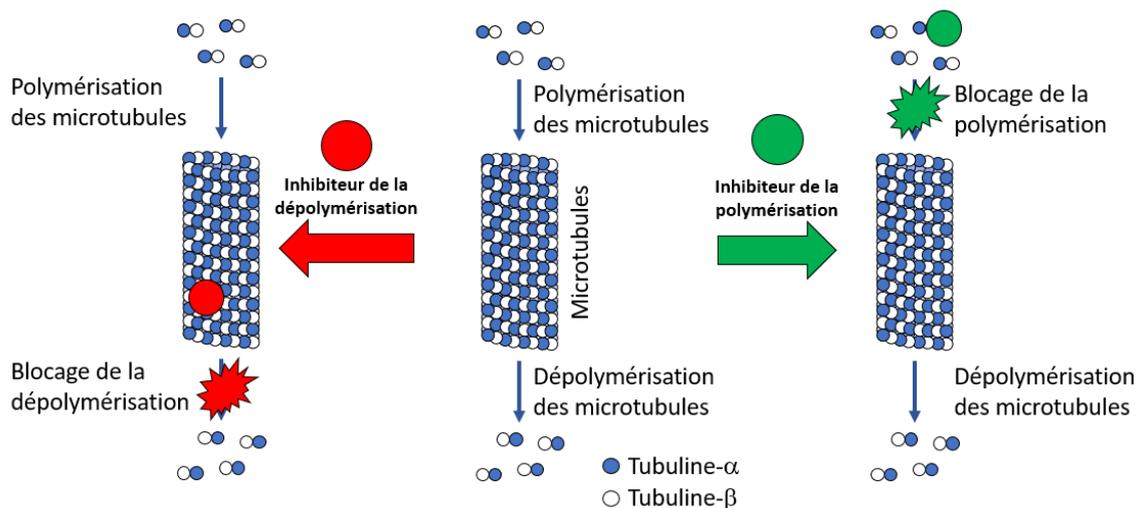
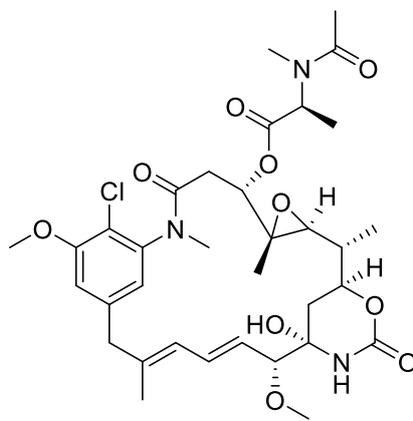


Figure 12 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de microtubules

Deux familles de drogues ciblant les microtubules sont communément utilisées en tant que charge thérapeutique : les maytansinoïdes et les auristatines. Ces composés sont des inhibiteurs de la polymérisation des microtubules.<sup>114</sup> Il existe d'autres familles de poisons mitotiques pouvant avoir un intérêt pour l'élaboration de nouveaux ADCs, mais n'étant pas utilisées en clinique, elles ne seront pas toutes détaillées. Cependant, une de ces familles ainsi qu'une autre molécule en particulier vont être détaillées car faisant l'objet de cette thèse, les vinca-alcaloïdes et la vérubuline **28**.

#### Les maytansinoïdes



Maytansine **8**

Figure 13 : Structure du maytansine **8**

Les maytansinoïdes sont des molécules dérivées du maytansine **8**, un composé hydrophobe macrocyclique dont le cycle principal est composé de 19 atomes. Le maytansine a été isolé d'une plante, le *Maytenus ovatus*, et possède une importante activité cytotoxique envers le fuseau mitotique.<sup>115</sup> Cette activité est due à sa capacité à se lier aux microtubules sur leur site de fixation présent sur la tubuline- $\beta$ <sup>112,116</sup>, avec une constante de dissociation, ou  $K_D$ , d'environ 1  $\mu\text{M}$ .<sup>117</sup> Ces inhibiteurs de la polymérisation des microtubules présentent des concentrations inhibitrices médianes de l'ordre du picomolaire. Ainsi, cette forte activité contre les microtubules fait des maytansinoïdes de mauvais candidats en chimiothérapie du fait de leur cytotoxicité trop grande pour une administration systémique, mais en fait des candidats de choix pour leur utilisation en tant que

charge thérapeutique pour les ADCs. De plus, leur caractère hydrophobe en fait d'excellentes molécules pouvant prétendre à un fort effet bystander.<sup>118</sup>

Cependant, les maytansinoïdes étant des macrocycles hydrophobes, ils sont d'avantage sensibles aux pompes à efflux telle que la glycoprotéine-P, pouvant ainsi réduire l'efficacité de cette famille de molécules.<sup>119</sup> Il est cependant possible de diminuer cet effet en rendant ces molécules plus hydrophiles. C'est le cas pour le Kadcyra® **11**, conjugué à l'aide d'un linker non-clivable formant un métabolite chargé et donc plus hydrophile. De façon surprenante, le Elahere® **13** est conjugué à l'aide d'un linker clivable, libérant le DM4 **10** de façon native, ce qui a pour effet d'augmenter la probabilité que la drogue soit évacuée des cellules. Cela peut s'expliquer par le fait que la glycoprotéine-P est exprimée dans environ 41% des cancers du sein alors qu'elle n'est exprimée que dans 7% des cancers des ovaires.<sup>120,121</sup> Ainsi, la faible proportion de cette protéine dans les cancers des ovaires limite l'effet d'efflux sur les drogues sensibles à cet effet.

Il existe deux analogues du maytansine **8** utilisés en tant que charge thérapeutique sur des ADCs approuvés par la FDA, le DM1 **9** et le DM4 **10**.<sup>122</sup> Comparé au maytansine **8**, le DM1 **9** et le DM4 **10** ont été modifiés sur la fonction acétamide afin d'y accrocher un petit linker alcane portant une fonction thiol permettant l'ajout d'un linker de conjugaison. Cette modification n'altère pas la capacité de ces molécules à se lier sur les microtubules (Figure 14).

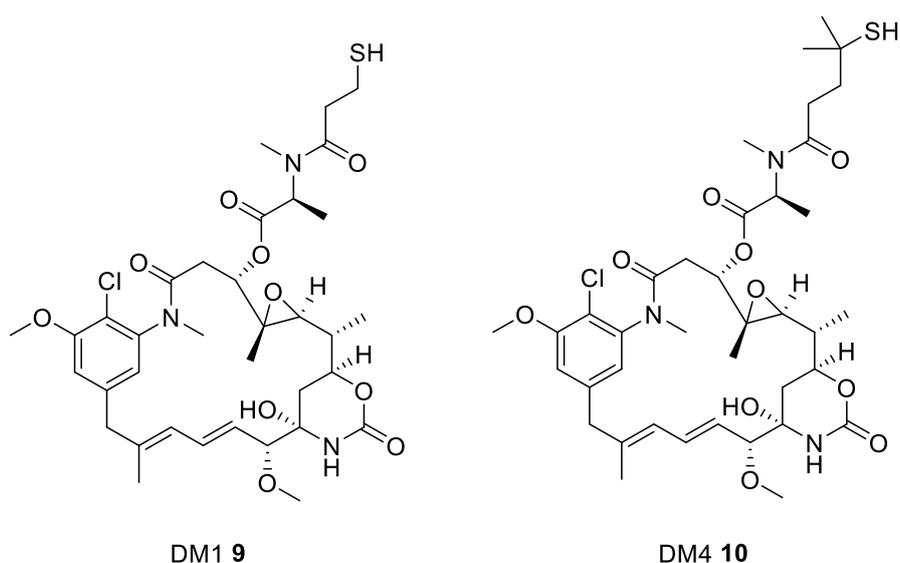


Figure 14 : Structure des analogues du maytansine **4** utilisés en ADC, DM1 **5** pour Kadcyra® **1** et DM4 **6** pour Elahere® **13**

Le DM1 **9** est utilisé en tant que charge thérapeutique avec un ADC approuvé, le Kadcyra® **11**, avec lequel il est conjugué à l'aide d'un linker non-clivable SMCC **2**.<sup>123</sup>

Le thiol présent sur le DM1 **9** va réagir avec la fonction maléimide présent sur le linker grâce à une addition 1,4 de Michael pour former le thioether correspondant. Cette molécule peut alors être bioconjuguée à l'anticorps, trastuzumab, grâce à une réaction d'addition-élimination entre l'amine des lysines et l'ester de NHS du linker (Figure 15).

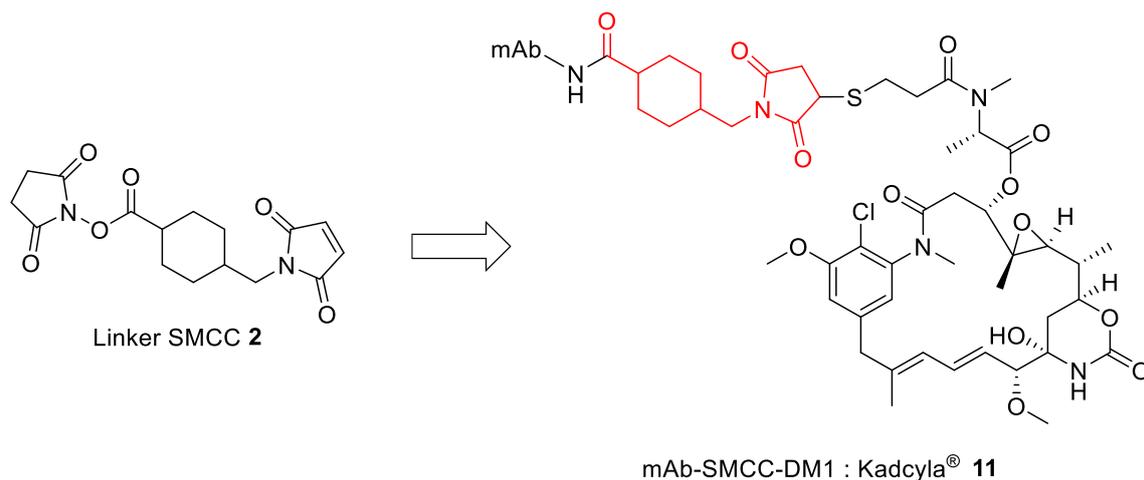


Figure 15 : Structure du linker utilisé pour le DM1 **9** et structure du Kadcyla® **11**

Cet ADC **11** possède un DAR moyen de 3,5. Ce ratio est intéressant ici car il permet d'obtenir un ADC suffisamment cytotoxique et dont l'hydrophobicité reste tolérable<sup>123</sup> Cet ADC **11** est utilisé contre les cancers du sein métastatique HER2 positif, une tumeur solide, avec un linker non-clivable.<sup>124</sup> De ce fait, le métabolite chargé empêchera la diffusion de la drogue, empêchant ainsi l'effet bystander.

Kadcyla® **11** fut le premier ADC approuvé conjugué avec un maytansinoïde. Il possède une forte activité cytotoxique avec une efficacité de l'ordre du subnanomolaire et a présenté un bon ORR (pour *Overall Response Rate*, la proportion de patients dont la tumeur a été significativement réduite lors de test cliniques) de 44%.<sup>123,125</sup>

Le DM4 **10** est utilisé en tant que charge thérapeutique avec un ADC approuvé, le Elahere® **13**, avec lequel il est conjugué à l'aide d'un linker clivable sulfo-SPDB **12** sensible en conditions réductrices.<sup>77</sup>

Le thiol du DM4 **10**, dans le cas du Elahere® **13**, permet d'y attacher le linker sulfo-SPDB **12** par une réaction avec le groupement disulfaneylpyridine afin de former le pont disulfure (Figure 16). Cette liaison disulfure va donner à ce linker son caractère clivable, en présence de glutathion, permettant la libération de la drogue native.<sup>126</sup> De plus, le thiol présent sur le DM4 **10**, contrairement à celui sur le DM1 **9**, est accroché sur une chaîne alcane ramifiée, avec deux groupement méthyles présents en position alpha du thiol. Ce *gem*-diméthyle permet notamment d'apporter de l'encombrement stérique proche de cette liaison, utile afin de diminuer le risque de relargage prématuré de la drogue dans la circulation.<sup>126</sup> Cependant, ce groupement peut également influencer l'étape de relargage dans le cytoplasme en diminuant la reconnaissance de la liaison disulfure par le glutathion.

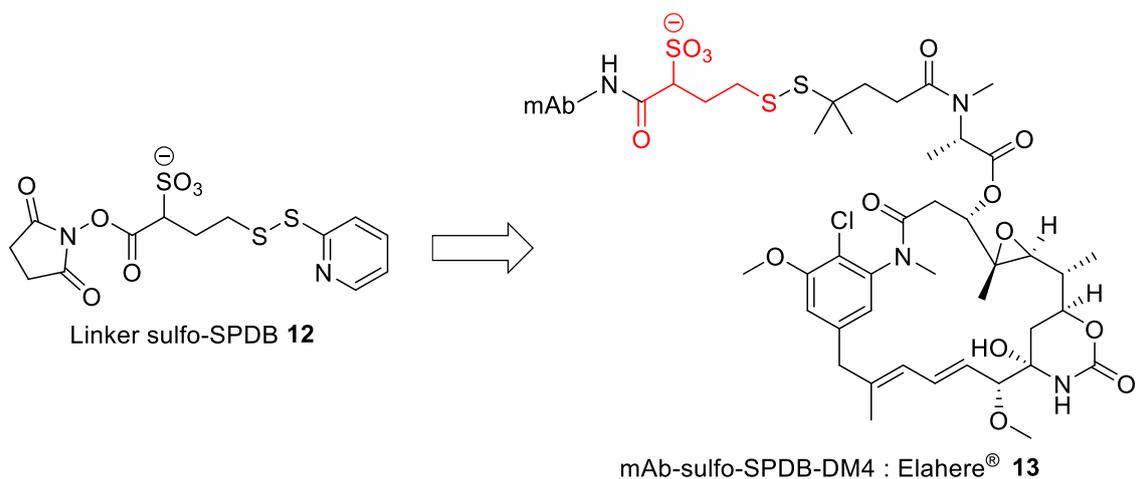


Figure 16 : Structure du linker utilisé pour le DM4 **10** et structure du Elahere® **13**

Le linker est également composé d'un ester de NHS permettant la bioconjugaison en ciblant les lysines par une réaction d'addition-élimination (Figure 16). Le Elahere® **13** possède un DAR moyen de 3,5 pour les mêmes raisons que le Kadcyra® **11**. Enfin, il a une indication contre le cancer des ovaires (ayant déjà montré des résistances face au traitement à base de platine), une tumeur solide.<sup>127</sup> Ainsi, l'utilisation d'un linker clivable, en plus de l'hydrophobicité du DM4 **10**, permet de favoriser l'effet bystander.

Il a fallu attendre 2022 avec l'approbation du Elahere® **13** pour qu'un autre ADC couplé à un maytansinoïde soit utilisé en clinique. Ce conjugué est indiqué contre le cancer des ovaires résistant aux traitements à base de platine. Il possède une activité cytotoxique de l'ordre du subnanomolaire et un ORR de 24% lors d'une étude clinique de phase III.<sup>128</sup> Une hypothèse serait que ce type de cellule cancéreuse serait difficilement accessible comparé à d'autres cancers tels que les cancers du sein, expliquant ainsi un ORR aussi bas.

#### Les auristatines

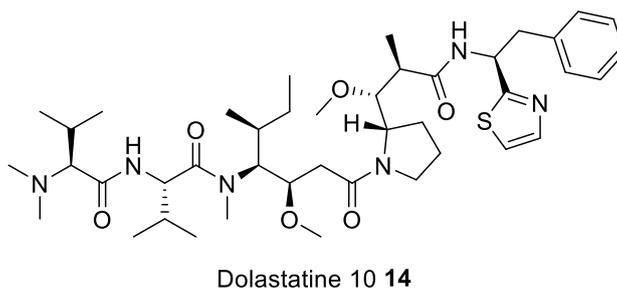


Figure 17 : Structure de la dolastatine 10 **14**

Les auristatines sont des pseudo-peptides (peptides composés d'acide-aminés naturels et non-naturels) dérivés des dolastatines, molécules extraites des *Dolabella auricularia*, des mollusques de mer.<sup>129</sup> Il existe différents analogues naturels dont la dolastatine 10 **14** qui possède l'activité cytotoxique la plus élevée. Cette dernière est composée de quatre acide-aminés : la dolavoline, la valine, la dolaisoleucine et la dolaproine. La partie C-terminale de cette molécule est composée d'une amine, la dolaphénine.<sup>130</sup> La dolastatine 10 **14** possède une forte activité contre la tubuline en se liant sur le site de liaison des vinca-alcaloïdes, présent sur la tubuline- $\beta$ .<sup>112,131</sup> Son activité cytotoxique est de l'ordre du subnanomolaire.<sup>132</sup>

Par la suite, d'autres analogues de la dolastatine **10 14** ont été développés, deux d'entre eux étant communément utilisés en tant que charge thérapeutique pour les ADCs : la monométhylauristatine E (MMAE **15**) et la monométhylauristatine F (MMAF **16**).

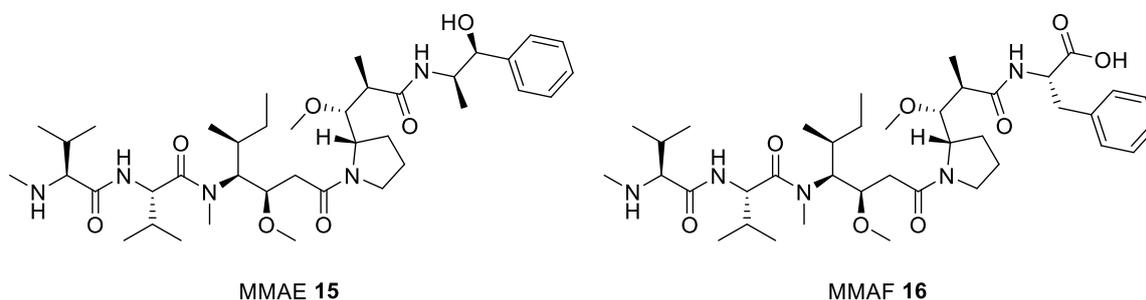


Figure 18 : Structures des auristatines MMAE **15** et MMAF **16**

Ces molécules sont structurellement semblables, mais les différentes modifications apportées vont faire varier certains paramètres (Figure 18).<sup>133</sup> Dans un premier temps, la MMAE **15** et la MMAF **16** sont monométhylées en *N*-terminal, permettant notamment de créer un point d'ancrage sur ces molécules sans diminuer leur affinité pour la tubuline. D'un point de vue structural, la modification des auristatines sur l'extrémité *C*-terminale permettrait de moduler leurs propriétés physicochimiques. D'abord, le cycle thiazole a été retiré car cette modification n'altère pas l'affinité de cette molécule avec la tubuline et son remplacement par un méthyle permet d'accroître l'activité cytotoxique.<sup>134,135</sup> Deux fonctions hydrophiles ont été rajoutées, une fonction hydroxy pour la MMAE **15** et une fonction acide carboxylique pour la MMAF **16**. La MMAE **15** comparée à la dolastatine **10 14** a gardé une efficacité cellulaire similaire, malgré une différence d'affinité que ces molécules ont pour la tubuline ( $K_D = 25$  nM pour la dolastatine **10 14**, 291 nM pour la MMAE **15** et 63 nM pour la MMAF **16**).<sup>134,136</sup> Par contre, l'ajout de l'acide carboxylique sur la MMAF **16** a rendu cette molécule beaucoup plus hydrophile, ce qui a grandement diminué la capacité de cette molécule à traverser les membranes plasmiques, l'empêchant ainsi d'atteindre sa cible intracellulaire. De ce fait, alors que la MMAF **16** a une meilleure affinité pour la tubuline que la MMAE **15**, elle est beaucoup moins toxique ( $IC_{50}$  de l'ordre du nanomolaire pour MMAF **16** et subnanomolaire pour MMAE **15**).

Enfin, contrairement à la MMAE **15**, il est impossible pour la MMAF **16** d'exercer un effet bystander sur les cellules voisines.<sup>137,138</sup> Cette différence est davantage marquée car la MMAE **15** est également sensible aux pompes à efflux alors que la MMAF **16** n'est pas sensible à ce phénomène.<sup>139</sup>

Il est intéressant de noter que les ADCs approuvés par la FDA et composés d'auristatines sont conjugués en ciblant les cystéines des anticorps, permettant d'obtenir une distribution avec des DAR de 2, 4, 6 ou 8. En effet, pour un équivalent d'agent réducteur, il est théoriquement possible de réduire un pont disulfure libérant ainsi deux thiols. Donc, en utilisant deux équivalents d'agent réducteur, il est possible de réduire partiellement les anticorps, menant à un DAR moyen de 4. Ce ratio semble être optimal pour des drogues telles que les auristatines car cela limite le taux d'anticorps non conjugués et les problèmes de stabilité tout en conservant une bonne efficacité cytotoxique.

Ainsi, ces différents paramètres sont à prendre en compte afin de choisir un linker adéquat pour la bioconjugaison avec un anticorps. Dans le cas de la MMAE **15**, il est intéressant de pouvoir relarguer cette molécule de façon native afin qu'elle puisse exercer l'effet bystander pour une utilisation sur des tumeurs solides.<sup>138</sup> C'est pour cela que les ADCs utilisés en clinique sont conjugués

à la MMAE **15** à l'aide d'un linker clivable MC-ValCit-PAB-PNP **17**.<sup>140</sup> Ce linker est composé d'un motif ValCit (clivage enzymatique), d'une fonction carbonate de *p*-nitrophénol (PNP) et d'un maléimide. Le carbonate de PNP est utilisé afin d'accrocher la drogue sur le linker grâce à une réaction d'addition-élimination formant ainsi une liaison carbamate (Figure 19).

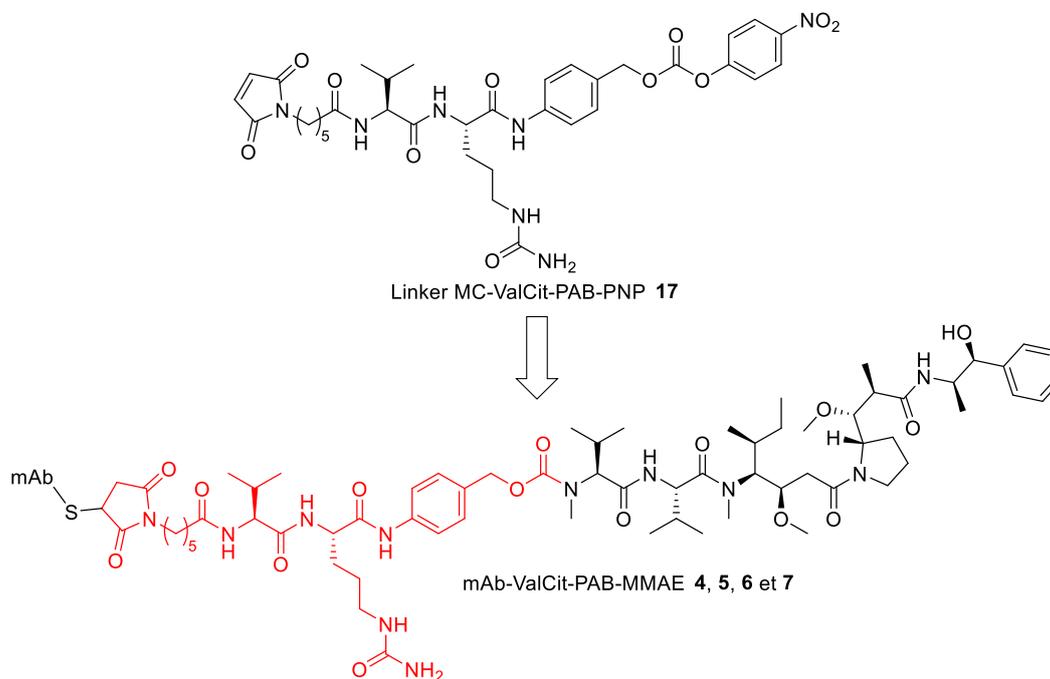


Figure 19 : Structure du linker **17** utilisé pour la MMAE **15** et structure des ADCs composés de cette charge thérapeutique

L'Adcetris® **4** est le premier ADC porteur d'auristatines (MMAE **15**) approuvé en 2011. Ce conjugué est utilisé pour une indication contre les lymphomes Hodgkien récidivants et lymphomes anaplasiques systémiques récidivants. Il a présenté un excellent ORR de 63% lors d'une étude clinique de phase III.<sup>141</sup>

Par la suite, deux ADCs conjugués à la MMAE **15** ont été approuvés en 2019, le Polivy® **5** et le Padcev® **6** ; suivi d'un dernier en 2021, le Tivdak **7**. Le Polivy® **5** est utilisé pour une indication contre les lymphomes diffus à grandes cellules B récidivants. De plus, cet ADC possède un excellent ORR de 76% lors d'une étude clinique de phase III.<sup>142</sup>

Le Padcev® **6** est utilisé pour une indication contre les carcinomes urothéliaux localement avancés ou métastatiques. Il possède un bon ORR de 41% lors d'une étude clinique de phase III.<sup>143</sup>

Le Tivdak **7** est utilisé pour une indication contre les cancers du col de l'utérus métastatiques. Cet ADC présente un ORR de 24% lors d'une étude clinique de phase II.<sup>144</sup> Comme pour le Elahere® **13**, la mauvaise distribution dans ce type de cancer, et donc un accès difficile de la tumeur, pourrait être responsable d'un ORR bas.

Dans le cas de la MMAF **16**, cette molécule étant très hydrophile, l'utilisation d'un linker clivable ne permet pas d'optimiser son utilisation. C'est pour cela qu'il est plus intéressant d'utiliser un linker non-clivable, plus simple structurellement et plus stable dans la circulation.<sup>145</sup> Ainsi, un ADC conjugué à la MMAF **16** serait un médicament intéressant contre les tumeurs hématopoïétiques. Par exemple, le linker utilisé dans le cas de l'ADC Blenrep® **18** est un linker MC **3** composé d'un ester de NHS et d'un maléimide (Figure 20).

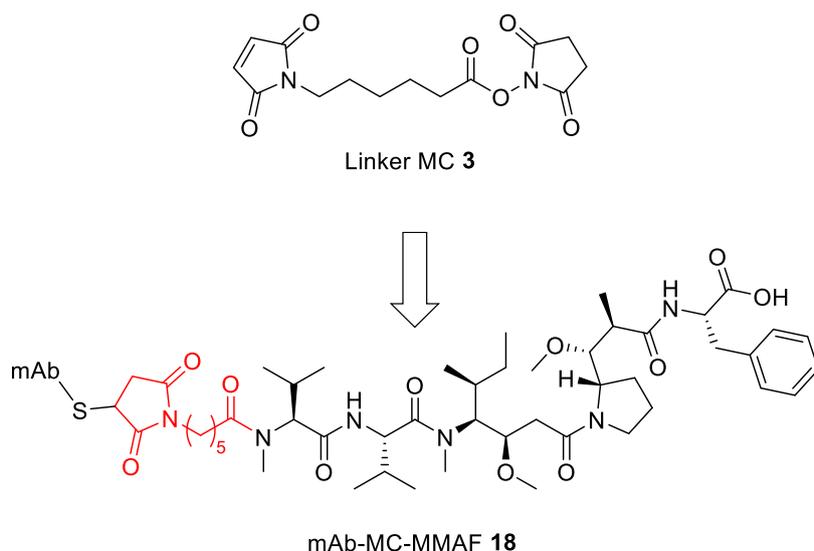


Figure 20 : Structure du linker 3 utilisé pour la MMAF 16 et structure du Blenrep® 18

La FDA a approuvé en 2021 le premier ADC conjugué à la MMAF 16, le Blenrep® 18, indiqué contre les myélomes multiples récidivants. Cet ADC 18 présente un ORR de 31% lors d'une étude clinique de phase II.<sup>146</sup> Malgré que le Blenrep® 18 ne soit plus approuvé par la FDA, son utilisation en Europe est toujours possible grâce à une autorisation de l'EMA.

#### Les vinca-alcaloïdes

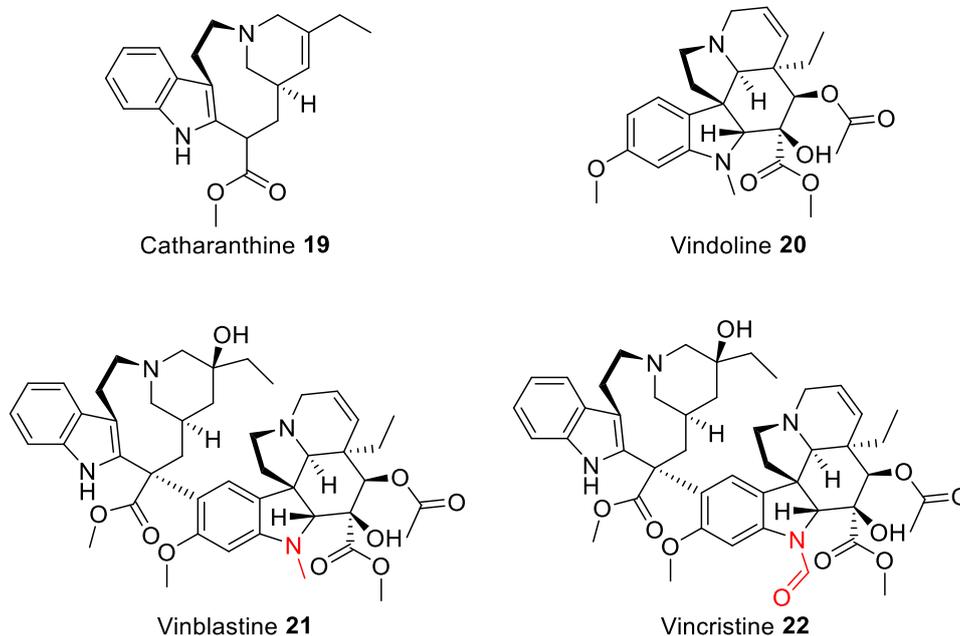


Figure 21 : Structures de la catharanthine 19 et de la vindoline 20, les deux unités composant les vinca-alcaloïdes telles que la vinblastine 21 et la vincristine 22

Les vinca-alcaloïdes sont des molécules alcaloïdes hétérodimériques isolées de plantes, les pervenches, et plus particulièrement la *Catharanthus roseus*.<sup>147</sup> Cette famille de molécule est la plus ancienne famille permettant d'inhiber la polymérisation des microtubules. Ces molécules dimériques sont composées d'une unité de catharanthine 19 et d'une unité de vindoline 20. Il existe deux

vinca-alcaloïdes naturels, la vinblastine **21** et la vincristine **22** dont la seule différence structurale se trouve sur l'azote de l'indoline de la sous-unité vindoline. Ainsi, la vinblastine **21** est fonctionnalisée avec une méthyle amine alors que la vincristine **22** est fonctionnalisée avec un formamide (Figure 21).<sup>148</sup> Il existe également d'autres vinca-alcaloïdes, qui sont des analogues de synthèses, utilisés en clinique : la vindesine **23**, la vinorelbine **24**, et la vinflunine **25** (Figure 22).<sup>149,150</sup> La vinblastine **21** et la vincristine **22** ont été approuvées par la FDA respectivement en 1961 et en 1963 en tant que nouvelles molécules anticancéreuses au vu de leur mécanisme d'action contre les microtubules.<sup>151</sup> Ces molécules sont indiquées pour traiter différents types de cancer comme les leucémies, les lymphomes Hodgkiniens, les cancers du poumon et les cancers du sein.<sup>152</sup>

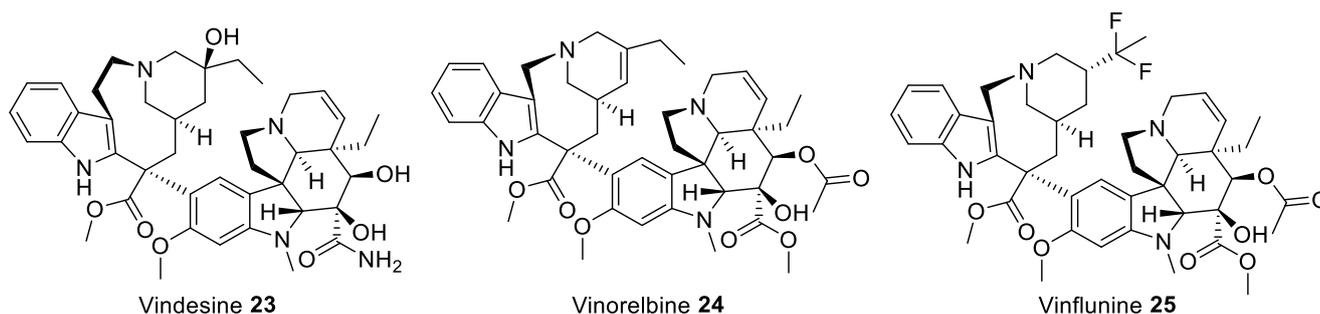


Figure 22 : Structures des vinca-alcaloïdes de synthèse, la vindesine **23**, la vinorelbine **24** et la vinflunine **25**

Les vinca-alcaloïdes peuvent se lier sur la tubuline- $\beta$  des microtubules. Ce sont notamment ces molécules qui ont donné le nom à ce site de liaison, étant les premières molécules découvertes avec ce mécanisme d'action.<sup>153</sup> Ces composés sont des inhibiteurs efficaces et possèdent des activités cytotoxiques de l'ordre du nanomolaire jusqu'au subnanomolaire.<sup>154</sup> Ceci s'explique par leur capacité à se lier fortement à la tubuline- $\beta$ . La vinblastine **21** et la vincristine **22**, les premiers vinca-alkaloïdes découverts, possèdent une constante d'affinité d'environ 1  $\mu\text{M}$  pour la tubuline- $\beta$ .<sup>155</sup>

Grâce à leur caractère hydrophobe, ces molécules présentent la capacité d'exercer un effet bystander sur les cellules voisines des cellules cancéreuses.<sup>156,157</sup> Ce paramètre représente un avantage pour les vinca-alcaloïdes en tant que potentielles charges thérapeutiques pour les ADC, surtout dans le ciblage de tumeurs solides comme par exemple les cancers du sein.

Les vinca-alcaloïdes sont des molécules sensibles aux pompes à efflux, notamment à la glycoprotéine P, menant à un amoindrissement de leur effet cytotoxique.<sup>158,159</sup>

Bien que les vinca-alcaloïdes soient de bons inhibiteurs de la polymérisation des microtubules, aucun ADC approuvé n'est conjugué à l'une de ces molécules. Cependant, utiliser des molécules comme la vinblastine **21** ou la vincristine **22** représenterait un avantage certain dans le but de limiter la toxicité systémique et d'augmenter la qualité de vie des patients. Ces molécules étant moins toxiques que les auristatines ou les maytansinoïdes, une libération prématurée dans la circulation permettrait de diminuer la toxicité systémique et donc de limiter l'apparition d'effets secondaires néfastes. Ainsi, il serait très intéressant de générer un ADC dont la conjugaison serait optimisée afin d'obtenir de nouveaux conjugués anticorps-médicament porteurs de vinca-alcaloïdes.

Dans ce but, un ADC conjugué à la vinblastine **21** a été généré en 1989 en modifiant l'ester méthylique présent sur la sous-unité vindoline de la vinblastine **21** afin d'incorporer un linker

hydrazone, sensible en milieu acide.<sup>160</sup> Cependant, le développement de cet ADC n'a pas été poursuivi par manque d'efficacité, de tolérance et de stabilité.<sup>161</sup>

Afin d'outrepasser ces problèmes, il paraît nécessaire d'optimiser le linker utilisé et donc de trouver de nouveaux points d'accroche. Dans ce but, des chercheurs de Genentech ont publié un article mettant en avant une nouvelle méthode de modification des molécules cytotoxiques fonctionnalisées avec une amine tertiaire dans le but d'y incorporer un linker ValCit-PAB.<sup>162</sup> Les auteurs ont montré qu'à partir d'un analogue du linker ValCit-PAB comportant un chlorure de benzyle (MC-ValCit-PAB-Cl **26**), il était possible de former des ammoniums quaternaires permettant le relargage natif de drogue. Ils ont donc pu fonctionnaliser un panel de molécules cytotoxiques, dont la vinblastine **21**, formant le MC-ValCit-PAB-vinblastine **27** (Figure 23). Cependant, aucun ADC conjugué à un vinca-alcaloïdes n'a été généré, ni lors de ces études ni par la suite.

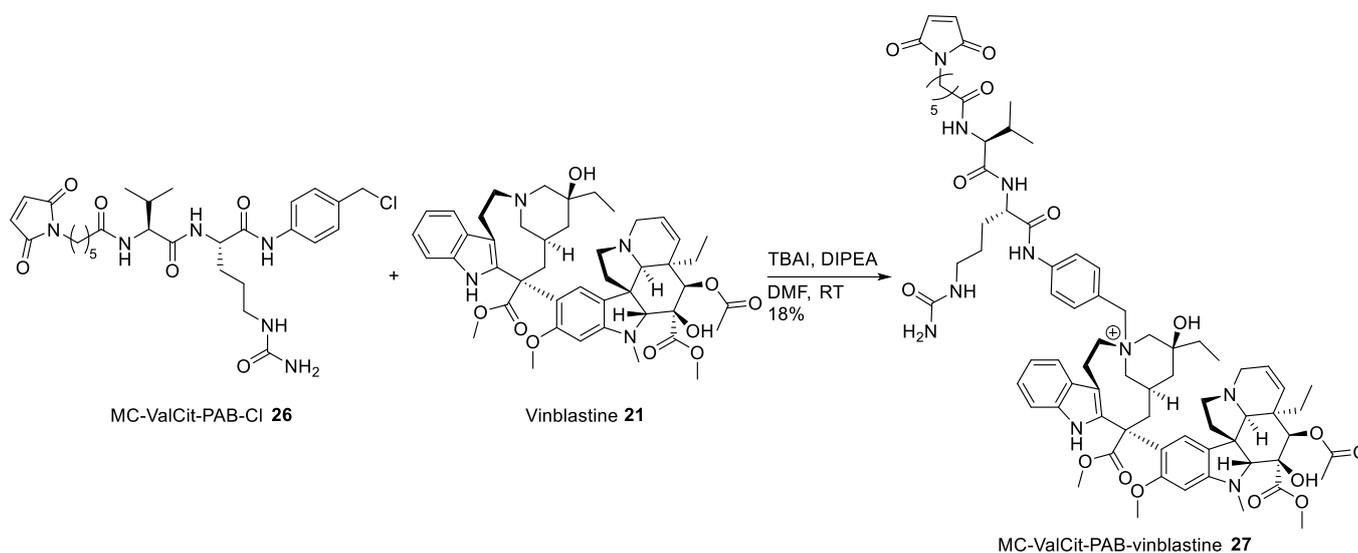


Figure 23 : Stratégie d'alkylation quaternaire développée par Genentech

### La vérubuline

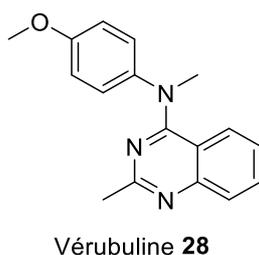


Figure 24 : Structure de la vérubuline **28**

La vérubuline **28** est une molécule de synthèse développée par *Myriad Pharmaceutical* possédant un mécanisme d'action permettant l'inhibition de la polymérisation des microtubules et l'endommagement des vaisseaux sanguins tumoraux.<sup>163</sup>

La vérubuline **28** (Figure 24) possède une forte activité cytotoxique de l'ordre du subnanomolaire.<sup>164</sup> Elle peut se lier efficacement à la tubuline- $\beta$  sur le site de liaison de la colchicine provoquant ainsi l'arrêt de la division cellulaire entre la phase G2 et la mitose. De façon intéressante, comparée à d'autres poisons mitotiques, la vérubuline n'est pas sensible aux pompes à l'efflux,

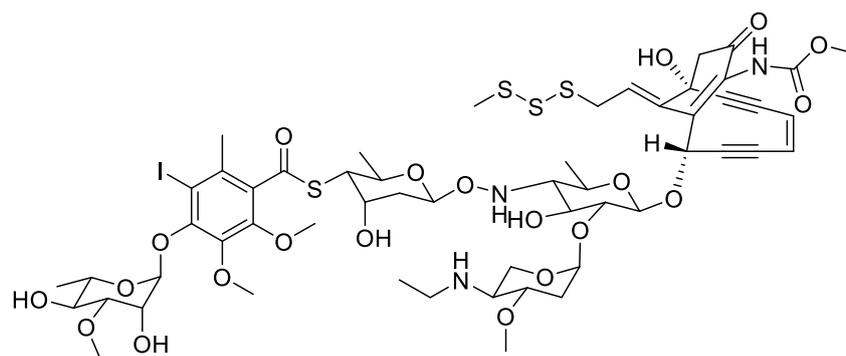
empêchant ainsi les cellules cancéreuses de développer ce genre de résistance.<sup>165</sup> La vérubuline **28** est également capable, au vu de son faible poids moléculaire, de traverser la barrière hémato-encéphalique, faisant de ce composé un candidat de choix pour les maladies du cerveau telle que le glioblastome.<sup>165</sup>

Cependant les études cliniques de la molécule **28** ont été stoppées car cette elle présentait une toxicité systémique trop importante, notamment au niveau cardiovasculaire. Il serait possible d'empêcher les effets néfastes en vectorisant cette molécule, ce qui supprimerait le ciblage non-spécifique tout en conservant son activité cytotoxique.

#### *Agents provoquants des dommages dans l'ADN*

Des molécules induisant des dommages à l'ADN peuvent également être utilisées en tant que charge thérapeutique dans des ADC.<sup>166</sup> Trois familles de molécules avec des mécanismes d'action différents sont utilisées en tant que tel sur des ADCs approuvés par la FDA : la calichéamicines **29** qui va provoquer des cassures double-brins dans l'ADN, les camptothécines qui sont des inhibiteurs de la topoisomérase I et les pyrrolobenzodiazépines (ou PBD) qui vont alkyliser l'ADN.<sup>166</sup>

#### *La calichéamicine*



Calichéamicine **29**

*Figure 25 : Structure de la calichéamicine 29*

La calichéamicine **29** (Figure 25) est une molécule provoquant des dommages dans l'ADN en faisant un clivage double-brin dans le petit sillon de l'ADN.<sup>167</sup> Elle possède une partie polysaccharidique, utilisée pour la stabilité de ce composé en milieu biologique, et une fonction ène-diyne capable de se réarranger, grâce à une cyclisation de Bergman, en diradical 1,4-benzoïde en présence d'un thiolate protégé sous la forme d'une fonction trisulfure dans la molécule.<sup>168</sup> Ainsi, cette nouvelle fonction radicalaire peut faire le transfert de deux atomes d'hydrogène venant de la répétition monosaccharide-phosphate, présente sur le squelette de l'ADN, menant au clivage de l'ADN (Figure 26).<sup>169,170</sup>

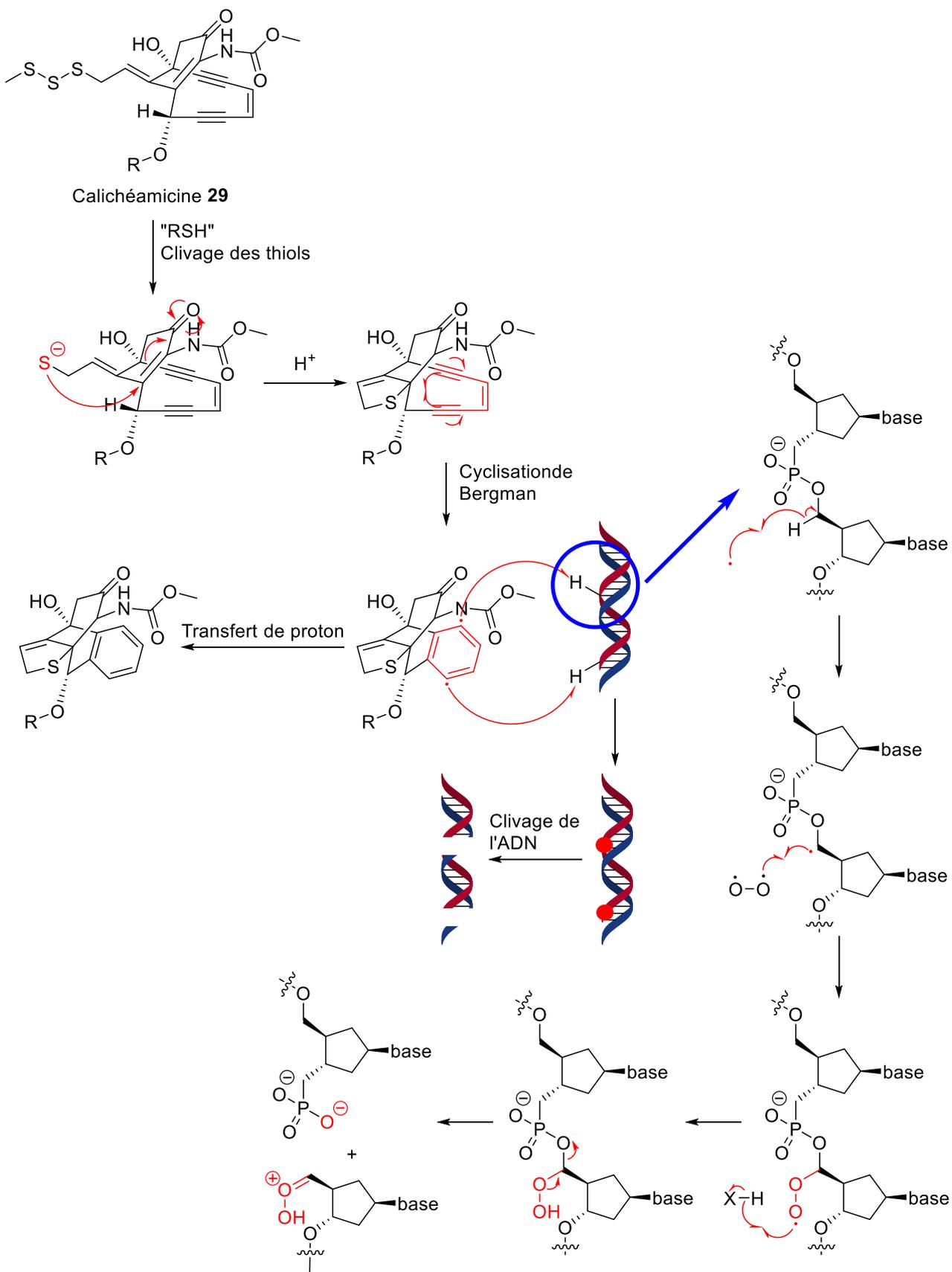


Figure 26 : Mécanisme d'action de la calichéamicine 29

Ainsi, la calichéamicine **29** peut interagir fortement avec l'ADN pour provoquer la mort cellulaire. En effet, en fonction de la lignée cellulaire utilisée, cette molécule peut avoir une  $IC_{50}$  subnanomolaire.<sup>171</sup> Cette forte efficacité *in vitro* justifie le fait que la calichéamicine **29** ne peut pas être utilisée en chimiothérapie mais en fait un excellent candidat pour l'élaboration d'ADC.

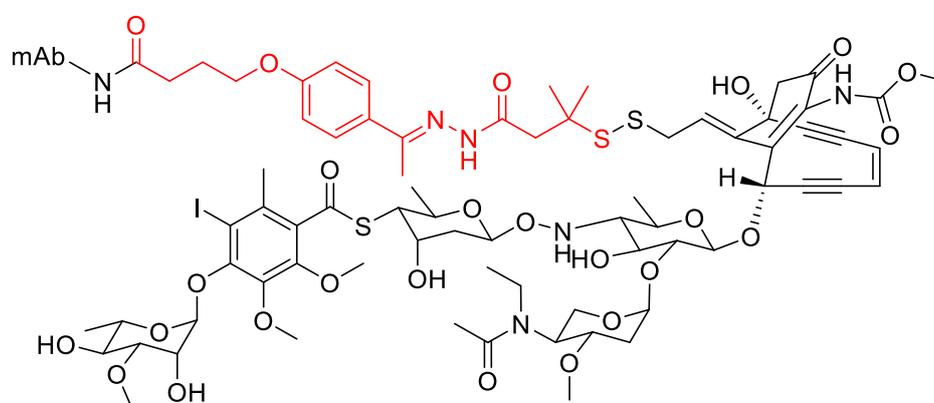
Etant donné que le mécanisme d'action de la calichéamicine **29** repose sur sa fonction ene-diène, il est donc envisageable de modifier les autres parties de cette molécule sans altérer son mécanisme d'action. Ainsi, il est possible de fonctionnaliser la calichéamicine **29** par une réaction d'échange de thiols directement sur le groupement trisulfure de la molécule. La liaison méthyle-disulfure étant plus labile, l'échange se fera en alpha cette liaison. Dans ce but, le linker utilisé doit être clivable afin de libérer le thiol en milieu intracellulaire afin qu'il puisse déclencher la cyclisation nécessaire au mécanisme d'action.

La calichéamicine **29** est intéressante pour une utilisation pour des tumeurs hématopoïétiques car elle n'entraîne pas d'effet bystander.<sup>172</sup> C'est le cas du Mylotarg® **1** qui possède une indication pour les leucémies myéloïdes aiguës récidivantes ; et pour le Besponsa® **30** qui possède une indication pour les leucémies lymphoblastiques aiguës récidivantes.

Cependant, la calichéamicine **29** souffre d'une sensibilité à la glycoprotéine-P, menant à une résistance des cellules cancéreuses conduisant à l'apparition de toxicité systémique.<sup>173</sup> De plus, le motif hydrazone pouvant se cliver dans la circulation et le faible DAR, en plus de la toxicité systémique, ont conduit au retrait du marché du Mylotarg® **1** en 2010.

Le Mylotarg® **1** possède un DAR moyen de 1,5, ce qui représente un faible ratio anticorps/drogue menant à la présence d'anticorps non-conjugués dans le mélange. Un tel DAR rend le médicament moins efficace, augmentant les doses utilisées, et provoque une hausse de la toxicité systémique de ce médicament. Dans le but de pouvoir le réhabiliter, les doses ainsi que l'espacement entre plusieurs prises ont été optimisés en 2017 afin d'augmenter son index thérapeutique.

Le Besponsa® **30** quant à lui possède un DAR moyen de 6, permettant de pallier les problèmes de toxicité systémique du Mylotarg® **1**. En effet, avec un DAR plus élevé, un ADC permet de délivrer davantage de drogues, menant à l'augmentation de son activité cytotoxique. Il est donc possible de diminuer les doses injectées.

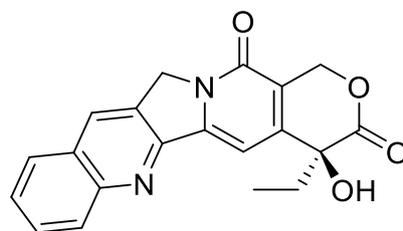


mAb-AcBut-calichéamicine **1** et **30**

Figure 27 : Structure des ADCs conjugués à la calichéamicine **29**

Le Mylotarg® **1** est indiqué pour le traitement des leucémies myéloïdes aiguës récidivantes. Il possède un très bon ORR de 30% lors d'un test clinique de phase III.<sup>174</sup> De plus, un autre ADC conjugué cette molécule a été approuvé en 2017, le Besponsa® **30**. Cet ADC possède une indication pour le traitement des leucémies lymphoblastiques aiguës récidivantes. Il possède un très bon ORR de 81% lors d'un test clinique de phase III.<sup>175</sup>

#### Les camptothécines



Camptothécine **31**

Figure 28 : Structure de la camptothécine **31**

Les camptothécines sont des molécules polycycliques composées d'au moins cinq cycles, issues de *Camptotheca acuminata*, un arbre chinois, et dont le premier membre à avoir été isolé est la camptothécine **31**.<sup>176</sup> Ces molécules sont des inhibiteurs de la topoisomérase I (ou Topo I).<sup>177</sup>

La Topo I est une enzyme monomérique et est utilisée pour une grande partie des problèmes structuraux liés à l'ADN, comme l'apparition de nœuds dans l'ADN.<sup>178</sup> Afin de réparer les problèmes topologiques, la Topo I va d'abord se lier de façon covalente à l'ADN. Pour se faire, un résidu tyrosine présent à la position 723 dans le site actif de l'enzyme va cliver la fonction phosphodiester sur un seul brin de l'ADN proche du site de liaison.<sup>179</sup> Après clivage et séparation des brins, une tyrosine appartenant au site actif de l'enzyme va catalyser une réaction de transestérification réversible afin de reformer le brin d'ADN coupé (Figure 29).<sup>180</sup>

Les camptothécines peuvent provoquer des dommages à l'ADN, en stabilisant la Topo I alors en complexe avec de l'ADN clivé. La fonction lactone, qui est la partie active des camptothécines, va imiter une paire de base de l'ADN et pourra se lier sur le site de clivage en s'intercalant grâce aux liaisons hydrogènes.<sup>181</sup> Ainsi, les camptothécines vont inhiber la réaction de transestérification permettant la reformation de l'ADN, menant à l'accumulation d'ADN endommagé puis à la mort cellulaire.<sup>182</sup>

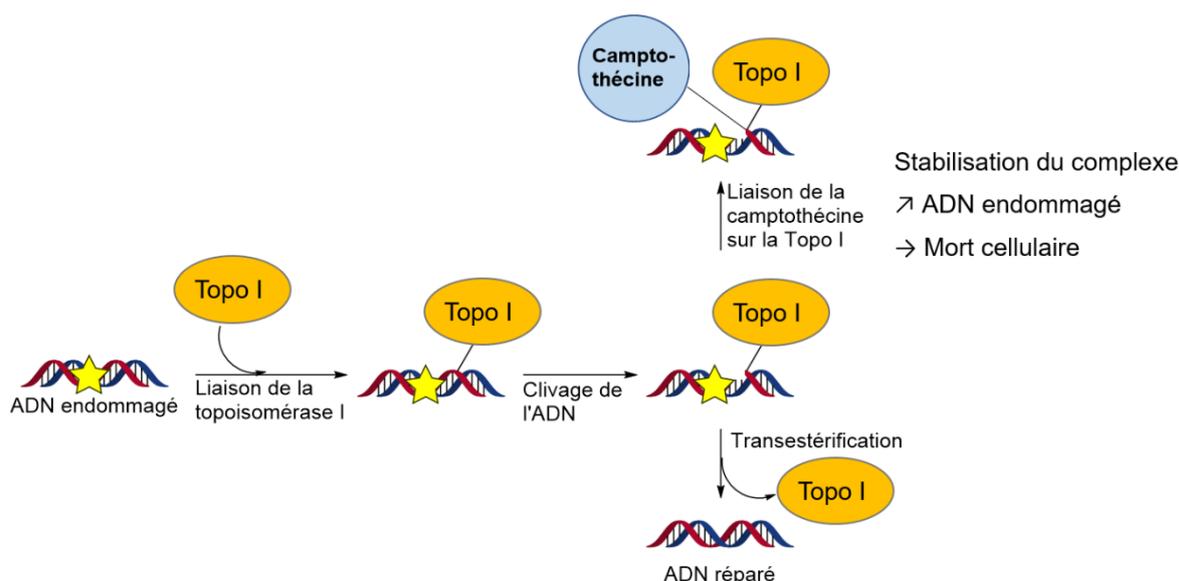


Figure 29 : Mécanisme de réparation de la Topo I et mécanisme d'action des camptothécines

Différents analogues de la camptothécine **31** existent, tels que le topotécane **34** et l'irinotécane **35**, mais seuls deux d'entre eux seront détaillés ici, le DXd **32** et le SN38 **33**, métabolite actif de l'irinotécane **35** (Figure 30). Ces derniers sont notamment utilisés avec deux ADCs approuvés par la FDA, respectivement l'Enhertu® **37** et le Trodelvy® **39**.

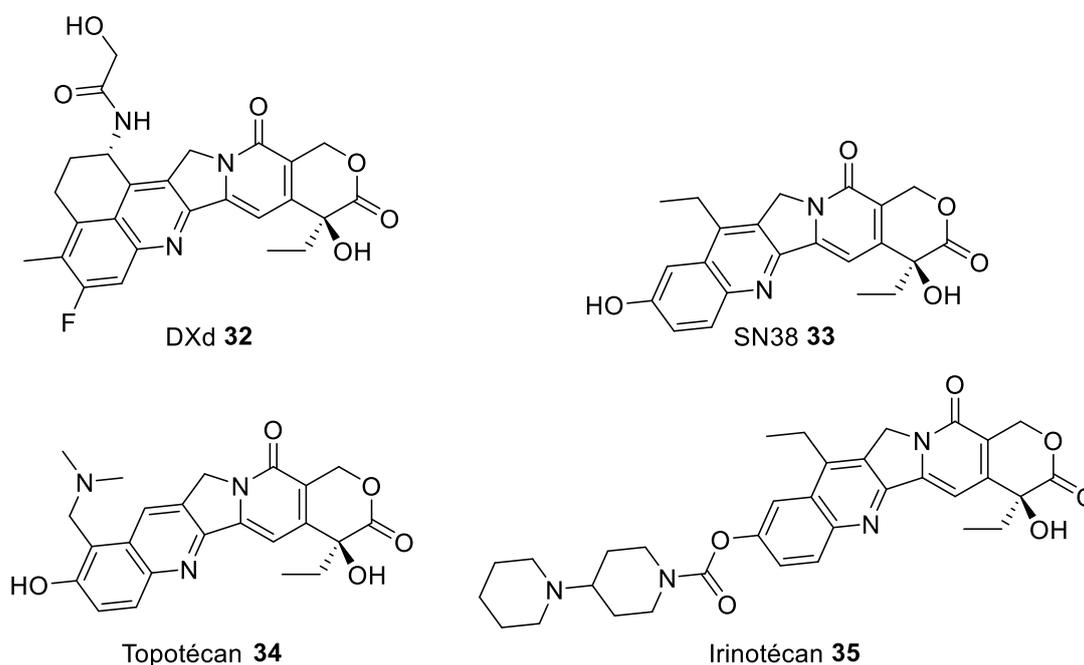


Figure 30 : Structures des analogues de la camptothécine **31** : le DXd **32**, le SN38 **33**, le topotécane **34** et l'irinotécane **35**

Le DXd **32** possède une cytotoxicité submicromolaire.<sup>183,184</sup> De plus, comparé à la camptothécine **31**, il possède un cycle cyclohexane supplémentaire.<sup>183,184</sup> De plus, comparé à la camptothécine **31**, il possède un cycle cyclohexane supplémentaire et le cycle benzénique n'est plus substitué avec une fonction hydroxy mais avec un fluor. Ainsi, le cyclohexane permettrait d'augmenter l'hydrophobicité de la molécule afin d'augmenter l'efficacité de l'effet bystander.<sup>185</sup> L'ajout d'un fluor quant à lui permet d'augmenter l'activité cytotoxique de la molécule.<sup>186</sup> Enfin, l'ajout de ces deux

substituants, cyclohexane et fluor, permet d'augmenter la stabilité de la lactone qui sera moins sujette à l'hydrolyse.<sup>181</sup>

De par sa nature hydrophobe, le DXd **32** est capable d'exercer l'effet bystander ce qui lui permettrait de cibler aisément les cellules cancéreuses voisines aux cellules cibles.<sup>187</sup> De plus, l'effet bystander de l'ADC approuvé Enhertu® **37** a prouvé son efficacité sur les cancers du sein, y compris ceux possédant peu de récepteurs HER2.<sup>188</sup> Ainsi, l'efficacité de ce conjugué repose en partie sur l'effet bystander, possible grâce à l'internalisation des ADC sur le peu de cellules possédant le récepteur HER2.<sup>189</sup> Ainsi, cette efficacité est donc basée en partie sur l'effet bystander, mais également sur le DAR du Enhertu® **37** car ce dernier est conjugué avec 8 molécules de DXd **32**, faisant de ce conjugué le premier ADC approuvé avec un ratio anticorps/drogue aussi élevé. Ce ratio est cependant nécessaire afin d'obtenir un ADC suffisamment efficace, au vu de l'activité cytotoxique faible de la drogue comparé à d'autres drogues classiquement employées. De plus, le DXd **32** est sensible à la glycoprotéine-P, provoquant ainsi l'apparition de résistance cellulaire.<sup>190</sup>

Afin de pouvoir modifier le DXd **32** en vue d'y incorporer un linker, il est possible de cibler la fonction hydroxyacétamide qui sera couplée avec le linker MC-GlyGlyPheGly **36** à l'aide d'un petit bras espaceur (Figure 31).<sup>191</sup> Ce linker est composé d'un groupement auto-immolable amino-méthylène assurant le relargage de la drogue de façon native, après clivage enzymatique du linker térapeptidique **36**. Enfin, il est composé d'un motif maléimide permettant l'étape de conjugaison cystéine.

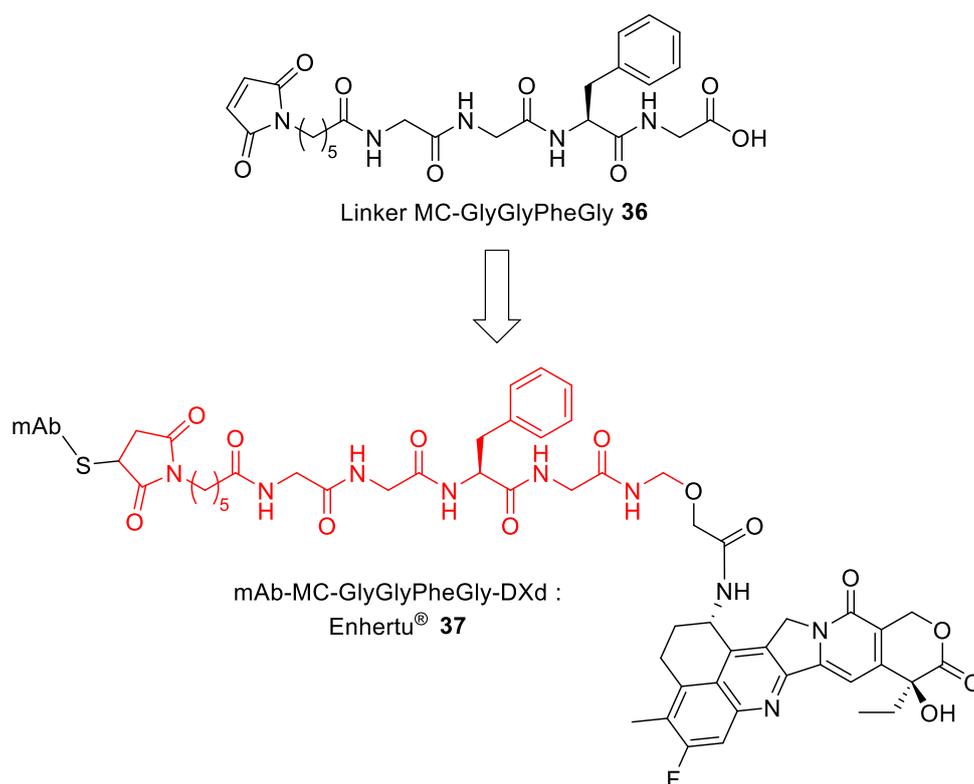


Figure 31 : Structures du linker MC-GlyGlyPheGly **36** et de l'Enhertu® **37**

L'Enhertu® **37** est un ADC approuvé en 2019 et conjugué à l'analogue DXd **32**. Cet ADC **37** possède une indication pour le traitement des cancers du sein HER2 positifs non résecables ou métastatiques ayant déjà reçus un traitement ciblant le récepteur HER2. Il possède un très bon ORR de 80% testé lors d'une étude clinique de phase III.<sup>192</sup>

Le SN38 **33** est le métabolite actif de l'irinotécan **35** (un autre analogue de la camptothécine **31**), une molécule anti-cancéreuse utilisée en monothérapie ou en combinaison contre des cancers de l'estomac.<sup>193</sup> L'irinotécan **35** est fonctionnalisé avec un motif bipipéridine sur la fonction hydroxy du cycle quinolinol, permettant d'augmenter la solubilité de la drogue en milieu aqueux. En présence de carboxylestérases non spécifiques, l'irinotécan **35** va être métabolisé en SN38 **33**.<sup>194</sup> Ce dernier est moins actif que le DXd **32** et possède une cytotoxicité de l'ordre du micromolaire. Pour qu'un ADC conjugué au SN38 **33** soit actif, il est alors nécessaire d'obtenir un haut degré de conjugaison, ce qui est le cas pour le Trodelvy® **39** avec un DAR moyen de 7,6.

Le SN38 **33**, de par son caractère hydrophobe, peut provoquer un effet bystander sur les cellules voisines.<sup>195</sup> De plus, cette molécule est également sensible à la glycoprotéine-P, favorisant donc l'apparition de résistance.<sup>196</sup>

Le Trodelvy® **39** utilise un linker clivable en conditions acides. Ce dernier est lié au SN38 **33** grâce à une fonction carbonate, incorporée via une réaction d'addition-élimination de l'alcool présent sur la drogue avec un carbonate de PNP présent sur le linker SMCC-PEG<sub>8</sub>-Lys-PAB-PNP **38**. Cette fonction carbonate, peu stable en milieu aqueux, permet le relargage d'une partie des drogues avant l'internalisation de l'ADC **39**. De ce fait, il est alors possible de déclencher un effet bystander sur les cellules voisines de façon intra- et extracellulaire. De plus, ce conjugué possède un temps de vie très faible, de moins d'un jour dans le plasma, dû au faible temps de demi-vie du linker.<sup>195</sup> Il est ainsi nécessaire de recourir à un DAR élevé et à de grandes doses d'injection permettant de saturer en ADC les récepteurs des cellules cancéreuses afin d'avoir une activité cytotoxique suffisante.

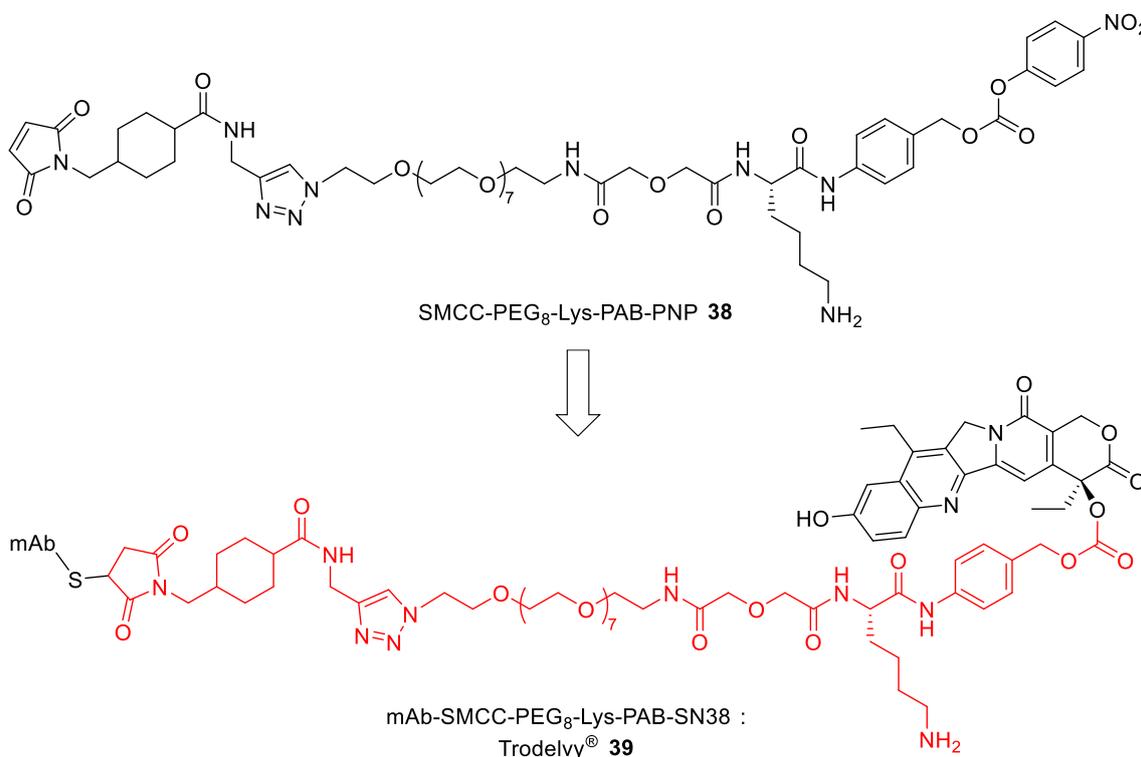


Figure 32 : Structures du linker SMCC-PEG<sub>8</sub>-Lys-PAB-PNP **38** et du Trodelvy® **39**

Le Trodelvy® **39**, approuvé en 2020, est un ADC conjugué à l'analogue SN38 **33**. Cet ADC **39** possède une indication pour le traitement des cancers du sein triple négatifs. Il possède un ORR de

35%, meilleur qu'avec des traitements de chimiothérapie classique (ORR = 5%) pour la même indication.<sup>197</sup>

### Les pyrrolobenzodiazépines

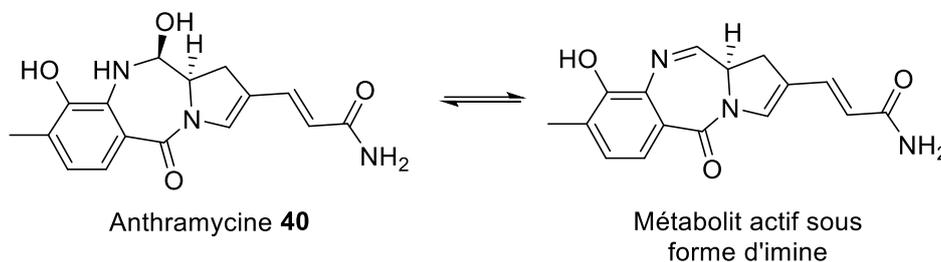


Figure 33 : Structures de l'anthramycine **40** et de son métabolite actif sous forme d'imine

Une autre famille permettant de cibler l'ADN est la famille des pyrrolobenzodiazépines (PBD). Les PBDs sont composées d'une benzodiazépine et d'une pyrrolidine, avec un centre chiral en position C11a.<sup>198</sup> Elles sont également composées d'une partie électrophile (imine, carbinolamine) présente sur la diazépine permettant de créer une liaison covalente avec une guanine de l'ADN mais également sensible à l'hydrolyse en milieu aqueux.<sup>198</sup>

Les PBDs sont des analogues de l'anthramycine **40**, une molécule naturelle isolée de *Streptomyces refuineus*, une actinobactérie.<sup>199</sup> De nombreux laboratoires ont travaillé sur le développement d'analogues de l'anthramycine **40** afin d'accroître son activité contre l'ADN. De façon intéressante, ces groupes ont également élaboré des dimères de PBD afin de permettre de toucher deux positions différentes dans l'ADN. Il serait alors possible de former des liaisons covalentes dans l'ADN de façon inter- et intra-brin, menant à une meilleure stabilisation comparée à un monomère de PBD, et donc d'augmenter efficacement la cytotoxicité.<sup>198</sup>

Ces molécules sont capables de se lier sur le petit sillon de l'ADN grâce à leur géométrie parfaitement adéquate, et sont donc des agents alkylants de l'ADN. Cette alkylation va produire des déformations dans la double hélice de l'ADN, l'empêchant d'être réparé et menant à la mort cellulaire.

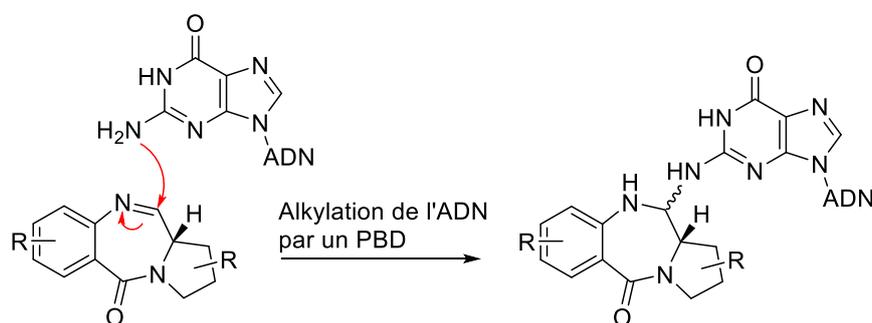


Figure 34 : Mécanisme d'action des PBDs

Le dimère de PBD tesirine **41** est un analogue dimérique de l'anthramycine **40**, et est utilisé en tant que charge thérapeutique pour ADC. Un linker C5 a été utilisé afin de lier entre elles les deux molécules de PBD. Après la libération de cette molécule dans les cellules, le tesirine **41** va se métaboliser en SG3199 **42**, qui est le métabolite actif. La cytotoxicité de ce métabolite **42** va du

subnanomolaire au picomolaire.<sup>200</sup> Ainsi, la tesirine **41** et son métabolite actif **42**, sont d'excellents candidats pour une utilisation en ADC.

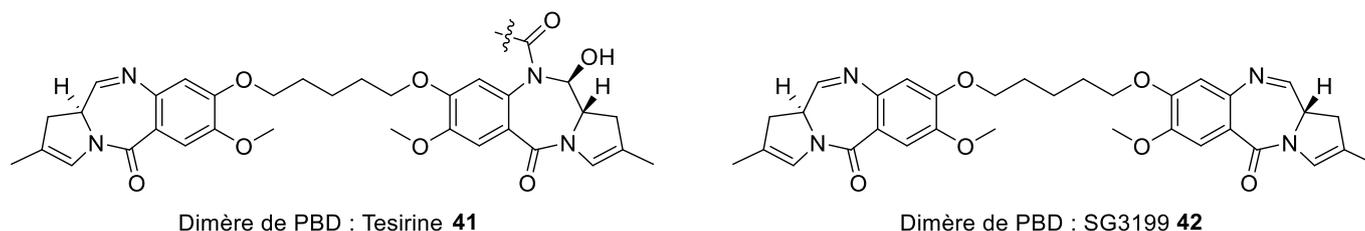


Figure 35 : Structures de la tesirine **41** utilisée en tant que charge thérapeutique pour l'ADC Zynlonta® **44** et de son métabolite actif, le SG3199 **42**

La tesirine **41** est une molécule pouvant exercer l'effet bystander, mais son indication contre des tumeurs hématopoïétiques est surprenante au vu du risque d'augmenter la toxicité systémique.<sup>201</sup> Cependant, l'alkylation de l'ADN se fait par liaison covalente, montrant ainsi qu'après la réaction, la drogue se retrouve bloquée sur l'ADN.

De façon générale, les PBDs sont sensibles à la glycoprotéine-P, provoquant ainsi une augmentation de la toxicité systémique et une réduction de l'efficacité.<sup>198</sup>

Afin de pouvoir libérer la tesirine **41**, il est nécessaire d'utiliser un linker clivable afin qu'elle puisse être métabolisée en SG3199 **42**. Ainsi, le Zynlonta® **44**, le seul ADC approuvé par la FDA et conjugué à un dimère de PBD, utilise un linker permettant un clivage enzymatique, le linker mal-PEG<sub>8</sub>-ValAla-PAB-PNP **43**. Ce linker, comparé au classique motif ValCit, possède un motif ValAla présentant une meilleure hydrophilicité et une meilleure stabilité, ce qui permettrait notamment d'obtenir des ADCs moins hydrophobes et donc plus stable en milieu biologique.<sup>102</sup> Le carbonate de PNP présent sur le linker permet d'accrocher ce dernier sur le dimère de PBD grâce à une réaction d'addition-élimination, formant ainsi un carbamate. Cette fonction présente sur la partie auto-immolable du linker pourra, après élimination 1-6, libérer la fonction amine secondaire qui pourra alors être métabolisée en imine grâce à un équilibre, formant ainsi le métabolite actif (Figure 36).<sup>200</sup>

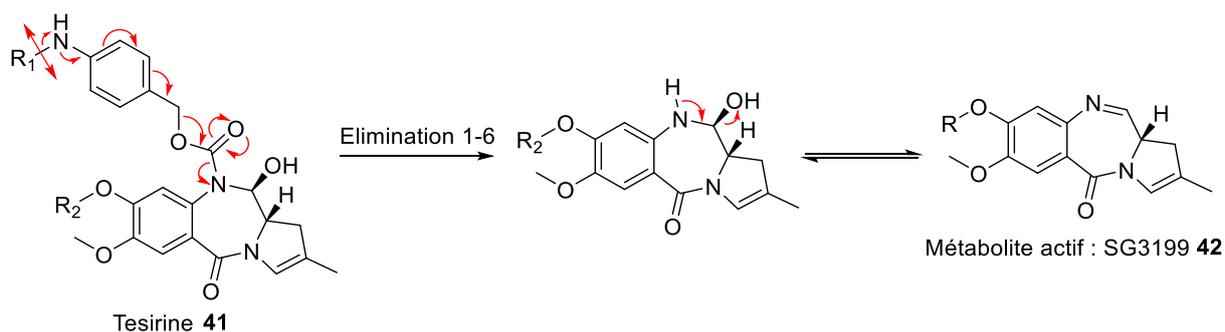


Figure 36 : Mécanisme de formation du métabolite actif **42** de la tesirine **41**

Le Zynlonta® **44** possède un DAR moyen de 2,3, ce qui est assez faible. Cette valeur est intéressante ici car elle permet de diminuer la toxicité systémique du conjugué, provoquée par l'effet bystander et la glycoprotéine-P, tout en conservant une efficacité suffisante pour le traitement.

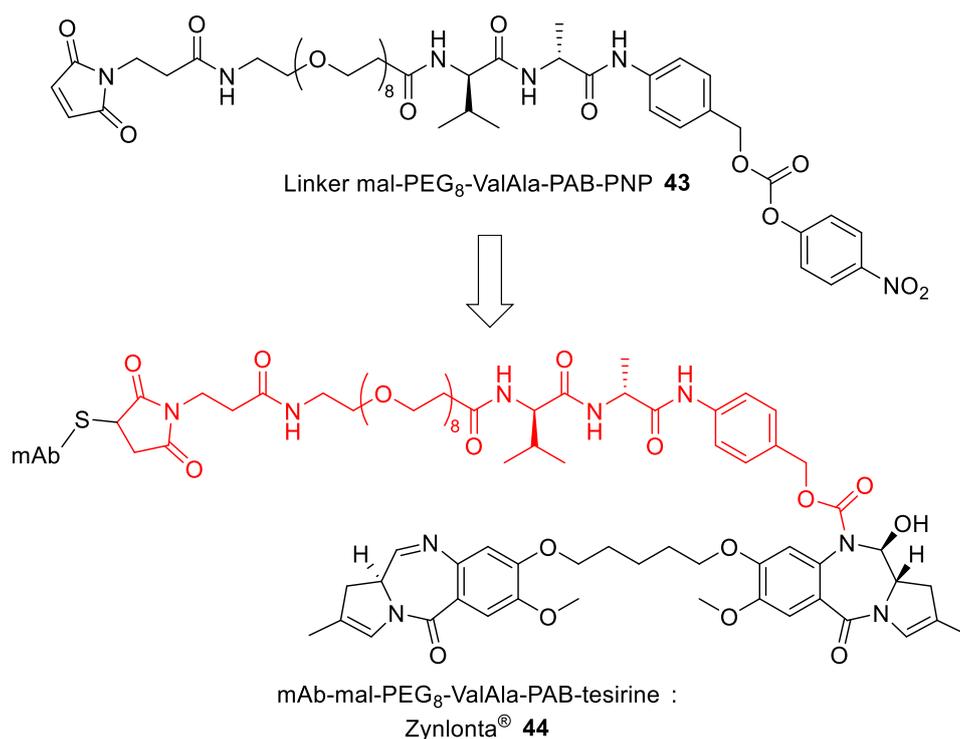


Figure 37 : Structure du Zynlonta<sup>®</sup> **44**, un ADC conjugué à la tesirine **41** à l'aide d'un linker clivable **43**

La FDA a approuvé en 2021 le Zynlonta<sup>®</sup> **44**, le premier ADC conjugué à un dimère de PBD. Ce conjugué est utilisé pour une indication contre les lymphomes à grande cellules B. Il possède un ORR moyen de 48% testé lors d'une étude clinique de phase II.<sup>202</sup>

#### Vers l'utilisation de nouvelles charges thérapeutiques afin de diversifier la proposition en ADC

Les ADCs représentent aujourd'hui une classe de traitements alliant ciblage spécifique des anticorps et forte activité cytotoxique des charges thérapeutiques. Cependant, afin de varier la proposition en ADC, il serait intéressant d'utiliser de nouvelles charges thérapeutiques ayant des modes d'actions, des cibles biologiques ou des propriétés différentes. Ainsi, l'utilisation de petits ARN interférants permettrait d'élargir l'effet des ADCs à n'importe quelle cible protéique tout en ne se limitant pas uniquement à l'utilisation de molécules cytotoxiques. Cette versatilité permettrait d'agir sur des cibles ne pouvant pas être atteintes avec des molécules ordinaires. Nous avons donc décidé dans cette thèse d'utiliser de petits ARN interférants afin de dépléter l'expression de protéines d'intérêt.

#### Les oligonucléotides

Les petits ARN interférants (ou siRNA pour *small interfering Ribonucleic acid*) sont une classe d'acides ribonucléiques double brins thérapeutiques de 19 à 24 paires de bases pouvant spécifiquement interférer avec l'expression d'une protéine cible.<sup>203</sup>

Après incorporation dans les cellules et une fois arrivé dans le cytosol, les siRNA sont intégrés dans un complexe multiprotéique, appelé le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*).<sup>204</sup> De là, un brin de l'ARN interférant est éliminé (brin dit « passager ») tandis que l'autre brin (brin dit « guide »)

dirige le complexe RISC vers un ARN messager codant pour la protéine cible par complémentarité de séquence.<sup>205</sup> Il est intéressant de noter que le brin passager est le brin ayant l'extrémité 5' la plus stable.<sup>206</sup> Une fois l'ARN guide apparié sur l'ARN messager correspondant, le complexe RISC va cliver ce dernier, empêchant donc sa traduction en protéine (Figure 38).<sup>207</sup>

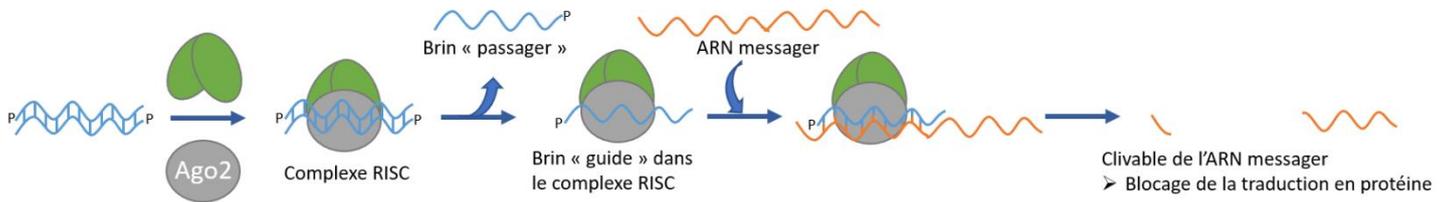


Figure 38 : Mécanisme d'action des siRNA

Ainsi, la capacité des siRNA à pouvoir cibler virtuellement n'importe quel mRNA fait de ce type de composé un choix d'intérêt en thérapie.<sup>208</sup> Malheureusement, les siRNA souffrent d'un grand inconvénient, à savoir une incapacité à traverser les membranes de par leurs charges négatives.<sup>209</sup> Afin d'outrepasser ce problème, il est possible d'allier la diversité des siRNA pour leur cible aux propriétés de ciblage et d'internalisation de différents types de vecteurs, tels que les agents de transfection, les nanoparticules lipidiques ou les anticorps.<sup>210</sup> Il existe actuellement six siRNA approuvés par la FDA ainsi qu'un certain nombre en phase d'études cliniques.<sup>211</sup>

### Limitations des ADCs

Malgré la capacité des ADCs à pouvoir cibler sélectivement les cellules d'intérêts, ils souffrent de certaines limitations.<sup>92</sup> Parmi celles-ci, l'hétérogénéité des conjugués ainsi que les mécanismes de résistance et l'internalisation représentent des challenges importants dans l'élaboration de nouveaux ADCs.<sup>212</sup>

### Hétérogénéité des ADCs

Les anticorps sont des protéines composées de plus d'une centaine de sites aptes, tels que les lysines ou les cystéines, à être modifiés dans le but d'y incorporer une charge thérapeutique.<sup>83</sup> Les étapes de bioconjugaison vont donc générer des mélanges d'ADCs présentant une grande hétérogénéité, avec des DAR très variables, et différents sites de conjugaison.<sup>213</sup> Ces mélanges hétérogènes peuvent influencer les paramètres pharmacodynamiques, pharmacocinétiques et de biodistribution, menant à de moins bonnes fenêtres thérapeutiques.<sup>213</sup>

De plus, un mauvais contrôle du DAR peut engendrer certains problèmes. Dans le cas d'un ADC avec un DAR peu élevé, la présence d'anticorps non conjugués dans le mélange peut être favorisée, et ces derniers pourront agir en tant qu'inhibiteurs compétitifs des antigènes, empêchant ainsi l'internalisation des molécules cytotoxiques.<sup>214</sup> Dans le cas contraire, le nombre plus important de charges thérapeutiques va augmenter l'hydrophobicité des conjugués, menant à un risque plus élevé d'aggrégation. Ainsi, dans le but d'obtenir des ADCs plus efficaces, il est important de les produire de façon homogène. Comme dans le cas des ADCs Enhertu® **37** et Trodelvy® **39**, il est possible de générer des ADCs avec un DAR8 en ciblant toutes les cystéines présentes sous forme de pont disulfure, menant à la formation d'ADCs homogènes.<sup>215</sup>

## Mécanismes de résistance

Les cellules tumorales sont capables de déployer des mécanismes de résistance face à l'utilisation de certaines molécules anticancéreuses.<sup>216</sup> Ces mécanismes reposent principalement sur le fait que les cellules cancéreuses peuvent exprimer des pompes d'efflux, des transporteurs permettant d'évacuer les molécules cytotoxiques de l'environnement intracellulaire.<sup>217</sup> Ces pompes à efflux provoquent une diminution de la concentration en drogue dans les cellules, réduisant l'efficacité de l'ADC. Par exemple, la glycoprotéine-P est une protéine agissant comme pompe à efflux et est particulièrement exprimée à la surface des cellules cancéreuses.<sup>218</sup> Les molécules hydrophobes peuvent avoir une bonne affinité avec la glycoprotéine-P, et en sont donc des substrats potentiels.<sup>119</sup> L'hydrophobicité d'une drogue est donc un paramètre important à moduler afin de limiter leur évacuation des cellules cancéreuses.<sup>219</sup>

## Internalisation des anticorps

Afin qu'un ADC délivre efficacement sa charge thérapeutique, l'anticorps doit se lier avec l'antigène correspondant et ce dernier doit pouvoir être internalisé en étant en complexe avec l'anticorps.<sup>220</sup> Le taux d'expression des antigènes présents à la surface des cellules cancéreuses est également lié à la quantité de molécules pouvant être internalisées.<sup>221</sup> Si ces cellules présentent peu d'antigènes, alors la concentration de charges thérapeutiques arrivant dans les cellules sera faible.<sup>222</sup> La vitesse d'internalisation peut également varier, une cinétique d'internalisation lente mènera à une accumulation de charges thérapeutiques plus faible.<sup>70</sup> De plus, une grande quantité d'ADCs internalisés peuvent être recyclés avant la dégradation lysosomale. Dans le cas du Kadcyla® **11**, 50% des anticorps internalisés sont recyclés et renvoyés sur les membranes cellulaires après 5 min, montant jusqu'à 85% en 30 min.<sup>223</sup> Au final, seul un faible pourcentage (entre 0,01 et 0,001%) de ces conjugués atteignent leur cible cellulaire et libèrent leur charge thérapeutique dans les cellules, menant à une faible délivrance des charges thérapeutiques.<sup>98</sup>

## Utilisation d'ADCs dans le ciblage de cancers résistants

Le but de cette thèse est d'utiliser les ADCs comme outils thérapeutiques afin de cibler les cancers résistants aux traitements classiques. Nous allons ici nous intéresser tout particulièrement à un sous-type de cancer du sein présentant un besoin médical non-satisfait dû à son agressivité, le cancer du sein triple négatif (ou TNBC pour *triple negative breast cancer*).

## Cancer du sein triple négatif

Le TNBC représente à ce jour un important défi thérapeutique en raison de son mauvais pronostic dû à l'agressivité de ce type de cancer, à des résistances envers les traitements conventionnels, au très haut potentiel métastatique des cellules cancéreuses et à d'importants risques de récurrence provoqués par des lésions métastatiques résiduelles.<sup>224,225</sup>

Le TNBC représente 15 à 20% des cancers du sein et en est un sous-type présentant un déficit de trois récepteurs extracellulaires : le récepteur hormonal d'estrogène (ER), le récepteur hormonal de progestérone (PR) et le récepteur HER2, complexifiant le traitement par thérapies ciblées.<sup>226</sup>

En présence de métastases, le taux de survie à 5 ans passe de 90% pour une tumeur locale à seulement 12% pour un cancer métastatique du TNBC.<sup>225,227</sup> Malgré les traitements actuels, les lésions métastatiques résiduelles vont mener à une récurrence de la tumeur dans 40% des cas.<sup>228</sup>

Ainsi, les traitements d'hormonothérapie et ciblant le récepteur HER2 ne peuvent plus être utilisés au vu du déficit des trois récepteurs impliqués. Il est alors impératif de développer de nouveaux traitements ciblés dans le but de réduire la quantité de métastases et de tuer efficacement les cellules cancéreuses. Il serait alors judicieux de développer de nouveaux anticorps monoclonaux pouvant reconnaître sélectivement le TNBC à l'aide d'autres récepteurs. De plus, il paraît intéressant d'allier ce ciblage spécifique à l'action de molécules cytotoxiques afin de générer de nouveaux conjugués anticorps-médicaments ciblant le TNBC.

## Vers le développement d'outils thérapeutiques contre les cancers résistants

Afin de pouvoir combattre efficacement la pléthore de cancers existants, divers traitements ont été développés ces dernières années comme les ADCs qui, par le biais de leur charge thérapeutique, vont cibler les microtubules et l'ADN des cellules cancéreuses pour entraîner leur mort. Cependant, certains cancers ont développé des mécanismes de résistance aux traitements actuellement sur le marché. Il est donc primordial de mettre au point des stratégies thérapeutiques innovantes basées sur de nouveaux mécanismes d'action permettant d'outrepasser ces résistances. Il serait ainsi pertinent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques impliquées dans des processus biologiques différents.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons décidé d'explorer une famille d'enzymes impliquées dans différents processus biologiques, les poly(ADP-ribose) polymérases (PARPs).

### Famille des PARPs et leur intérêt dans la recherche contre le cancer

La famille des PARPs a été découverte en 1963 par deux chercheurs de l'Université de Strasbourg, Pierre Chambon et Paul Mandel, et est composée de dix-sept membres.<sup>229,230</sup> Les PARPs partagent toutes un domaine catalytique conservé permettant de catalyser le transfert d'unités d'ADP-ribose sur une protéine acceptrice grâce à l'hydrolyse du cofacteur NAD<sup>+</sup> afin de polymériser l'ADP-ribose. On parle ici alors de poly-(ADP-ribosyl)ation.<sup>231</sup> Ce transfert est possible par la liaison entre un acide glutamique ou aspartique de la protéine acceptrice et le premier monomère d'(ADP-ribose) de la chaîne au niveau du site actif de l'enzyme.<sup>232</sup> Il est également possible qu'une PARP ne catalyse le transfert que d'une seule unité d'ADP-ribose, on parlera alors de mono-(ADP-ribosyl)ation.<sup>233</sup> Ces étapes d'ADP-ribosylation ont un rôle important dans différents processus cellulaires. En effet, ce transfert se faisant généralement en réponse à des lésions de l'ADN, il joue un rôle de signalisation cellulaire. Ainsi, une fois (ADP-ribosyl)és, les différents acteurs de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN vont pouvoir être recrutés au niveau de la lésion afin de la réparer, permettant de ce fait le maintien de l'intégrité du génome (Figure 39). En plus de leur rôle

dans la réparation de l'ADN, les PARPs interviennent également au cours du métabolisme de l'ADN et dans la régulation de la transcription.<sup>234</sup>

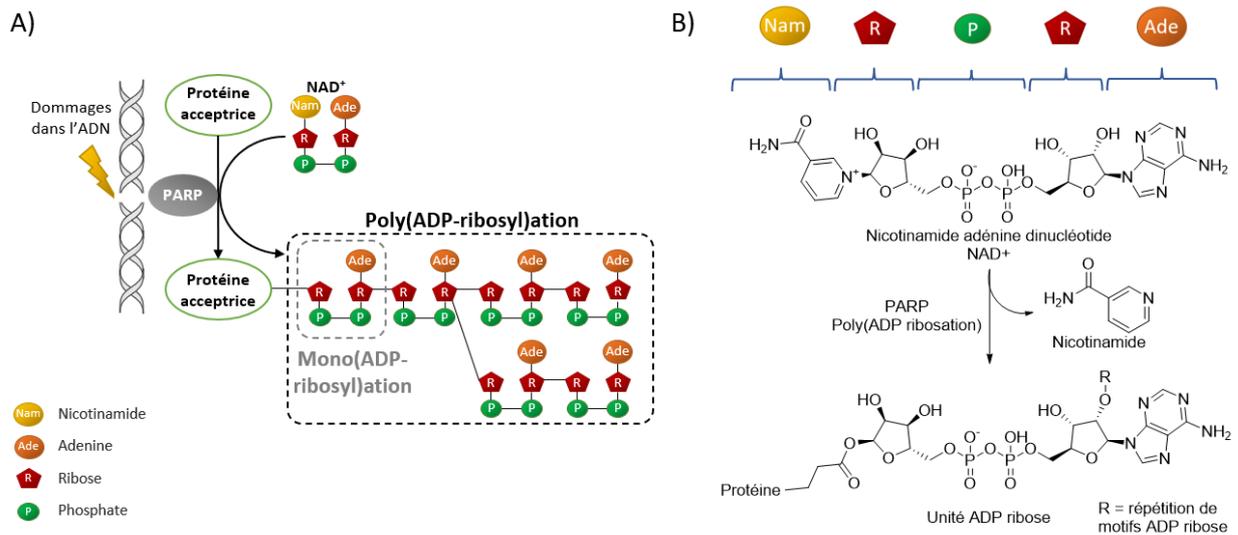


Figure 39 : Mécanisme d'action des PARPs. A) Réaction de poly(ADP-ribosylation) survenant après l'activation des enzymes PARP sur les brins d'ADN endommagés. Le cofacteur NAD<sup>+</sup> est transféré dans le site actif de l'enzyme suivi d'un départ de nicotinamide. Cette étape de transfert est répétée permettant la polymérisation des unités d'ADP ribose de façon linéaire ou ramifiée. Ainsi cette polymérisation va servir de signal pour recruter différents acteurs de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. B) Structure du cofacteur NAD<sup>+</sup> et réaction de transfert d'une unité d'ADP ribose sur la protéine.

### PARP1 dans les thérapies anticancéreuses

PARP1 est le premier membre de cette famille à avoir été identifié, et est de ce fait le membre le plus étudié et le mieux connu. Cette enzyme est notamment décrite pour son rôle dans la réparation des cassures simple-brin de l'ADN car elle peut se lier rapidement et de façon covalente à l'ADN endommagé. Ce processus aura pour effet d'activer cette enzyme, ce qui déclenchera tout d'abord son auto-poly-(ADP-ribosylation) puis celles d'autres protéines de la réparation de l'ADN,<sup>235</sup> faisant de PARP1 la principale source de poly-ADP-ribosylation impliquée dans la réparation de l'ADN.<sup>236</sup> De plus, il a été démontré que PARP1 est surexprimée dans un grand nombre de cancers, tels que les cancers du sein, de l'utérus et du poumon.<sup>237</sup> Au vu de cette surexpression dans les cellules cancéreuses et de l'implication de cette enzyme dans divers processus biologiques, PARP1 est une cible biologique intéressante pour l'élaboration de nouveaux traitements.

Il est possible d'utiliser des inhibiteurs de PARP1 afin de cibler cette enzyme dans le traitement de certains cancers. Cependant, cette inhibition à elle seule ne permet pas d'observer d'effets cytotoxiques dans toutes les cellules cancéreuses. Ces inhibiteurs vont notamment être utilisés pour cibler des tumeurs possédant des mutations spécifiques des gènes *BRCA1* et *BRCA2* (*Breast Cancer Associated 1/2*) présentes chez certains patients atteints de cancers du sein (10 à 15%).<sup>238</sup> Ces gènes, impliqués dans la préservation de l'intégrité génomique, sont des gènes suppresseurs de tumeurs permettant d'empêcher une prolifération cellulaire incontrôlable.<sup>239</sup> Cependant, des mutations (plusieurs centaines de mutations ont été identifiées) de ces gènes conduisent à une augmentation du risque de cancers car ils ne peuvent plus assurer leur rôle.<sup>240</sup>

Il existe actuellement quatre inhibiteurs approuvés par la FDA utilisés dans le ciblage de PARP1 : le rucaparib **45** (approuvé en 2016 avec une indication contre les cancers des ovaires), l'olaparib **46** (approuvé en 2018 avec une indication contre les cancers du sein HER2 négatif), le niraparib **47** (approuvé en 2017 avec une indication contre les cancers des ovaires) et le talazoparib **48** (approuvé en 2018 avec une indication contre les cancers du sein HER2 négatif avancés ou métastatique).<sup>238</sup> Ces molécules sont des inhibiteurs compétitifs du cofacteur NAD<sup>+</sup> dans le site actif de l'enzyme et vont donc empêcher la poly-(ADP-ribosyl)ation (Figure 40).<sup>241</sup>

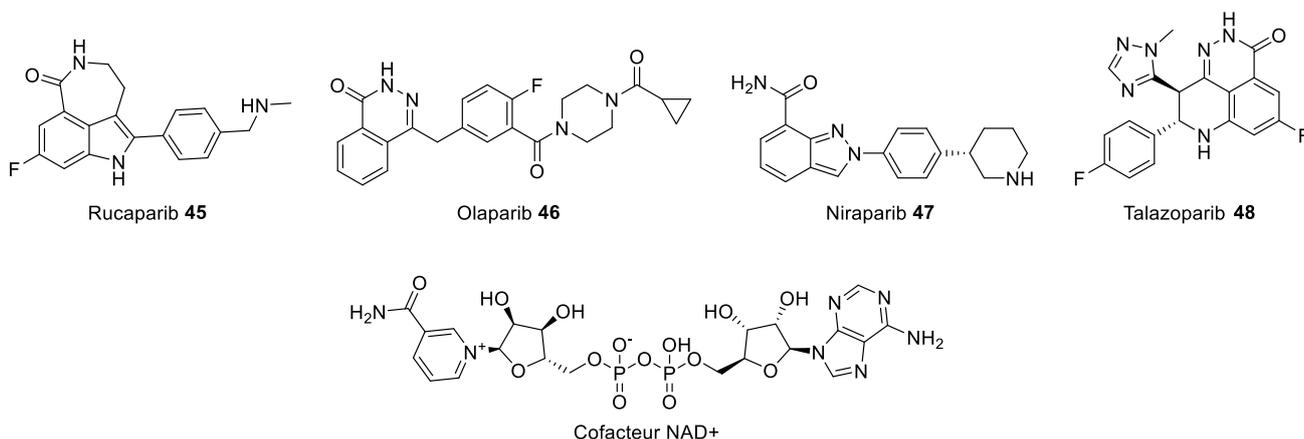


Figure 40 : Structures des inhibiteurs de PARP approuvés par la FDA, le rucaparib **45**, l'olaparib **46**, le niraparib **47** et le talazoparib **48** comparées à la structure du cofacteur NAD<sup>+</sup>

Dans le cas où un patient est atteint d'un cancer avec une mutation *BRCA1* ou *BRCA2*, cette dernière entraîne un déficit dans la réparation de l'ADN mais sans pour autant détruire les cellules cancéreuses. Cependant, si l'on ajoute à cela l'inhibition de PARP1, d'autres voies de la réparation seront ainsi altérées entraînant une accumulation de dommages non réparés dans l'ADN conduisant à la mort cellulaire. On parle alors de létalité synthétique. La létalité synthétique est un type de mort cellulaire ne se produisant qu'après l'altération ou l'inhibition de deux cibles biologiques ou plus, qui individuellement n'ont pas d'effets cytotoxiques.<sup>238</sup> Ainsi, les inhibiteurs de PARPs, olaparib **46** et talazoparib **48**, ayant une indication pour le cancer du sein ont été évalués sur un panel de cellules cancéreuses et ont montré une meilleure efficacité contre des cellules cancéreuses *BRCA*<sup>mut</sup> (Tableau 2).<sup>242,243</sup>

Tableau 2 : IC<sub>50</sub> des inhibiteurs de PARP (utilisés contre les cancers du sein) en fonction de la présence ou non de mutations *BRCA*.<sup>243</sup>

Inhibiteur PARP	IC <sub>50</sub> (M)	
	Cellules cancéreuses <i>BRCA</i> <sup>WT</sup>	Cellules cancéreuses <i>BRCA</i> <sup>mut</sup>
Olaparib <b>46</b>	10 <sup>-9</sup> à 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-10</sup> à 10 <sup>-7</sup>
Talazoparib <b>48</b>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>

Les stratégies de ciblage des cancers résistants reposent sur des thérapies combinées mais aussi sur d'autres mécanismes comme la létalité synthétique. Etant donné que 15 à 25 % des TNBC présentent une mutation des gènes *BRCA1/2*, l'inhibition de PARP semble pertinente dans ce contexte.<sup>244,245</sup>

Malheureusement, l'utilisation de ces inhibiteurs en thérapie est limitée. En effet, ces molécules ont présenté une faible sélectivité face aux cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines ainsi que pour les différentes PARPs, provoquant de ce fait l'apparition d'effets secondaires (tels que l'immunodépression ou l'hépatotoxicité) liés à l'inhibition concomitante de PARP1 et PARP2.<sup>246</sup> Enfin, 40 à 70 % des patients ont démontré une résistance à l'inhibition de PARP1, rendant l'utilisation de ces inhibiteurs inefficace. La principale cause de résistance est due à une inversion des mutations *BRCA1/2*, permettant à ces gènes de retrouver leurs fonctionnalités initiales.<sup>247</sup> Ceci a pour effet de rendre inefficaces les inhibiteurs en empêchant la létalité synthétique. Il est aussi possible que PARP1 subisse des mutations la rendant résistante aux inhibiteurs.<sup>247, 248</sup> Cependant, cibler PARP1 présente malgré tout un grand intérêt dans les TNBC car les patients atteints d'une mutation *BRCA1* ont plus de chance de développer ce type de cancer du sein. Enfin, à cause de la grande hétérogénéité dans certains cancers résistants, les inhibiteurs de PARP1 n'ont pas démontré une assez bonne efficacité.<sup>249</sup> Afin d'outrepasser ces mécanismes de résistance contre le TNBC, il est possible de cibler un autre membre de la famille des PARPs, comme PARP3.

#### *Une nouvelle cible thérapeutique d'intérêt : PARP3*

PARP3 a été identifiée par le chercheur Magnus Johansson en 1999.<sup>250</sup> Cette enzyme est impliquée dans des processus biologiques liés à la réparation double-brin de l'ADN (contrairement à PARP1, impliquée dans la réparation simple-brin), à la régulation de la transcription, aux réarrangements chromosomiques et à la progression mitotique.<sup>251</sup>

PARP3 s'est révélée être surexprimée dans certains types de cancers résistants tels que le TNBC.<sup>252</sup> En effet, cette enzyme possède deux rôles clés dans la prolifération de ce type de cellules cancéreuses : un rôle dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN et un rôle dans la mitose, notamment dans l'organisation et la stabilisation des microtubules ainsi que dans l'intégrité des télomères.<sup>251</sup>

Ainsi, l'inhibition de PARP3 dans les TNBC *BRCA1*<sup>mut</sup> fonctionne de la même façon que pour l'inhibition de PARP1. Il est donc également possible de provoquer de la létalité synthétique afin de cibler ce type de cellules cancéreuses.<sup>252</sup>

Cependant, l'absence de PARP3 induite par des modifications génétiques (*PARP3 knock out*) ou par l'action de siRNA ciblant l'ARN messager de PARP3 (*PARP3 knock down*), s'avère non-léthale sur des cellules ne présentant pas de mutation *BRCA1/2* mais permettrait tout de même de les fragiliser.<sup>253</sup> Il serait alors possible de provoquer la mort des cellules en combinant l'absence de PARP3 avec des drogues ciblant des processus dans lesquels elle est impliquée, comme des dommages dans l'ADN ou ciblant la polymérisation des microtubules.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons décidé de nous focaliser sur l'étoposide **50**, un inhibiteur de la topoisomérase II, ainsi que sur la vincristine **22**, un poison mitotique. Ainsi, en combinant l'altération de PARP3 (à l'aide d'un inhibiteur ou d'un siRNA) avec l'action d'une molécule cytotoxique, il serait possible de développer une nouvelle thérapie contre les cancers reposant sur un nouveau mode d'action synergique.

## Ciblage de PARP3 à l'aide d'une combinaison synergique

Afin d'empêcher PARP3 d'assurer ses fonctions dans la cellule, une possibilité serait d'utiliser un inhibiteur de cette enzyme. Actuellement, il n'existe qu'un seul inhibiteur sélectif de PARP3, le Me0328 **49** développé par le chercheur Anders E. G. Lindgren en 2013 (Figure 41). Le Me0328 **49** est un inhibiteur compétitif du cofacteur NAD<sup>+</sup> dans le site actif de l'enzyme et possède une IC<sub>50</sub> de 0,89 µM sur l'enzyme purifiée.<sup>254</sup> Une autre possibilité serait de provoquer la déplétion de PARP3 à l'aide d'un siRNA, une approche plus spécifique que l'utilisation d'un inhibiteur en raison de la grande homologie entre les sites catalytiques des différentes PARPs.

Ainsi, il serait intéressant d'utiliser un inhibiteur sélectif de PARP3 comme le Me0328 **49**, car les inhibiteurs actuellement utilisés contre manquent de sélectivité. En effet, ces molécules peuvent cibler PARP1 et PARP2, mais également PARP3 à des concentrations plus élevées. Le Me0328 **49** pourrait donc cibler PARP3 sans interagir avec PARP1 et PARP2, ce qui supprimerait le manque de sélectivité observé jusqu'à présent.

### *Nouvelles méthodes combinatoires pour surpasser la résistance cellulaire des cancers*

Afin de pouvoir profiter des effets de l'inhibition de PARP3 provoquée par le Me0328 **49**, il serait judicieux d'utiliser des molécules cytotoxiques aptes à développer un effet synergique. Le premier candidat est l'étoposide **50** (Figure 41), un inhibiteur de la topoisomérase II (ou Topo II).<sup>255</sup> La Topo II est une enzyme homodimérique possédant un mode d'action similaire à la topoisomérase I (détaillé dans le chapitre « Les camptothécines »).<sup>256</sup> A la différence de la Topo I, la Topo II permet de créer des coupures double-brin dans l'ADN (la Topo I ne pouvant réaliser que des coupures simple-brin).<sup>257</sup> L'étoposide interagit avec la Topo II lorsqu'elle est fixée sur l'ADN après avoir réalisé une coupure double-brin, l'empêchant ainsi de se libérer pour qu'une ADN-ligase puisse réparer la cassure générée. Ainsi, l'inhibition simultanée de la Topo II et de PARP3 permettrait d'observer un effet synergique en entraînant l'accumulation de cassures double-brins non réparées à un niveau létal pour la cellule.

Notre deuxième candidat est la vincristine **22** (Figure 41), un poison mitotique dont le mécanisme d'action a été détaillé dans le chapitre « Inhibiteur de microtubules ». Sa capacité à inhiber la polymérisation des microtubules serait un atout considérable en combinaison avec un inhibiteur de PARP3, cette enzyme étant impliquée dans la progression mitotique, notamment dans l'assemblage du fuseau mitotique ou dans la taille des télomères et leur cohésion.<sup>258</sup>

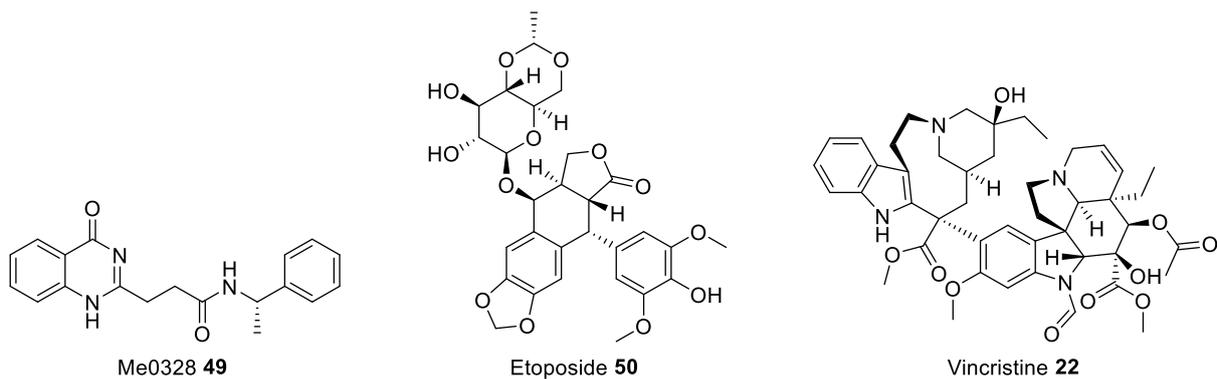


Figure 41 : Structures du Me0328 49 et des molécules sélectionnées afin de développer un effet synergique

### Nouveaux systèmes de délivrance

Afin d'améliorer l'efficacité d'une telle combinaison et de la rendre sélective envers le TNBC, il serait intéressant de vectoriser ces molécules à l'aide d'un anticorps. Les ADCs ainsi formés avec ces nouvelles charges thérapeutiques représenteraient une stratégie thérapeutique innovante.

Dans un premier temps, ces composés seront modifiés afin d'y incorporer un *linker* permettant leur relargage intracellulaire de façon optimale. Ces nouveaux ADCs seront alors évalués séparément et en combinaison dans des cellules de TNBC *in vitro* puis dans des modèles murins de xénogreffes de ces cellules.

La finalité de cette stratégie serait de générer un anticorps bi-conjugué composé de charges thérapeutiques avec deux mécanismes d'action distincts dont les effets seront synergiques. Pour ce faire, les méthodes de conjugaison développées pour la génération des mono-conjugués seront appliquées de façon séquentielle afin d'obtenir l'anticorps bi-conjugué final (Figure 42).

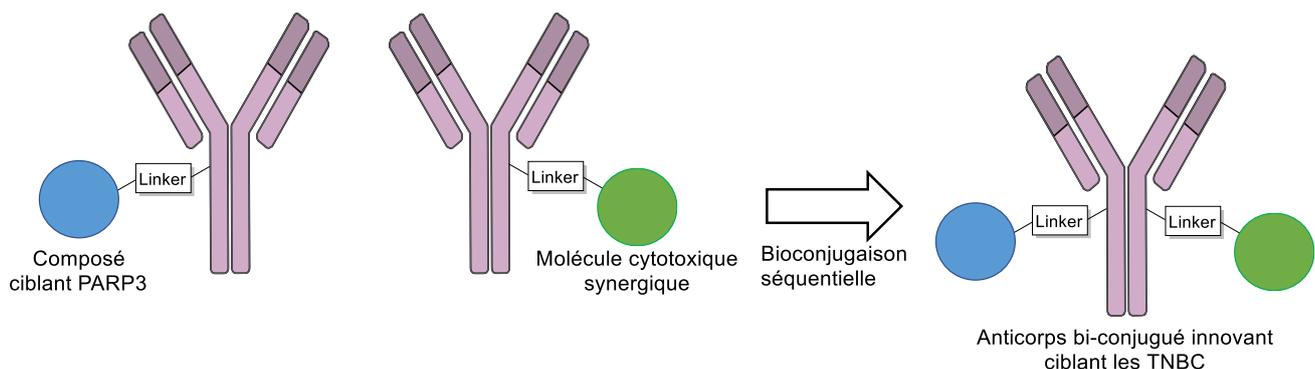


Figure 42 : Stratégie de mono-conjugaison d'un composé ciblant PARP3 et d'une molécule cytotoxique complémentaire. Les composés ciblant PARP3 et les molécules cytotoxiques seront fonctionnalisés avec un linker afin de les bioconjuguer à un anticorps. Ces méthodes de conjugaison seront ensuite opérées de façon séquentielle sur un même anticorps, permettant ainsi la génération d'anticorps bi-conjugaison porteurs de nos deux composés d'intérêt.

## Objectifs de thèse

Nous avons développé dans l'introduction que les ADCs représentent une classe émergente d'agents thérapeutiques permettant le ciblage spécifique de cancers via l'utilisation d'anticorps monoclonaux liés à des molécules cytotoxiques. Cependant, les ADCs souffrent de quelques limitations telles qu'un manque d'efficacité sur certains cancers résistants ou un choix de charge thérapeutique limité.

Ainsi, le but de cette thèse est de générer des ADCs équipés avec de nouveaux types de charges thérapeutiques qui permettront de pallier ces limitations. Nous avons décidé de cibler l'enzyme PARP3 du fait de son implication dans différents processus biologiques tels que la réparation des dommages dans l'ADN double-brins et la progression mitotique et plus particulièrement pour son rôle dans la prolifération des cellules cancéreuses. L'objectif est de générer un ADC ayant un mode d'action contre cette enzyme afin de provoquer de la létalité synthétique dans les cancers résistants présentant une mutation BRCA1/2, comme le TNBC. Pour ce faire, il sera possible d'utiliser soit le Me0328 **49**, un inhibiteur de PARP3, soit un petit ARN interférant, permettant la déplétion sélective de l'enzyme.

Pour étendre cette stratégie aux cancers ne présentant pas ces mutations, nous allons exploiter le fait que l'absence de PARP3 permet de fragiliser les cellules envers des molécules cytotoxiques. Dans ce but, nous allons générer des ADCs équipés de molécules cytotoxiques dont les mécanismes d'action seront complémentaires à l'inhibition ou la déplétion de PARP3, comme l'étoposide **50** ou la vincristine **22**. La finalité de cette thèse serait de combiner l'un de ces composés cytotoxiques et un agent agissant sur PARP3 sur un même anticorps afin de permettre leur délivrance simultanée et bénéficier d'un effet synergique.

Par conséquent, ces travaux de thèse concernent nos tentatives pour vectoriser des drogues cytotoxiques peu exploitées comme charge thérapeutique dans les ADCs en développant des stratégies de synthèse pour y installer des linkers. Pour finir, une stratégie de synthèse d'anticorps bi-conjugués a été élaborée afin de délivrer à la fois une molécule cytotoxique et une molécule ciblant PARP3.

En guise de preuve de concept, cette stratégie d'anticorps bi-conjugués utilisera dans un premier temps l'anticorps trastuzumab **54** (un anticorps monoclonal utilisé en routine dans notre laboratoire) ciblant spécifiquement le marqueur de surface HER2 surexprimé dans une lignée de cancer du sein, la lignée SKBR3.

### Projet 1 : Développement d'anticorps bi-conjugués porteurs d'agents ciblant PARP3 et de molécules cytotoxiques pour le ciblage des cancers du sein triple négatif

Ce premier projet a pour but de développer des ADCs bi-conjugués permettant de délivrer deux molécules dont les mécanismes d'action agiraient de concert afin d'obtenir un effet synergique. Un de ces composés sera une molécule permettant l'inhibition ou la déplétion de PARP3, l'autre sera quant à lui cytotoxique. Ainsi, l'absence de PARP3 provoquerait une fragilisation des cellules, sans induire de toxicité, menant à la potentialisation des effets du deuxième composé.

Afin de provoquer l'absence de PARP3, nous envisageons d'utiliser soit un inhibiteur de l'enzyme, le Me0328 **49**, soit un siRNA. Par la suite, l'impact de l'inhibition de PARP3 sur la potentialisation des effets de différentes molécules cytotoxiques sera évalué par un test de viabilité cellulaire.

Après avoir déterminé la meilleure combinaison de molécules, ces dernières seront fonctionnalisées avec un linker en vue d'être conjuguées séparément sur un anticorps modèle. Dans un premier temps, nous allons déterminer si ces ADCs sont bien actifs seuls *in vitro*. Dans un second temps, ces différents composés seront évalués en combinaison puis en bi-conjugaison afin de déterminer s'il y a un potentiel effet synergique entre la molécule cytotoxique et l'inhibition de PARP3.

## Projet 2 : Développement de nouveaux ADCs conjugués à la vérubuline, une nouvelle charge thérapeutique

Ce deuxième projet a pour but de développer des analogues de la vérubuline **28** en tant que nouvelle classe de charge thérapeutique pour ADCs. La vérubuline **28**, à l'inverse des drogues classiquement employées, est une petite molécule hydrophile agissant en tant qu'inhibiteur des microtubules. Ainsi, ce type de molécule permettrait de diminuer les problèmes d'hydrophobicité apportées par certaines drogues classiquement utilisées en ADC.

Dans ce projet, nous allons synthétiser la vérubuline **28** ainsi que différents analogues portant des fonctions nucléophiles afin de la vectoriser. Nous allons par la suite synthétiser des dérivés contenant un linker pour la bioconjugaison et étudier leur efficacité en tant qu'ADC sur une lignée cellulaire modèle par des tests de viabilité cellulaire.

# Développement d'anticorps bi-conjugués porteurs d'agents ciblant PARP3 et de molécules cytotoxiques pour le ciblage des cancers du sein triple négatifs

## Introduction

Le cancer du sein triple négatif (ou TNBC pour *triple negative breast cancer*) représente à ce jour un important défi thérapeutique en raison de son mauvais pronostic dû à son agressivité, à des résistances envers les traitements conventionnels, à son très haut potentiel métastatique et à d'importants risques de récurrence (causés par des lésions métastatiques résiduelles).<sup>224</sup> De plus, en présence de métastase, le taux de survie à 5 ans passe de 90% pour une tumeur locale à seulement 12% pour un cancer métastatique. Malgré les traitements actuels, les lésions métastatiques résiduelles vont mener à une récurrence de la tumeur dans 40% des cas.<sup>228</sup>

Le TNBC représente 15-20% des cancers du sein et en est un sous-type présentant un déficit de trois récepteurs extracellulaires généralement utilisés en thérapie : le récepteur hormonal d'estrogène (ER), le récepteur hormonal de progestérone (PR) et le récepteur HER2 (*Human Epidermal growth factor 2 receptor*). Cette particularité empêche ainsi son exploitation dans les thérapies hormonales ciblant les récepteurs ER et PR, et limite les immunothérapies basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant le récepteur HER2, comme le trastuzumab.<sup>226</sup> Il est alors impératif de développer de nouveaux traitements ciblés afin de réduire la quantité de métastases et de tuer efficacement les cellules cancéreuses.

L'une des particularités des TNBC est qu'ils peuvent, dans 20% des cas, présenter des mutations BRCA<sup>1/2</sup>. Ces mutations sont impliquées dans leur résistance en entraînant un déficit dans la réparation de l'ADN.<sup>259</sup> Aussi, il est possible d'exploiter ces mutations avec des inhibiteurs de PARP, ce qui permettra d'altérer d'autres voies de la réparation. Ceci aura pour effet de provoquer une accumulation de dommages non réparables dans l'ADN menant à la mort cellulaire. Ce phénomène contribue à générer de la létalité synthétique, un type de mort cellulaire possible uniquement après l'altération ou l'inhibition de plusieurs cibles biologiques qui individuellement n'ont pas d'effets cytotoxiques.<sup>260</sup>

Dans l'intention d'élaborer un nouveau type de thérapie pour soigner le TNBC, nous avons décidé de nous tourner vers l'enzyme PARP3. Cette enzyme participe à de nombreux processus biologiques, comme la réparation double-brin de l'ADN, la régulation de la transcription, les réarrangements chromosomiques ou la progression mitotique.<sup>251</sup>

PARP3 est impliquée dans l'agressivité tumorale car les cellules cancéreuses peuvent utiliser les mécanismes de défense de PARP3, notamment dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, dans l'organisation et la stabilisation des microtubules ainsi que dans l'intégrité des télomères, afin de développer une résistance cellulaire.<sup>261</sup> De plus, une surexpression de PARP3 a été observée dans des lignées cellulaires de certains cancers agressifs tel que le glioblastome ou le TNBC (comparé à des lignées de cancer du sein non-triple négative).<sup>244</sup>

De ce fait, mettre au point une thérapie permettant l'inhibition de PARP3 serait à l'origine d'un nouveau type de thérapie innovante et efficace sur les TNBC BRCA<sup>1/2mut</sup>.<sup>259</sup> Le but de ce projet est de cibler spécifiquement l'enzyme PARP3 pour profiter de son implication dans la réparation double-brin de l'ADN et dans l'agressivité tumorale afin de provoquer de la létalité synthétique. De plus, dans le but d'étendre cette stratégie aux TNBC non BRCA<sup>mut</sup>, l'inhibition de PARP3 sera alors combinée à l'action cytotoxique d'une molécule synergique dont les effets seraient potentialisés en l'absence de cette enzyme.

Pour provoquer l'absence de PARP3, une possibilité serait l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de cette enzyme. Actuellement, il n'existe qu'un seul inhibiteur de PARP3, le Me0328 **49** développé par le chercheur Anders E. G. Lindgren en 2013 (Figure 43). Le Me0328 **49** est un inhibiteur compétitif du cofacteur NAD<sup>+</sup> dans le site actif de l'enzyme permettant l'inhibition de PARP3 avec une IC<sub>50</sub> de 0,89 μM sur l'enzyme purifiée.<sup>254</sup> Il serait également possible d'utiliser un petit ARN interférant ciblant directement l'expression de PARP3 (siPARP3 **53**).

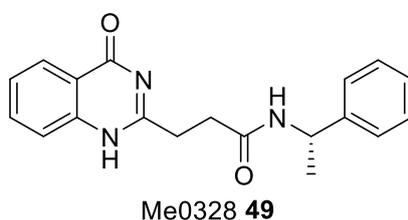


Figure 43 : Structure de l'inhibiteur de PARP3, le Me0328 **49**

La stratégie explorée dans ce projet est de générer un anticorps sur lequel sera conjugué le Me0328 **49** ou le siPARP3 **53** à l'aide d'un bras espaceur (ou linker) dans le but de délivrer sélectivement l'un de ces composés directement dans les cellules cancéreuses désirées. Ainsi, des méthodes de conjugaison seront développées pour permettre la modification d'anticorps avec ces composés par une étape de conjugaison lysine. Dans le cas du Me0328 **49**, comme aucune stratégie n'a été développée précédemment, des méthodes de modifications ainsi que différents linkers (clivables ou non) seront évalués dans ce projet. Pour la modification du siPARP3 **53**, nous allons nous baser sur une méthode ayant déjà été développée en interne dans notre laboratoire et reposant sur l'utilisation d'un linker non-clivable polyéthylène glycol. Ce siRNA fonctionnalisé pourra alors être bioconjugué sur un anticorps grâce à une stratégie de modification en deux temps, appelée stratégie « Plug and Play ».

Un ADC permettrait la délivrance simultanée et sélective de ces deux composés afin de s'assurer qu'ils soient internalisés dans les mêmes cellules. En guise de preuve de concept, cette stratégie d'anticorps conjugués utilisera dans un premier temps l'anticorps trastuzumab, un anticorps monoclonal déjà approuvé par la FDA et utilisé en routine dans notre laboratoire, ciblant spécifiquement le marqueur de surface HER2 surexprimé dans une lignée de cancer du sein, la lignée SKBR3<sup>262</sup>. En vue d'utiliser un anticorps valide pouvant cibler le TNBC, nos collaborateurs dans ce projet sont en cours de sélection d'un marqueur de surface pertinent et dont l'efficacité a déjà été prouvé sur ces cellules cancéreuses. La combinaison des composés sera également évaluée sur une lignée cellulaire de TNBC afin de vérifier si la synergie créée est efficace dans ces cellules cancéreuses d'intérêt, la lignée MDA-MB-436. Enfin, après validation de ce nouveau système, les méthodes de bioconjugaison seront transposées à un anticorps ciblant le TNBC.

En effet, l'enzyme PARP3 étant impliquée dans la réparation double-brin de l'ADN, son absence serait capable de fragiliser les cellules cancéreuses face à l'action de molécules cytotoxiques provoquant des dommages dans l'ADN telle que l'étoposide **50** (un inhibiteur de la topoisomérase II avec une efficacité cytotoxique de l'ordre du micromolaire<sup>263</sup>), ce qui potentialiserait l'accumulation de lésions dans l'ADN. Dans le but de vectoriser l'étoposide **50**, nous envisageons de nous baser sur les travaux de Toki, *et al.* pour accrocher un linker clivable ValCit-PAB grâce à une réaction de Mitsunobu.<sup>264</sup> Cette équipe a développé cette stratégie de modification de l'étoposide **50** à l'aide d'un motif ValCit protégé avec un groupement carbamate de benzyle en position N-terminale, Z-ValCit-PAB-OH **51**, afin d'employer cette molécule en tant que prodrogue sous sa forme Z-ValCit-étoposide **52** (Figure 44). Ainsi, nous planifions d'utiliser un linker ValCit-PAB-OH protégé avec un groupement Fmoc ou Boc pour la réaction de Mitsunobu avec l'étoposide **50**. Ensuite, cette molécule sera déprotégée et fonctionnalisée à l'aide d'un bras espaceur possédant un motif maléimide en vue de l'étape de bioconjugaison cystéine.

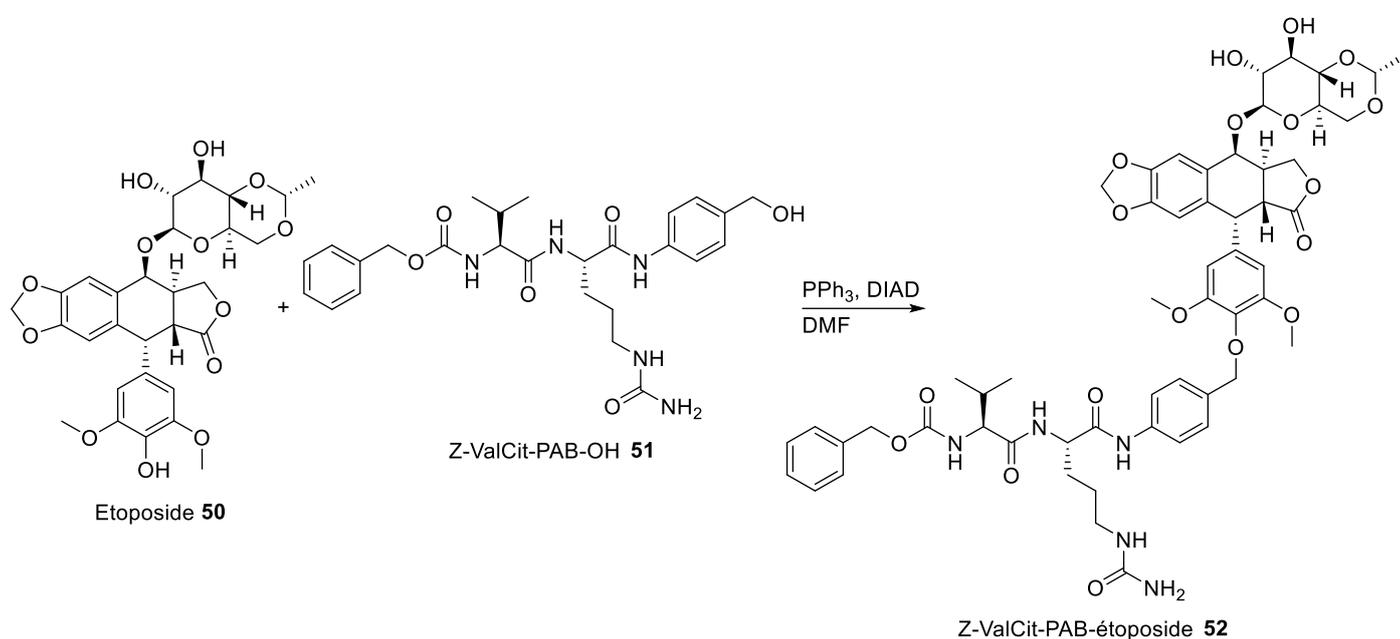


Figure 44 : Stratégie de modification de l'étoposide **50** développée par Toki, *et al.* utilisant la réaction de Mitsunobu pour obtenir la prodrogue Z-ValCit-étoposide **52**

De plus, PARP3 étant également impliquée dans la progression mitotique (notamment dans l'organisation et la stabilisation des microtubules ainsi que dans l'intégrité des télomères)<sup>244,251</sup>, son absence permettrait de rendre sensibles les cellules cancéreuses face à l'action de molécules influençant la division cellulaire telle que la vincristine **22**, un vinca-alcaloïde inhibiteur de la polymérisation des microtubules lors de la division cellulaire ayant une activité cytotoxique subnanomolaire.<sup>265</sup> La molécule cytotoxique synergique sera alors également conjuguée à un anticorps à l'aide d'un linker pour permettre sa délivrance sélective dans les cellules désirées. Dans le but de modifier la vincristine **22** et d'y incorporer un linker clivable ValCit à l'aide d'une stratégie d'alkylation quaternaire.<sup>162</sup> Ces chercheurs ont montrés qu'en utilisant un analogue chlorure de benzyle **26**, dérivé du linker MC-ValCit-PAB-OH **85**, il est possible de fonctionnaliser un panel de drogues telle que la vinblastine **21**, un vinca-alcaloïdes très proche structuralement de la vincristine **22**, leur permettant d'obtenir l'ammonium MC-ValCit-PAB-vinblastine **27** (Figure 45). De ce fait, cette stratégie sera

adaptée pour la modification de la vincristine **22**, qui sera alors prête pour une étape de conjugaison cystéine à l'aide d'un motif maléimide.

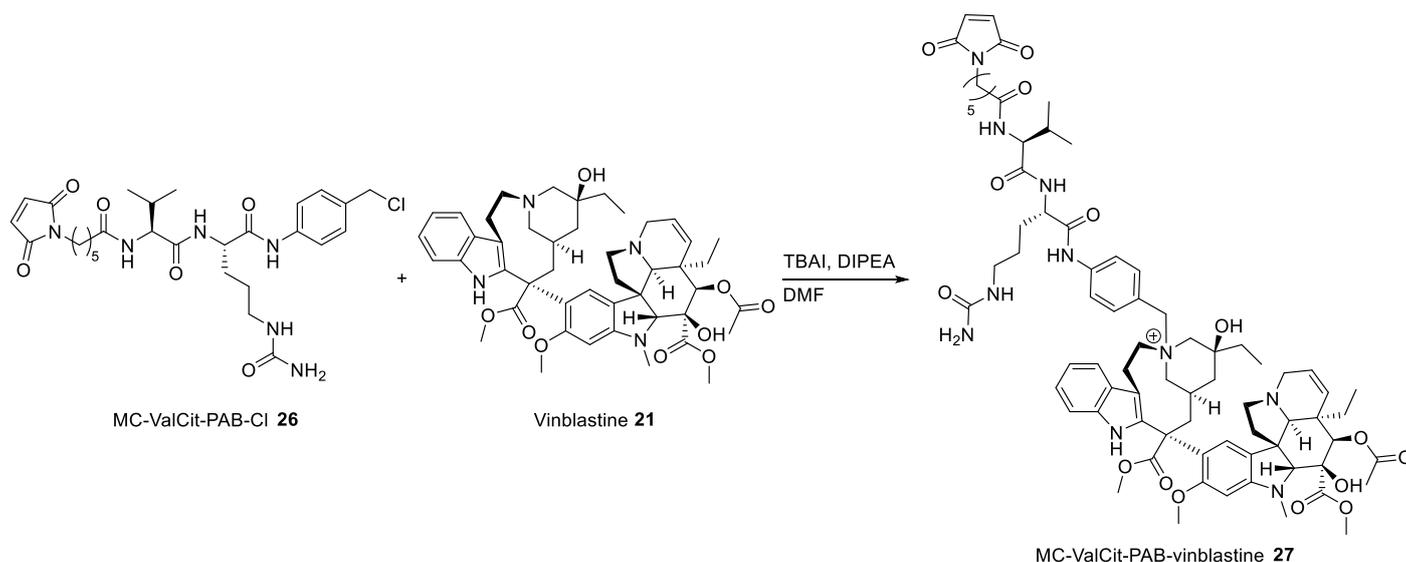


Figure 45 : Stratégie d'alkylation quaternaire développée par Staben, et al. afin de fonctionnaliser la vinblastine **21** à l'aide d'un linker MC-ValCit-PAB-Cl **26** pour obtenir le MC-ValCit-PAB-vinblastine **27**

Avant de générer un anticorps bi-conjugué portant à la fois un composé ciblant PARP3 et une molécule cytotoxique, il nous est apparu opportun de nous concentrer sur la simple conjugaison de ces composés sur trastuzumab, afin d'évaluer dans un premier temps l'efficacité d'un mélange de ces immunoconjugués. Puis, dans un deuxième temps, ces méthodes de mono-conjugaison optimisées seront appliquées de façon séquentielle afin d'obtenir les anticorps bi-conjugués finaux.

Tout d'abord, le Me0328 **49** sera synthétisé pour évaluer sa combinaison *in vitro* avec l'étoposide **50** ou la vincristine **22**. En fonction des résultats biologiques obtenus, des linkers seront synthétisés permettant la modification et la mono-conjugaison de ces composés. Ces ADCs seront alors évalués *in vitro* seuls ou en combinaison afin de déterminer les paramètres menant à une synergie entre ces composés. Enfin, les méthodes de bioconjugaison développées seront opérées de façon successive sur un même anticorps, menant à l'obtention d'un anticorps bi-conjugué (Figure 46).

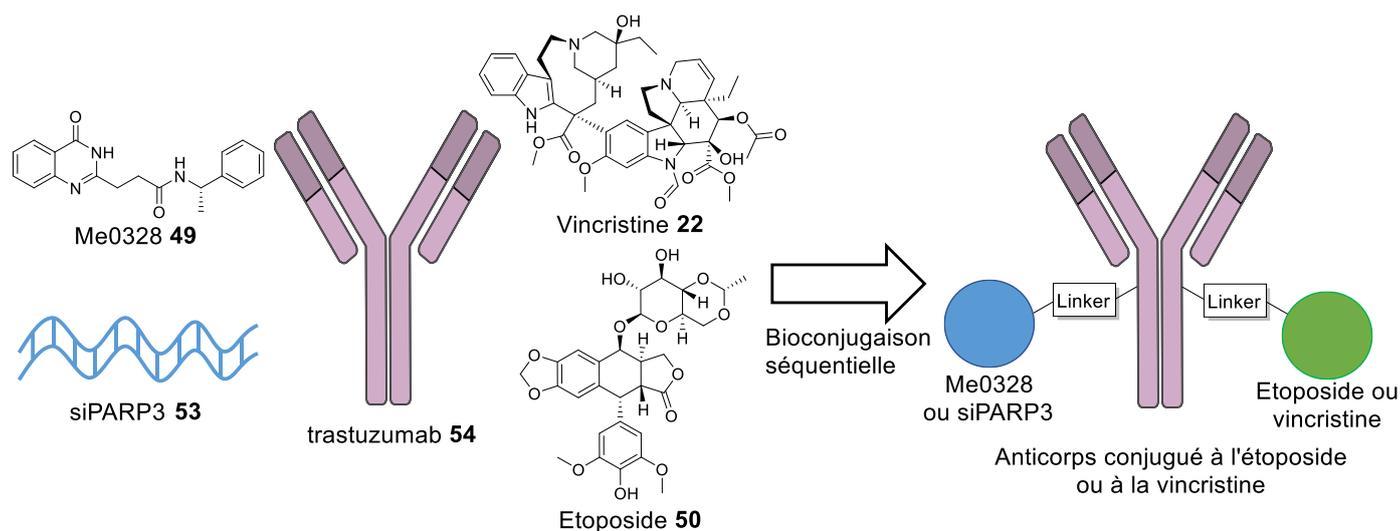


Figure 46 : Stratégie de bioconjugaison séquentielle envisagée pour obtenir l'anticorps bi-conjugué portant à la fois un composé ciblant PARP3 et une molécule synergique

Ce dernier permettra alors l'internalisation dans les cellules de deux molécules différentes dont les mécanismes d'action seront complémentaires, menant à une mort cellulaire efficace sur les cellules SKBR3. Ainsi, ces méthodes de conjugaison pourront être transposées à un anticorps ciblant les TNBC.

## Résultats et discussions

### Combinaison de l'inhibiteur Me0328 49 et de l'étoposide 50

#### Synthèse du Me0328 49

Le Me0328 49 est l'un des seuls inhibiteurs connus de l'enzyme PARP3. Cette molécule est un inhibiteur compétitif du cofacteur NAD<sup>+</sup> et cible le site actif de PARP3.

Le Me0328 49 a été synthétisé en trois étapes et a été obtenu avec un rendement global de 25%.<sup>266,267</sup> D'abord, le premier intermédiaire 57 a été obtenu grâce à une réaction d'addition-élimination en condition acide entre l'antranilamide 55 et l'anhydride succinique 56 menant à une ouverture de cycle. La molécule 57 a été obtenue avec un rendement de 74%. Cette dernière a ensuite été cyclisée en condition basique grâce à une réaction de condensation afin de former l'acide 58 correspondant avec un rendement de 51%. Enfin, le composé 58 a été couplé à de la (S)-(-)-1-phényléthylamine 59 en présence de benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) et de pyridine afin d'obtenir le Me0328 49 final avec un rendement de 65% (Figure 47).

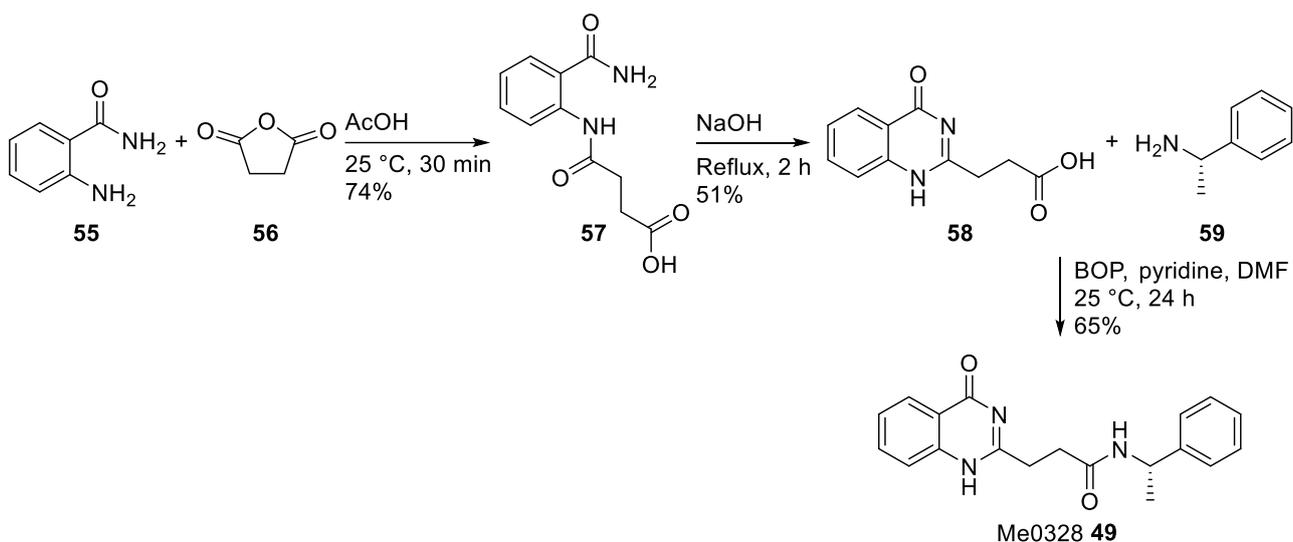


Figure 47: Synthèse du Me0328 49 en trois étapes à partir d'antranilamide 55 commercial

#### Evaluation de la combinaison entre le Me0328 49 et l'étoposide 50 sur les cellules SKBR3

La combinaison entre le Me0328 49 et l'étoposide 50 commercial a été évaluée par un test de viabilité cellulaire WST-1 (pour *Water Soluble Tetrazolium*) sur la lignée cellulaire SKBR3. Différentes concentrations de composés ont été évaluées pendant 72 h d'incubation. Le Me0328 49 ayant une  $IC_{50}$  de 0,89  $\mu\text{M}$  sur l'enzyme purifiée, cette molécule a été incubée à des concentrations de 0 à 10  $\mu\text{M}$ .<sup>254</sup> De 0,5  $\mu\text{M}$  à 3  $\mu\text{M}$  d'étoposide 50, seul son effet cytotoxique est observé, et ce, indépendamment de la concentration de Me0328 49 (Figure 48). Ce résultat suggère que l'effet du Me0328 49 ne permet pas d'augmenter l'activité cytotoxique de l'étoposide 50 de 0 à 10  $\mu\text{M}$  d'inhibiteur.

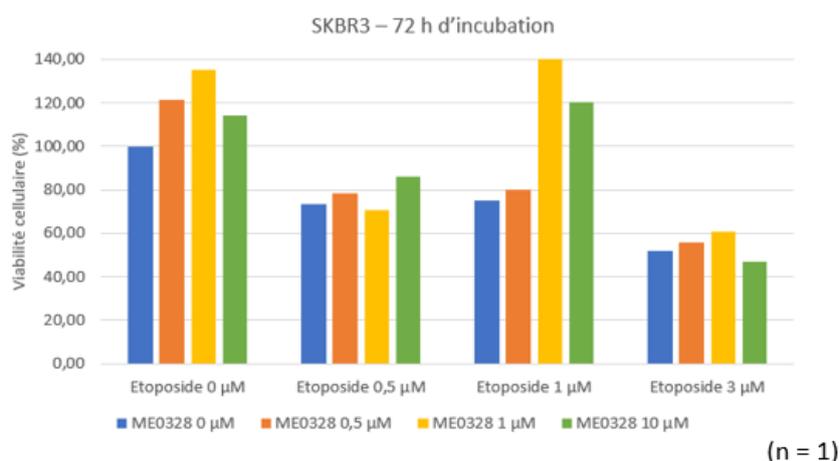


Figure 48 : Evaluation *in vitro* de la combinaison du Me0328 49 et de l'étoposide 50 sur les cellules SKBR3. Différentes concentrations des composés ont été évaluées pendant 72 h d'incubation afin de déterminer le pourcentage de viabilité cellulaire par un test WST-1.

Il s'avère que le Me0328 **49** ne présentait pas une activité suffisante afin d'inhiber PARP3 à ces concentrations. Comme son IC<sub>50</sub> est de 0,89 µM sur l'enzyme purifiée, une incubation sur des cellules nécessiterait des concentrations plus importantes. Afin d'outrepasser ces problèmes, nous avons décidé d'employer une méthode, basée sur l'utilisation de petits ARN interférents (siRNA), permettant de cibler et de dépler sélectivement PARP3.

Dans ce but, un SMARTpool commercial (mélange de plusieurs siRNAs dont les séquences sont complémentaires à l'ARN messenger permettant la traduction de PARP3) de siRNA ciblant PARP3 a été évalué. De plus, les séquences de ces siRNAs ont été soumises à un test de transfection afin de sélectionner un siRNA ciblant PARP3 (siPARP3 **53**) permettant une déplétion de l'enzyme.

#### Evaluation de la combinaison entre le siPARP3 **53** et l'étoposide **50** sur les cellules SKBR3

Dans un premier temps, la déplétion de PARP3 a été mesurée à l'aide d'un agent de transfection, le JETprime®, afin de s'assurer de l'efficacité du siPARP3. Les cellules ont été transfectées avec 50 nM de siPARP3 **53** ou 50 nM d'un siRNA de contrôle, le siSCR, pendant 4 h. Ainsi, l'expression de PARP3 a été évaluée par western-blot et mesurée par un gel d'électrophorèse, montrant une déplétion de l'enzyme d'environ 50% (Figure 49). De cette façon, il a été possible de provoquer la déplétion de PARP3 grâce à l'utilisation du siPARP3 **53** transfecté comparé au siSCR. Ce résultat suggère que cette méthode était suffisamment efficace et sélective de l'enzyme, pouvant être utilisée en combinaison avec une molécule synergique.

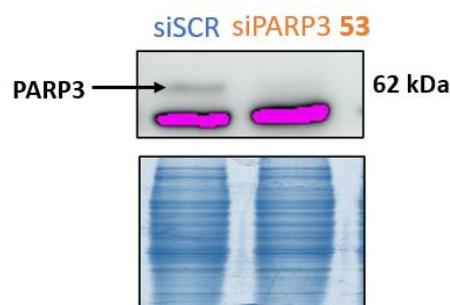


Figure 49 : Déplétion de PARP3 provoquée par la transfection du siPARP3 **53** comparé au siSCR. Les cellules SKBR3 ont été transfectées avec 50 nM de siPARP3 **53** ou siSCR pendant 4 h. L'expression de l'enzyme a été évaluée par western-blot et mesurée grâce à un gel d'électrophorèse.

La combinaison entre le siPARP3 **53** et l'étoposide **50** commercial a ensuite été évaluée par un test de viabilité cellulaire sur la lignée cellulaire SKBR3. Ainsi, les concentrations de siRNA ont été fixées à 50 nM, dose à laquelle une déplétion de PARP3 a été observée. Les cellules ont été prétraitées pendant 48 h avec les siRNA avant d'ajouter l'étoposide **50** à différentes concentrations ; cet ensemble sera incubé pendant 72 h. De 1 nM à 10 µM, seule l'activité cytotoxique de l'étoposide **50** a été observée, malgré la transfection du siPARP3 **53**, et comparée à la transfection du siSCR (Figure 50). Ce résultat suggère que la déplétion de PARP3 induite par le siPARP3 **53** ne permettait pas d'augmenter l'activité cytotoxique de l'étoposide **50** de 4 à 12 µM, concentrations où l'effet de **50** apparaît.

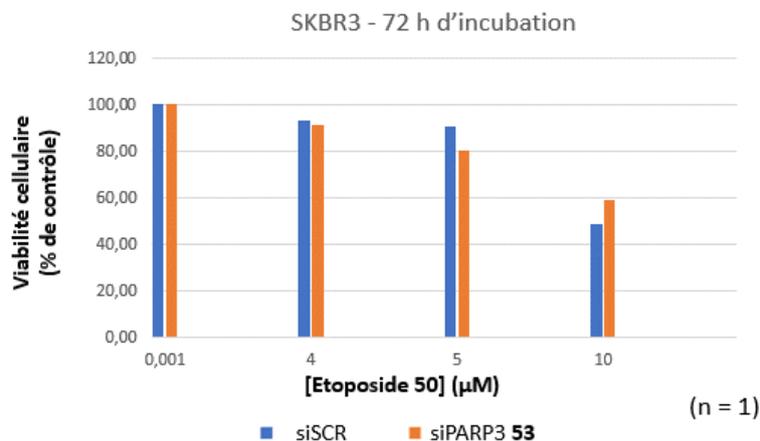


Figure 50 : Evaluation *in vitro* de la combinaison entre le siPARP3 **53** et l'étoposide **50** sur les cellules SKBR3. Les cellules ont été prétraitées avec 50 nM de siRNA 48 h avant l'ajout d'étoposide **50**. Différentes concentrations de **50** ont été évaluées pendant 72 h d'incubation afin de déterminer le pourcentage de viabilité cellulaire par un test WST-1.

Pour tenter d'outrepasser ces problèmes, nous avons décidé d'augmenter les temps d'incubation de l'étoposide **50** (non montré ici). Cependant, les résultats étaient similaires : aucune potentialisation n'a été observée en l'absence de PARP3. Au vu de ces résultats, il nous paraissait nécessaire de changer de molécule cytotoxique. Nous avons donc décidé de cibler un autre mécanisme d'action dans lequel PARP3 est impliquée, la progression mitotique. En effet, PARP3 est notamment impliquée dans l'assemblage du fuseau mitotique ou dans la taille des télomères et leur cohésion.<sup>258</sup>

Nous nous sommes alors penchés sur l'utilisation de poison mitotique tel que la vincristine **22**. Cette molécule sera alors évaluée en test de viabilité cellulaire en combinaison avec la déplétion de PARP3 induite par le siPARP3 **53**.

Evaluation de la combinaison entre le siPARP3 **53** et la vincristine **22**

#### *Evaluation sur les cellules SKBR3*

La combinaison entre le siPARP3 **53** et la vincristine **22** commerciale a été évaluée par un test de viabilité cellulaire sur la lignée cellulaire SKBR3, comparé avec le siSCR. Les cellules ont été prétraitées pendant 48 h avec 50 nM de siRNAs avant d'ajouter la vincristine à différentes concentrations. Puis cet ensemble a été incubé pendant 48 h. Entre 1 et 2 nM de vincristine **22**, une augmentation de l'activité cytotoxique a été observée. De plus, cette augmentation n'a pas eu lieu lorsque le siSCR a été transfecté. Ce résultat suggère qu'une augmentation significative de 60-70% des effets de la vincristine **22** est possible en absence de PARP3 provoquée par l'action du siPARP3 **53**. De plus, cette potentialisation a pu être mise en évidence avec un temps d'incubation plus court (48 h vs 72 h) (Figure 51).

### Pré-traitement 48 h avant le traitement avec la vincristine **22**

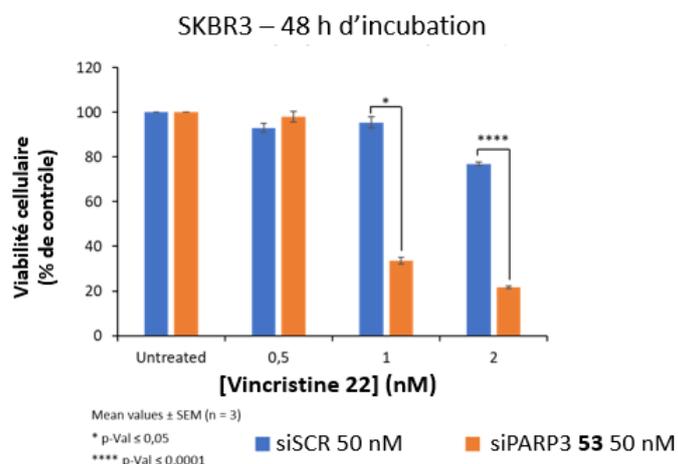


Figure 51 : Evaluation *in vitro* de la combinaison entre le siPARP3 **53** et la vincristine **22** sur les cellules SKBR3. Les cellules ont été prétraitées avec 50 nM de siRNA 48 h avant l'ajout de vincristine **22**. Différentes concentrations de **22** ont été évaluées pendant 48 h d'incubation afin de déterminer le pourcentage de viabilité cellulaire par un test WST-1.

L'absence de PARP3 provoquée par le siPARP3 **53** a permis ici de mettre en avant une augmentation significative des effets de la vincristine **22** sur les cellules SKBR3. Afin de valider cette combinaison sur un modèle de TNBC, ces composés seront évalués sur la lignée MDA-MB-436.

#### Evaluation sur les cellules MDA-MB-436 TNBC

Dans un premier temps, la déplétion induite par le siPARP3 **53** dans les cellules MDA-MB-436 a été évaluée par western-blot, mesurée par un gel d'électrophorèse et comparée avec le siSCR après 4 h d'incubation. Ici une déplétion totale de l'enzyme par le siPARP3 **53** a été observée avec 50 nM de composé (Figure 52).

Dans un deuxième temps, les cellules ont été prétraitées avec 50 nM de siRNAs, 48 h avant le traitement avec la vincristine **22**, à différentes concentrations de vincristine **22** pendant 72 h. La viabilité cellulaire a alors été mesurée avec un test WST-1. Cependant, afin d'observer une potentialisation, le temps d'incubation a été augmenté, passant de 48 h à 72 h. Ces résultats nous montrent que l'activité cytotoxique de la vincristine **22** passe de 18 nM (cellules transfectées avec le siSCR) à 1,9 nM (cellules transfectées avec le siPARP3 **53**), indiquant une efficacité 10 fois supérieure (Figure 52). Ainsi, la potentialisation observée avec les cellules SKBR3 a également été obtenue dans la lignée cellulaire MDA-MB-436, prouvant que cette combinaison est efficace sur ces cellules de TNBC. Cependant, les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont plus élevées que sur les cellules SKBR3. Mais ce résultat est compréhensible car les cellules MDA-MB-436 sont plus résistantes que les cellules SKBR3.

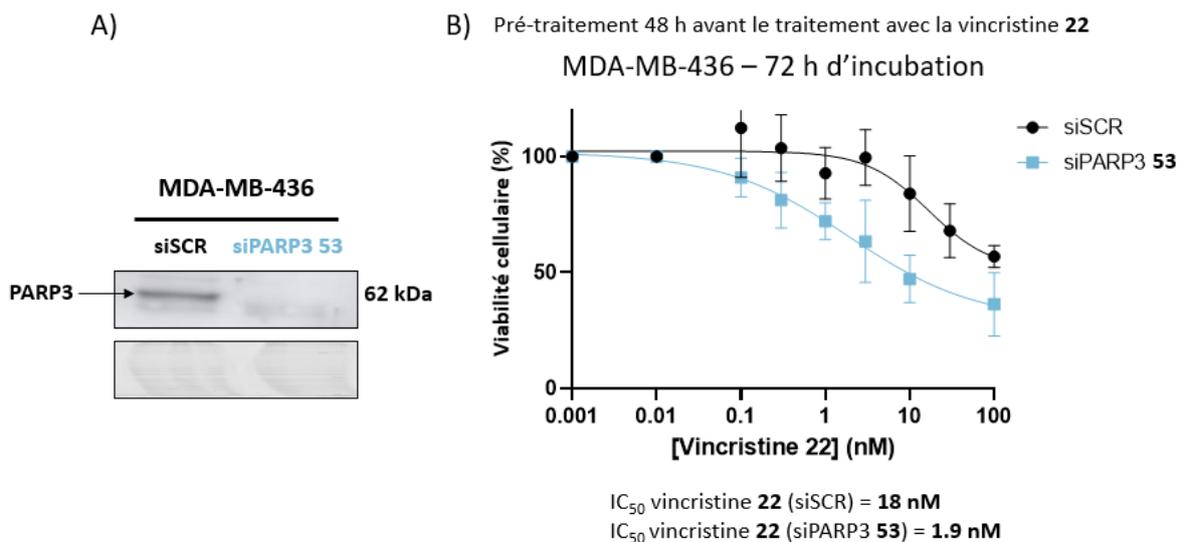


Figure 52 : Evaluation *in vitro* de la combinaison entre le siPARP3 **53** et la vincristine **22** sur les cellules MDA-MB-436. A) La déplétion provoquée par le siPARP3 **53** comparée à la transfection du siSCR a été mesurée par western-blot avec 50 nM de composé et une incubation de 4 h, et grâce à un gel d'électrophorèse. B) Mesure du pourcentage de viabilité cellulaire après incubation de la vincristine **22** pendant 72 h sur les cellules prétraités avec les siRNAs. La déplétion mesurée est en accord avec la potentialisation observée lors du test WST-1.

Au vu de l'effet de potentialisation que possède la combinaison entre le siPARP3 **53** et la vincristine **22**, il a été décidé de conjuguer ces deux composés sur l'anticorps trastuzumab, d'abord séparément afin d'évaluer les effets des mono-conjugués seuls puis en combinaison avec les composés libres ou conjugués.

#### Bioconjugaison du siPARP3 **53**

##### Synthèse du linker BCN-PEG<sub>6</sub>-PFP **61**

Dans le but de générer des conjugués anticorps-siRNA, nous avons décidé d'employer une stratégie de fonctionnalisation en deux temps, la stratégie « Plug and Play ». Dans un premier temps, les anticorps sont pré-fonctionnalisés par un fluorure de 4-azidobenzoyl (ABF **60**) permettant l'incorporation d'un motif azoture sur les anticorps. Cet électrophile, développé en interne dans notre laboratoire, possède l'avantage de permettre une conjugaison rapide (30 min) et linéaire. Ainsi la conjugaison sera stœchiométrique, qui permettra d'obtenir un DoC moyen égal au nombre d'équivalent d'ABF **60** utilisé.<sup>268</sup> Dans un deuxième temps, l'azoture inséré pourra être utilisé afin d'incorporer n'importe quel composé fonctionnalisé avec un motif bicyclo[6.1.0]non-4-yne (ou BCN) par une réaction SPAAC (*strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*) en 24 h (Figure 53).

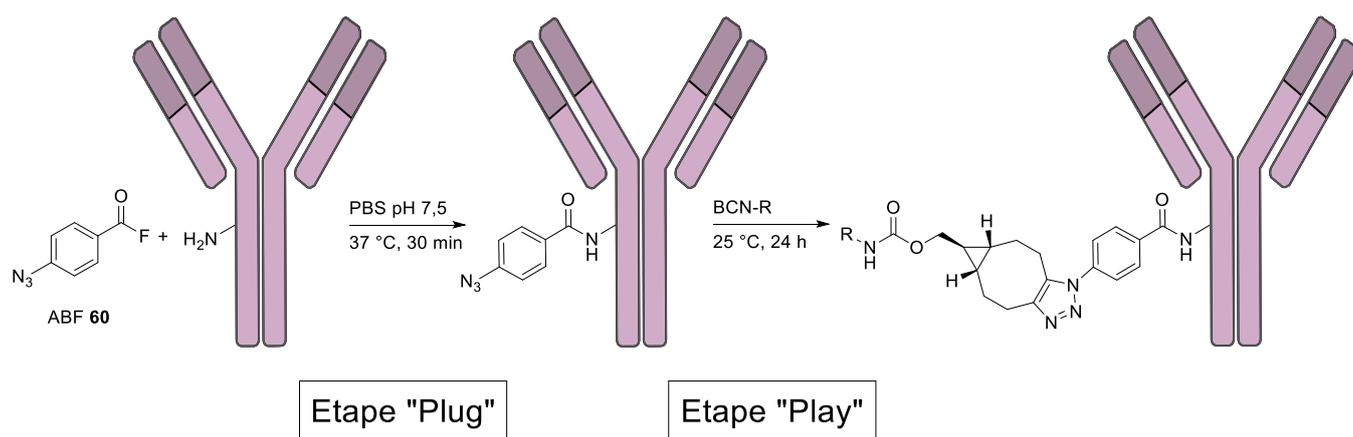


Figure 53 : Stratégie "Plug and Play" envisagée pour la bioconjugaison des siRNAs

En vue d'effectuer la conjugaison entre le siPARP3 **53** et le trastuzumab **54**, un linker bifonctionnel hexaéthylène glycol **61**, développé par notre laboratoire, a été synthétisé.<sup>268</sup> Ce linker **61** est composé d'un motif ester de pentafluorophénol et d'un motif bicyclo[6.1.0]nonyne – BCN (Figure 54). L'ester de pentafluorophénol est un motif électrophile très réactif, qui réagit efficacement et qui est moins susceptible à l'hydrolyse en milieu aqueux. Le motif BCN est quant à lui nécessaire afin de réagir avec les azotures, introduits sur les anticorps avec l'ABF **60**, par réaction SPAAC.

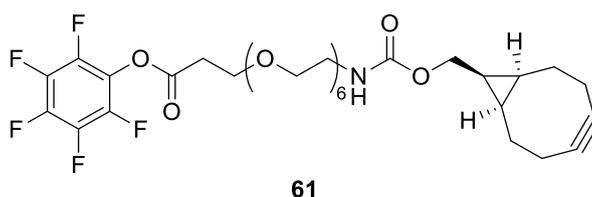


Figure 54 : Structure du linker BCN-PEG<sub>6</sub>-PFP **61** utilisé pour la bioconjugaison des siRNAs

Dans un premier temps, un BCN alcool **68** a été activé sous forme de carbonate par une réaction d'addition-élimination avec du chloroformate de *p*-nitrophénol **69**, permettant d'obtenir le BCN-PNP **67** avec un rendement de 88%.

Ensuite, le linker **61** a été synthétisé en sept étapes avec un rendement global de 7%. La synthèse démarre à partir de l'hexaéthylène glycol (PEG<sub>6</sub> **62**) qui a été mono-tosylé à l'aide d'une réaction d'addition-élimination avec du chlorure de tosylé. La mono-tosylation a été rendue possible en utilisant de l'iodure de potassium, afin de catalyser la réaction, et de l'oxyde d'argent (I) afin de complexer la chaîne PEG<sub>6</sub>, ne laissant libre qu'une seule fonction alcool, permettant l'obtention de la molécule **63** avec un rendement de 56%.<sup>269</sup> Le motif -OTs a été substitué par un groupement azoture par une réaction de substitution nucléophile en présence de d'azoture de sodium afin d'obtenir la molécule **64** avec un rendement de 74%. La fonction alcool restante a ensuite été déprotonée en présence de *tert*-butanolate de potassium et mise en réaction avec de l'acrylate de *tert*-butyle par une addition d'oxa-Michael conduisant à la molécule **65** avec un rendement de 45%. L'azoture a par la suite été réduit par une réaction d'hydrogénation catalysée avec du palladium (0) afin d'obtenir l'amine correspondante **66** avec un rendement de 74%. Cette molécule a ensuite été fonctionnalisée avec le BCN-PNP **67**, synthétisé précédemment, par une réaction d'addition-élimination permettant l'obtention du PEG<sub>6</sub>-BCN **70** avec un rendement de 78%. L'ester *tert*-butylique **70** a été déprotégé par une réaction de saponification en présence d'hydroxyde de lithium dans un méthanol/eau, générant

l'acide **71** avec un rendement de 92%. L'acide carboxylique libre a enfin été activé par une réaction de couplage en présence de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyle)carbodiimide (EDCI) avec du pentafluorophénol permettant l'obtention du linker BCN-PEG<sub>6</sub>-PFP **61** avec un rendement de 68% (Figure 55). L'obtention de ce linker **61** a pu être confirmée par la présence de l'ester de pentafluorophénol grâce à une analyse par spectroscopie RMN F<sup>19</sup>.

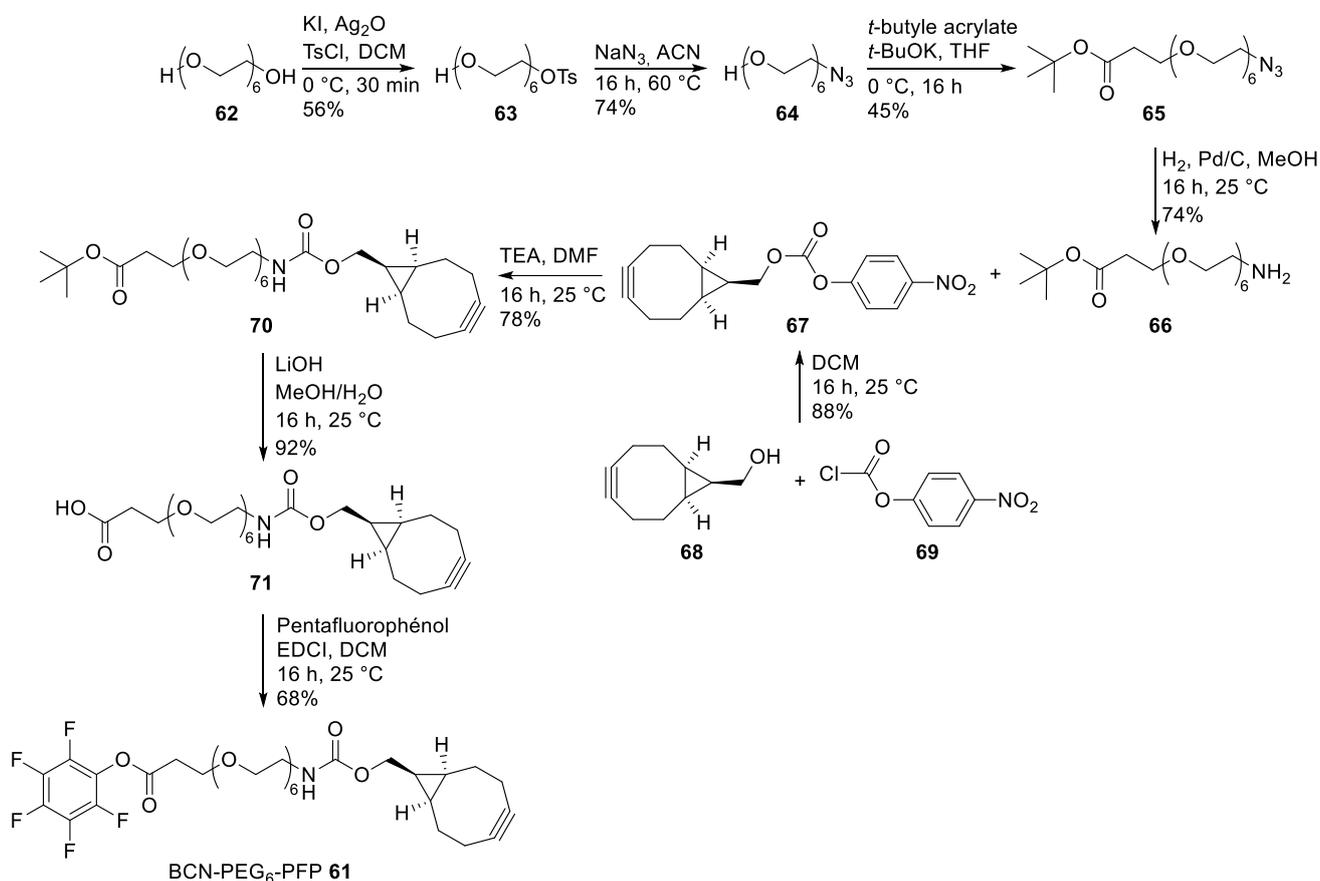


Figure 55 : Synthèse du linker BCN-PEG<sub>6</sub>-PFP **61** en sept étapes

### Conjugaison du linker **61** avec les siRNAs

La stratégie permettant l'incorporation de linkers sur les siRNAs a été développée et optimisée en interne dans le laboratoire par un ancien doctorant, le chercheur Tony Rady. Pour ce faire, l'ester activé a été utilisé pour accrocher le linker **61** sur un brin d'ARN modifié avec un groupement amine en position 5'. Cette modification sur cette position permet notamment de rendre cette extrémité plus stable en diminuant la reconnaissance par les ribonucléases, générant ainsi une espèce plus apte à devenir le brin passager (chapitre sur les oligonucléotides). Le linker **61** a été conjugué au brin de siRNA sens (ssPARP3 **72**) modifié avec une fonction amine primaire sur l'extrémité 5' par une réaction d'addition-élimination. Cette réaction a été faite dans un tampon borate à une concentration de 0,1 M à pH 8, permettant d'obtenir le BCN-ssRNA **73** avec de très bons rendements (entre 80 et 95%) après une étape de précipitation dans de l'acétone froide. De plus, l'utilisation d'un tampon avec un pH faiblement basique de 8 contribue à d'activer efficacement l'amine primaire afin de la rendre suffisamment nucléophile. Le brin antisens complémentaire (asPARP3 **74**) a ensuite été hybridé au BCN-ssPARP3 **73** en chauffant le milieu réactionnel à  $65^\circ\text{C}$  pendant 5 min afin de casser les liaisons

hydrogènes des oligonucléotides, puis en amorçant une descente de température de 65 °C à 25 °C en 15 min afin d'obtenir le BCN-siPARP3 **75** (Figure 56). Cette méthode a également été utilisée pour générer le BCN-siSCR utilisé en tant que contrôle négatif.

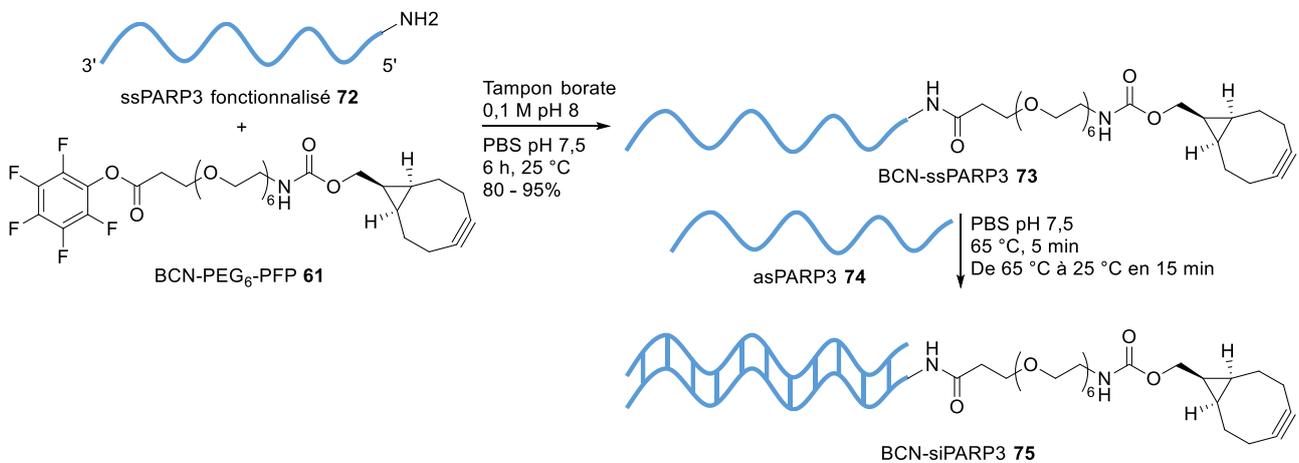


Figure 56 : Modification du ssPARP3-NH<sub>2</sub> **72** avec le linker **61** puis hybridation avec le asPARP3 **74** afin d'obtenir le BCN-siPARP3 **75**

#### Evaluation de la déplétion de PARP3 avec le BCN-siPARP3 **75**

L'efficacité de déplétion du BCN-siPARP3 **75** a d'abord été évaluée par western-blot afin de s'assurer que le linker n'allait pas altérer la déplétion de PARP3. Pour ce faire, le BCN-siPARP3 **75**, le siPARP3 **53** commercial et le siSCR commercial ont été utilisés sur les cellules SKBR3. Les siRNAs ont été transfectés à l'aide de JETprime®, à des concentrations de 50 nM et ont été incubés pendant 4 h avant d'être analysés par western-blot. Le siSCR n'a pas montré de déplétion de PARP3 alors que les deux autres siRNAs en ont été capables, avec une déplétion d'environ 50% pour le siPARP3 **53** commercial et d'environ 70% pour le BCN-siPARP3 **75** (Figure 57). Ces résultats nous ont permis de déterminer que le linker n'influçait pas la déplétion de PARP3 et donc que le BCN-siPARP3 **75** était assez actif et pouvait être utilisé pour être bioconjugué à un anticorps.

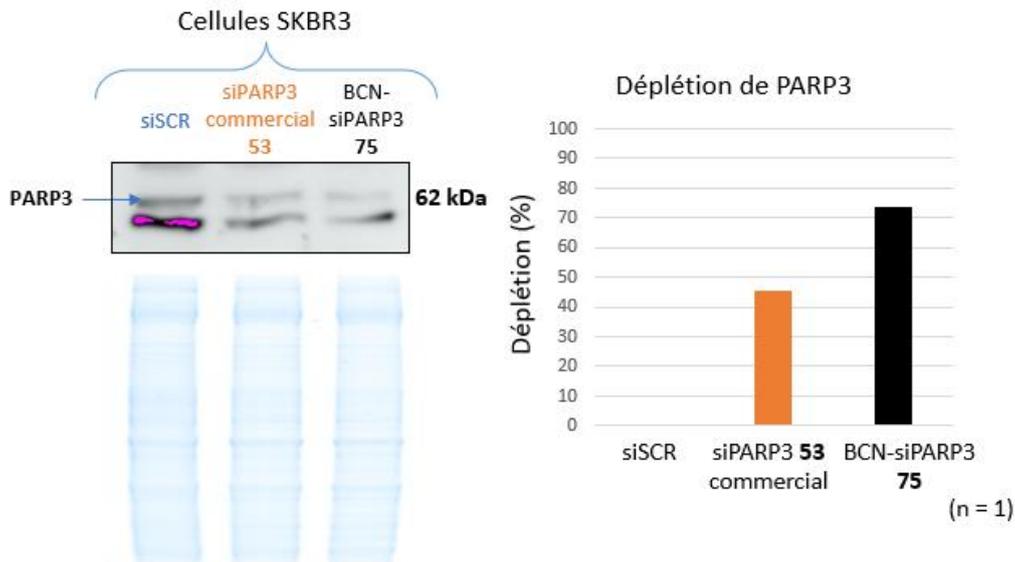


Figure 57 : Evaluation in vitro de la déplétion de PARP3 avec le BCN-siPARP3 75, le siPARP3 53 commercial et le siSCR commercial. Les cellules SKBR3 ont été transfectées avec 50 nM de siRNAs pendant 4 h. L'expression de l'enzyme a été évaluée par western-blot et mesurée grâce à un gel d'électrophorèse.

#### Bioconjugaison du BCN-siPARP3 avec le trastuzumab 75

#### Pré-fonctionnalisation du trastuzumab 54

L'anticorps trastuzumab 54 a été pré-fonctionnalisé dans le but d'incorporer un groupement azoture. Puis il a été mis en présence d'ABF 60 dans du PBS à un pH de 7,5 pendant 30 min à 37 °C, permettant l'obtention de l'azido-trastuzumab 76 avec des rendements entre 90 et 95% (Figure 58).

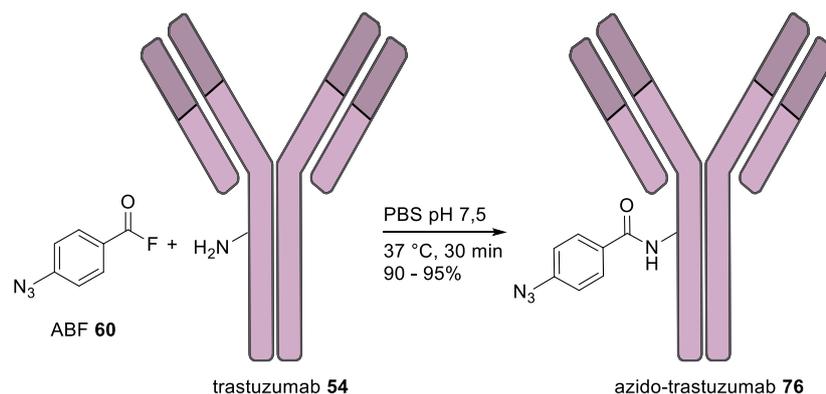


Figure 58 : Etape "Plug" : pré-fonctionnalisation du trastuzumab 54

#### Bioconjugaison entre l'azido-trastuzumab 76 et le BCN-siPARP3 75

Le groupement BCN a été utilisé afin de conjuguer le BCN-siPARP3 75 et le BCN-siSCR sur un anticorps pré-fonctionnalisé 76 (Figure 58) par réaction SPAAC afin d'obtenir le conjugué

trastuzumab-siPARP3 (T-siPARP3 **77**) (Figure 59). Cette réaction a été faite à 25 °C pendant 36 h au lieu des 24 h requis pour une meilleure conversion. Cela a permis de générer le T-siPARP3 **77** avec des rendements moyens, allant de 30 à 60% (Figure 59). Les anticorps conjugués, ou AOC (pour *Antibody-Oligonucleotide Conjugate*), ont ensuite été purifiés par chromatographie d'exclusion stérique en utilisant un système Akta Pure et du PBS pH 7,5 en tant qu'éluant, la grande différence de taille entre ces composés permettant leur séparation facile.

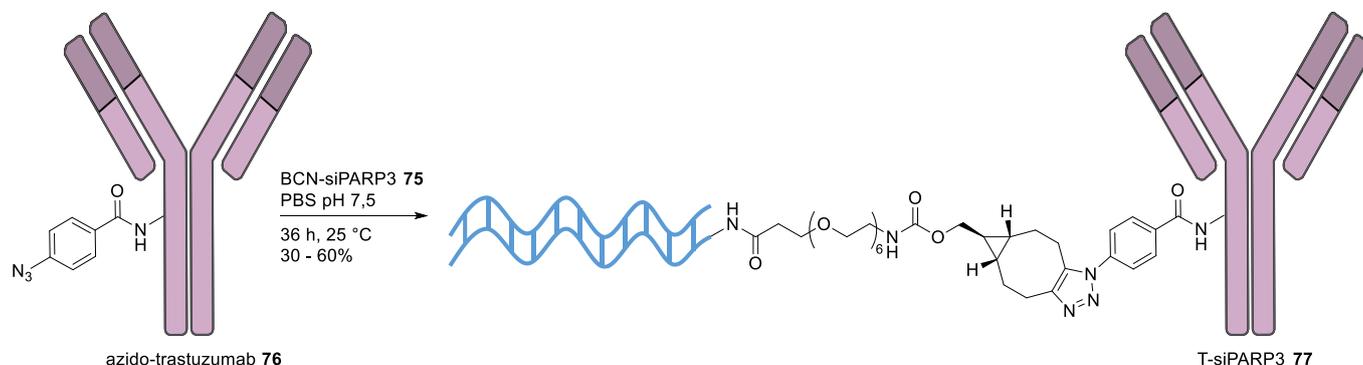


Figure 59 : Etape "Play" : réaction SPAAC permettant l'obtention du conjugué T-siPARP3 **77**

Enfin, les AOCs ont été filtrés sur des filtres spinX (membrane en acétate de cellulose avec un diamètre de pore de 0,22 µM) afin d'éliminer les traces de bactéries en prévision des tests biologiques. Ces AOCs ont été caractérisés par spectrométrie de masse SEC-ESI native. Un mélange de DoC1 et DoC2 a été obtenu, menant à un DoC moyen de 1,5 (Figure 60).

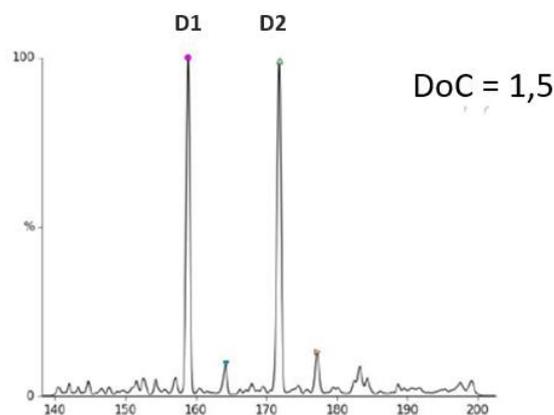


Figure 60 : Spectre de masse du T-siPARP3 **77** avec un DoC de 1,5 (mélange équivalent de DoC 1 et 2)

#### Evaluation du trastuzumab-siPARP3 **77** : déplétion de PARP3 et combinaison avec la vincristine **22**

Dans le but d'évaluer l'efficacité du T-siPARP3 **77** *in vitro*, la déplétion de PARP3 a d'abord été mesurée avec ce conjugué et comparée avec le trastuzumab-siSCR (T-siSCR) sur les cellules SKBR3. Ces cellules ont été incubées avec 100 nM d'AOCs pendant 4 h avant de mesurer l'expression de PARP3 par western-blot. Le T-siSCR n'a pas montré de déplétion de PARP3 alors que le T-siPARP3 **77** a permis une déplétion d'environ 80%. Les résultats préliminaires de cette stratégie sont prometteurs, avec une bonne déplétion de l'expression de PARP3 induite par le conjugué anticorps-siPARP3 **77** (Figure 61).

De plus, le conjugué T-siPARP3 **77** a été testé en combinaison avec la vincristine **22** à l'aide d'un test de viabilité cellulaire. Les cellules SKBR3 ont été, dans un premier temps, prétraitées avec le conjugué **77** à une concentration de 100 nM pendant 48 h avant d'être incubées avec la vincristine **22** à des concentrations variables pendant 72 h. En l'absence de PARP3, induite par le conjugué **77**, les effets cytotoxiques de la vincristine **22** se sont vu améliorer, passant d'une IC<sub>50</sub> d'environ 1 nM pour la vincristine **22** seule à environ 0,2 nM (Figure 61).

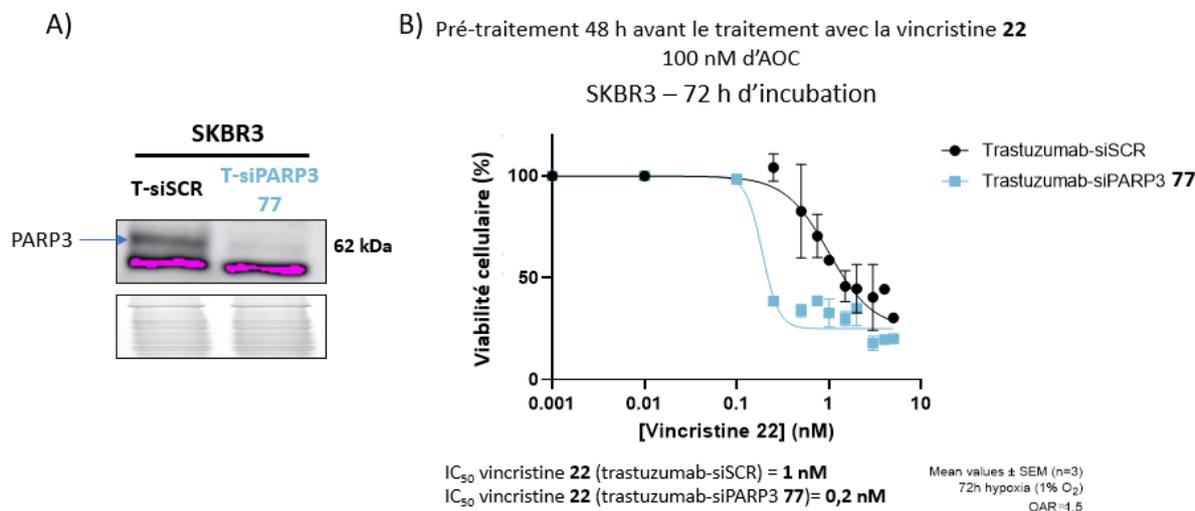


Figure 61 : Evaluation *in vitro* du T-siPARP3 **77**, ainsi que de la combinaison T-siPARP3 **77** avec la vincristine **22**. A) La déplétion, provoquée par le T-siPARP3 **77** comparé avec le T-siSCR, a été mesurée par western-blot avec 100 nM de composé et une incubation de 4 h. B) Mesure du pourcentage de viabilité cellulaire après incubation de la vincristine **22** pendant 72 h sur les cellules prétraitées avec les AOCs. La déplétion mesurée est en accord avec la potentialisation observée lors du test WST-1.

Le conjugué T-siPARP3 **77** a pu être généré grâce à la stratégie « Plug and Play ». Cet AOC, ainsi que le conjugué contrôle T-siSCR ont été efficaces pour déterminer la déplétion de PARP3 ainsi que la potentialisation des effets de la vincristine **22**.

Il est alors maintenant nécessaire de développer une méthode de conjugaison de la vincristine **22** permettant sa délivrance sélective dans les cellules SKBR3.

## Bioconjugaison de la vincristine **22**

### Stratégie d'alkylation quaternaire

Afin de développer une stratégie efficace pour la bioconjugaison de la vincristine **22**, il a été décidé de s'inspirer de la méthode d'alkylation quaternaire développée par Staben, *et al.*<sup>162</sup> Cette méthode repose sur l'utilisation d'un analogue chlorure de benzyle du linker MC-ValCit-PAB-OH **85**, le MC-ValCit-PAB-Cl **26**. Ainsi, en présence de DIPEA, et de TBAI, les auteurs ont démontré qu'il était possible d'alkyler les amines tertiaires sur un panel de drogues par une étape de substitution nucléophile avec un équivalent de chlorure de benzyle dans du DMF (Figure 62). Cependant, les rendements d'alkylation étant très bas, notamment dans le cas de l'alkylation de la vinblastine **21** (de l'ordre de 18%), une optimisation de la méthode a alors été effectuée afin de l'adapter pour la modification de la vincristine **22**.

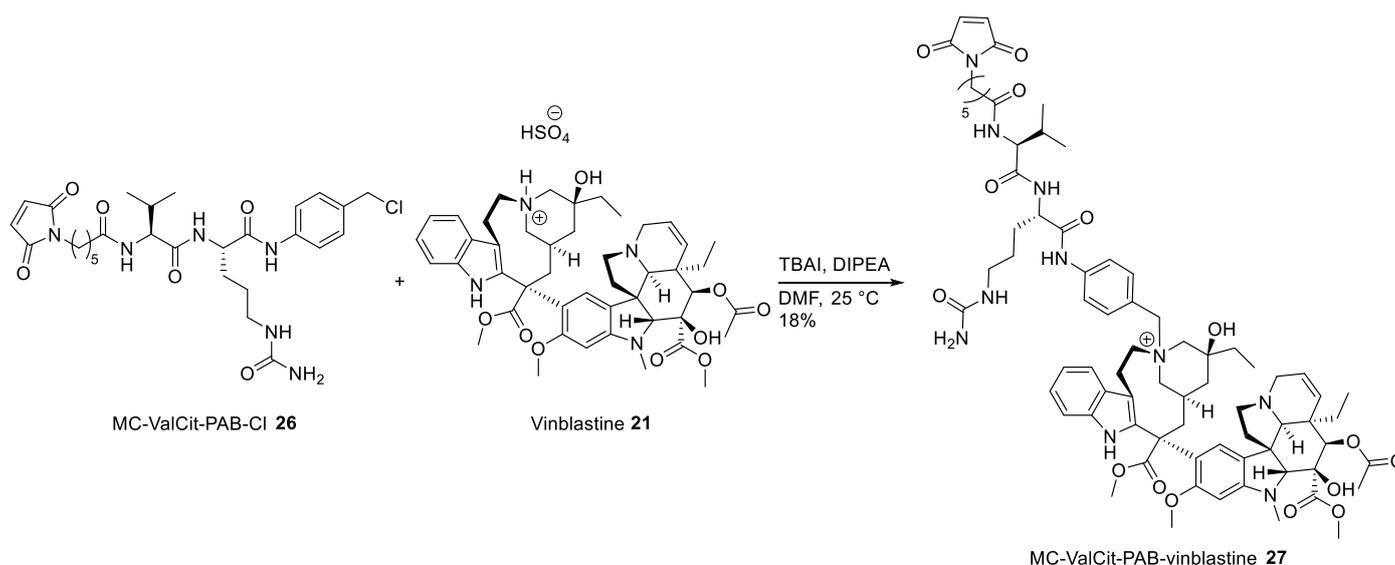


Figure 62 : Stratégie d'alkylation quaternaire développée par Staben, *et al.*<sup>162</sup>

### Test d'alkylation quaternaire de la vincristine **22**

### Synthèse d'un analogue du groupement PAB-OH **78**

En vue d'optimiser cette réaction, les tests d'alkylation ont été faits avec un composé modèle, le chlorure de *N*-acétyl-*p*-aminobenzyle **80**, un analogue du groupement PAB (alcool *p*-aminobenzyle) présent sur le linker d'intérêt **26**. Cet analogue **80** a été synthétisé en deux étapes avec un rendement global de 80%. D'abord, le PAB-OH **78** a été acylé par une réaction d'addition-élimination avec de l'anhydride acétique en présence d'une base, permettant l'obtention de l'intermédiaire **79** avec un rendement de 82%. Staben, *et al.* ont décrit une chloration utilisant un équivalent de chlorure de thionyle dans le DMF ; cependant avec l'intermédiaire **79**, ces conditions n'ont pas permis d'obtenir l'analogue **80**, aucune conversion n'ayant été observée.

Nous avons donc décidé d'utiliser un autre agent de chloration, le chlorure cyanurique. L'intermédiaire **79** a été chloré par une réaction de substitution nucléophile aromatique suivie d'une substitution nucléophile, menant au Ac-*N*-PAB-Cl **80** avec un rendement quantitatif (Figure 63).

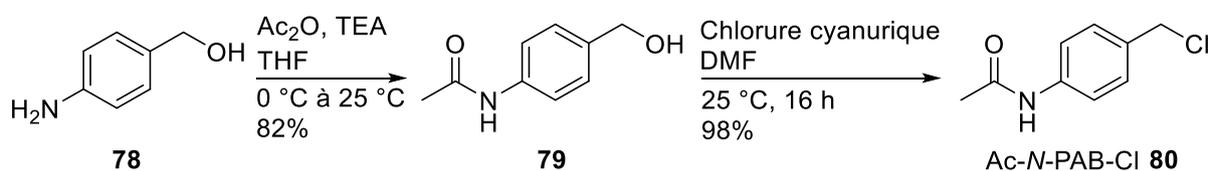


Figure 63 : Synthèse de l'analogue Ac-*N*-PAB-Cl **80**

Il a également été envisagé de synthétiser d'autres analogues électrophiles du Ac-*N*-PAB-Cl **80**, fonctionnalisés avec un motif tosylé **81**, mesyle **82** et triflate **83** (Figure 64). Cependant, ces molécules n'ont pas pu être isolées, du fait de leur conversion *in situ*, en leur analogue Ac-*N*-PAB-Cl **80** par substitution par le contre-anion chlorure formé.

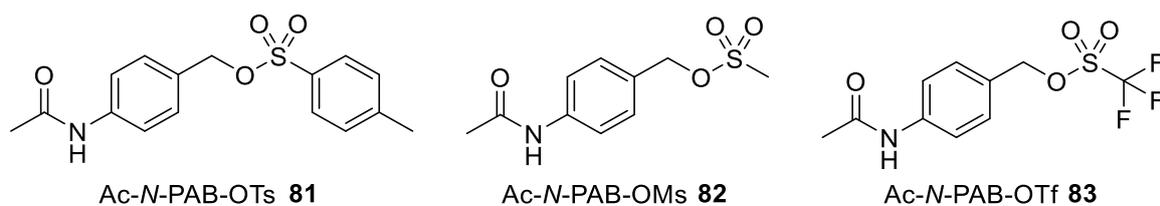


Figure 64 : Structures des analogues électrophiles envisagés

Test d'alkylation avec les conditions de Staben, et al.<sup>162</sup>

Dans un premier temps, les conditions développées par Staben, *et al.* ont été testées. La vincristine **22** a été mise en présence du Ac-N-PAB-Cl **80**, de TBAI et de DIPEA (Figure 65). Cependant, même après 5 jours de réaction, la conversion en ammonium **84** restait très faible et inférieure à 10%. Cette réaction a été répétée mais avec une température de 37 °C, mais le changement de température n'a pas permis une meilleure conversion, toujours inférieure à 10% après 5 jours.

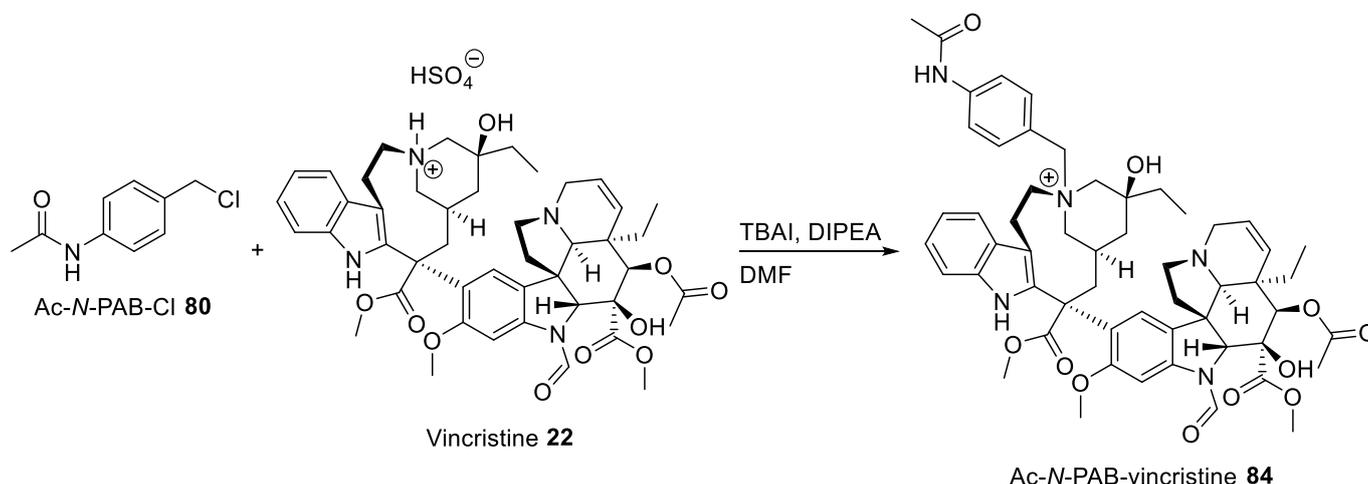


Figure 65 : Tests d'alkylation de la vincristine **22**

Test d'alkylation en conditions faiblement basiques

Nous avons donc décidé de remplacer la base organique par une base inorganique et de s'affranchir, dans un premier temps, de l'utilisation de TBAI. Nous avons constaté que l'utilisation d'hydroxyde de potassium (KOH) ou de carbonate de potassium (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), conduisait à la formation préférentielle de l'ammonium **84** attendu après 72 h à 25 °C.

Ces résultats ont été obtenus par une analyse HPLC du milieu réactionnel. Après 72 h de réaction à 25 °C, la présence de KOH a permis une conversion quasi-totale de la vincristine **22** (Figure 66) alors que la présence de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a permis une conversion totale (Figure 67).

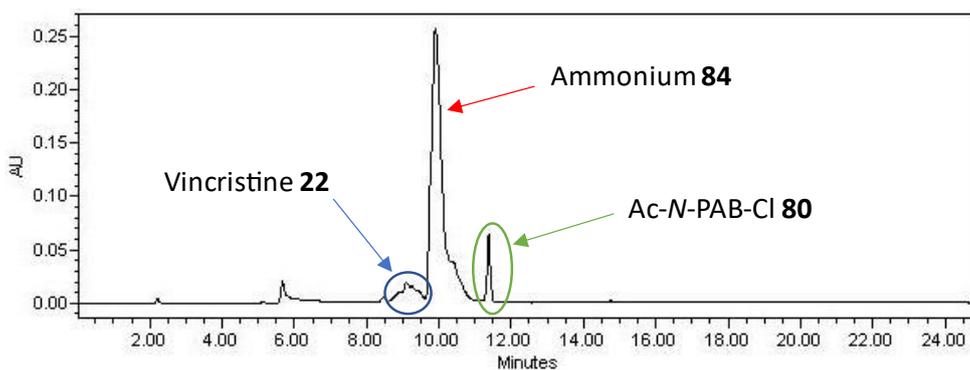


Figure 66 : Analyse HPLC de la réaction d'alkylation entre la vincristine **22** et du Ac-N-PAB-Cl **80** en présence de KOH

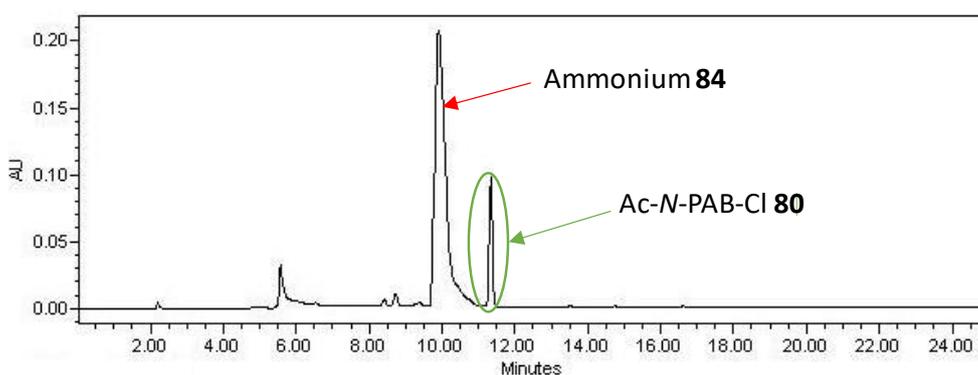


Figure 67 : Analyse HPLC de la réaction d'alkylation entre la vincristine **22** et du Ac-N-PAB-Cl **80** en présence de  $K_2CO_3$

Ces tests ayant été réalisés avec 0,5 mg de vincristine **22**, la réaction en présence de  $K_2CO_3$  a été répétée sur une échelle plus importante, en utilisant 10 mg de réactif afin de valider ces conditions par spectroscopie RMN et spectrométrie de masse. Cette réaction a ainsi permis l'obtention de l'ammonium **84** isolé avec rendement de 62% et une excellente pureté. De plus, le site de modification a été identifié grâce à une analyse RMN. D'abord, la présence d'un singulet à environ 10 ppm intégrant pour un proton nous a permis de déterminer la non-modification de l'amine du cycle indolique. Ensuite, les signaux caractéristiques des fonctions hydroxy étaient aussi présents, montrant que ces sites n'ont pas été modifiés. Enfin, les déplacements chimiques des protons périphériques des différentes amines tertiaires ont été comparés avec ceux de la vincristine **22** non-modifiée. Ainsi, aucune modification de signaux n'a été observée sur l'environnement de l'amine de la sous-unité vindoline alors que ceux de la sous-unité catharanthine ont été modifiés. Ces informations, validées grâce à une analyse spatiale NOESY, nous ont donc permis de conclure que la modification se faisait sur l'amine tertiaire présente sur la sous-unité catharanthine.

#### Synthèse linker du linker MC-ValCit-PAB-Cl **26**

Ces conditions d'alkylation en main, nous nous sommes attelés à la synthèse d'un linker adéquat. Le bras espaceur comportant un chlorure de benzyle a été synthétisé en une étape à partir du classique MC-ValCit-PAB-OH **85**. Dans un premier temps, nous avons utilisé du chlorure cyanurique. Cependant, aucune conversion n'a été observée. Nous avons alors décidé d'utiliser du DMSO à la place de la DMF afin de catalyser cette réaction, mais encore une fois aucune conversion n'a été observée.<sup>270</sup>

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé du chlorure de tosyl ou du chlorure en mésyle en présence d'une base pour procéder à la chloration, cependant aucune conversion n'a été observé.<sup>271</sup> Dans un dernier temps, nous avons essayé les conditions de chloration développées par Staben, *et al.*, sans succès. De plus, différents équivalents de chlorure de thionyle ont été testés. Il s'avère que la diméthylformamide (DMF) peut réagir avec le chlorure de thionyle, menant à une réaction secondaire type Vilsmeier-Haack. Des mélanges de solvants ont également été évalués chloration (Tableau 3).

Tableau 3 : Conditions testées pour l'étape de chloration

Réactif	Equivalents	Base	Equivalents	Solvant	Conversion
Chlorure cyanurique	1	/	/	DMF	/
Chlorure cyanurique	0,6	/	/	DMF	/
Chlorure cyanurique	0,6	/	/	DMSO	/
MsCl	3	DBU	3	DCM	/
MsCl	3	TEA	3	DCM	/
MsCl	3	TEA	3	DCM/DMF (1/1 v/v)	/
TsCl	3	DBU	3	DMF	/
SOCl <sub>2</sub>	1	/	/	DMF	Réaction secondaire (Vilsmeier-Haack)
SOCl <sub>2</sub>	5	/	/	DMF	30% + réaction secondaire
SOCl <sub>2</sub>	2 + 2	/	/	DMF/ACN (1/1 v/v)	90%

Ainsi, le chlorure de thionyle était l'agent de chloration le plus efficace permettant la réaction de substitution nucléophile. Cependant, l'utilisation de DMF menait à l'apparition de réactions parasites. Pour éviter ces réactions de Vilsmeier-Haack, il a été décidé d'ajouter de l'acétonitrile en co-solvant afin de diminuer la proportion de DMF (le DMF étant nécessaire afin de solubiliser efficacement le linker **85**, notamment dans l'acétonitrile, solvant dans lequel le linker n'était pas soluble). De plus, l'utilisation de deux équivalents de réactif ne permettait qu'une conversion moyenne après 2 h ; un nouvel ajout de deux équivalents a permis une bien meilleure conversion après 2 h supplémentaires. Après une purification sur silice, nous avons pu obtenir le linker **26** avec un rendement de 75% (Figure 68).

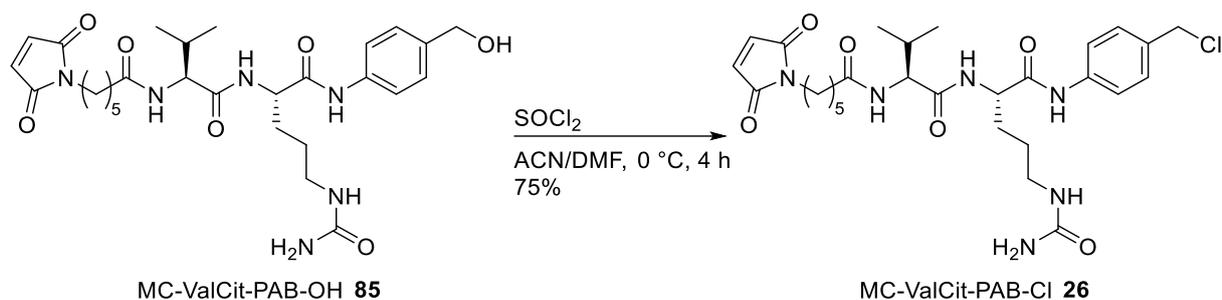


Figure 68 : Réaction de chloration permettant l'obtention du linker MC-ValCit-PAB-Cl **26**

#### Alkylation quaternaire de la vincristine **22** avec le linker **26**

Le linker MC-ValCit-PAB-Cl **26** a été mis en présence de vincristine **22** et de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  à 25 °C pendant 72 h. Cette réaction de substitution nucléophile nous a permis d'obtenir une vingtaine de milligramme de vincristine alkylée **86** avec un rendement de 60% et une excellente pureté (Figure 69). Cette molécule est ainsi fonctionnalisée et prête à être utilisée pour la bioconjugaison sur le trastuzumab.

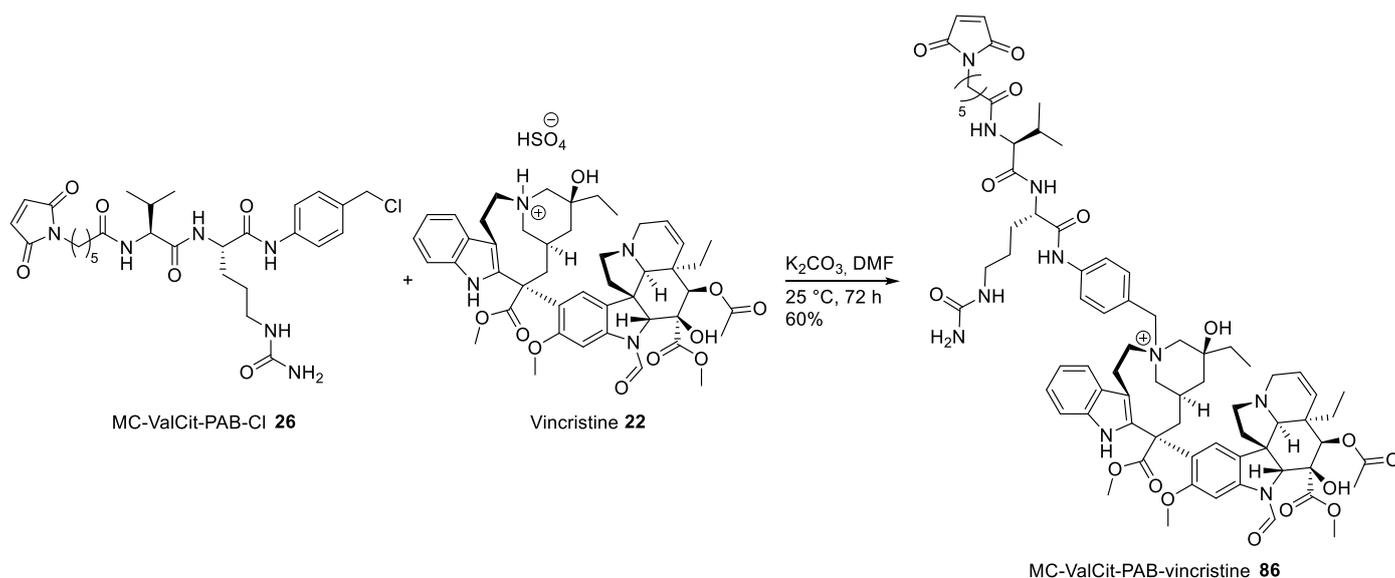


Figure 69 : Réaction d'alkylation permettant l'obtention de la vincristine alkylée **86**

#### Bioconjugaison du MC-ValCit-PAB-vincristine **86**

La vincristine alkylée **86** a été conjuguée sur l'anticorps trastuzumab **54** par une étape de conjugaison cystéine classique grâce à une addition de Michael. Les ponts disulfures du trastuzumab **54** ont été réduits (partiellement ou totalement, en fonction du DAR désiré) en utilisant un agent réducteur, le TCEP, dans un tampon PBS à un pH de 6,5 contenant 1% v/v d'une solution d'EDTA à 0,5 M (Figure 70), permettant l'obtention de deux ADC trastuzumab-vincristine (T-vincristine) avec deux DAR différents, le T-vincristine D4 **87** et le T-vincristine D8 **88**. De plus, l'utilisation d'EDTA favorise la chélation des métaux résiduels du PBS, évitant la réoxydation des ponts disulfures.

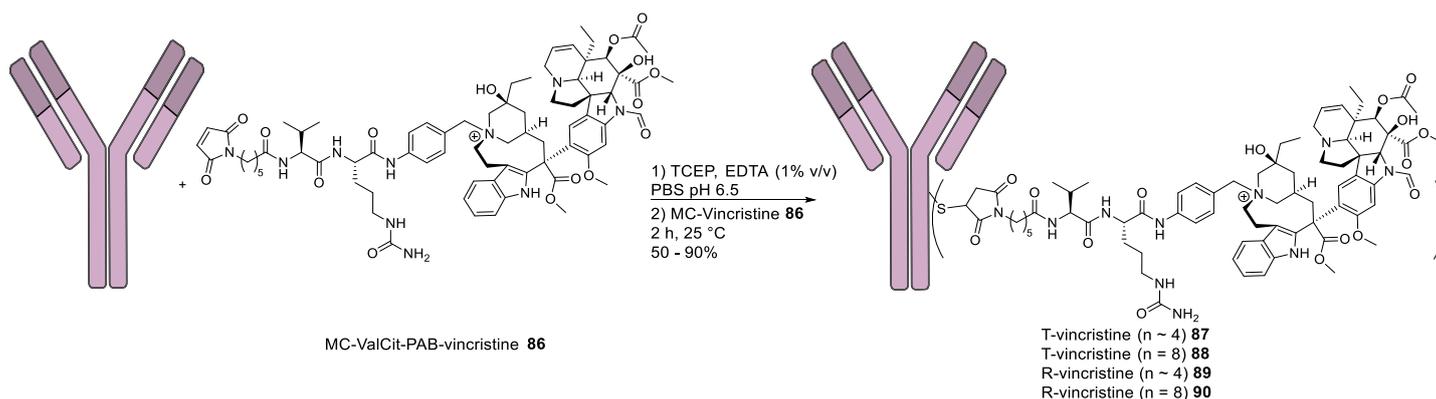


Figure 70: Bioconjugaison de la vincristine alkylée **86**

D'autres ADCs ont été générés en utilisant l'anticorps rituximab (R-vincristine), formant le R-vincristine D4 **89** et le R-vincristine D8 **90**, comme contrôle négatif car ce dernier ne reconnaît pas le récepteur HER2 présent sur les cellules SKBR3.

Ces ADCs ont été caractérisés par spectrométrie de masse ESI native. Ces analyses ont montré une excellente conjugaison de la vincristine. En effet, la distribution de masse pour les anticorps partiellement réduits donne un DAR moyen de 4, ce qui était souhaité au vu de la réduction partielle effectuée. De plus, il n'y a que très peu d'anticorps non-conjugués (4%), empêchant le risque d'inhibition compétitif des récepteurs HER2 (Figure 71). Dans le cas d'une réduction totale des anticorps, un DAR homogène de 8 a été observé.

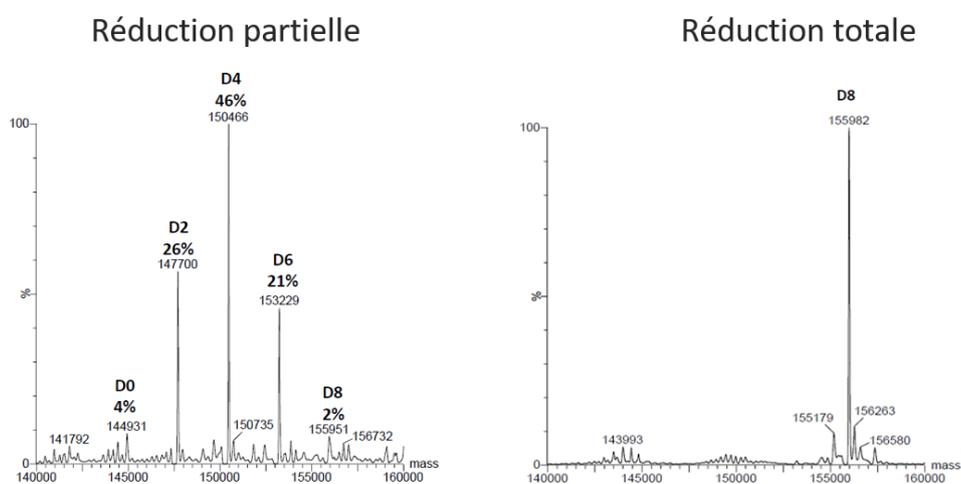


Figure 71 : Spectres de masse des ADCs T-vincristine D4 **87** et D8 **88**

Ces immunoconjugués ont été évalués *in vitro* sur les cellules SKBR3 (HER2 positives) et MDA-MB-231 (HER2 négatives) par un test de viabilité cellulaire après filtration sur spinX afin d'éliminer les traces de bactéries.

#### Evaluation *in vitro* des ADCs conjugués à la vincristine **22**

La viabilité cellulaire a été mesurée par un test WST-1 sur les cellules SKBR3 et MDA-MB-231. Les ADCs ainsi que la vincristine libre **22** ont été incubés pendant 72 h à différentes concentrations.

Le T-vincristine D4 **87** obtenu après réduction partielle a démontré une activité cytotoxique de 0.03 nM (vs 0.5 nM pour la vincristine libre **22**) sur la lignée SKBR3. Enfin, le R-vincristine D4 **89** n'a pas présenté de toxicité sur les cellules SKBR3 et MDA-MB-231 (Figure 72). Ces résultats nous montrent que la vincristine **22** ne traverse pas les membranes cellulaires efficacement et qu'une internalisation de cette drogue conjuguée à un anticorps permet d'outrepasser les problèmes de perméabilité de la vincristine **22**. De plus, la non-toxicité du conjugué R-vincristine D4 **89** sur les cellules SKBR3 et du T-vincristine **22** sur les cellules MDA-MB-231 suggère une bonne sélectivité de ces ADCs.

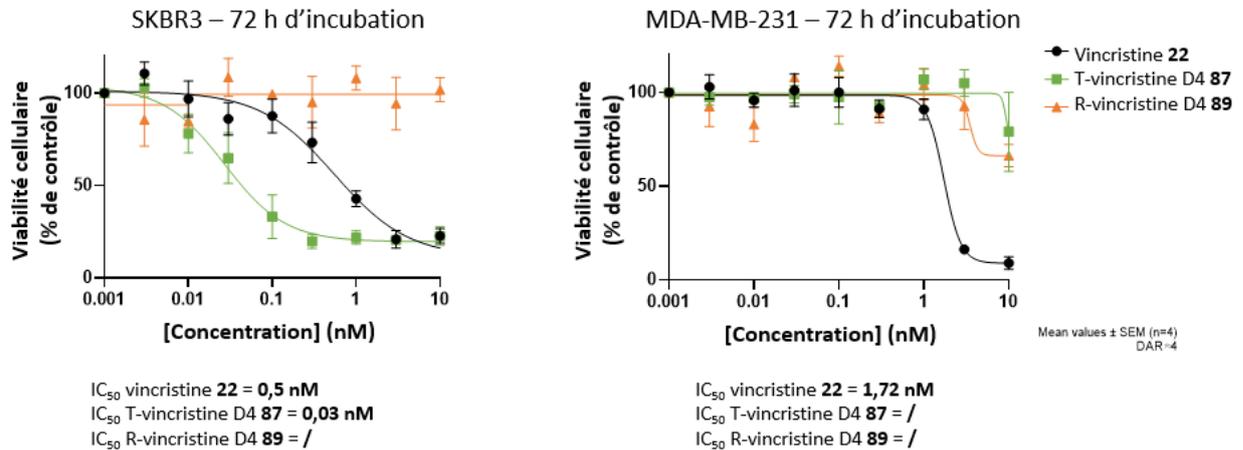


Figure 72 : Evaluation in vitro de la vincristine libre **22**, des ADCs **87** et **89**. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été mesuré après incubation des composés pendant 72 h sur les cellules SKBR3 et MDA-MB-231 par un test WST-1.

Le T-vincristine D8 **88** obtenu avec réduction totale a démontré un profil de cytotoxicité similaire, de l'ordre de 0,01 nM (vs 0,5 nM pour la vincristine libre **22**). Les résultats obtenus sur la lignée cellulaire HER2 négative et avec le R-vincristine D8 **90** ont également mis en évidence des profils de cytotoxicité similaires aux immunoconjugués partiellement réduits, c'est-à-dire une bonne sélectivité pour les cellules SKBR3 et aucune toxicité pour les lignées et le conjugué **90** contrôles (Figure 73).

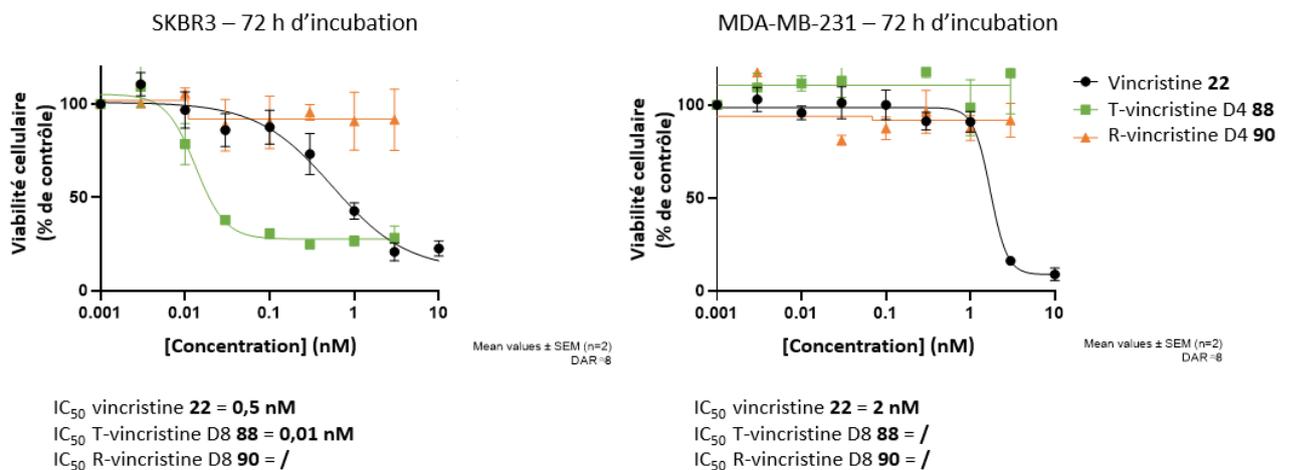


Figure 73 : Evaluation in vitro de la vincristine libre **22**, des ADCs **88** et **90**. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été mesuré après incubation des composés pendant 72 h sur les cellules SKBR3 et MDA-MB-231 par un test WST-1.

De plus, les ADCs T-vincristine D4 **87** et D8 **88** ont également été évalués dans d'autres lignées cellulaires, dont les résultats sont résumés dans le Tableau 4. Ainsi, dans les lignées testées, ces ADCs ont présenté une activité cytotoxique améliorée par rapport à la vincristine **22** seule.

Tableau 4 : Résultats des tests de viabilité cellulaire *in vitro* sur différentes lignées cellulaires après une incubation de 72 h.

Cellules	IC <sub>50</sub> T-vincristine D4 <b>87</b> (nM)	IC <sub>50</sub> T-vincristine D8 <b>88</b> (nM)	Vincristine libre <b>22</b> (nM)
SKBR3 (HER2+)	0,03	0,01	0,5
MDA-MB-231 (HER2-)	/	/	2
BT474 (HER2+)	0,01	0,01	12
NCI-N87 (HER2+)	0,3	0,2	12 - 15

#### Bioconjugaison de la MMAE **15** et comparaison avec les conjugués trastuzumab-vincristine

Le profil de cytotoxicité des ADCs conjugués à la vincristine a également été comparé avec celui des ADCs conjugués à des charges thérapeutiques classiquement utilisées : la MMAE **15** et le DM1 **9**. Pour ce faire, nous avons utilisé un conjugué trastuzumab-DM1 (T-DM1 ou Kadcyra® **11**) commercial avec un DAR de 3,5 et des conjugués trastuzumab-MMAE (T-MMAE). Ces derniers ont été conjugués à l'aide d'un MC-ValCit-PAB-MMAE **91** commercial et suivant le même protocole de bioconjugaison utilisé précédemment. Ainsi, deux ADCs ont été générés, après réduction partielle (T-MMAE D2 **92**) et réduction totale (T-MMAE D8 **93**) (Figure 74). Cependant, l'étape de bioconjugaison ne s'est pas déroulée comme prévu : l'étape de réduction partielle n'ayant pas permis de libérer quatre thiols en moyenne, menant donc à l'obtention de l'ADC avec un DAR moyenne de 2,5. De plus, dans le cas de la réduction totale, 25% de DAR9 a été observé (Figure 75).

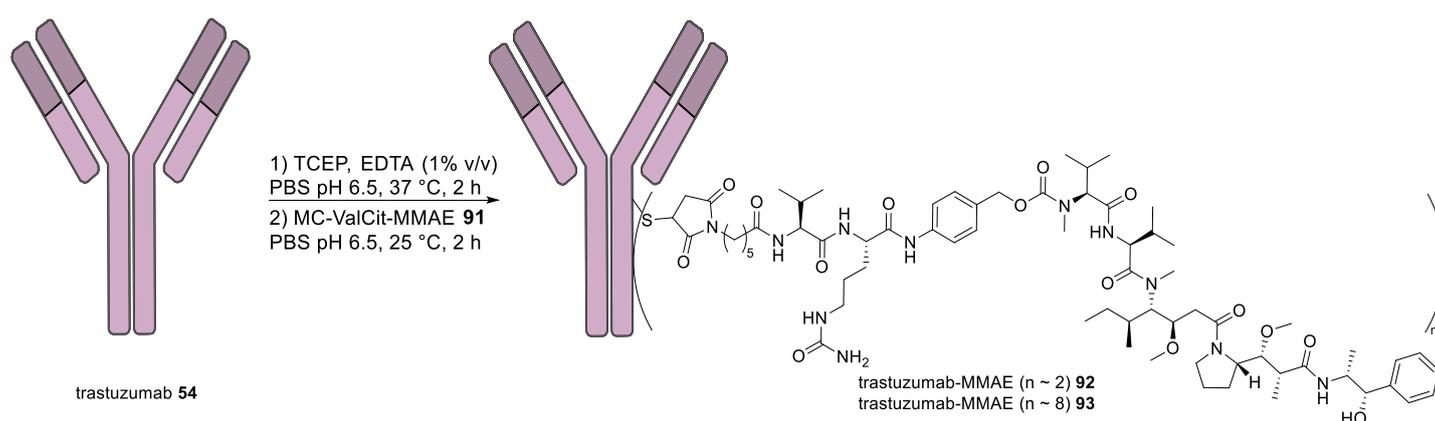


Figure 74 : Bioconjugaison du MC-ValCit-MMAE **91**

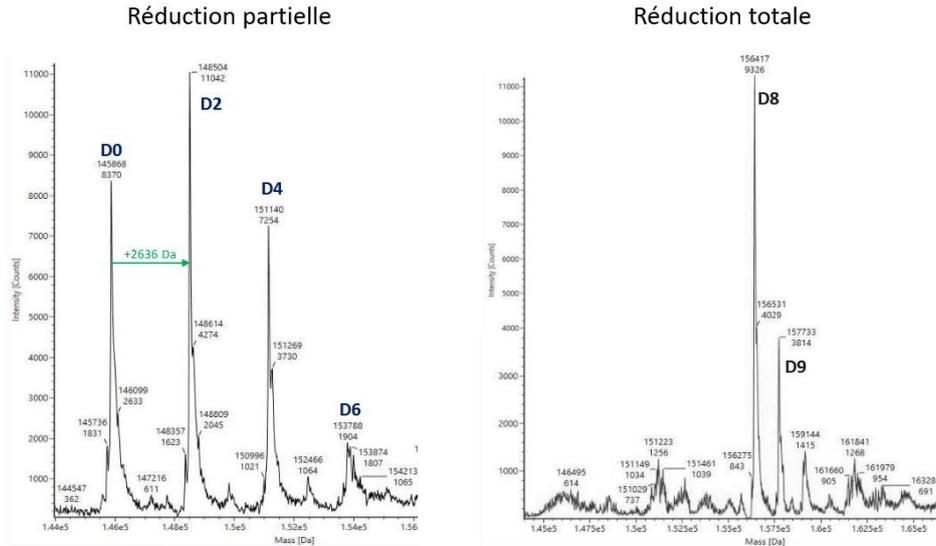


Figure 75 : Spectres de masse des ADCs trastuzumab-MMAE D2 92 et D8 93

### Comparaison *In vitro*

Les conjugués T-vincristine D4 87, T-DM1 11 et T-MMAE D2 92 ont été évalués par un test de viabilité cellulaire WST-1. Les profils de cytotoxicités de ces ADCs sont similaires avec des  $IC_{50}$  de l'ordre du picomolaire (T-vincristine D4 87 = 0,03 nM, T-DM1 11 = 0,07 nM, T-MMAE D2 92 = 0,09 nM) (Figure 76). Par conséquent, le T-vincristine D4 97 est tout autant efficace que des ADCs conjugués aux drogues classiquement utilisées, en prenant en compte les différences de DAR.

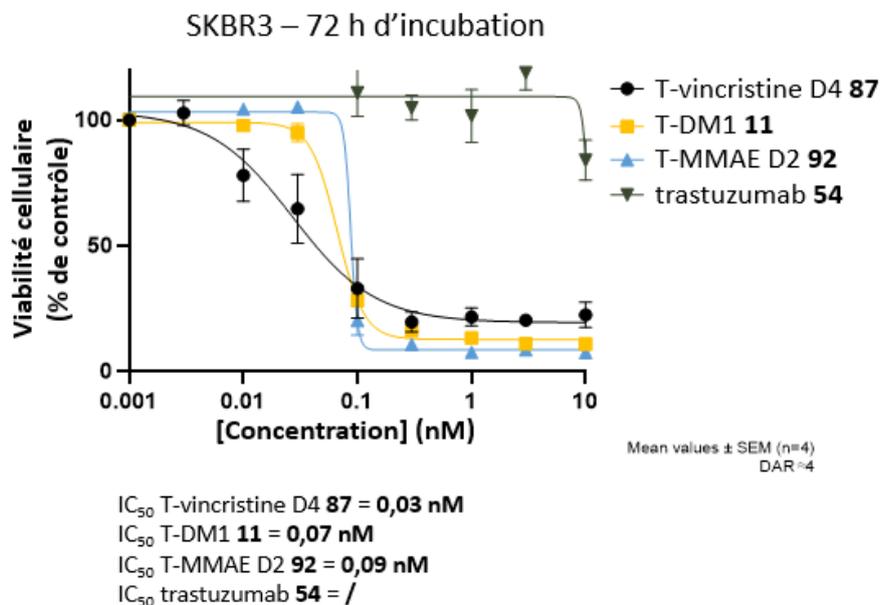


Figure 76 : Evaluation *in vitro* des ADCs 87, 11 et 92. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été mesuré après incubation des composés pendant 72 h sur les cellules SKBR3 par un test WST-1.

Afin de compléter les résultats obtenus entre ces trois ADCs, d'autres tests de viabilité cellulaire ont été effectués, cette fois pour comparer l'activité cytotoxique des ADCs par rapport à leur

drogue libre. Cependant, le DM1 **9**, sous forme de métabolite Lys-SMCC-DM1, n'a pas encore été évalué *in vitro*, mais ce test sera effectué prochainement. Les composés ont été incubés à différentes concentrations pendant 72 h sur les cellules SKBR3 et la viabilité cellulaire a été mesurée par un test WST-1. Les deux ADCs **87** et **92** ainsi que la MMAE **15** ont un profil de cytotoxicité similaire, de quelques dizaines de pM, alors que la vincristine **22** possède une activité d'environ 1 nM. La MMAE libre **15** possède une activité cytotoxique similaire à l'ADC correspondant **92** ( $IC_{50} \sim 0.05-0.06$  nM), ce qui implique qu'un relargage prématuré de la MMAE **15** dans la circulation causerait une augmentation de la toxicité systémique, néfaste pour un patient. De façon intéressante, la cytotoxicité de la vincristine libre **22** est moins efficace comparée au T-vincristine D4 **87** (1 nM vs 0,03 nM), ce qui permettrait de diminuer les risques de toxicité systémique dues à un relargage prématuré (Figure 77).

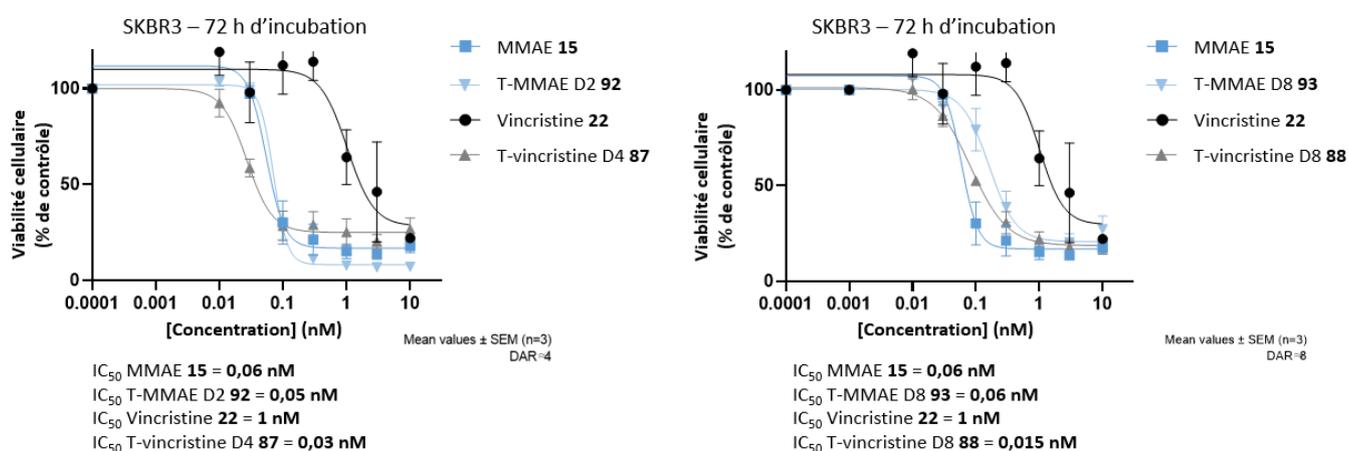


Figure 77 : Evaluation *in vitro* des ADCs **87**, **88**, **92** et **93** ainsi que de la MMAE **15** et de la vincristine **22**. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été mesuré après incubation des composés pendant 72 h sur les cellules SKBR3 par un test WST-1

Les ADCs basés sur la vincristine **22** ayant été générés et les tests *in vitro* ayant validé leur l'activité cytotoxique, nous nous sommes attelés à leur évaluation en combinaison avec le siPARP3 **53** afin de déterminer si une potentialisation de leurs effets était observable.

Evaluation des conjugués *in vivo* sur des modèles de souris xénotreffées

#### Problème de stabilité plasmatique du motif ValCit

Afin de valider l'efficacité de nos ADCs vincristine (**87** et **88**), des tests *in vivo* sur des modèles de souris xénotreffées vont être réalisés. Cependant, le linker ValCit utilisé pour la bioconjugaison de la vincristine, bien que stable dans le plasma humain, n'est pas stable dans le plasma de rongeurs. En effet, un motif dipeptidique peut être reconnu par la carboxylesterase 1c (Ces1c), menant au même clivage qu'en présence de cathepsines.<sup>272</sup> Hors, la Ces1c est présente en abondance dans le plasma de rongeurs. Ainsi, l'utilisation d'ADCs construits avec le linker ValCit *in vivo* sur des modèles murins mènerait à un relargage prématuré extra-cellulaire et donc à une diminution des effets cytotoxiques sur les tumeurs et une hausse de la cytotoxicité systémique.<sup>272</sup>

De manière à éviter ce problème, Anami, *et al.* ont développé un linker diminuant la reconnaissance du bras espaceur par l'enzyme Ces1c mais sans modifier le clivage généré par les

cathepsines. Celui-ci est composé de trois acides aminés : acide glutamique (Glu), valine et citrulline. L'incorporation d'un acide-aminé hydrophile, le glutamate, permet de diminuer la reconnaissance de Ces1c et donc de limiter son clivage dans le plasma.<sup>273</sup>

#### Synthèse du linker tripeptidique MC-Glu(OH)ValCit-PAB-Cl

Dans le but de synthétiser un linker MC-Glu(OH)ValCit-PAB-Cl **94** (Figure 78), la méthodologie développée par Mondal, *et al.* a été utilisée et adaptée.<sup>274</sup> Les auteurs ont développé une méthode de synthèse du linker MC-ValCit-PAB-OH **85** à partir d'acides aminés protégés à l'aide de groupement Fmoc en position N-terminale et activés par un ester de NHS en position C-terminale.

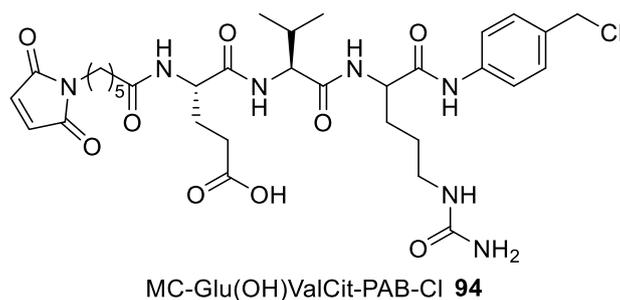


Figure 78 : Structure du linker tripeptidique MC-Glu(OH)ValCit-PAB-Cl **94**

D'abord, une molécule de citrulline **95** protégée en N-terminale avec un groupement Fmoc a été couplée avec un groupement PAB **78** en présence de HATU et de DIPEA, permettant l'obtention du Fmoc-Cit-PAB-OH **96** avec un rendement de 94%. Cette molécule **96** a ensuite été déprotégée par une réaction d'élimination du groupement Fmoc en présence de pipéridine. Après évaporation, l'intermédiaire formé a été dissous dans du DMF et un équivalent de Fmoc-Val-OSu a été ajouté, menant à l'obtention du linker Fmoc-ValCit-PAB-OH **97** avec un rendement sur ces deux étapes de 79%. Les intermédiaires **98** et **99** ont été obtenus suivant le même protocole. Ainsi, les molécules **98** et **99** ont été obtenues avec un rendement de 88% et de 92% respectivement. Le linker MC-Glu(OtBu)ValCit-PAB OH **99** a été synthétisé en quatre étapes avec un bon rendement global de 60% (Figure 79).

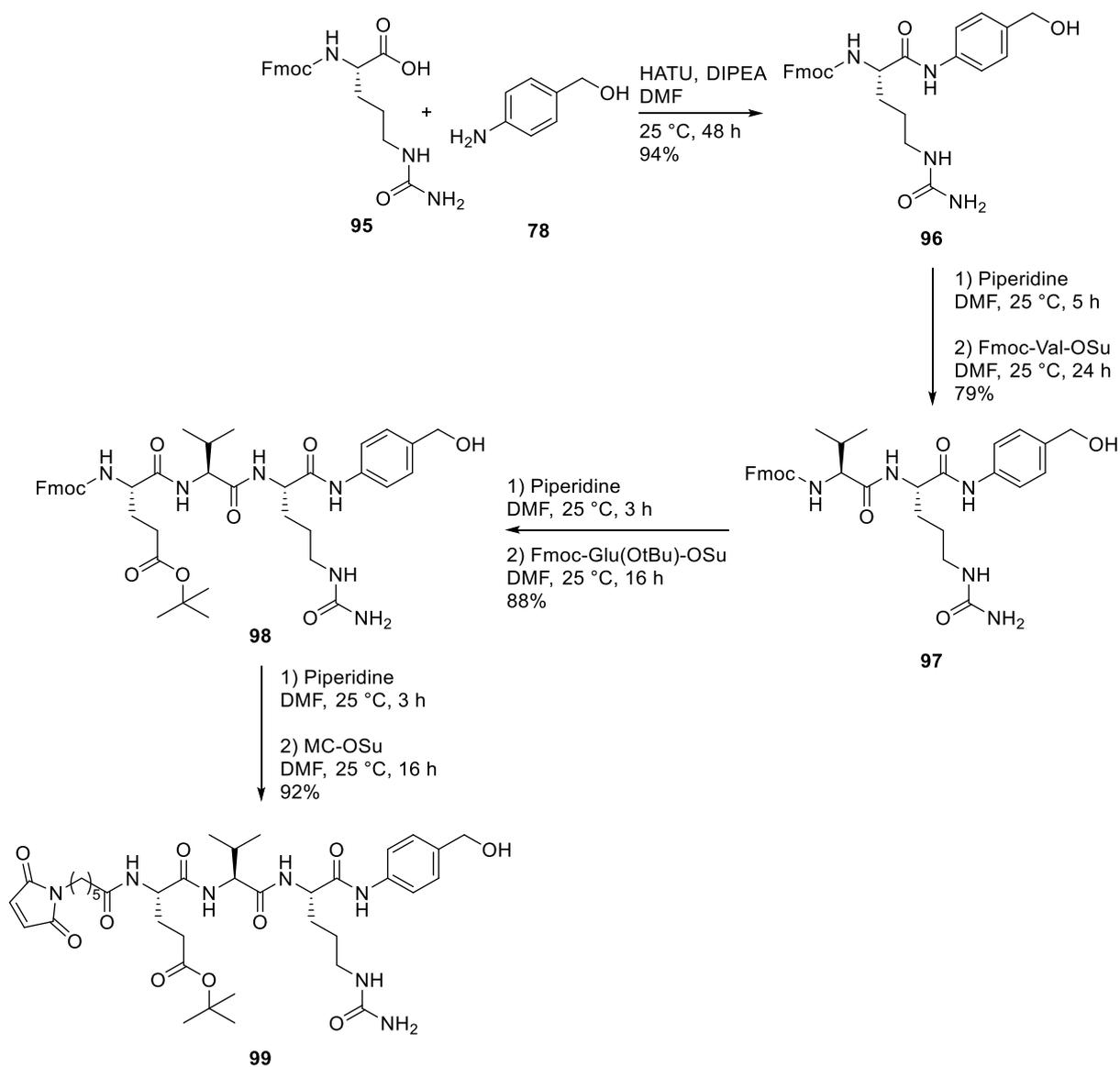


Figure 79 : Synthèse de l'intermédiaire MC-Glu(OtBu)ValCit-PAB-OH **99**

L'étape de substitution nucléophile permettant l'incorporation du chlore a cependant causé un certain nombre de problèmes, similaires à ceux rencontrés lors de l'étape de chloration du linker MC-ValCit-PAB-OH **85**, c'est-à-dire l'apparition de réactions secondaires de Vilsmeier-Haack dues à l'utilisation de DMF. De ce fait, le ratio DMF/ACN a été varié, tout comme le nombre d'équivalent d'agent de chloration ; le temps de réaction quant à lui a été raccourci. Tous ces changements de paramètres ont été reportés dans le Tableau 5.



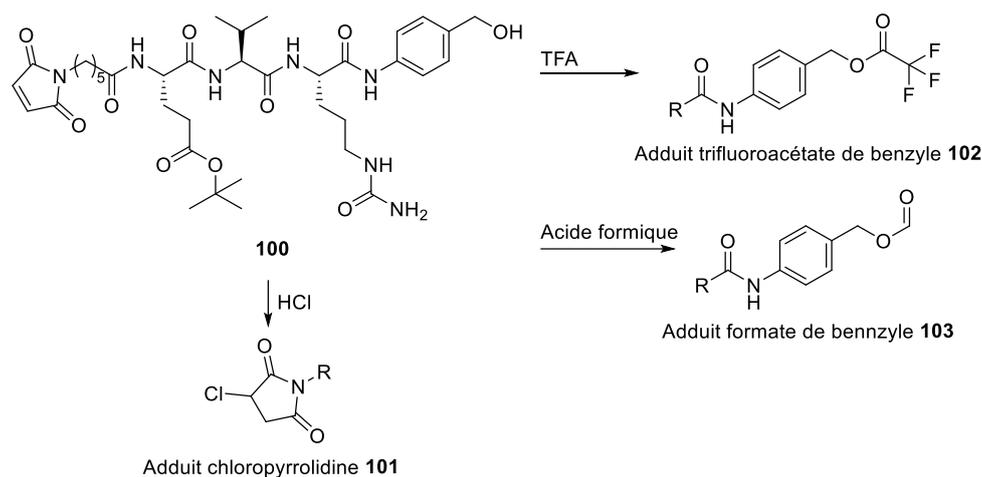


Figure 81 : Structures des adduits formés lors de l'étape de déprotection du linker **100**

Tableau 6 : Conditions testées pour la déprotection du linker **100**

Acide	Température	Temps	Commentaires
TFA 50% + 50% DCM (v/v)	25 °C	2 h	Formation de 50% d'adduit <b>102</b> + 50% de <b>94</b>
TFA 20% + 80% DCM (v/v)	0 °C	4 h	Pas de conversion
Acide formique 100%	25 °C	30 min	Formation de l'adduit <b>103</b> avec une conversion totale
Acide formique 30% + 70% DMF (v/v)	25 °C	30 min	Pas de conversion
HCl/dioxane 4 M	25 °C	1 h	Formation de l'adduit <b>101</b> avec une conversion totale
HCl/dioxane 4 M	0 °C	2 h	Formation de 23% d'adduit <b>101</b> + 77% de <b>94</b>
HCl/dioxane 4 M	0 °C	1 h 30	Formation de 10% d'adduit <b>101</b> + 70% de <b>94</b>
HCl/dioxane 4 M	0 °C	1 h	Formation de 17% d'adduit <b>101</b> + 80% de <b>94</b>
HCl/dioxane 4 M	0 °C	30 min	Formation de 7% d'adduit <b>101</b> + 76% de <b>94</b>

#### Alkylation quaternaire de la vincristine **22** avec le linker protégé **100**

Le linker protégé **100** a été utilisé afin de procéder à l'alkylation quaternaire de la vincristine **22** suivant le même protocole que précédemment. Ainsi, en présence de  $K_2CO_3$  pendant 5 jours, le MC-Glu(OtBu)ValCit-vincristine **104** a été obtenu avec un rendement de 46% (Figure 82).

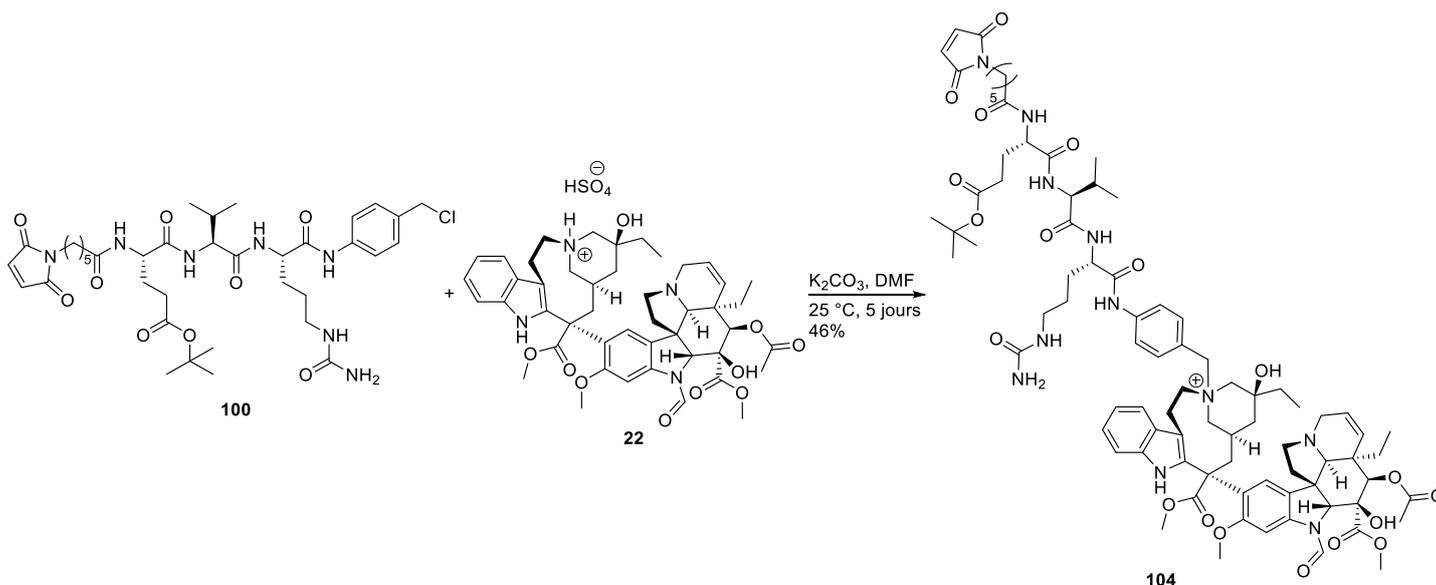


Figure 82 : Réaction d'alkylation quaternaire permettant l'obtention de l'ammonium protégé **104**

Cependant, de façon à synthétiser le linker déprotégé **94**, nous avons décidé d'optimiser l'étape de déprotection.

#### Déprotection du linker **100** en conditions acides

Lors de cette optimisation, nous avons remarqué qu'avec un temps de réaction inférieur à 30 min à 0 °C aucun adduit ne se formait, mais que les conversions n'étaient pas totales. Afin de convertir entièrement la molécule **100** en moins de 30 min, nous avons décidé d'utiliser du HCl concentré à 37% dans de l'eau à 0 °C. De cette manière, une conversion complète a été observée après 20 min sans formation de produits secondaires. Le milieu réactionnel a alors été concentré sous pression réduite, menant à l'obtention du linker final **94** sans purification avec un rendement quantitatif (Figure 83).

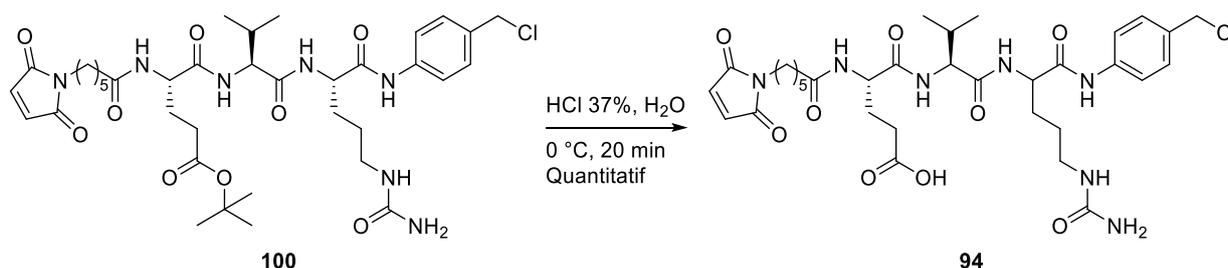


Figure 83 : Déprotection du linker **100** en présence d'acide chlorhydrique concentré

#### Alkylation quaternaire de la vincristine **22** avec le linker déprotégé **94**

Le linker déprotégé **94** a permis la formation de l'ammonium **105** en présence de  $K_2CO_3$  pendant 5 jours, avec un rendement de 48% (Figure 84).

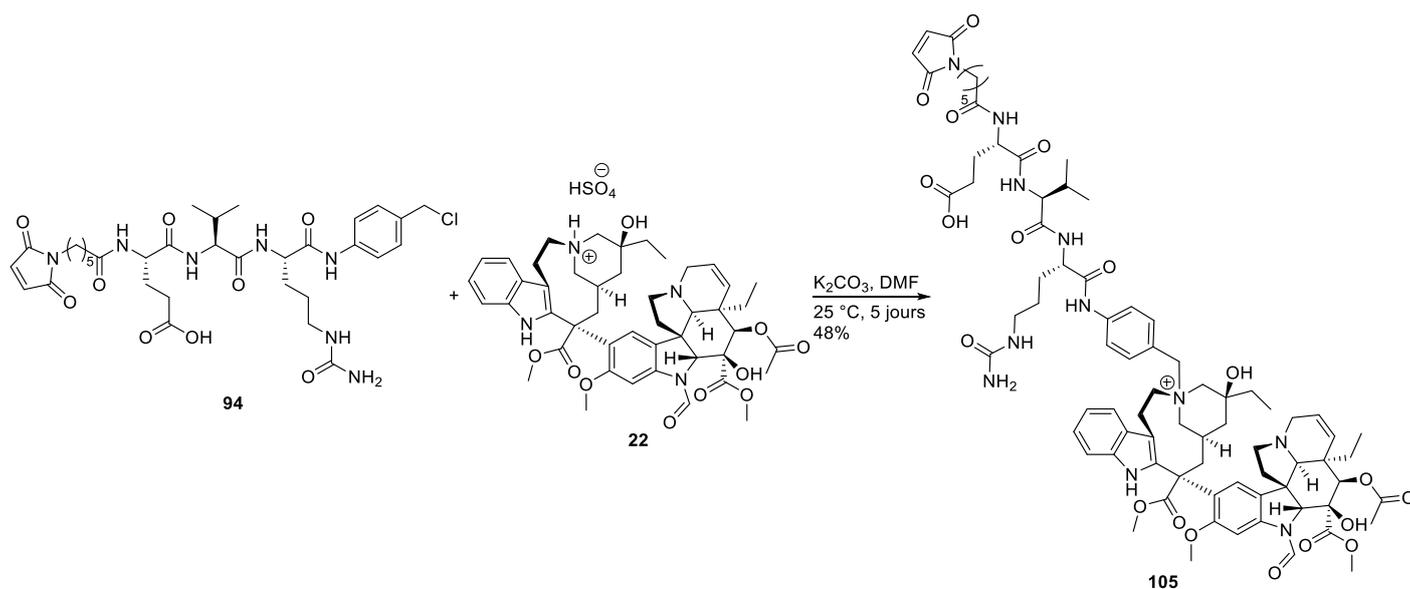


Figure 84 : Réaction d'alkylation quaternaire permettant l'obtention de l'ammonium déprotégé **105**

### Bioconjugaison des ammoniums **104** et **105**

Les ammoniums **104** et **105** ont été bioconjugués à l'anticorps trastuzumab **54** à l'aide d'une conjugaison cystéine après une première étape de réduction, partielle et totale, suivant le même mode opératoire que précédemment. Ces conjugués ont été obtenus avec des rendements, allant de 65% à 90% (Figure 85).

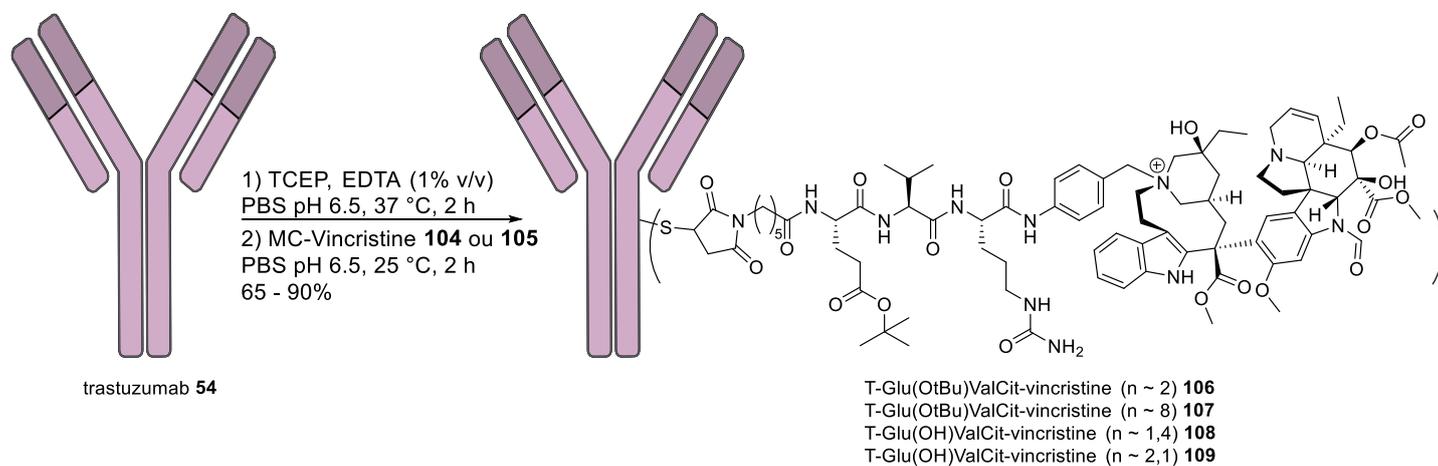


Figure 85 : Bioconjugaison des ammonium protégé **104** et déprotégé **105**

L'analyse par spectrométrie de masse native des conjugués T-Glu(OtBu)ValCit-vincristine **106** et **107** a révélé une conjugaison moins efficace que pour les conjugués **87** et **88**. La distribution pour le conjugué **106** de DAR se situe entre le D0 et le D4 avec 23% d'anticorps non-conjugués et un DAR moyen de 2 (Figure 86).

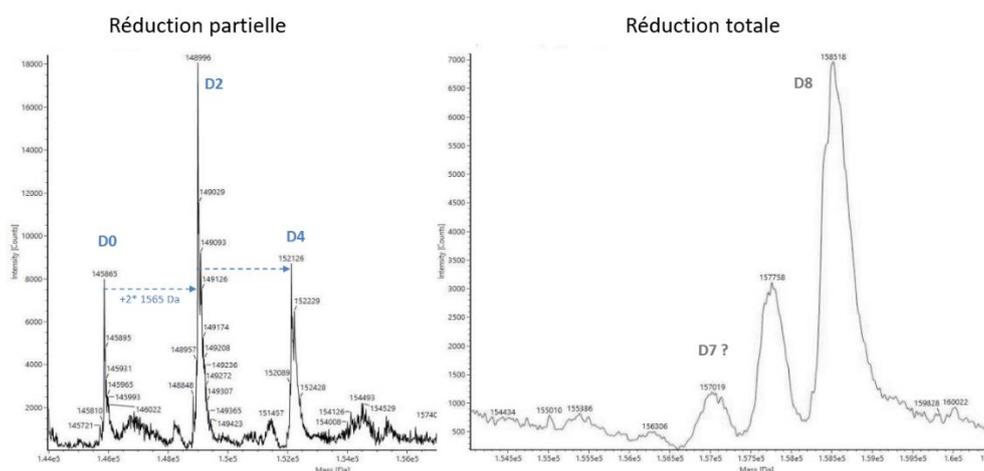


Figure 86 : Spectres de masse des conjugués T-Glu(OtBu)ValCit-vincristine D2 **106** et D8 **107**

L'analyse par spectrométrie de masse ESI native des conjugués T-Glu(OH)ValCit-vincristine après réduction partielle et totale a révélé une mauvaise conjugaison de la charge thérapeutique. D'abord, la réduction partielle nous a permis d'obtenir un DAR moyenne de 1,4 alors que la réduction totale nous a permis d'obtenir un DAR moyen de 2,1. Ensuite, nous pouvons observer des différences de masse d'environ 800 Da, pouvant correspondre à une déconjugaison de la vincristine **22** (Figure 87).

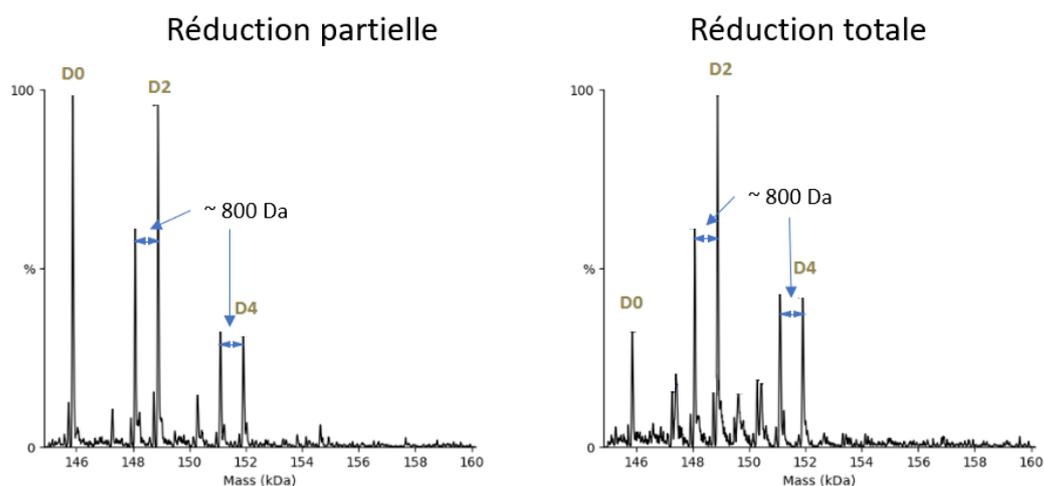


Figure 87 : Spectres de masse des conjugués T-Glu(OH)ValCit-vincristine D1,4 **108** et D2,1 **109**

#### Evaluation *in vitro* des conjugués générés à partir des linker GluValCit

Les quatre ADCs (**106**, **107**, **108** et **109**) ont été évalués *in vitro* par un test de viabilité cellulaire WST-1 sur les cellules SKBR3 pendant 72 h. Les profils de cytotoxicité ont été comparés à celui des conjugués T-ValCit-vincristine D4 **87** et D8 **88**. Le T-Glu(OtBu)ValCit-vincristine D2 **106** présente une efficacité légèrement inférieure à celle du conjugué **87**, mais ceci s'explique car son DAR est deux fois moins élevé. Le conjugué D8 **107** quant à lui présente un profil de cytotoxicité similaire au T-vincristine D8 **88**. Ainsi, l'utilisation du linker MC-Glu(OtBu)ValCit-PAB-Cl **100** n'influence pas l'efficacité des ADCs construits avec. Les valeurs de cytotoxicité des ADCs construits avec le linker

déprotégé **94** sont moins bonnes par rapport aux autres ADCs, ce qui était attendu au vu des analyses de masse (Figure 88).

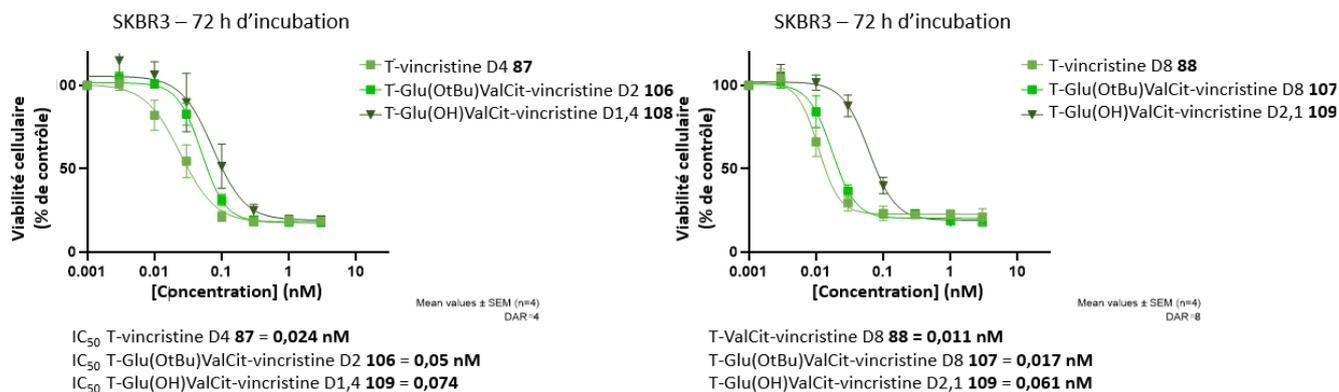


Figure 88 : Evaluation *in vitro* des ADCs construits avec les linkers **94** et **100** et comparaison avec les conjugués T-vincristine D4 **87** et D8 **88**

Nous avons donc décidé d'utiliser les ADCs **106** et **107**, composés du linker tripeptidique protégé **100**, afin de les tester sur des modèles *in vivo* de souris xénogreffées.

#### Utilisation d'un linker non-clivable

Dans l'intention d'étudier davantage l'influence du linker sur un ADC conjugué à la vincristine **22**, nous avons choisi d'utiliser un linker non-clivable. Afin d'adapter ce linker à l'étape d'alkylation quaternaire, ce dernier sera composé d'un motif maléimide ainsi que d'un groupement chlorure de benzyle, formant le linker MC-PAB-Cl **110** (Figure 89).

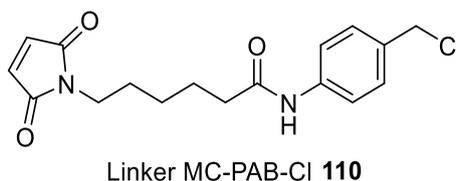


Figure 89 : Structure du linker non-clivable MC-PAB-Cl **110**

#### Synthèse du linker MC-PAB-Cl **110**

Ce linker a été synthétisé en deux étapes avec un rendement global moyen de 35%. Dans un premier temps, un linker bifonctionnel MC **3** a été couplé à un PAB-OH **78** par une réaction d'addition-élimination en présence d'une base, menant à l'intermédiaire **111** avec un rendement de 53%. Dans un deuxième temps, cet intermédiaire a été chloré en présence de chlorure de thionyle par une réaction de substitution nucléophile menant à l'obtention du linker **110** avec un rendement de 65% (Figure 90). Pour cette dernière étape, la simple évaporation des réactifs a été suffisante pour procéder à l'alkylation de la vincristine **22**.

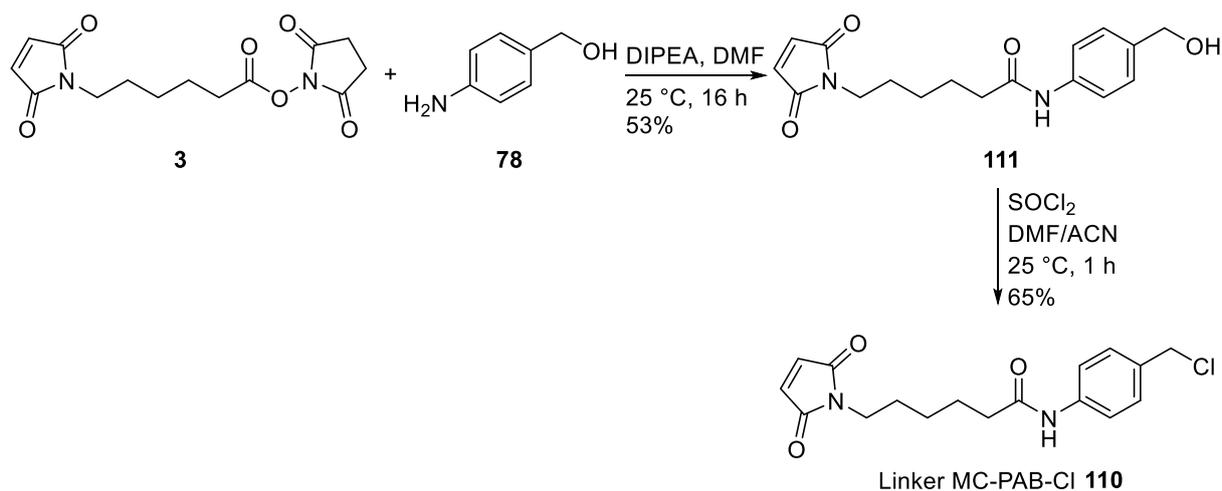


Figure 90 : Synthèse du linker MC-PAB-Cl **110**

### Alkylation quaternaire de la vincristine **22** avec le linker non-clivable MC-PAB-Cl **110**

Ce dernier linker **110** a été utilisé afin d'alkyler la vincristine **22** suivant le même protocole utilisé précédemment, nous permettant d'obtenir le MC-PAB-vincristine **112** avec un rendement de 71% (Figure 91).

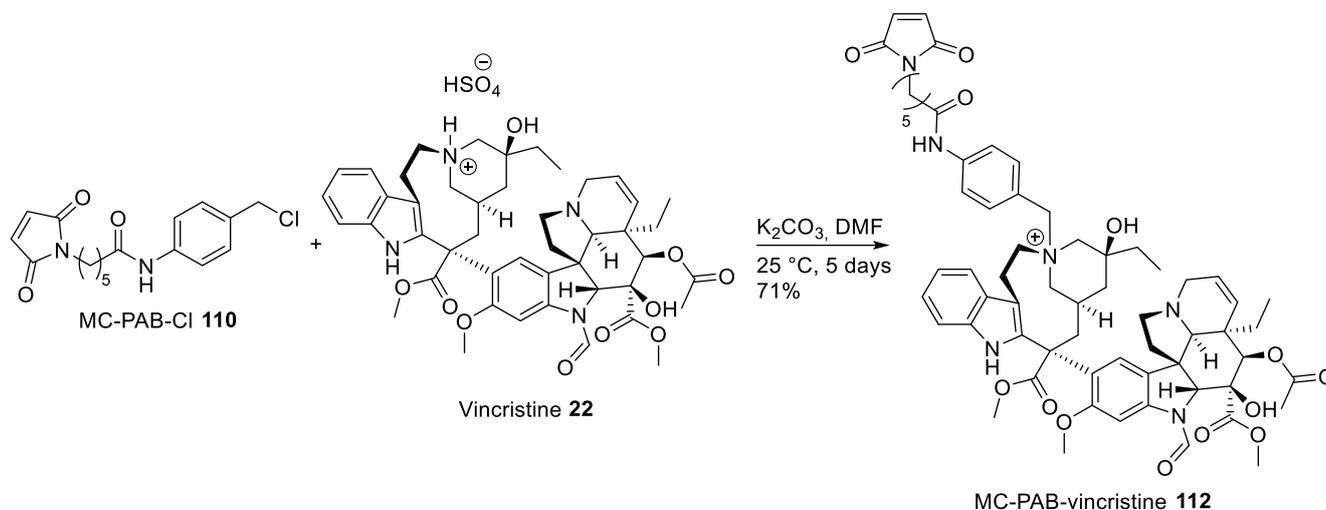


Figure 91 : Alkylation quaternaire de la vincristine **22** avec le linker non-clivable **110**

### Bioconjugaison du MC-PAB-vincristine **112**

L'ammonium **112** a été bioconjugué à l'anticorps trastuzumab **54** à l'aide d'une conjugaison cystéine après une première étape de réduction, partielle et totale, suivant le même mode opératoire que précédemment. Les conjugués T-MC-vincristine D2 **113** et D8 **114** ont été obtenus avec des rendements entre 55 et 65%, respectivement (Figure 92).

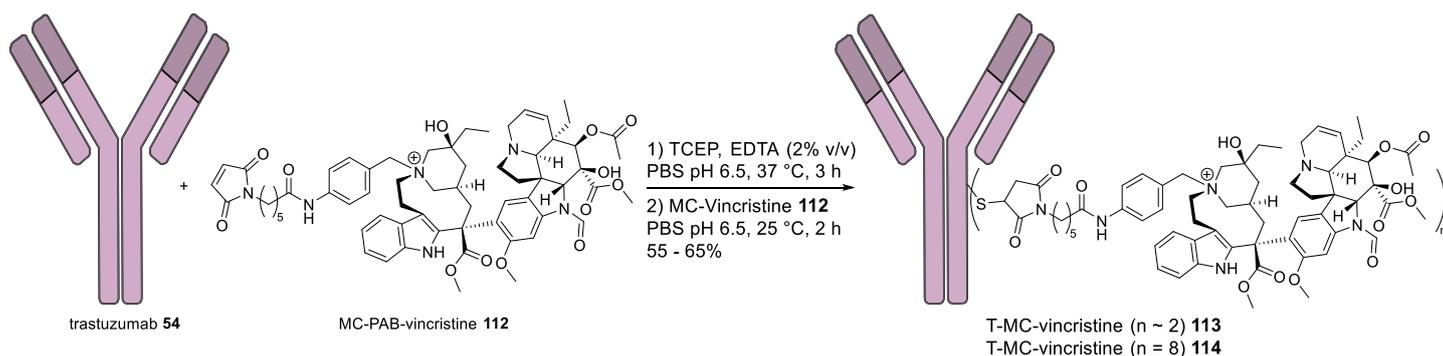


Figure 92 : Bioconjugaison de l'ammonium **112**

Ces ADCs ont été analysés par spectrométrie de masse ESI native afin de déterminer leur distribution de charges thérapeutiques. Après réduction partielle, le conjugué **113** présente un DAR moyen de 2,6 avec 17% d'anticorps non conjugués. Après réduction totale, le conjugué **114** présente un DAR homogène de 8 (Figure 93).

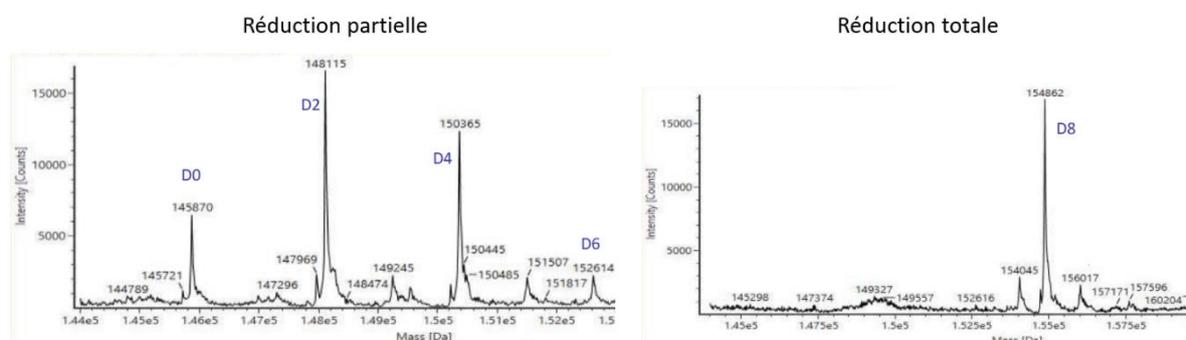


Figure 93 : Spectres de masse des conjugués T-MC-vincristine D2 **113** et D8 **114**

#### Evaluation *in vitro* sur les cellules SKBR3

Ces nouveaux conjugués **113** et **114** sont en cours d'évaluation *in vitro* afin de déterminer leur cytotoxicité sur les cellules SKBR3 par un test de viabilité cellulaire WST-1.

#### Evaluation *in vitro* combinatoire

Les ADCs trastuzumab-vincristine ont ensuite été évalués en combinaison avec la déplétion de PARP3. Ainsi, dans la suite de ce manuscrit, les ADCs trastuzumab-vincristine utilisés pour les tests biologiques et l'étape de double-conjugaison sont ceux construits avec le motif ValCit.

#### Evaluation de la combinaison entre le siPARP3 **53** et les conjugués trastuzumab-vincristine

Afin de tester la combinaison entre le siPARP3 **53** et le T-vincristine D4 **87**, les cellules SKBR3 ont été transfectées avec le siPARP3 **53** à une concentration de 100 nM 48 h avant le traitement avec les ADCs à différentes concentrations. La viabilité cellulaire a été mesurée et comparée avec le siSCR par un test WST-1. Lors de ces tests, l'activité cytotoxique des ADC a été mesurée, avec des IC<sub>50</sub> de

0,07 nM et 0,04 nM pour le siRNA contrôle et le siPARP3 **53**, respectivement (Figure 94). La déplétion causée par le siPARP3 **53** ne nous a pas permis d'observer une réelle potentialisation. Seule une légèrement augmentation des effets de l'ADC T-vincristine D4 **87** a été constatée. Pour obtenir une potentialisation significative, les doubles ADCs seront générés afin de maximiser l'internalisation simultanée du siPARP3 **53** et de la vincristine **22**.

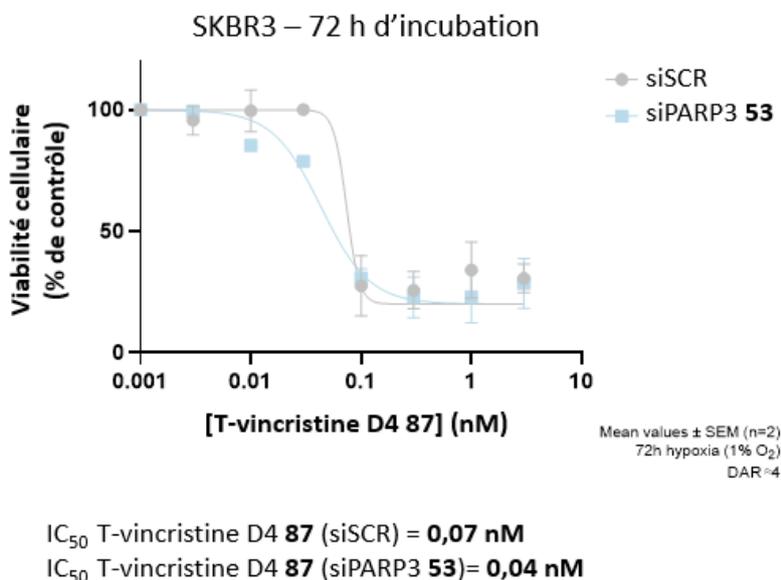


Figure 94 : Evaluation *in vitro* de la combinaison entre les siRNAs et les conjugués trastuzumab-vincristine. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été mesuré par WST-1 après incubation du T-vincristine D4 **87** pendant 72 h sur les cellules prétraitées avec les siRNAs.

### Double-conjugaison séquentielle

Dans le but de générer les anticorps doublement conjugués composés du trastuzumab **54**, de la vincristine **22** et du siPARP3 **53**, une stratégie de bioconjugaison séquentielle a été élaborée. D'abord, des ADCs conjugués à la vincristine et construits avec le motif ValCit, T-vincristine D4 **87** et T-vincristine D8 **88**, ont été générés en utilisant la méthode de conjugaison développée précédemment. Ensuite, ces ADCs ont été fonctionnalisés avec un motif azide en présence d'ABF **60**, menant à l'obtention des conjugués N<sub>3</sub>-trastuzumab-vincristine D4 **115** et D8 **116** grâce à une réaction d'addition-élimination. Enfin, ces ADCs ont été mis en présence de BCN-siRNA (BCN-siPARP3 **75** et BCN-siSCR) afin de procéder à la réaction SPAAC (Figure 95). Après purification par chromatographie d'exclusion stérique en utilisant un système Akta Pure et du PBS pH 7,5 en tant qu'éluant, ces double-conjugués ont été filtrés sur spinX pour les stériliser. Ces anticorps bi-conjugués ont été caractérisés par spectrométrie de masse SEC-ESI native. De cette façon, quatre anticorps bi-conjugués ont été générés :

- siPARP3-trastuzumab-vincristine D4 **117** (29% de rendement).
- siPARP3-trastuzumab-vincristine D8 **118** (20% de rendement).
- siSCR-trastuzumab-vincristine D4 **119** (23% de rendement).
- siSCR-trastuzumab-vincristine D8 **120** (7% de rendement).

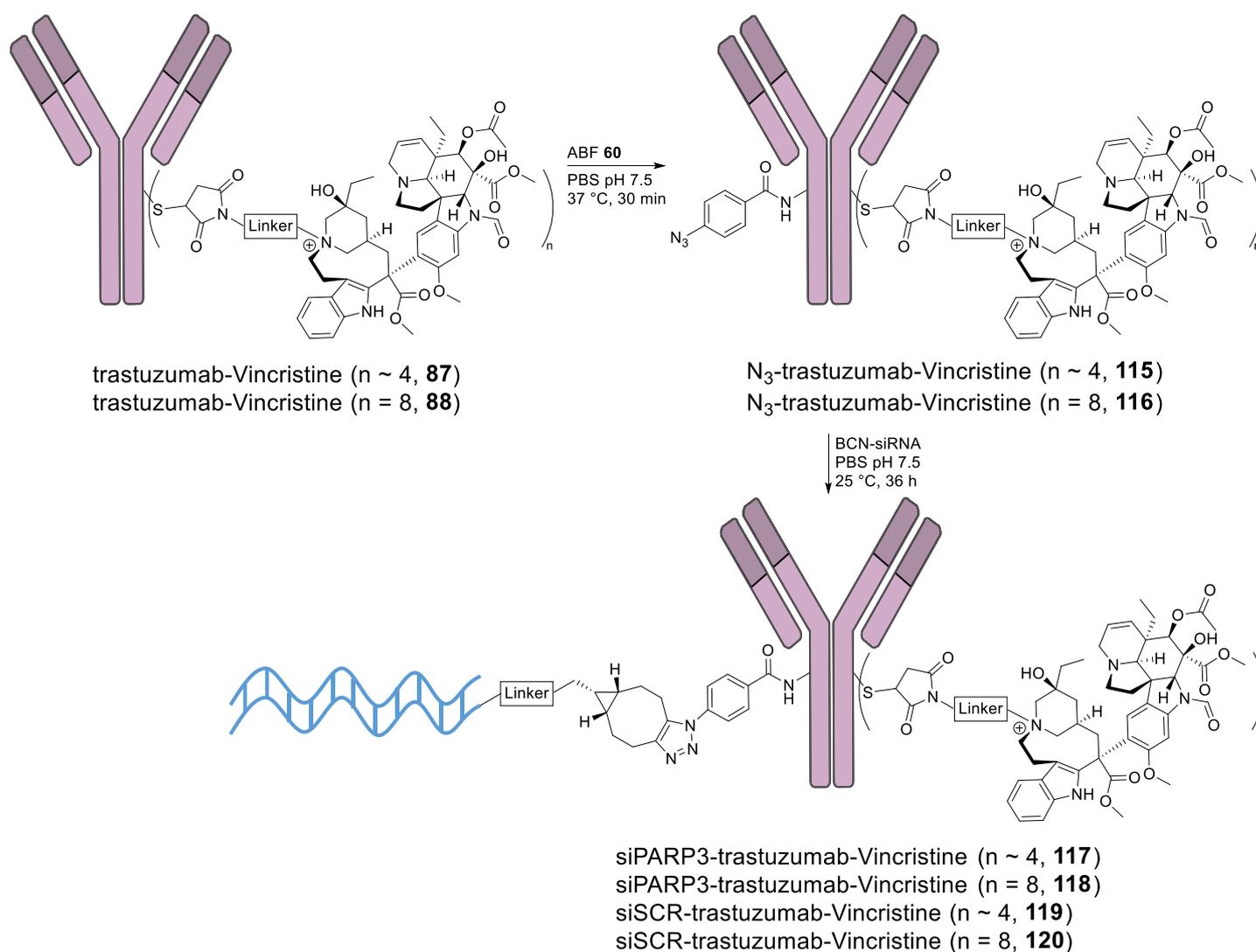


Figure 95 : Stratégie de double-conjugaison séquentielle permettant l'obtention des double-conjugués siRNA-trastuzumab-vincristine

Grâce à une chromatographie d'exclusion stérique effectuée lors de la purification, l'obtention des double-conjugués a pu être validée. La taille de la vincristine étant négligeable par rapport à celle des double-conjugués, il était facile de distinguer les différentes espèces grâce à l'incrément apporté par les siRNAs. Cette bonne séparation nous a donc permis, dans un premier temps, de déterminer la distribution de DoC allant du DoC 0 (en plus faible proportion) au DoC 2, et dans un deuxième temps de séparer efficacement la quantité d'ADC non-conjugué à un siRNA.

Dans le but de valider la formation des double-conjugués, ces derniers ont été analysés par spectrométrie de masse native, permettant en même temps de caractériser la distribution des deux charges thérapeutiques. Cette analyse nous a permis de déterminer quelles étaient les différentes espèces présentes dans le mélange. Dans le cas du conjugué siPARP3-T-vincristine D4 **117**, le mélange était composé de cinq espèces, facilement distinguables. Majoritairement, nous pouvons observer des anticorps conjugués à la fois d'un siRNA avec soit 2, 4 ou 6 molécules de vincristine **22**. Il y avait également la présence d'un anticorps conjugué seulement avec un double-brin de siRNA mais aussi celle d'un anticorps conjugué à la fois avec deux double-brin de siRNA et deux molécules de vincristine **22**, ce qui représentait l'espèce avec le plus haut poids moléculaire (Figure 96). Ainsi, la

génération des double-conjugués a pu être validé, avec un mélange d'espèces relativement homogène suite à l'utilisation de deux méthodes de conjugaison différentes et séquentielles.

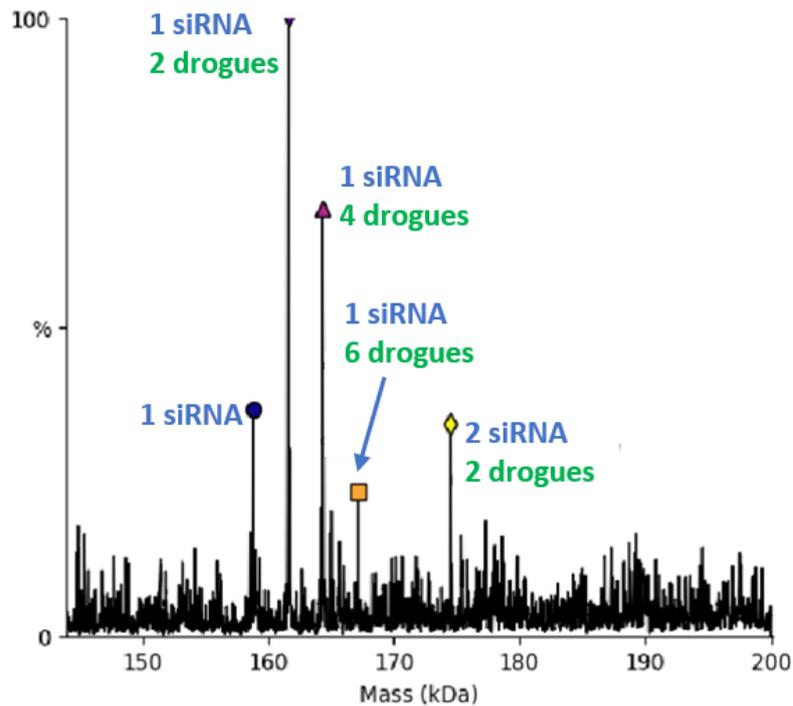


Figure 96 : Spectre de masse du conjugué siPARP3-trastuzumab-vincristine D4 117

#### Evaluation *in vitro* des double-conjugués

#### Evaluation *in vitro* sur les cellules SKBR3

Les double-conjugués siPARP3-T-vincristine D4 **117** et D8 **118** ainsi que les double-conjugués contrôles siSCR-T-vincristine D4 **119** et D8 **120** ont été évalués *in vitro* par des tests de viabilités cellulaires sur les cellules SKBR3. Cependant, peu importe les temps d'incubation, les profils de cytotoxicités étaient similaires entre les double-conjugués **117**, **118** et les double-conjugués contrôles **119** et **120**, montrant donc une absence de potentialisation, sûrement dû à une mauvaise déplétion de PARP3 à ces faibles concentrations (Figure 97).

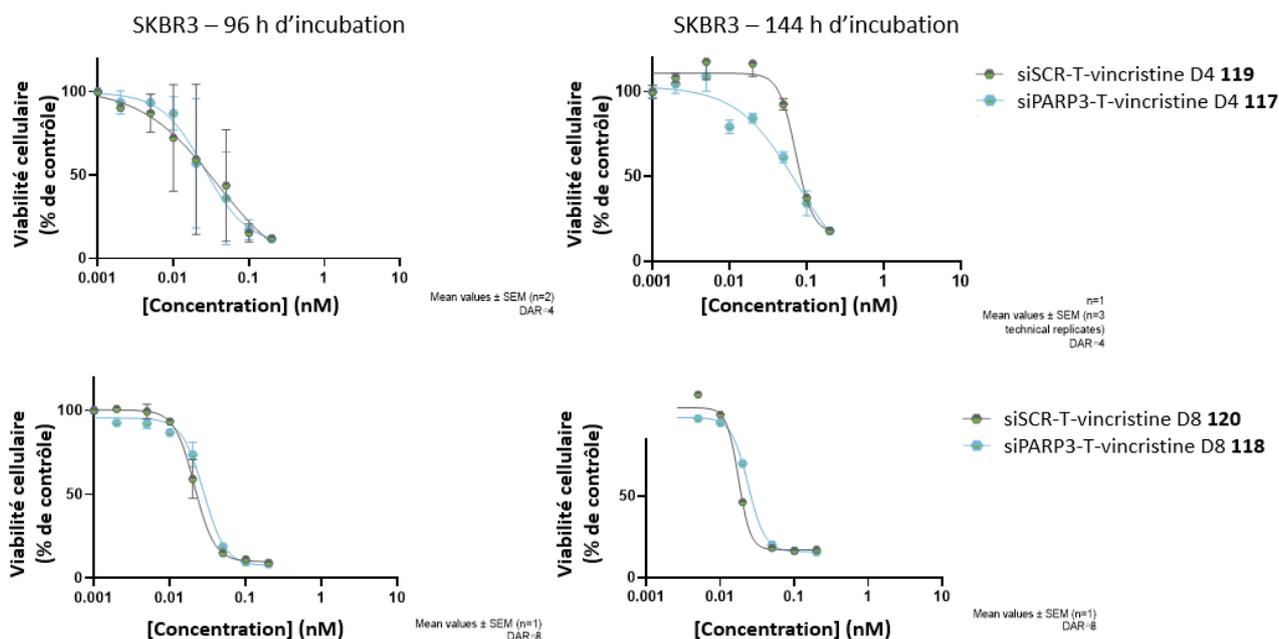


Figure 97 : Evaluation *in vitro* des double-conjugués sur les cellules SKBR3 sur les cellules SKBR3. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été mesuré par WST-1 après incubation des double-conjugués à différents temps.

Ainsi, afin d'obtenir une potentialisation, l'utilisation d'un linker permettant une libération de vincristine **22** plus lente ou l'utilisation de lignée cellulaire possédant une plus forte expression de PARP3 permettraient de pallier ces problèmes.

#### Evaluation *in vitro* sur les cellules BT474

Les double-conjugués ont aussi été évalués sur une autre lignée cellulaire HER2 positives, la lignée BT474 par un test de viabilité cellulaire WST-1. Nous avons également augmenté le temps d'incubation, passant à 120 h, afin de permettre au siPARP3 **53** de pouvoir agir plus efficacement à de faibles concentrations. Une petite augmentation des effets cytotoxiques de la vincristine **22** a été observée avec le double-conjugué **117**. De plus, ces profils de cytotoxicité ont été comparés à celui du conjugué T-ValCit-vincristine D4 **87**, montrant que ce dernier possède la même activité que le double-conjugué contrôle **119**, mettant en avant que l'utilisation d'un siRNA non-actif n'influençait pas l'activité de l'ADC **117** (Figure 98).

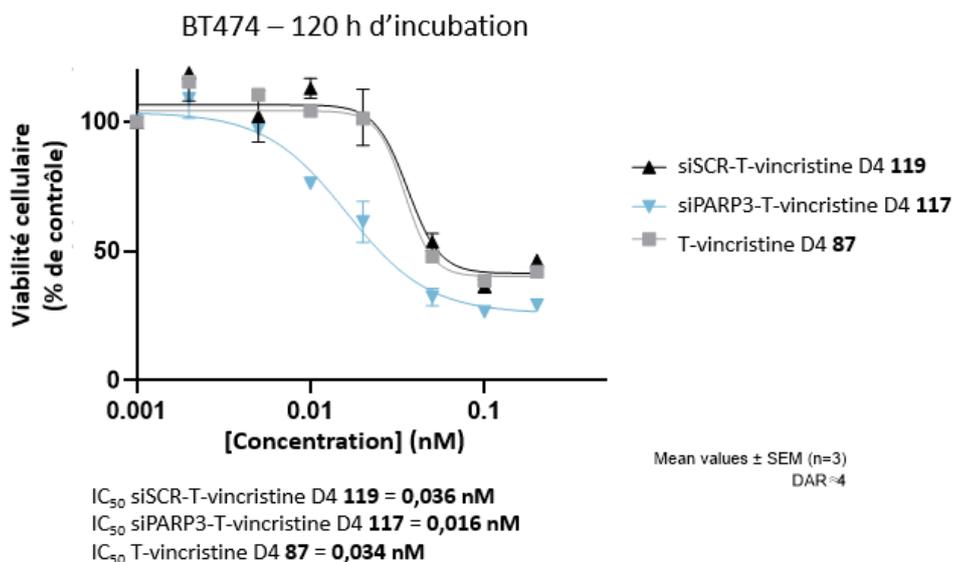


Figure 98 : Evaluation *in vitro* des double-conjugués et de l'ADC **87** sur les cellules BT474

Dans ces conditions, une légèrement augmentation de l'activité cytotoxique du double-conjugué **117** a été observée et comparée au double-conjugué contrôle **119** et au T-vincristine D4 **87**. Pour mettre en évidence une réelle potentialisation, il serait possible de diminuer le DAR de vincristine ou d'utiliser un linker avec une cinétique de libération plus lente.

## Conclusion

Pour conclure, afin de générer un anticorps conjugué à la fois avec un ARN interférant et une molécule cytotoxique, des méthodes de conjugaison ont été développées. Dans un premier temps, le conjugué T-siPARP3 **77** a été généré avec succès à l'aide d'une stratégie « Plug and Play » par une étape de conjugaison lysine suivi d'une réaction SPAAC. Le conjugué **77** a montré une déplétion de PARP3 d'environ 80% à 100 nM et a permis d'augmenter les effets de la vincristine **22** d'un facteur 5.

Les conjugués trastuzumab-vincristine ont ensuite été générés grâce à une première étape de fonctionnalisation de la vincristine **22**, reposant sur la *N*-alkylation quaternaire du linker MC-ValCit-PAB-Cl **26**, conduisant au MC-ValCit-PAB-vincristine **86** avec un rendement de 60%. Ce composé **86** a été finalement conjugué sur le trastuzumab **54** à l'aide d'une étape de conjugaison cystéine. Ainsi, deux conjugués trastuzumab-vincristine ont été générés avec succès, l'un avec un DAR moyen de 4 (**87**) – l'autre avec un DAR homogène de 8 (**88**), et ont montré une excellente cytotoxicité 20 fois supérieure par rapport à la vincristine **22** en tests de viabilité cellulaire WST-1 sur différentes lignées cellulaires.

Ces ADCs ont été comparés à deux autres immunoconjugués équipés de charges thérapeutiques classiquement employées, la MMAE **15** et le DM1 **9**. Ces tests ont démontré que les ADC **87** et **88** avaient un profil cytotoxique similaire au T-MMAE **92** et **93** et au T-DM1 **11**.

Dans le but d'évaluer l'efficacité des ADCs **87** et **88** *in vivo*, un linker **94** tripeptidique, basé sur le classique linker Fmoc-ValCit PAB-OH **97**, a été synthétisé en vue de pallier les problèmes de stabilité du motif *ValCit* dans le plasma de rongeur. De cette manière, deux versions de ce linker, l'un protégé

**100** et l'autre déprotégé **94**, nous ont permis de synthétiser deux analogues de l'ammonium MC-ValCit-PAB-vincristine **86**. Ces ammoniums **104** et **105** ont été conjugués au trastuzumab **54** et ont été évalués *in vitro* par un test de viabilité cellulaire WST-1. Ces données nous ont permis de déterminer que les ADCs construits avec le linker protégé **100** possédaient une activité cytotoxique similaire aux T-vincristine **87** et **88**. C'est pour cela que nous évaluerons l'efficacité *in vivo* des ADCs D2 **106** et D8 **107** sur des modèles de souris xénogreffées afin de compléter ces études.

Un dernier linker non-clivable **110** a été synthétisé et alkylé à la vincristine **22** pour étudier son influence sur les anticorps conjugués à la vincristine **22**. Actuellement, les ADCs basés sur ce linker ont été générés et sont en phase d'évaluation *in vitro* sur les cellules SKBR3.

Avec ces résultats en main, nous avons pu générer les double-conjugués siPARP3-trastuzumab-vincristine **117** et **118** en opérant les étapes de conjugaison de façon successive à partir des ADCs trastuzumab-vincristine construits avec le linker ValCit. Ces double-conjugués **117** et **118** n'ont pas permis de potentialiser les effets des conjugués trastuzumab-vincristine sur les cellules SKBR3, probablement dû à une déplétion insuffisante due à des concentrations trop faibles ou à une cinétique trop lente. Cependant, une légère augmentation des effets cytotoxiques a été observée sur les cellules BT474, nous encourageant ainsi dans cette voie.

Pour terminer et afin de générer une thérapie basée sur les double-conjugués siRNA-anticorps-vincristine contre les TNBC, de nouveaux anticorps seront sélectionnés. Nous projetons de recourir à un anticorps anti-TROP2, un antigène surexprimé sur les TNBC et ayant déjà fait ses preuves pour ce type de cellules.

## Partie expérimentale

### Material and methods.

All reagents were obtained from commercial sources and used without prior purifications. Dry solvents were obtained from Merck. Unless otherwise indicated, reactions were carried out under an argon atmosphere in flame-dried glassware with magnetic stirring. Air and/or moisture-sensitive liquids were transferred via syringe. Organic solutions were concentrated by rotary evaporation at 40-60 °C. Volume ratios (v/v) are indicated when referring to mixtures of solvents (e.g. DCM/MeOH 95:5). Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed using plates aluminium sheets (silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Ref. 1.05554). Visualization was achieved under a 254 or 365 nm UV light and by immersion in an appropriate staining solution. Silica gel for column chromatography was purchased from Merck (Geduran® Si 60, 40-63 µm).

NMR: <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded at 23 °C on Bruker Avance III - 400 MHz / 500 MHz spectrometers. Recorded shifts are reported in parts per million (δ) and calibrated using residual nondeuterated solvent. Data are represented as follows: chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad, app = apparent), coupling constant (J, Hz), integration and assignment for <sup>1</sup>H NMR data.

Analytical LC-MS analyses were carried out on Waters ARC separations module equipped with Waters 2998 PDA UV detector, Waters Acquity QDa mass detector and XBridge®, 3.5 µm, C18, 50 x 4.6 mm column. The flow rate was 1 mL/min and the solvent system was composed as follows: solvent A: 0.05% TFA in water; solvent B: acetonitrile. The gradient run was: 0 to 5 min. – 5% to 95% B; 5 to 6 min. – 95% B; 6 to 7 min. – 5% B. Mass detector was operated in positive MS Scan mode with 600 °C probe temperature, 1.5 kV capillary voltage and 10 V cone voltage.

High resolution mass spectra (HRMS) were obtained using an Agilent Q-TOF 6520.

IR spectra were recorded in a Thermo-Nicolet FT/IR-380 spectrometer. Spectra were interpreted with OMNIC 9 software and are reported in cm<sup>-1</sup>. The abbreviations used are w (weak), m (medium), s (strong).

Concentrations of protein or RNA solutions in DPBS (calcium and magnesium free, Merck, Ref. D8537-6X500ML) were determined by UV absorbance using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) at 280 nm for proteins and 260 nm for RNA. The concentration of antibody conjugates was measured using a BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France, Ref. 23225) as RNA also absorb at 280 nm.

The concentration in antibody and antibody conjugates was determined either by UV absorbance using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) or using a BCA Protein Assay Kit (Ref. 23225, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Antibody deglycosylation was achieved with Remove-iT® Endo S (New England Biolabs, Ipswich, U.S.A.).

Size Exclusion Chromatography hyphenated to non-denaturing Mass Spectrometry The BioAccord system (Waters, Manchester, UK) comprising a binary solvent manager, a sample manager cooled at 8 °C, a column oven maintained at room temperature and an UV detector operating at 280 nm and 214 nm hyphenated to the ACQUITY RDa detector was used for the online SEC-native MS instrumentation. Around twenty micrograms of antibody were loaded on the ACQUITY UPLC Protein BEH SEC column (2.1 x 150 mm, 1.7 µm particle size, 200 Å pore size) from Waters (Manchester, UK) using 0.100 mL/min flow rate and isocratic elution of 100 mM ammonium acetate (NH<sub>4</sub>OAc) at pH 6.9 for a 6 minutes total

run. The ACQUITY RDa detector (TOF analyzer) was operated in positive mode with a capillary voltage of 1.5 kV while sample cone and desolvation temperature were set to 120 or 160 V (cystein or lysine conjugate) and 250 °C, respectively. Acquisitions were performed under full scan mode and high mass range (400–7,000 m/z) with 2 Hz scan rate. The mass spectrometer was calibrated using the ACQUITY RDa Detector Calibrant and Wash Kit (Waters, Manchester, UK, ref. 186009013). The ACQUITY RDa Waters connect LockMass Kit (Waters, Manchester, UK, ref. 186009298) was used before and after each injection in order to compensate for mass variations due to temperature changes in the laboratory. UNIFI Scientific Information System (Waters, Manchester, UK) was used as a single solution to encompass data acquisition and processing. Average DoC values were calculated using equation (1):

$$DoC = \frac{(\sum_{k=0}^8 k \times intensity\ DoCk)}{\sum_{k=0}^8 intensity\ DoCk} \quad (1)$$

These results were derived from the relative peak intensities measured from deconvoluted mass spectra, following a method developed and validated by the Cianféroni group.<sup>275</sup>

Size Exclusion Chromatography hyphenated to non-denaturing Mass Spectrometry (SEC-non denaturing MS): An ACQUITY UPLC H-class system (Waters, Manchester, UK) comprising a quaternary solvent manager, a sample manager cooled at 10 °C, a column oven maintained at room temperature and an UV detector operating at 280 nm and 214 nm was coupled to the Synapt G2 HDMS mass spectrometer (Waters, Manchester, UK). A quantity comprised between 10 to 20 µg of sample were loaded on the ACQUITY UPLC Protein BEH SEC column ( 2.1 × 150 mm, 1.7 µm particle size, 200 Å pore size from Waters, Manchester, UK) using an isocratic elution of 100 mM ammonium acetate (NH<sub>4</sub>OAc) at pH 6.9 and at a flow rate of 0.100 mL/min over 6.0 minutes. The Synapt G2 HDMS was operated in positive mode with a capillary voltage of 3.0 kV while sample cone and pressure in the interface region were set to 180 V and 6 mbar, respectively Acquisitions were performed in 1,000–10,000 m/z range with a 1.5 s scan time. The mass spectrometer was calibrated using singly charged ions produced by a 2 g/L solution of cesium iodide (Acros organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) in 2-propanol/water (50/50 v/v). Native MS data interpretations were performed using UniDec software.

RNA sequences (5'- to 3'-):

siPARP3 sense (NH<sub>2</sub>-5'-ssPARP3-) : 5'NH<sub>2</sub>-(A)(U)(C)(A)(C)(U)(A)(C)(U)(C)(G)(A)(A)(G)(A)(C)(G)(C)(A)

siPARP3 antisense (asPARP3) : (U)(G)(C)(G)(U)(C)(U)(U)(C)(G)(A)(G)(U)(A)(G)(U)(G)(A)(U)

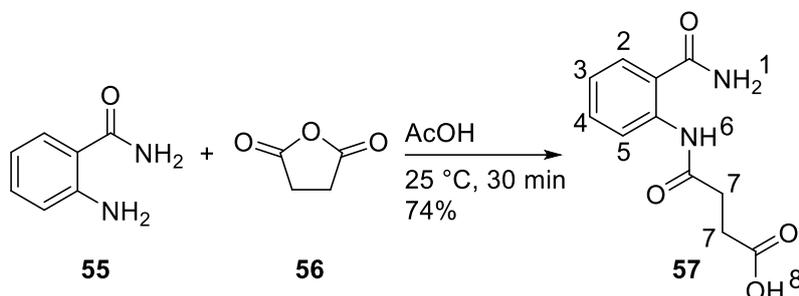
siSCR sense (NH<sub>2</sub>-5'-ssSCR) : 5'NH<sub>2</sub>-(G)(C)(A)(U)(G)(C)(G)(A)(C)(C)(U)(C)(U)(G)(U)(U)(G)(A)

siSCR antisense (asSCR) : (U)(C)(A)(A)(A)(C)(A)(G)(A)(G)(G)(U)(C)(G)(C)(A)(U)(G)(C)

RNAs were purchased HPLC-purified from Eurogentec. Every step using RNA were carried out under a biosafety cabinet cleaned with ethanol and RNaseZap. RNAs bearing primary amine were modified with a C6 linker and were modified at 5' sequence position. Upon reception, tubes were centrifuged, then RNAs were suspended in DEPC-treated water to 1 mM for conjugation. RNAs are stored dried at -80 °C until use, and at -80 °C when solubilized.

## Chemical synthesis

### Synthesis of 4-[[2-(aminocarbonyl)phenyl]amino]-4-oxobutanoic acid **57**



To a solution of anthranilamide **55** (5 g, 32.64 mmol, 1.1 equiv.) in 15 mL of acetic acid was added succinic anhydride **56** (3 g, 30 mmol, 1 equiv.) in 15 mL of acetic acid. The reaction mixture was stirred at 25 °C for 30 min. Cold water is added and the remaining solid was washed with cold water and diethyl ether. The product is dried under reduced pressure and afforded **57** with 74% yield (5.22 g, 22.06 mmol) as a white solid.

**TLC:** Rf = 0.20 (DCM 9:1 MeOH)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):** 12.20 (br, s, 1H, H8), 11.74 (s, 1H, H6), 8.46 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H2), 8.28 (s, 1H, H1), 7.80 (d, *J* = 8.0, 1H, H5), 7.48 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H4), 7.11 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H H3), 2.53 – 2.73 (m, 4H, H7).

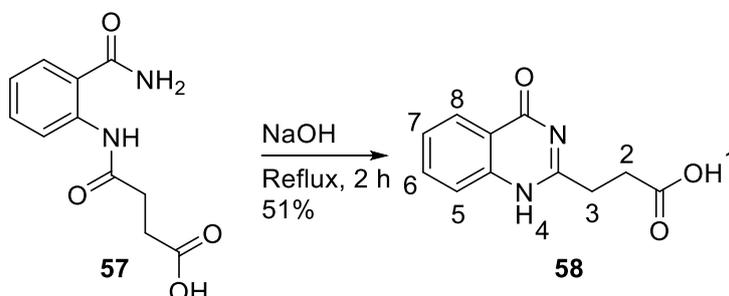
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):** 174.1, 171.2, 170.4, 140.1, 132.7, 129.0, 122.7, 120.5, 119.9, 32.5, 29.2.

**u<sub>max</sub> (thin film) /cm<sup>-1</sup>:** 3408 (br), 2359 (s), 2331 (m), 2213 (w), 2022 (m), 2006 (w), 1975 (w), 1713 (m), 1659 (m), 1615 (m), 1558 (w), 1516 (m); 1404 (m), 1318 (w), 1173 (m), 759 (m), 647 (w), 553 (m), 472 (m), 458 (m), 426 (m).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+H<sup>+</sup>] 237.087, found 237.086.

**Mp:** 221 °C.

### Synthesis of 3,4-dihydro-4-oxo-2-quinazolinepropanoic acid **58**



4-[[2-(aminocarbonyl)phenyl]amino]-4-oxobutanoic acid **57** (4 g, 16.93 mmol, 1 equiv.) was dissolved in a solution of 2 N NaOH (40 mL, aq.) and the mixture allowed to reflux for 2 h. The mixture was cooled down to room temperature and the pH is carefully adjust to 5-6 with 4 N HCl under stirring. The

remaining solid was filtered, washed with water, dried and afforded **58** with 51% yield (1.87 g, 8.58 mmol) as a white solid.

**TLC:** Rf = 0.20 (DCM 9:1 MeOH)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):** 12.22 (br s, 2H, H1 & H4), 8.08 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H8), 7.76 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H6), 7.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H5), 7.45 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H7), 2.81 – 2.97 (m, 2H, H3), 2.80-2.67 (m, 2H, H2).

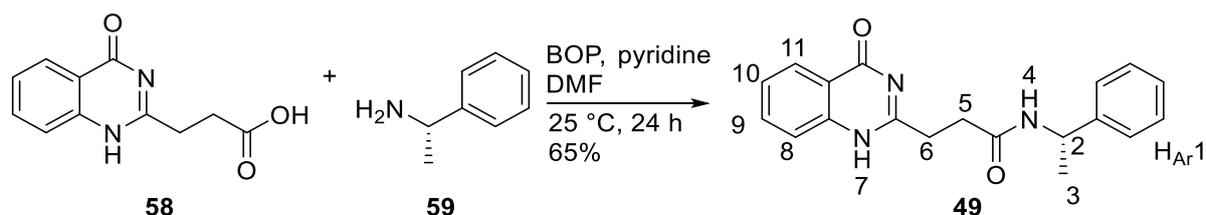
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):** 174.0, 162.1, 156.8, 149.1, 134.7, 127.2, 126.5, 126.2, 121.3, 30.3, 29.6.

**u<sub>max</sub> (thin film) /cm<sup>-1</sup>:** 3646 (br), 2359 (s), 2331 (m), 2209 (s), 2176 (m), 2050 (w), 2037 (s), 2019 (w), 2011 (w), 1996 (m), 1963 (w), 1694 (s), 1659 (m), 1613 (s), 1557 (m), 1468 (m), 1398 (w), 1354 (m), 1244 (m), 1214 (w), 1177 (w), 952 (w), 871 (w), 780 (m), 651 (m), 595 (w), 490 (w), 418 (m).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H<sup>+</sup>] 219.078, found 219.077.

**Mp:** 234 °C.

#### Synthesis of Me0328 **49**



To a solution of 3,4-dihydro-4-oxo-2-quinazolinepropanoic acid **58** (200 mg, 0.92 mmol, 1 equiv.) and (S)-(-)-1-phenylethylamine **59** (0.13 mL, 1.01 mmol, 1.1 equiv.) in DMF (10 mL) were sequentially added BOP (426 mg, 0.96 mmol, 1.05 equiv.) and pyridine (0.22 mL, 2.75 mmol, 3 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. Ethyl acetate was then added to the reaction media. The organic layer was washed with 0.1 M HCl (25 mL, aq.) and NaHCO<sub>3</sub> (2 x 25 mL, aq., sat.). The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under reduced pressure. The compound was purified by chromatography column (eluent, cyclohexane 1/1 ethyl acetate, then 100% ethyl acetate, then dichloromethane 9/1 methanol) and afforded **49** with 65% yield (190 mg, 0.59 mmol) as a white solid.

**TLC:** Rf = 0.35 (DCM 95:5 MeOH)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):** 12.18 (s, 1H, H7), 8.49 – 8.35 (m, 1H, H4), 8.08 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H11), 7.79 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H9), 7.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H10), 7.48 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H8), 7.17 – 7.29 (m, 5H, H<sub>Ar1</sub>), 4.91 (s, 1H, H2), 2.86 (s, 2H, H6), 2.68 (s, 2H, H5), 1.47 – 1.17 (m, 3H, H3).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):** 170.6, 162.1, 157.2, 149.3, 145.2, 134.7, 128.6, 127.2, 126.9, 126.4, 126.3, 126.2, 121.4, 48.2, 31.9, 30.1, 23.0.

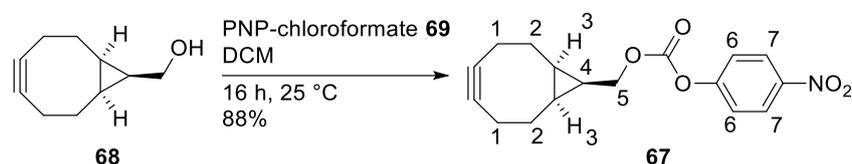
**u<sub>max</sub> (thin film) /cm<sup>-1</sup>:** 3327 (w), 3297 (w), 2204 (w), 2192 (w), 2182 (w), 2171 (w), 2161 (w), 2055 (w), 2044 (w), 2028 (w), 1999 (w), 1678 (s), 1631 (s), 1610 (m), 1545 (m), 1467 (m), 1367 (m), 1339 (w), 1249 (w), 1175 (w), 898 (w), 773 (m), 700 (m), 689 (m), 630 (w), 621 (w), 462 (w), 435 (w), 415 (m), 406 (m), 401 (m).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H<sup>+</sup>] 332.157, found 322.156.

**Mp:** 232 °C.

The protocol used for the synthesis of the linker **61** was developed by Dovgan, *et al.*<sup>268</sup>

**Synthesis of BCN-PNP ((1R,8S,9S)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyl (4-nitrophenyl) carbonate) **67****



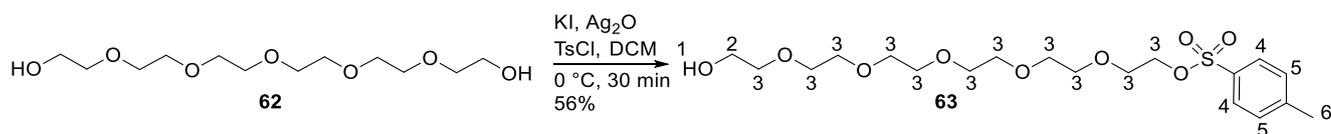
To a solution of (1R,8S,9S)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethanol **68** (1 equiv., 780 mg, 5.12 mmol) in dichloromethane (20 mL) was added p-nitrophenol chloroformate (1.2 equiv., 1.24 g, 6.15 mmol) and pyridine (10 equiv., 4.05 g, 4.12 mL, 51.2 mmol). The reaction was stirred 16 h at 25 °C. After concentration, the mixture was quenched by a solution of NH<sub>4</sub>Cl (75 mL, aq., sat.) and extracted with EtOAc (3 x 75 mL). The combined organic layers were washed with brine (75 mL, aq., sat.), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by chromatography column (eluent : cyclohexane 100%, then Cyclohexane 8:2 EtOAc) and afforded **67** with 88% yield (1.416 g, 4.49 mmol) as a colorless oil that solidifies to a white solid at -20°C.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 8.28 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, H7), 7.39 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, H6), 4.41 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H5), 2.37 – 2.23 (m, 6H, H1 & H2), 1.62 – 1.59 (m, 3H, H3 & H4), 1.09 – 1.04 (m, 2H, H2).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 155.6, 152.6, 125.3, 121.8, 98.7, 68.0, 29.1, 21.4, 20.5, 17.3.

**LRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 338.10, found 338.27.

**Synthesis of PEG<sub>6</sub>-OTs (17-hydroxy-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl 4-methylbenzenesulfonate) **63****



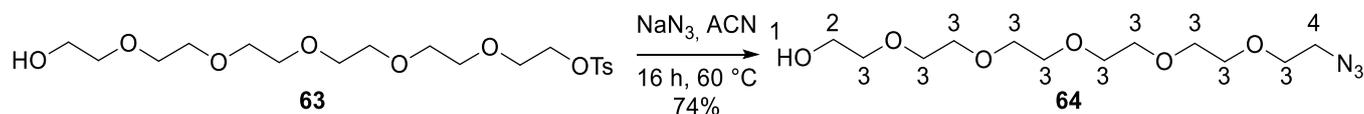
To a solution of dried hexaethylene glycol **62** (1 equiv., 5 g, 17.71 mmol) in dichloromethane (80 mL) at 0 °C were added KI (0.2 equiv., 470 mg, 2.83 mmol) and Ag<sub>2</sub>O (1.5 equiv., 4.92 g, 21.23 mmol). Tosyl chloride (1.05 equiv., 3.55 g, 18.60 mmol) was then added portion wise and the reaction mixture was stirred 30 min at 0 °C. The mixture was then filtered through a pad of Celite, washed with THF (20 mL) and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by chromatography column (eluent, EtOAc 15:85 cyclohexane, then 100% EtOAc, then DCM 95:5 MeOH) and afforded **63** with 56% yield (4.3 g, 9.85 mmol) as a clear yellow oil.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 7.78 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H4), 7.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H5), 4.14 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H, H2), 3.72–3.53 (m, 22H, H3), 2.94 (s, 1H, H1), 2.43 (s, 3H, H6).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 144.8, 133.1, 129.8, 128.0, 72.5, 70.7-70.4, 69.7, 68.7, 61.7, 21.6.

**LRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>19</sub>H<sub>33</sub>O<sub>9</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 437.18, found 437.19.

**Synthesis of PEG<sub>6</sub>-N<sub>3</sub> (17-azido-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecan-1-ol) **64****



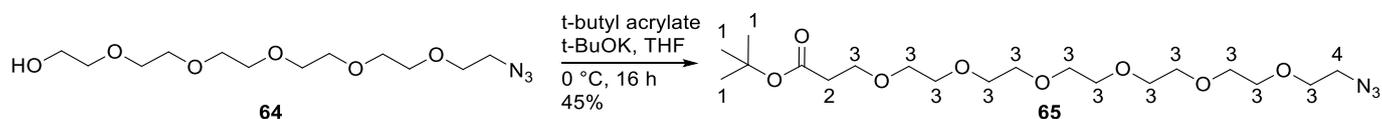
To a solution of 17-hydroxy-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecyl 4-methylbenzenesulfonate **63** (1 equiv., 4.25 g, 9.74 mmol) in ACN (10 mL) was added NaN<sub>3</sub> (1.5 equiv., 0.95 g, 14.60 mmol). The reaction was stirred 16 h at 60 °C. The mixture was cooled down to room temperature and was filtrated. The filtrate was concentrated under reduced pressure and afforded the pure compound **64** with 74% yield (2.21 g, 7.19 mmol) as a yellow oil which is used without further purifications.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.71 – 3.70 (m, 2H, H<sub>2</sub>), 3.69 – 3.58 (m, 20H, H<sub>3</sub>), 3.37 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H<sub>4</sub>), 2.98 (s, 1H, H<sub>1</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 72.5, 70.7 – 70.6, 70.4, 70.0, 61.7, 50.7.

**LRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 330.16, found 330.06.

**Synthesis of tButylester-PEG<sub>6</sub>-N<sub>3</sub> (tert-butyl 1-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oate) **65****



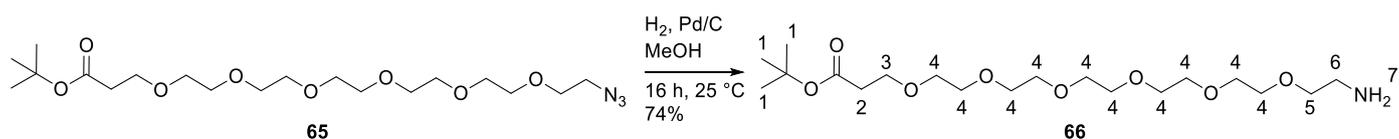
To a solution of 17-azido-3,6,9,12,15-pentaoxaheptadecan-1-ol **64** (1 equiv., 2.19 g, 7.14 mmol) in THF (24 mL, concentration = 0.3 mmol/mL) at 0 °C was added tert-butyl acrylate (1.3 equiv., 1.19 g, 9.28 mmol). Potassium tert-butoxide 1 M in THF (0.1 equiv., 0.714 mL, 0.714 mmol) was then added portion wise at 0 °C and the reaction mixture was stirred 16 h at 25 °C. After concentration, a solution of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (aq., 1M, 20 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 x 40 mL). The combined organic layers were washed with brine (1 x 40 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated in vacuo. The crude material was purified by chromatography column (eluent: cyclohexane 8:2 EtOAc) and afforded **65** with 45% yield (1.40 g, 3.2 mmol) as a yellow oil.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.72 - 3.56 (m, 24H, H<sub>3</sub>), 3.38 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 2.49 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H<sub>4</sub>), 1.44 (s, 9H, H<sub>1</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 171.0, 70.7 – 70.4, 70.1, 66.9, 50.7, 36.3, 28.1.

**LRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>19</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 458.25, found 458.23.

### Synthesis of *t*Butylester-PEG<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> (*tert*-butyl 1-amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oate) **66**



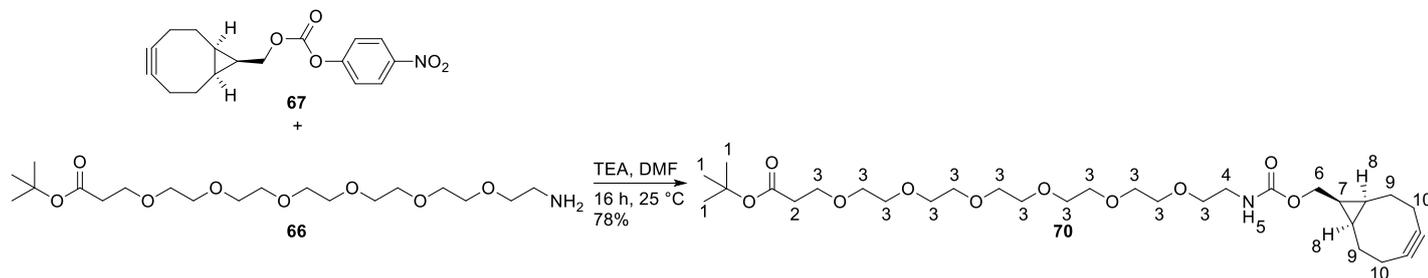
To a solution of *tert*-butyl 1-azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oate **65** (1 equiv., 1.39 g, 3.18 mmol) in degassed methanol (80 mL, concentration under 50 mM) and flushed with argon was added Pd/C (1 mol%, 33.84 mg, 31.8  $\mu$ mol). The atmosphere was replaced by H<sub>2</sub> and the mixture was stirred 16 h at 25 °C. The mixture was filtered through a pad of Celite and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by chromatography column (eluent: DCM 100%, then DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 9/0.9/0.1) and afforded **66** with 74% yield (966 mg, 2.36 mmol) as a yellow oil.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 3.71 – 3.68 (m, 2H, H<sub>2</sub>), 3.66 – 3.57 (m, 20H, H<sub>4</sub>), 3.53 – 3.51 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 2.88 – 2.85 (t, *J* = 5.5, 4.8 Hz, 2H, H<sub>6</sub>), 2.51 – 2.47 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H<sub>5</sub>), 1.84 (s, 2H, H<sub>7</sub>), 1.43 (s, 9H, H<sub>1</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 170.9, 80.5, 73.1, 70.6 – 70.3, 66.9, 50.7, 41.7, 36.3, 28.1.

**LRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>19</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>8</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 410.28, found 410.28.

### Synthesis of *t*Butylester-PEG<sub>6</sub>-BCN (*tert*-butyl 1-(bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)-3-oxo-2,7,10,13,16,19,22-heptaaxa-4-azapentacosan-25-oate) **70**



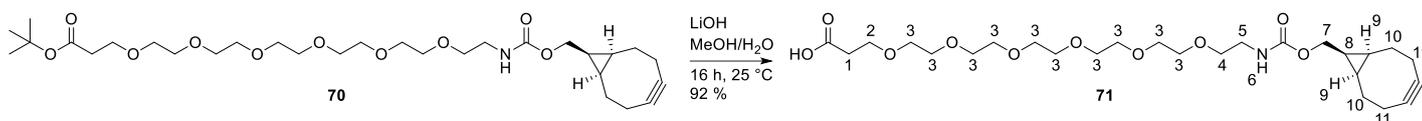
To a solution of (1R,8S,9S)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethyl (4-nitrophenyl) carbonate **67** (1 equiv., 337.4 mg, 1.1 mmol) in DMF (3 mL) was added a solution of *tert*-butyl 1-amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oate **66** (1.1 equiv., 483 mg, 1.18 mmol) and triethylamine (3 equiv., 0.447 mL, 3.21 mmol) in DMF (3 mL). The mixture was stirred 16 h at 25 °C. After concentration under reduced pressure, a solution of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1M, 100 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 x 100 mL). The combined organic layers were washed with brine (100 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography column (eluent: cyclohexane 8:2 EtOAc, then DCM 9:1 MeOH) and afforded **70** with 78% yield (539 mg, 0.92 mmol) as a colorless oil.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 5.24 (s, 1H, H<sub>5</sub>), 4.13 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H<sub>6</sub>), 3.64– 3.51 (m, 24H, H<sub>3</sub>), 3.35 (m, 2H, H<sub>2</sub>), 2.50 – 2.47 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H<sub>4</sub>), 2.28 – 2.21 (m, 6H, H<sub>9</sub> & H<sub>10</sub>), 1.59 – 1.56 (m, 2H, H<sub>9</sub>), 1.43 (s, 9H, H<sub>1</sub>), 1.35 (t, 1H, H<sub>7</sub>), 0.95 – 0.90 (m, 2H, H<sub>8</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 170.9, 98.8, 80.5, 70.6 – 70.1, 66.9, 62.7, 40.8, 36.3, 29.1, 28.1, 21.5, 20.1, 17.8.

**LRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>10</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 608.34, found 608.29.

Synthesis of COOH-PEG<sub>6</sub>-BCN (1-[(bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethoxy)carbonyl]amino] 3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oic acid) **71**



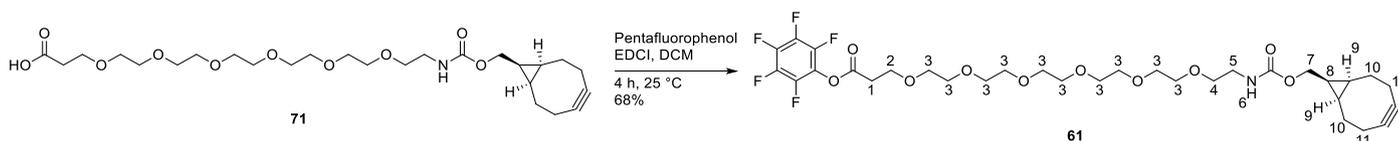
To a solution of *tert*-butyl 1-(bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)-3-oxo-2,7,10,13,16,19,22-heptaoxa-4-azapentacosan-25-oate **70** (1 equiv., 530 mg, 0.905 mmol) in MeOH (5 mL) was added a solution of LiOH (10 equiv., 216.85 mg, 9.05 mmol) in H<sub>2</sub>O (5 mL). The reaction was stirred 16 h at 25 °C. After concentration, a solution of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1M, 50 mL) was added and the mixture was extracted with DCM (4 x 75 mL). The combined organic layers were washed with brine (75 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* and afforded **71** with 92% yield as a yellowish oil (439 mg, 0.83 mmol).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 5.35 (s, 1H, H<sub>6</sub>), 4.14 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H<sub>7</sub>), 3.79 – 3.76 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 3.67 – 3.64 (m, 20H, H<sub>3</sub>), 3.57 – 3.54 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 3.35 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 2.62 – 2.59 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H<sub>5</sub>), 2.29 – 2.19 (m, 6H, H<sub>10</sub> & H<sub>11</sub>), 1.58 (m, 2H, H<sub>10</sub>), 1.37 – 1.33 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 0.96 – 0.91 (m, H<sub>9</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 170.7, 98.9, 80.4, 70.6 – 70.2, 67.0, 62.8, 40.7, 36.4, 29.0, 21.5, 20.1, 17.8.

**LRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>NO<sub>10</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 530.30, found 530.17.

Synthesis of BCN-PEG<sub>6</sub>-PNP (perfluorophenyl 1-((1R,8S,9s)-bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-yl)-3-oxo-2,7,10,13,16,19,22-heptaoxa-4-azapentacosan-25-oate **13**) **61**



To a solution of 1-[(bicyclo[6.1.0]non-4-yn-9-ylmethoxy)carbonyl]amino] 3,6,9,12,15,18-hexaoxahenicosan-21-oic acid (1 equiv., 434 mg, 0.819 mmol) **71** and EDCI (2 equiv., 254.28 mg, 0.290 mL, 1.638 mmol) in dichloromethane (15 mL) was added pentafluorophenol (2 equiv., 301.67 mg, 0.177 mL, 1.638 mmol). The reaction mixture was stirred 16 h at 25 °C. After concentration, the crude was dissolved in EtOAc (75 mL), washed with aqueous solutions of HCl (0.1 M, 75 mL) and saturated NaHCO<sub>3</sub> (2 x 75 mL). The combined organic layers were washed with brine (75 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography column (eluent: EtOAc 7:3 cyclohexane, then 100% EtOAc, then EtOAc 95:5 MeOH) and afforded **61** with 68% yield as a colorless oil (388 mg, 0.558 mmol).

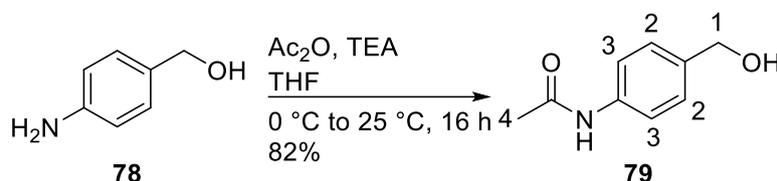
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 5.19 (s, 1H, H<sub>6</sub>), 4.06 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H<sub>7</sub>), 3.82 – 3.80 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 3.59 – 3.56 (m, 20H, H<sub>3</sub>), 3.50 – 3.48 (t, *J* = 5.2 Hz, H<sub>5</sub>), 3.31 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, H<sub>4</sub>), 2.89 – 2.87 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 2.22 – 2.13 (m, 6H, H<sub>10</sub> & H<sub>11</sub>), 1.53 – 1.50 (m, 2H, H<sub>10</sub>), 1.30 – 1.27 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 0.89 – 0.85 (m, 2H, H<sub>9</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 170.7, 98.8, 70.7 – 70.5, 70.3, 70.1, 66.1, 62.7, 53.4, 40.8, 34.4, 29.1, 21.4, 20.1, 17.8.

<sup>19</sup>F NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): -152.54, -157.94, -162.34.

LRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>F<sub>5</sub>NO<sub>10</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 718.26, found 718.21.

#### Synthesis of Ac-N-PAB-OH **79**



To a solution of *p*-aminobenzyl alcohol **78** (1 equiv., 500 mg, 4.06 mmol) in THF (10 mL) at 0 °C were added triethylamine and acetic anhydride. The mixture was allowed to stir 16 h at 25 °C. Reaction media was diluted with water (6 mL) and pH was acidified until pH 1 with a solution of HCl (1 M). Aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 20 mL). Combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography (eluent, EtOAc 8:2 cyclohexane) and afforded **79** with 82% yield (550 mg, 3.33 mmol) as a white solid.

TLC: R<sub>f</sub> (100% EtOAc) = 0.32.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 7.54 – 7.49 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 7.32 – 7.27 (m, 2H, H<sub>2</sub>), 4.55 (s, 2H, H<sub>1</sub>), 2.11 (s, 3H, H<sub>4</sub>).

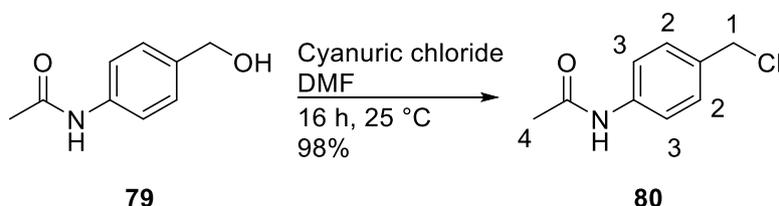
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 171.6, 139.0, 138.5, 128.6, 121.1, 64.9, 23.8.

ν<sub>max</sub> (thin film) /cm<sup>-1</sup>: 3416 (m), 3243 (w), 3185 (w), 3124 (w), 3073 (w), 2923 (w), 2882 (w), 1667 (s), 1606 (s), 1548 (s), 1515 (s), 1462 (w), 1408 (m), 1370 (m), 1321 (s), 1272 (m), 1211 (m), 1211 (m), 1179 (w), 1112 (w), 1034 (w), 1024 (w), 1000 (s), 969 (m), 949 (m), 937 (m), 859 (m), 826 (s), 796 (m), 724 (w), 648 (m), 630 (w), 601 (w), 555 (s), 501 (s), 437 (m), 410 (m).

LRMS (ESI<sup>+</sup>) calcd for C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 166.09, found 165.91.

Melting point: 127.35 °C.

#### Synthesis of Ac-N-PAB-Cl **80**



NAc-PAB-OH **79** (1.8 equiv., 30 mg, 0.182 mmol) was dissolved in DMF (300 μL). A solution of cyanuric chloride (1 equiv., 18.65 mg, 0.101 mmol) in DMF (200 μL) was added dropwise and the mixture was allowed to stir 16 h 25 °C. Solvent was removed under reduced pressure. The crude product was

purified by chromatography (eluent, 100% EtOAc) and afforded **80** with 98% yield (33 mg, 0.180 mmol) as a white solid.

**TLC:** Rf (100% EtOAc) = 0.40.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 7.50 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H3), 7.33 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H2), 4.56 (s, 2H, H1), 2.18 (s, 3H, H4).

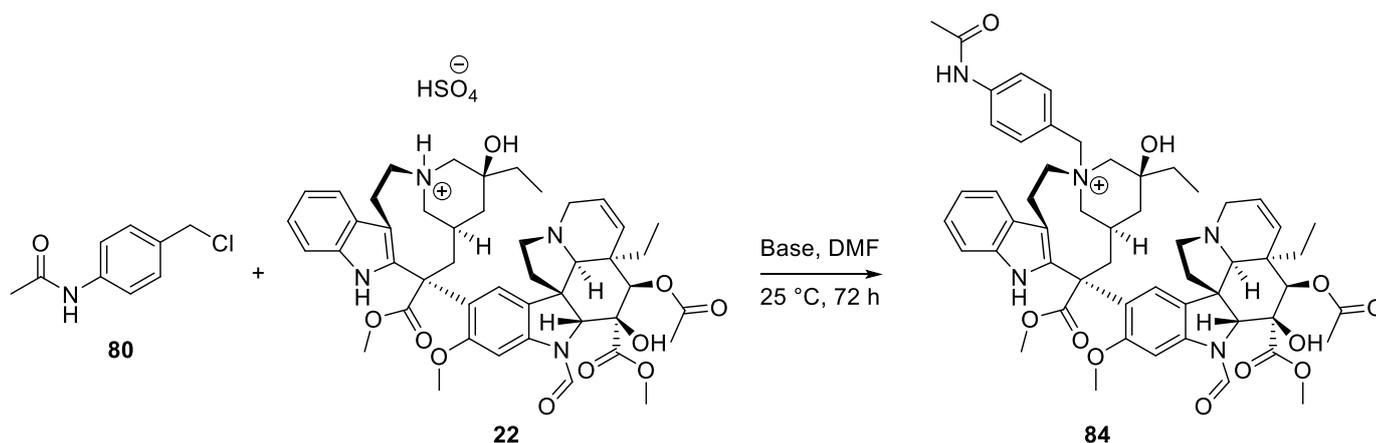
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 168.47, 138.13, 133.45, 129.54, 120.07, 46.07, 24.78.

**ν<sub>max</sub> (thin film) /cm<sup>-1</sup>:** 3253 (m), 3194 (m), 3128 (m), 3077 (m), 2819 (w), 1779 (w), 1698 (m), 1683 (m), 1666 (s), 1603 (s), 1539 (s), 1512 (s), 1455 (m), 1409 (s), 1367 (s), 1321 (s), 1270 (m), 1257 (s), 1212 (w), 1175 (w), 1109 (w), 1036 (w), 1012 (w), 971 (w), 962 (w), 853 (w), 839 (m), 760 (m), 733 (s), 657 (s), 645 (s), 626 (m), 603 (m), 551 (m), 530 (s), 502 (m), 448 (w).

**LRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NOCl<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 184.05, found 183.91.

**Melting point:** 169.6 °C.

Synthesis of Ac-*N*-PAB-Vincristine **84** with KOH or K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>



To a solution of vincristine **22** (1 equiv., 0.5 mg, 0.00054 mmol) in DMF (1.5 μL) was added a solution of base (KOH or K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (1.1 equiv., 0.033 mg or 0.082 mg, 0.00059 mmol) in DMF (3 μL) and the mixture was allowed to stir 10 min at 25 °C. A solution of Ac-*N*-PAB-Cl **80** (1.1 equiv., 0.11 mg, 0.00059 mmol) in DMF (4.6 μL) was added and the mixture was allowed to stir 72 h at 25 °C. The reaction was followed by HPLC and LC-MS and has showed a conversion of 95% (with KOH) and 99% (with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Figure 99).

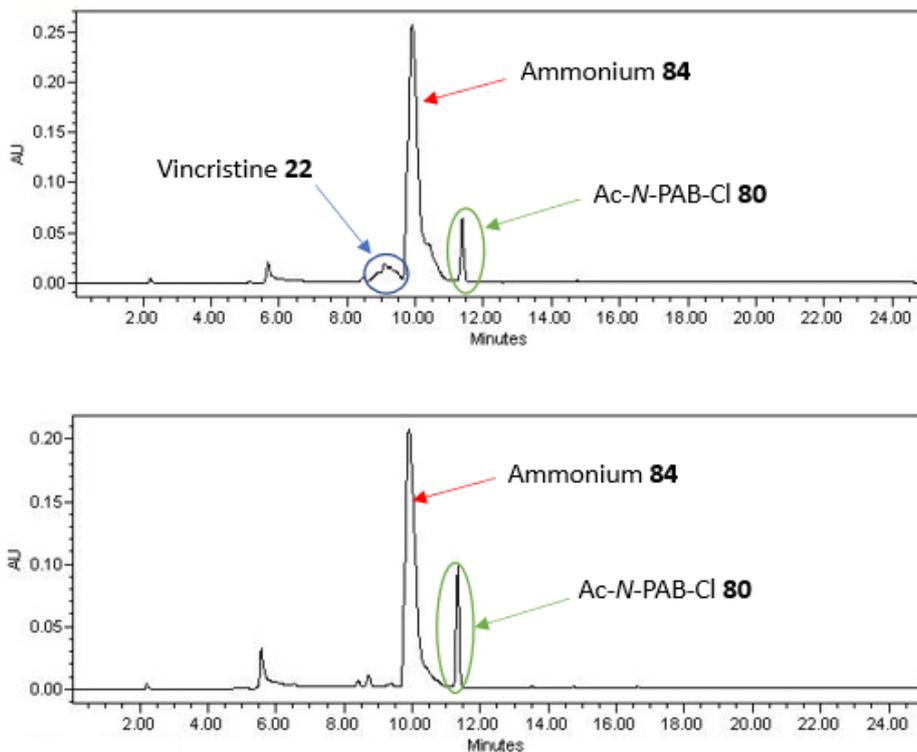
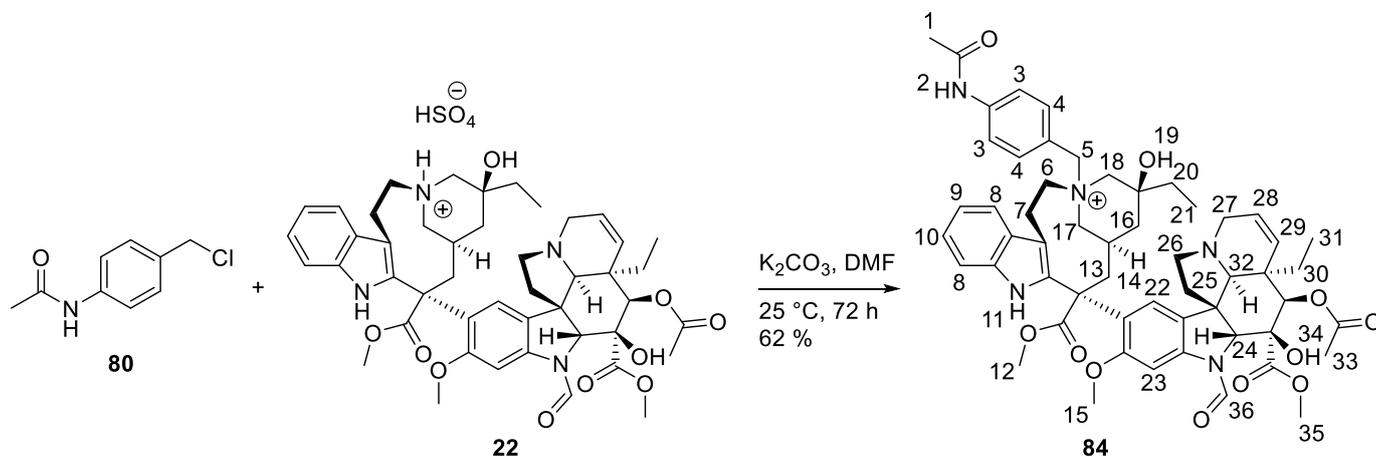


Figure 99: conversion after 72 h with KOH and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

#### Synthesis of Ac-N-PAB-vincristine **84**



A solution of vincristine **22** (1 equiv., 10 mg, 0.011 mmol) in DMF (60  $\mu$ L) was added to an Eppendorf containing K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.1 equiv., 1.7 mg, 0.012 mmol) and the mixture was allowed to stir 10 min at 25 °C. A solution of Ac-N-PAB-Cl **80** (1.1 equiv., 2.2 mg, 0.012 mmol) in DMF (30  $\mu$ L) was added and the mixture was allowed to stir 72 h at 25 °C. Crude product was purified by RP-HPLC (eluent: 5 to 95% ACN in 25 min), lyophilised and afforded **84** with 62% (6.5 mg, 0.0067 mmol) as a white/yellow solid.

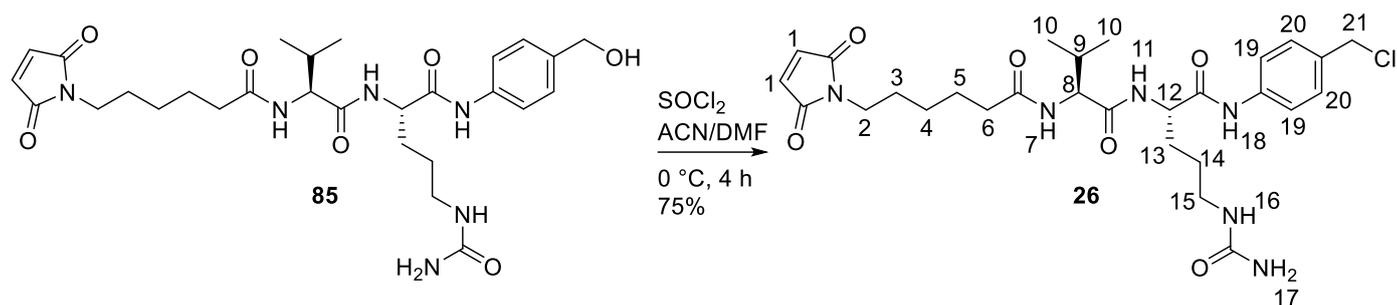
TLC: R<sub>f</sub> (DCM 9:1 MeOH) = 0.15

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm): 10.22 (s, 1H, H11), 9.08 (s, 1H, H36), 8.44 – 8.17 (m, 1H, H34), 7.95 (s, 1H, H2), 7.75 – 7.67 (m, 3H, H8 & H23), 7.51 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H3), 7.47 – 7.40 (m, 2H, H4), 7.12 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H10), 7.05 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H9), 7.01 (m, 1H, H22), 5.87 (dd, *J* = 10.9, 5.1 Hz, 1H,

H28), 5.52 (d,  $J = 10.9$  Hz, 1H, H29), 5.16 (s, 1H, H19), 5.01 (m, 2H, H13), 4.75 – 4.63 (m, 2H, H6), 4.58 (s, 1H, H24), 4.39 (d,  $J = 12.8$  Hz, 2H, H5), 4.19 – 4.10 (m, 2H, H18), 4.05 (s, 2H, H17), 3.87 (s, 3H, H15), 3.73 (d,  $J = 14.9$  Hz, 2H, H7), 3.66 (s, 3H, H12), 3.53 (s, 3H, H35), 3.28 (m, 2H, H26), 3.06 (s, 1H, H32), 3.00 – 2.91 (m, 2H, H27), 2.31 – 2.23 (m, 2H, H16), 2.07 (s, 3H, H1), 1.99 (s, 3H, H33), 1.51 (m, 2H, H25), 1.43 (q,  $J = 6.9, 5.9$  Hz, 2H, H30), 1.37 (m, 2H, H20), 1.16 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H, H14), 0.80 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H, H21), 0.60 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H31).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>55</sub>H<sub>66</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub><sup>+</sup> [M]<sup>+</sup> 972.4753, found 972.4731.

#### Synthesis of MC-ValCit-PAB-Cl **26**



MC-ValCit-PAB-OH **85** (1 equiv., 30 mg, 0.052 mmol) was dissolved in a mix of ACN (400  $\mu$ L) and DMF (400  $\mu$ L) and was stirred at 0 °C. Thionyl chloride (2 equiv., 12.4 mg, 7.5  $\mu$ L, 0.104 mmol) was added at 0 °C and the mixture was allowed to stir 2 h at 0 °C. 2 others equivalents of SOCl<sub>2</sub> were added at 0 °C and the mixture was allowed to stir 2 h at 0 °C. Solvents were removed under reduced pressure. Crude product was purified by chromatography (eluent: DCM 9:1 MeOH) and afforded **26** with 75% yield (23 mg, 0.039 mmol) as an off-white solid.

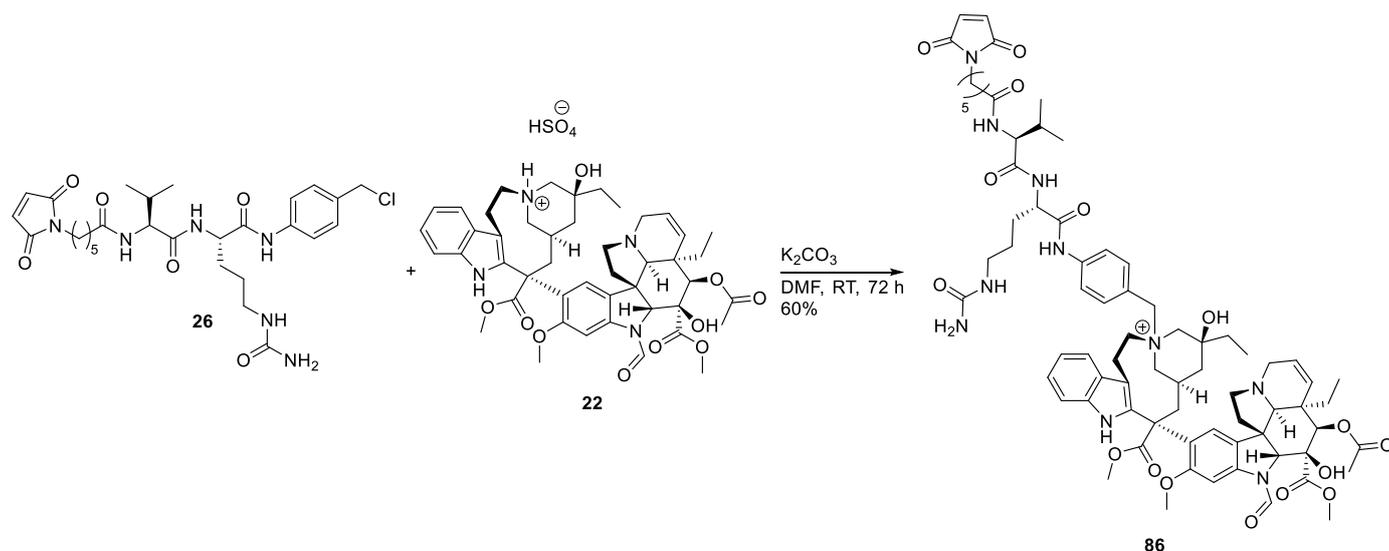
**TLC:** R<sub>f</sub> (DMC 9:1 MeOH) = 0.46.

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm):** 10.04 (s, 1H, H18), 8.09 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, H11), 7.80 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H7), 7.60 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H19), 7.36 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H20), 7.00 (s, 2H, H1), 5.98 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H, H16), 5.41 (s, 2H, H17), 4.71 (s, 2H, H21), 4.40 – 4.35 (m, 1H, H12), 4.19 (dd,  $J = 8.7, 6.8$  Hz, 1H, H8), 3.36 (m, 2H, H6), 3.01 (dt,  $J = 13.0, 6.4$  Hz, 1H, H15), 2.94 (dq,  $J = 13.0, 6.4$  Hz, 1H, H15), 2.21 – 2.08 (m, 2H, H2), 1.96 (dq,  $J = 13.3, 6.8$  Hz, 1H, H9), 1.73 – 1.66 (m, 1H, H13), 1.59 (m, 1H, H13), 1.51 – 1.45 (m, 4H, H3 & H5), 1.44 – 1.41 (m, 1H, H14), 1.35 (dq,  $J = 9.9, 6.4$  Hz, 1H, H14), 1.19 (m, 2H, H4), 0.83 (dd,  $J = 13.3, 6.8$  Hz, 6H, H10).

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm):** 172.3, 171.3, 171.1, 170.7, 158.9, 138.9, 134.4, 132.3, 129.5, 119.1, 57.6, 53.1, 46.2, 38.6, 37.0, 34.9, 30.4, 29.2, 27.8, 26.8, 25.8, 24.9, 19.2, 18.2.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>Cl<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 591.2692, found 591.2697.

### Synthesis of MC-ValCit-PAB-Vincristine **86**

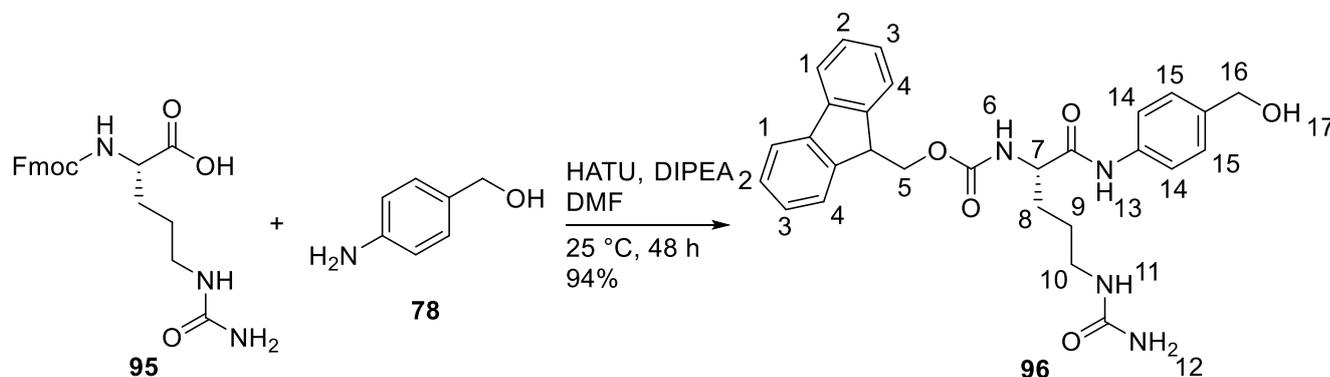


Vincristine **22** (1 equiv., 25 mg, 0.027 mmol), MC-ValCit-PAB-Cl **26** (1.1 equiv., 17.8 mg, 0.030 mmol) and  $K_2CO_3$  (1.1 equiv., 4.1 mg, 0.030 mmol) were dissolved in DMF (1 mL) and the mixture was allowed to stir 72 h at 25 °C. Solvent was removed under reduced pressure. Crude product was purified by chromatography (DCM 9/1 MeOH) and afforded **86** with 60% yield (22 mg, 0.016 mmol) as a white solid.

**TLC:** Rf (DMC 9:1 MeOH) = 0.1.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for  $C_{74}H_{96}N_{10}O_{16}^{2+}$  [(M+H)/2]<sup>+</sup> 690.3497, found 690.3501.

### Synthesis of Fmoc-Cit-PAB-OH **96**



Fmoc-Cit-OH **95** (1 equiv., 500 mg, 1.26 mmol) and PAB-OH **78** (3 equiv., 465 mg, 3.78 mmol) were dissolved in DMF (10 mL, 0.1 M). DIPEA (1 equiv., 162.9 mg, 220  $\mu$ L, 1.26 mmol) was added and the solution was stirred 15 min at 25 °C in the dark. HATU (1.1 equiv., 527 mg, 1.39 mmol) was added and the solution was allowed to stir 48 h at 25 °C in the dark. The solution was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography (eluent: DCM 95:5 MeOH, then DCM 9/1 MeOH) and afforded **96** with 94% yield (594 mg, 1.18 mmol) as a white/yellow solid.

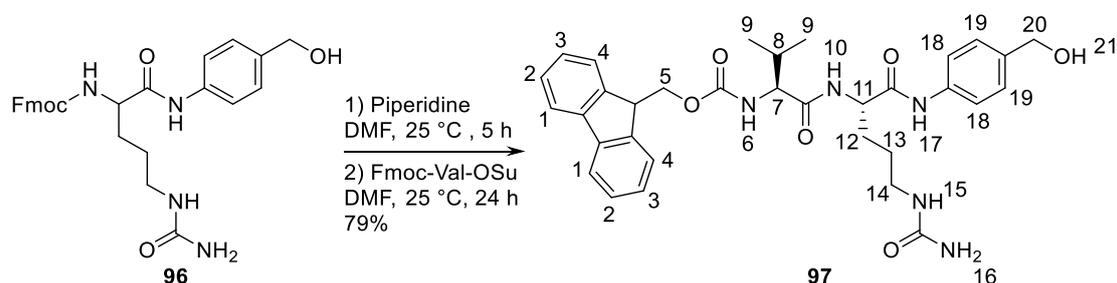
**TLC:** Rf (DMC 9:1 MeOH) = 0.35.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):** 10.00 (s, 1H, H13), 7.90 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H1), 7.76 (dd, *J* = 7.5, 4.4 Hz, 2H, H4), 7.68 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 7.57 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H14), 7.42 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H2), 7.34 (td, *J* = 7.5, 4.1 Hz, 2H, H3), 7.25 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H15), 6.01 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, H11), 5.44 (s, 2H, H12), 5.11 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H17), 4.44 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, H16), 4.31 – 4.14 (m, 4H, H7 + H5), 3.10 – 3.01 (m, 1H, H10), 2.97 (dt, *J* = 13.2, 7.2 Hz, 1H, H10), 1.74 – 1.56 (m, 2H, H8), 1.54 – 1.34 (m, 2H, H9).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):** 170.9, 158.9, 156.1, 143.9, 143.8, 140.7, 139.4, 137.6, 137.4, 128.9, 127.6, 127.3, 127.1, 126.9, 125.3, 121.4, 120.1, 120.0, 118.9, 109.7, 65.7, 62.6, 54.9, 46.7, 29.3, 26.9.

**LRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup> 525.21, found 525.04.

### Synthesis of Fmoc-ValCit-PAB-OH 97



Fmoc-Cit-PAB-OH **96** (1 equiv., 946 mg, 1.88 mmol) was dissolved in DMF (12 mL, 0.2 M) and piperidine (5 equiv., 802 mg, 930 μL, 9.42 mmol) was added. The solution was allowed to stir 5 h at 25 °C. Solvent was removed under reduced pressure. The mixture was diluted with DMF (10 mL) to co-evaporate piperidine traces twice. Crude product was diluted with DMF (25 mL) and Fmoc-Val-Osu (1.2 equiv., 986.6 mg, 2.26 mmol) was added and the solution was allowed to stir 24 h at 25 °C. The solution was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography (eluent: DCM 95:5 MeOH then DCM 9:1 MeOH) and afforded **97** with 79% yield (895 mg, 1.49 mmol) as a pale yellow solid.

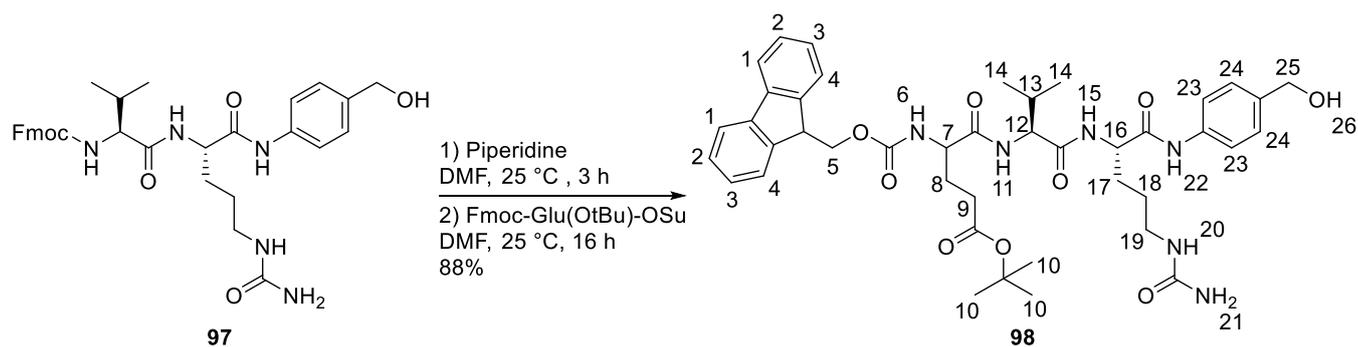
**TLC:** R<sub>f</sub> (DCM 9:1 MeOH) = 0.25.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ):** 9.98 (s, 1H, H17), 8.11 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H10), 7.90 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H1), 7.75 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H, H4), 7.55 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H18), 7.48 – 7.39 (m, 3H, H2 & H6), 7.33 (td, *J* = 7.4, 1.2 Hz, 2H, H3), 7.24 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H19), 5.98 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H15), 5.41 (s, 2H, H16), 5.10 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H21), 4.44 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, H20), 4.33 – 4.26 (m, 1H, H11), 4.25 (m, 2H, H5), 3.94 (dd, *J* = 9.0, 7.0 Hz, 1H, H7), 3.07 – 2.99 (m, 1H, H14), 2.98 – 2.92 (m, 1H, H14), 2.05 – 1.95 (m, 1H, H8), 1.74 – 1.65 (dt, *J* = 12.6, 8.0 Hz, 1H), 1.64 – 1.55 (m, 1H, H12), 1.51 – 1.41 (m, 1H, H13), 1.41 – 1.34 (m, 1H, H13), 0.88 (m, 6H, H9).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ):** δ 171.2, 170.3, 158.8, 156.1, 143.9, 143.7, 140.7, 137.5, 137.4, 127.3, 127.0, 126.9, 125.3, 120.0, 118.8, 65.7, 62.6, 60.1, 53.0, 46.7, 30.4, 29.5, 26.8, 19.2, 18.2.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 602,2973, found 602,2985.

## Synthesis of Fmoc-Glu(OtBu)ValCit-PAB-OH **98**



Fmoc-ValCit-PAB-OH **97** (1 equiv., 336 mg, 0.558 mmol) was dissolved in DMF (7 mL, 0.2 M) and piperidine (5 equiv., 237.7 mg, 275.8  $\mu$ L, 2.792 mmol) was added. The solution was allowed to stir 3 h at 25 °C. Solvent was removed under reduced pressure. The mixture was diluted with DMF (10 mL) to co-evaporate piperidine traces. Crude product was diluted with DMF (5 mL) and Fmoc-Glu(OtBu)-Osu (1.5 equiv., 437.4 mg, 0.837 mmol) was added and the solution was allowed to stir 16 h at 25 °C. The solution was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography (eluent: DCM 95:5 MeOH then DCM 9:1 MeOH) and afforded **98** with 88% yield (385.5 mg, 0.490 mmol) as a pale yellow solid.

**TLC:** R<sub>f</sub> (DCM 9:1 MeOH) = 0.32

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  9.94 (s, 1H, H22), 8.17 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H6), 7.92 – 7.86 (m, 2H, H1), 7.72 (m, 3H, H4 + H15), 7.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H11), 7.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H23), 7.41 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 2H, H2), 7.32 (td, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 2H, H3), 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H24), 5.97 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, H20), 5.42 (s, 2H, H21), 5.09 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H26), 4.42 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, H25), 4.38 (m, 1H, H7), 4.27 (m, 1H, H16), 4.22 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H5), 4.12 – 4.04 (m, 1H, H12), 3.03 (dt, *J* = 13.4, 6.6 Hz, 1H, H19), 2.92 (dt, *J* = 13.4, 6.6 Hz, 1H, H19), 2.26 – 2.19 (m, 2H, H9), 1.98 (m, 1H, H13), 1.93 – 1.83 (m, 1H, H8), 1.77 – 1.64 (m, 2H, H17), 1.62 – 1.53 (m, 1H, H8), 1.51 – 1.40 (m, 1H, H18), 1.39 (s, 9H, H10), 1.22 (m, 1H, H18), 0.87 – 0.80 (m, 6H, H14).

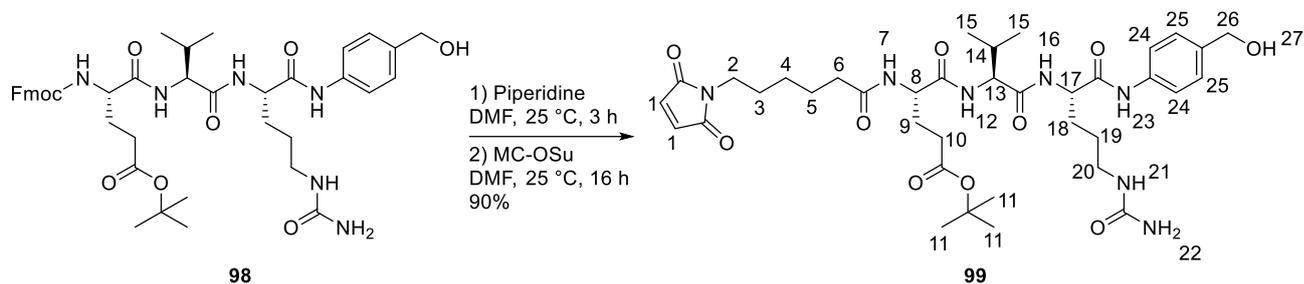
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm):**  $\delta$  172.7, 171.7, 170.3, 158.9, 143.7, 142.6, 140.7, 139.4, 137.5, 137.4, 128.9, 127.6, 127.3, 127.0, 126.9, 125.3, 121.3, 120.1, 120.0, 118.8, 109.7, 79.6, 65.6, 62.6, 53.9, 53.1, 46.7, 27.7, 25.2, 19.2, 17.9.

**$\nu_{\text{max}}$  (thin film) /cm<sup>-1</sup>:** 3271 (m), 2929 (w), 2871 (w), 1704 (m), 1693 (m), 1660 (m), 1650 (m), 1633 (s), 1563 (m), 1537 (s), 1531 (s), 1469 (w), 1446 (m), 1414 (w), 1392 (w), 1366 (w), 1336 (w), 1253 (m), 1224 (m), 1149 (s), 1084 (w), 1041 (m), 815 (w), 756 (w), 736 (s), 656 (m), 620 (w), 551 (w), 497 (w), 425 (w).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>42</sub>H<sub>55</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 787.4031, found 787.4032.

**Melting point:** 193.1 °C.

## Synthesis of MC-Glu(OtBu)ValCit-PAB-OH **99**



Fmoc-Glu(OtBu)ValCit-PAB-OH **98** (1 equiv., 200 mg, 0.254 mmol) was dissolved in DMF (4 mL, 0.2 M) and piperidine (5 equiv., 108.3 mg, 125.6  $\mu$ L, 1.271 mmol) was added. The solution was allowed to stir 3 h at 25 °C. Solvent was removed under reduced pressure. The mixture was diluted with DMF (10 mL) to co-evaporate piperidine traces. Crude product was diluted with DMF (7 mL) and MC-Osu (1.2 equiv., 94 mg, 0.305 mmol) was added and the solution was allowed to stir 16 h at 25 °C. The solution was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography (eluent: DCM 95:5 MeOH then DCM 9:1 MeOH) and afforded **99** with 90% yield (178 mg, 0.229 mmol) as a pale yellow solid.

**TLC:** Rf (DCM 9:1 MeOH) = 0.20.

**$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm):** 9.92 (s, 1H, H23), 8.11 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, H7), 8.00 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H, H16), 7.67 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, H12), 7.54 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, H24), 7.22 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, H25), 6.99 (s, 2H, H1), 5.99 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 1H, H21), 5.41 (s, 2H, H22), 5.11 – 5.05 (m, 1H, H27), 4.42 (s, 2H, H26), 4.39 (m, 1H, H8), 4.30 (td,  $J$  = 8.2, 5.7 Hz, 1H, H17), 4.19 (dd,  $J$  = 8.6, 6.4 Hz, 1H, H13), 3.36 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H, H2), 3.03 (dt,  $J$  = 13.0, 6.2 Hz, 1H, H20), 2.94 (dq,  $J$  = 13.0, 6.2 Hz, 1H, H20), 2.21 (m, 2H, H10), 2.14 – 2.05 (m, 2H, H6), 2.02 – 1.95 (m, 1H, H14), 1.90 – 1.83 (m, 1H, H19), 1.75 – 1.65 (m, 2H, H18), 1.59 (m, 1H, H19), 1.52 – 1.44 (m, 4H, H3 & H5), 1.45 – 1.40 (m, 1H, H9), 1.38 (s, 9H, H11), 1.27 – 1.21 (m, 1H, H9), 1.22 – 1.16 (m, 2H, H4), 0.83 (dd,  $J$  = 17.4, 6.7 Hz, 6H, H15).

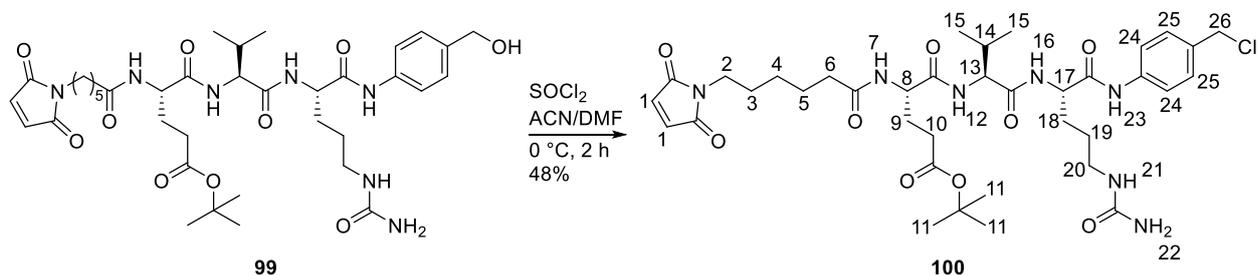
**$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm):** 172.8, 172.3, 171.7, 171.2, 171.0, 170.8, 170.3, 158.9, 137.5, 137.4, 134.4, 126.9, 118.8, 79.6, 62.6, 59.7, 57.3, 53.1, 51.7, 36.9, 34.9, 31.4, 30.6, 29.3, 27.7, 27.1, 26.7, 25.7, 25.2, 24.8, 19.1, 17.9.

**$\nu_{\text{max}}$  (thin film) / $\text{cm}^{-1}$ :** 3291 (m), 2929 (m), 2858 (m), 1698 (s), 1639 (s), 1537 (s), 1514 (s), 1443 (m), 1409 (m), 1391 (w), 1366 (m), 1306 (w), 1213 (s), 1150 (m), 1076 (w), 1044 (w), 998 (w), 825 (w), 715 (w), 695 (w), 654 (m), 565 (w).

**HRMS (ESI $^+$ )** calcd for  $\text{C}_{37}\text{H}_{56}\text{N}_7\text{O}_{10}^+$  [M+H] $^+$  758.4089, found 758.4087.

**Melting point:** 172.5 °C.

### Synthesis of MC-Glu(OtBu)ValCit-PAB-Cl **100**



MC-Glu(OtBu)ValCit-PAB-OH **99** (1 equiv., 40 mg, 0.053 mmol) was dissolved in a mix of DMF (0.5 mL) and CAN (5 mL) and the solution was stirred at  $0^\circ\text{C}$ . Thionyl chloride (7 equiv., 26.8  $\mu\text{L}$ , 0.369 mmol) was added dropwise at  $0^\circ\text{C}$  and the mixture was allowed to stir at  $0^\circ\text{C}$  for 1 h. Thionyl chloride (5 equiv., 19.2  $\mu\text{L}$ , 0.265 mmol) was added dropwise at  $0^\circ\text{C}$  and the mixture was allowed to stir at  $0^\circ\text{C}$  for 1 h. The solution was concentrated under reduced pressure. Crude product was purified by chromatography (DCM 9:1 MeOH) and afforded **100** with 48% yield (19.5 mg, 0.025 mmol) as a white solid.

**TLC:** Rf (DCM 95:5 MeOH) = 0.29.

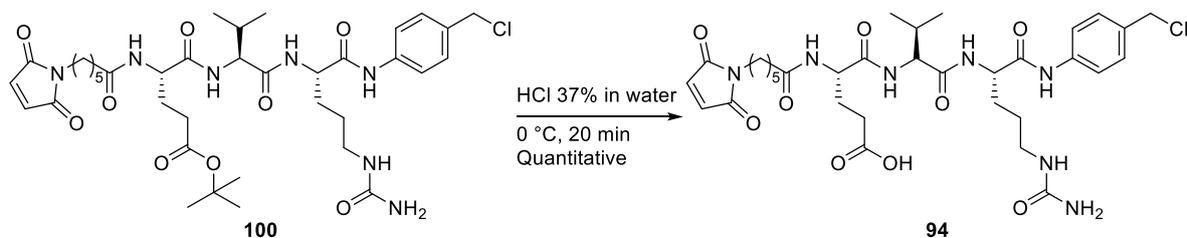
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm):** 10.07 (s, 1H, H23), 8.16 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H7), 8.01 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H16), 7.67 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H12), 7.60 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H24), 7.36 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H25), 6.99 (s, 2H, H1), 5.97 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H, H21), 5.42 (s, 2H, H22), 4.71 (s, 2H, H26), 4.43 – 4.35 (m, 1H, H8), 4.33 – 4.24 (m, 1H, H17), 4.21 – 4.17 (m, 1H, H13), 3.40 – 3.34 (m, 2H, H2), 3.08 – 3.00 (m, 1H, H20), 2.98 – 2.87 (m, 1H, H20), 2.20 (m, 2H, H10), 2.14 – 2.07 (m, 2H, H6), 2.00 – 1.96 (m, 1H, H14), 1.89 – 1.81 (m, 1H, H19), 1.75 – 1.63 (m, 2H, H18), 1.61 – 1.54 (m, 1H, H19), 1.52 – 1.43 (m, 4H, H3 & H5), 1.38 (s, 9H, H11), 1.20 – 1.14 (m, 2H, H9), 0.83 (dd,  $J = 14.4, 6.7$  Hz, 6H, H15).

**$\nu_{\text{max}}$  (thin film) / $\text{cm}^{-1}$ :** 3270 (br), 2960 (w), 2927 (w), 2873 (w), 2357 (w), 2339 (w), 1703 (s), 1650 (m), 1627 (s), 1606 (m), 1531 (s), 1514 (s), 1442 (m), 1410 (m), 1393 (m), 1366 (m), 1328 (w), 1309 (w), 1248 (w), 1150 (m), 826 (w), 770 (w), 732 (w), 710 (w), 695 (m), 668 (m), 536 (w), 434 (w).

**HRMS (ESI $^+$ )** calcd for  $\text{C}_{37}\text{H}_{55}\text{N}_7\text{O}_9\text{Cl}^+$  [M+H] $^+$  776.3744, found 776.3740.

**Melting point:** 139.2  $^\circ\text{C}$ .

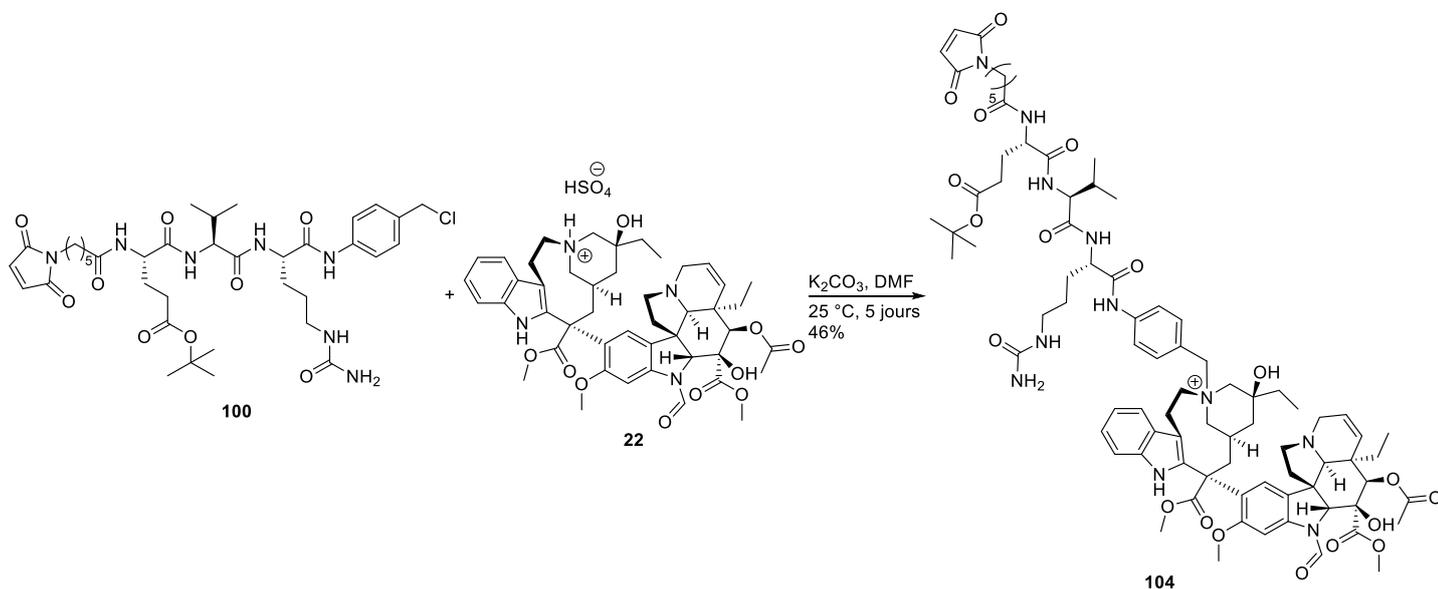
### Synthesis of MC-Glu(OH)ValCit-PAB-Cl **94**



MC-Glu(OtBu)ValCit-PAB-Cl **100** (1 equiv., 12.6 mg, 0.0162 mmol) was dissolved with HCl (650  $\mu\text{L}$ , 37% in water) at  $0^\circ\text{C}$  and the solution was stirred at  $0^\circ\text{C}$  for 20 min. The solution was concentrated under

reduced pressure and afforded the pure product **94** with quantitative yield (11.4 mg, 0.0158 mmol) as a white solid and was used like this without further purifications.

#### Synthesis of MC-Glu(OtBu)ValCit-PAB-Vincristine **104**

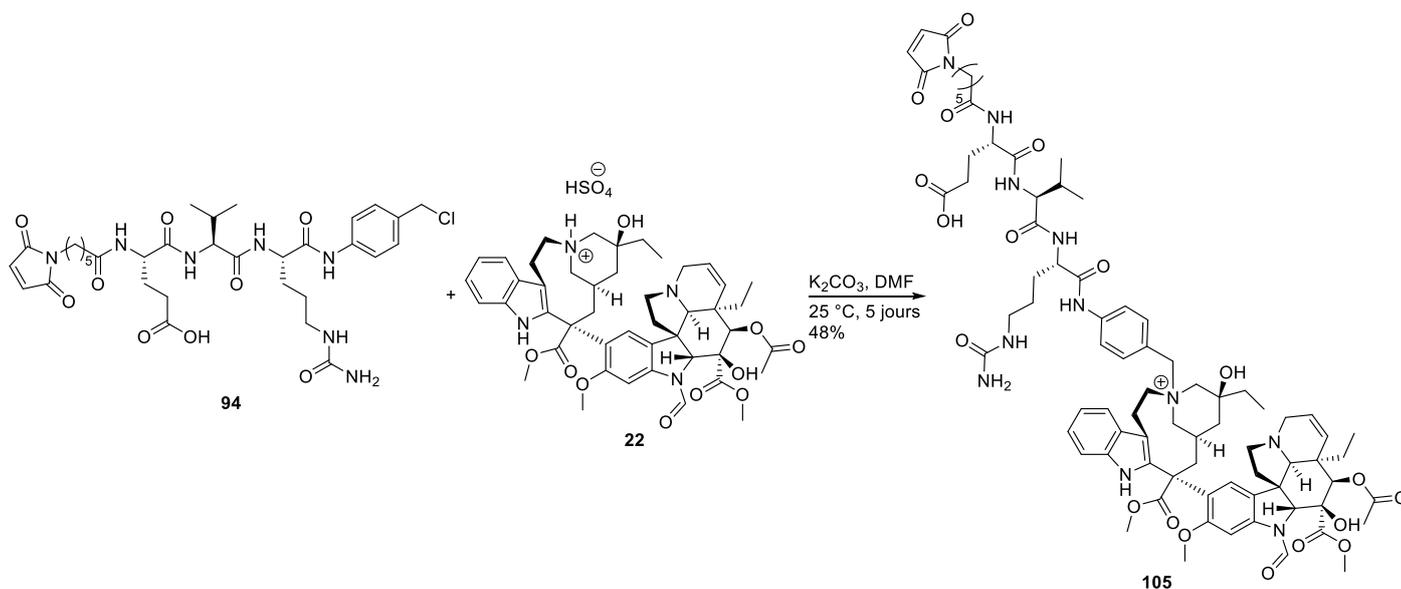


Vincristine **22** (1 equiv., 5.4 mg, 0.0060 mmol), MC-Glu(OtBu)ValCit-PAB-Cl **100** (1.1 equiv., 5 mg, 0.0064 mmol) and  $K_2CO_3$  (1.1 equiv., 0.9 mg, 0.0064 mmol) were dissolved in DMF (300  $\mu$ L) and the mixture was allowed to stir 5 days at 25 °C. Solvent was removed under reduced pressure. Crude product was purified by chromatography (DCM 9/1 MeOH) and afforded **104** with 46% yield (4.2 mg, 0.0027 mmol) as a white solid.

**TLC:** R<sub>f</sub> (DCM 9:1 MeOH) = 0.1.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for  $C_{83}H_{111}N_{11}O_{19}^{2+}$  [(M+H)/2]<sup>2+</sup> 783.4290, found 782.9027.

#### Synthesis of MC-Glu(OH)ValCit-PAB-Vincristine **105**

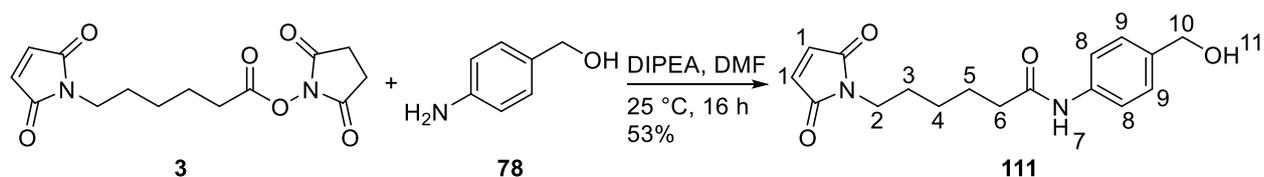


Vincristine **22** (1.1 equiv., 9.3 mg, 0.010 mmol), MC-Glu(OH)ValCit-PAB-Cl **94** (1 equiv., 6.6 mg, 0.009 mmol) and  $K_2CO_3$  (1.1 equiv., 1.4 mg, 0.010 mmol) were dissolved in DMF (350  $\mu$ L) and the mixture was allowed to stir 5 days at 25 °C. Solvent was removed under reduced pressure. Crude product was purified by chromatography (DCM 9/1 MeOH) and afforded **105** with 48% yield (6.7 mg, 0.0044 mmol) as a white solid.

**TLC:** Rf (DMC 9:1 MeOH) = 0.07.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for  $C_{79}H_{103}N_{11}O_{19}^{2+}$  [(M+H)/2]<sup>2+</sup> 754.8711, found 754.8709.

#### Synthesis of MC-PAB-OH **111**



PAB-OH **78** (1.2 equiv., 48 mg, 0.39 mmol) was dissolved in DMF (2 mL) then DIPEA (1.2 equiv., 68  $\mu$ L, 0.39 mmol) was added and the mixture was allowed to stir at 25 °C for 10 min in the dark. Linker MC **3** (1 equiv., 100 mg, 0.32 mmol) was added to the reaction media and the mixture was allowed to stir for 16 h at 25 °C in the dark. Solvent was removed under reduced pressure. Crude product was purified by chromatography (100% EtOAc) and afforded **111** with 53% yield (54 mg, 0.17 mmol) as a yellow solid.

**TLC:** Rf (EtOAc 8:2 cyclohexane) = 0.33

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm):** 9.78 (s, 1H, H), 7.51 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, H8), 7.21 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H, H9), 6.99 (s, 2H, H1), 5.06 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H, H11), 4.42 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 2H, H10), 3.39 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H, H2), 2.26 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, H6), 1.58 (p,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, H5), 1.51 (p,  $J$  = 7.1 Hz, 2H, H3), 1.29 – 1.20 (m, 2H, H4).

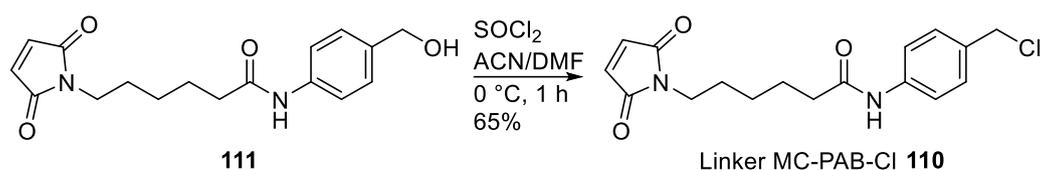
**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm):** 171.0, 170.9, 137.9, 137.0, 134.4, 126.8, 118.8, 62.6, 36.9, 36.1, 27.8, 25.8, 24.6.

**$\nu_{max}$  (thin film) / $cm^{-1}$ :** 3306 (br), 2934 (w), 2358 (w), 2340 (w), 1669 (s), 1661 (m), 1597 (m), 1524 (m), 1464 (w), 1448 (w), 1411 (m), 1371 (m), 1338 (w), 1313 (m), 1251 (w), 1207 (w), 1180 (w), 1128 (w), 1102 (w), 1085 (w), 1008 (m), 959 (w), 929 (w), 837 (m), 777 (w), 729 (w), 698 (s), 626 (m), 578 (m), 508 (m), 440 (w).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for  $C_{17}H_{21}N_2O_4^+$  [M+H]<sup>+</sup> 317.1496, found 317.1501.

**Melting point:** 123.4 °C.

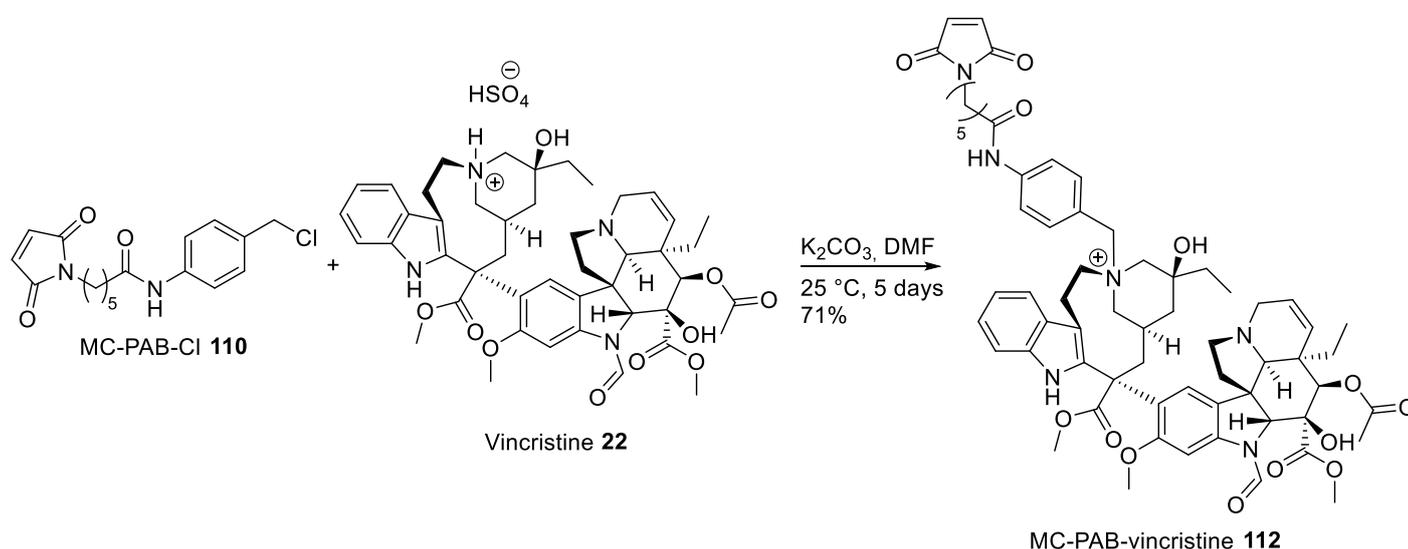
### Synthesis of MC-PAB-Cl **110**



Linker **111** (1 equiv., 10 mg, 0.032 mmol) was dissolved in a mix of DMF (0.15 mL) and ACN (1.5 mL) then thionyl chloride (30 equiv., 67.8  $\mu$ L, 0.948 mmol) was added dropwise at 0 °C. The mixture was allowed to stir for 1 h at 0 °C. Solvents and excess reagent were evaporated under reduced pressure and the product was afforded **110** with 65% yield (6.9 mg, 0.021 mmol) as a yellow solid and was used like this without further purifications.

**TLC:** Rf (EtOAc 1:1 cyclohexane) = 0.41.

### Synthesis of MC-PAB-vincristine **112**



Vincristine **22** (1 equiv., 11 mg, 0.012 mmol), MC-PAB-Cl **110** (1.1 equiv., 4.4 mg, 0.013 mmol) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.1 equiv., 1.8 mg, 0.013 mmol) were dissolved in DMF (500  $\mu$ L) and the mixture was allowed to stir 5 days at 25 °C. Solvent was removed under reduced pressure. Crude product was purified by chromatography (DCM 9/1 MeOH) and afforded **112** with 71% yield (6.7 mg, 0.0044 mmol) as a yellow solid.

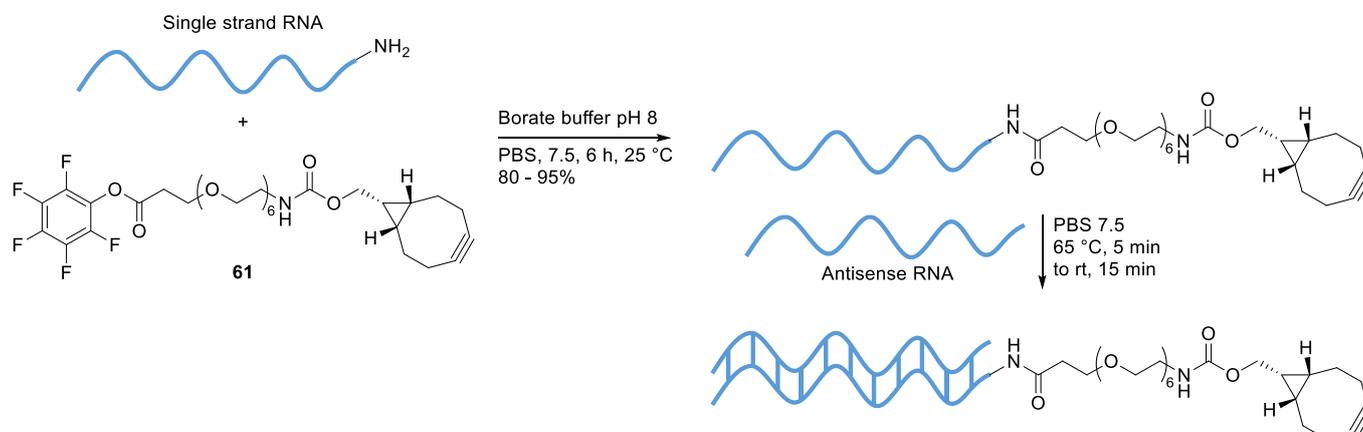
**TLC:** Rf (DMC 9:1 MeOH) = 0.2.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for  $\text{C}_{63}\text{H}_{75}\text{N}_6\text{O}_{13}^+$  [M]<sup>+</sup> 1123.5387, found 1123.5353.

## Bioconjugation

### General procedure for the synthesis of trastuzumab-siRNA

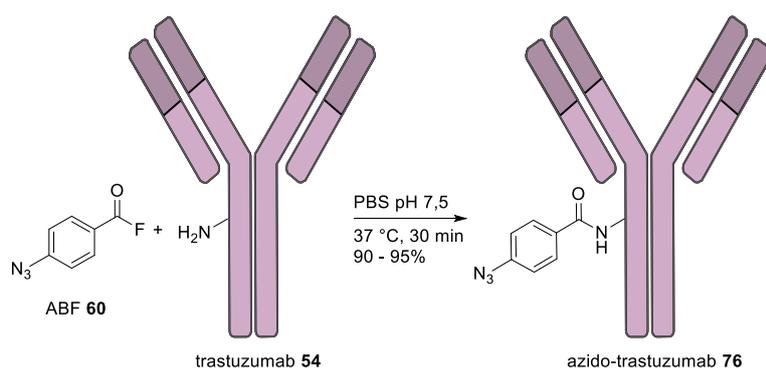
This procedure was used for the conjugation of siPARP3 **53** and siSCR.



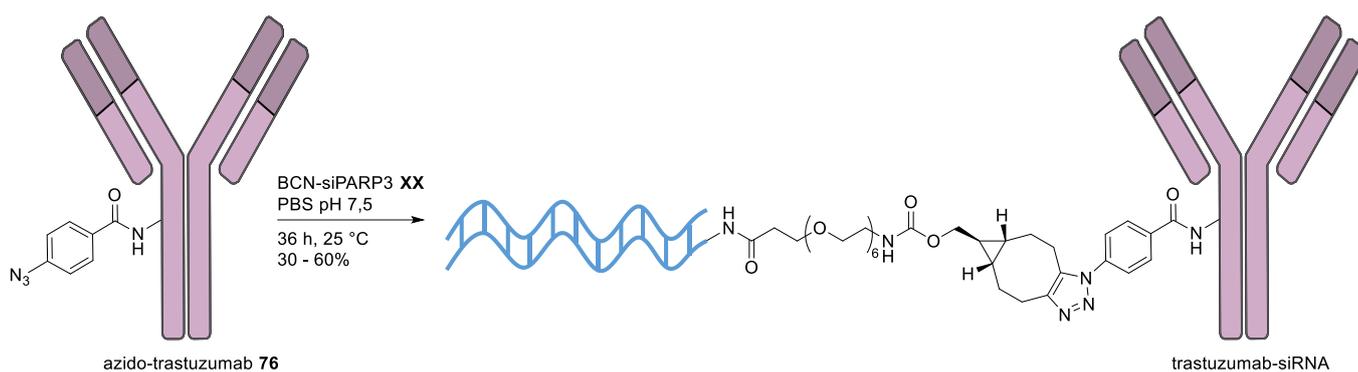
5'NH<sub>2</sub>-ssRNA in H<sub>2</sub>O in RNase-free (1 equiv. 20 nmol, 20  $\mu$ L, 1 mM) was diluted with RNase-free borate buffer (0.1 M, pH = 8.0, 100  $\mu$ L). Then BCN-PEG<sub>6</sub>-PFP **61** (100 equiv., 2  $\mu$ mol, 20  $\mu$ L, 100 mM in DMSO) was added and the mixture was incubated at 25  $^\circ$ C under nitrogen atmosphere for 6 h and followed by RP-HPLC.

The ssRNA-BCN was purified by two precipitation in a solution of LiClO<sub>4</sub> (~ 1/3 of the total volume) and cold acetone (~ 3x of the total volume). The resulting solid was then dissolved in RNase-free water (20  $\mu$ L) and concentration was measured by spectrophotometry using Nanodrop. ssRNA-BCN was afforded with 80-95% yield.

To the solution of ssRNA-BCN (1 equiv., 20  $\mu$ L) was added a solution of the complementary RNA strand (1.5 equiv.). The solution was incubated at 65  $^\circ$ C for 5 min, then the temperature was cooled from 65  $^\circ$ C to 25  $^\circ$ C over 15 min. The BCN-siRNA was directly used for bioconjugation to antibody.



To a solution of trastuzumab **54** (1 equiv., 5 mg/ml in PBS pH 7.4, 200  $\mu$ L, 1 mg, 6.9 nmol) was freshly added azidobenzoyl fluoride **60** (3 equiv., 20 mM in DMSO, 1.05  $\mu$ L, 20.7 nmol) and the mixture was incubated at 37  $^\circ$ C for 30 min. Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 7.4 and afforded the trastuzumab-N<sub>3</sub> **76** with 90 – 95% yield.

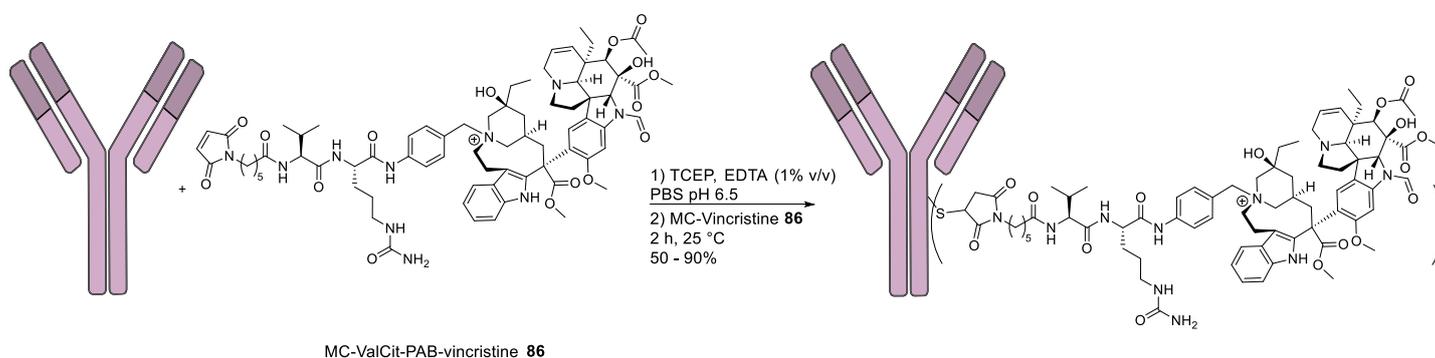


To a solution of trastuzumab-N<sub>3</sub> **76** (1 equiv., 15 mg/mL in PBS pH 7.4) was added BCN-siRNA in RNase-free water (2 equiv.) and the reaction mixture was incubated at 25 °C for 36 h.

The mixture was purified by size exclusion chromatography (Akta, S200, DPBS 1X as eluent, rt = 10 mL). Fractions containing the product were concentrated by centrifugation (Vivaspin 500 µL, 50 kDa MWCO, 12 minutes, 15 000 g) and filtered through centrifuge tube filters (Corning® Costar® Spin-X®, 0.22 µm, 1 minute, 15 000 g). Protein concentration was determined by BCA assay and afforded the conjugated trastuzumab with 30 – 60% yield.

Sample solution (2 mg/mL, 20 µL) was deglycosylated with Remove-iT® Endo S (New England Biolabs, Ipswich, U.S.A., Ref. P0741L) at 37 °C for 2 hours before SEC-ESI-MS analysis.

#### Bioconjugation of MC-ValCit-PAB-vincristine **86**



*Figure 100: Vincristine bioconjugation on antibody*

#### Bioconjugation of Vincristine **86** on partially reduced antibodies

To a solution of antibody (1 equiv., 5 mg/ml, 200 µL, 1 mg, 6.9 nmol) in PBS pH 6.5 with EDTA 1% v/v (solution of 0,5 M), was added TCEP (2 equiv., 10 mM in H<sub>2</sub>O mQ, 1.38 µL, 13.8 nmol) and the mixture was incubated at 37 °C for 2 h.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 6.5 to give a solution of partially reduced antibody.

Directly after, MC-ValCit-PAB-Vincristine **86** (20 equiv., 10 mM in DMSO, 13.8 µL, 138 nmol) was added and the mixture was incubated at 25 °C for 2 h under argon atmosphere.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 7.5 to give a solution of antibody-vincristine.

Buffer was exchanged on viva spin to afforded the final solution in PBS pH 7.5 with 60 – 90% yield (concentrations were measured by BCA assays).

DoC was determined by native ESI-MS (avDAR = 3.6 – 3.8).

### Bioconjugation of Vincristine **86** on totally reduced antibodies

To a solution of antibody (1 equiv., 5 mg/ml, 200  $\mu$ L, 1 mg, 6.9 nmol) in PBS pH 6.5 with EDTA 1% v/v (solution of 0,5 M), was added TCEP (20 equiv., 10 mM in H<sub>2</sub>O mQ, 13.8  $\mu$ L, 138 nmol) and the mixture was incubated at 37 °C for 2 h.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 6.5 to give a solution of totally reduced antibody.

Directly after, MC-ValCit-Vincristine **86** (20 equiv., 10 mM in DMSO, 13.8  $\mu$ L, 138 nmol) was added and the mixture was incubated at 25 °C for 2 h under argon atmosphere.

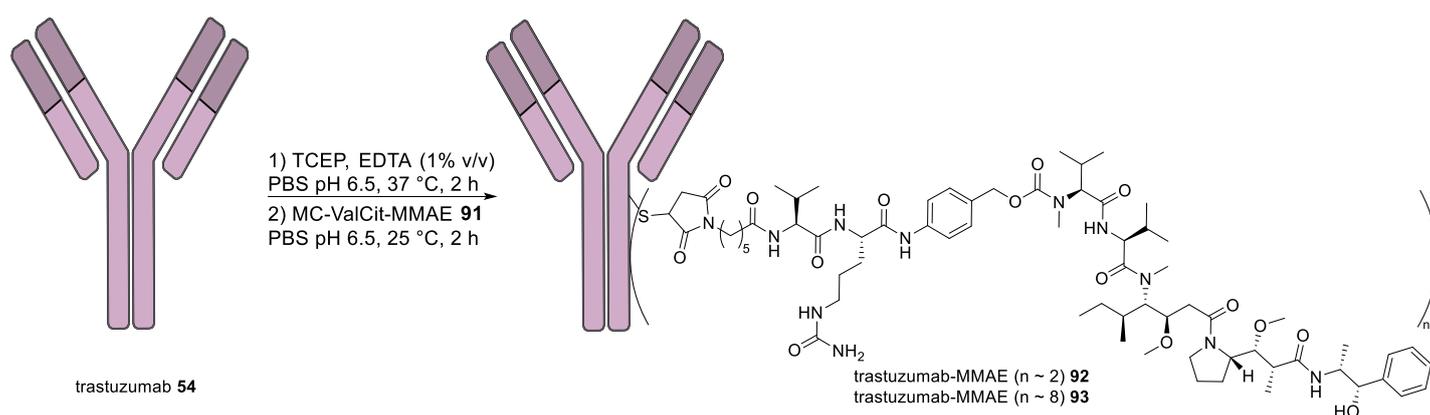
Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 7.5 to give a solution of antibody-vincristine.

Buffer was exchanged on viva spin to afforded the final solution in PBS pH 7.5 with 50 – 70% yield (concentrations were measured by BCA assays).

DoC was determined by native ESI-MS (DAR = 8).

These protocols were used to bioconjugate vincristine **22** with trastuzumab **54** and rituximab to generate control ADC that not recognize HER2.

### Bioconjugation of MC-ValCit-MMAE **91**



### Bioconjugation of MMAE **91** on partially reduced antibodies

To a solution of trastuzumab **54** (1 equiv., 5 mg/ml, 100  $\mu$ L, 0.5 mg, 3.45 nmol) in PBS pH 6.5 with EDTA 1% v/v (solution of 0,5 M), was added TCEP (2 equiv., 10 mM in H<sub>2</sub>O mQ, 0.69  $\mu$ L, 6.9 nmol) and the mixture was incubated at 37 °C for 2 h.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 6.5 to give a solution of partially reduced antibody.

Directly after, MC-ValCit-MMAE **91** (20 equiv., 10 mM in DMSO, 6.9  $\mu$ L, 69 nmol) was added and the mixture was incubated at 25  $^{\circ}$ C for 2 h under argon atmosphere.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 7.5 to give a solution of antibody-vincristine.

Buffer was exchanged on viva spin to afforded **92** the final solution in PBS pH 7.5 with 70 – 90% yield (concentrations were measured by BCA assays).

DoC was determined by native ESI-MS (avDAR = 3.6 – 3.7).

### Bioconjugation of MMAE **91** on totally reduced antibodies

To a solution of trastuzumab **54** (1 equiv., 5 mg/ml, 100  $\mu$ L, 0.5 mg, 3.45 nmol) in PBS pH 6.5 with EDTA 1% v/v (solution of 0,5 M), was added TCEP (20 equiv., 10 mM in H<sub>2</sub>O mQ, 6.9  $\mu$ L, 69 nmol) and the mixture was incubated at 37  $^{\circ}$ C for 2 h.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 6.5 to give a solution of partially reduced antibody.

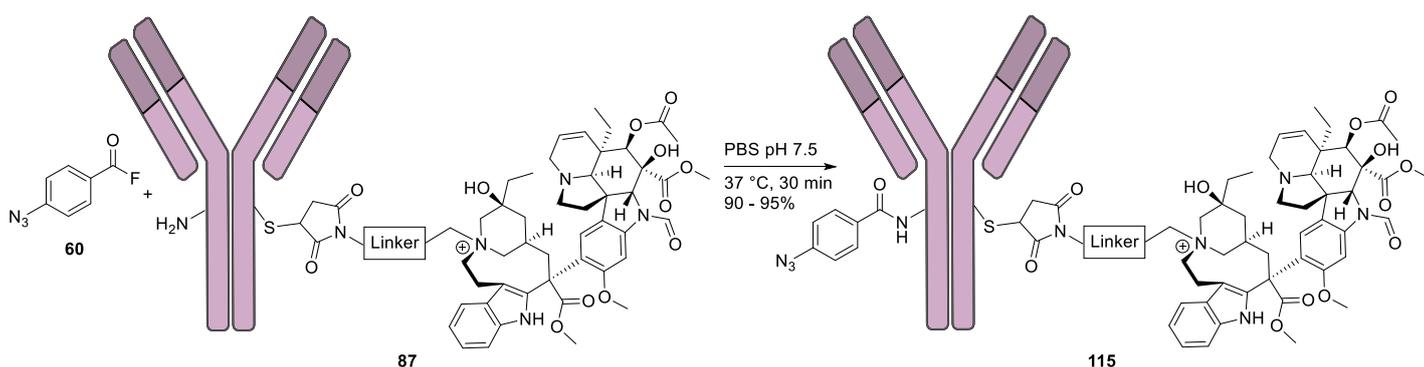
Directly after, MC-ValCit-MMAE **91** (20 equiv., 10 mM in DMSO, 6.9  $\mu$ L, 69 nmol) was added and the mixture was incubated at 25  $^{\circ}$ C for 2 h under argon atmosphere.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 7.5 to give a solution of antibody-vincristine.

Buffer was exchanged on viva spin to afforded **93** the final solution in PBS pH 7.5 with 70 – 90% yield (concentrations were measured by BCA assays).

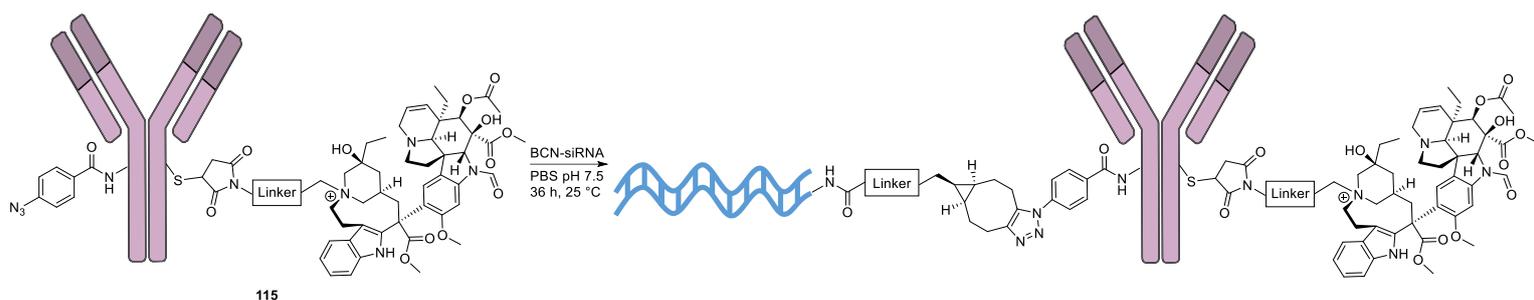
DoC was determined by native ESI-MS (avDAR  $\sim$  8).

### Dual conjugation with T-vincristine D4 **87**



To a solution of T-vincristine D4 **87** (1 equiv., 5 mg/ml in PBS pH 7.5, 220  $\mu$ L, 1.1 mg, 7.33 nmol) was added azidobenzoyl fluoride **60** (2 equiv., 20 mM in DMSO, 0.73  $\mu$ L, 14.66 nmol) and the mixture was incubated at 37  $^{\circ}$ C for 30 min.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 7.5 and afforded N<sub>3</sub>-trastuzumab-vincristine D4 **115** with 90 – 95% yield.

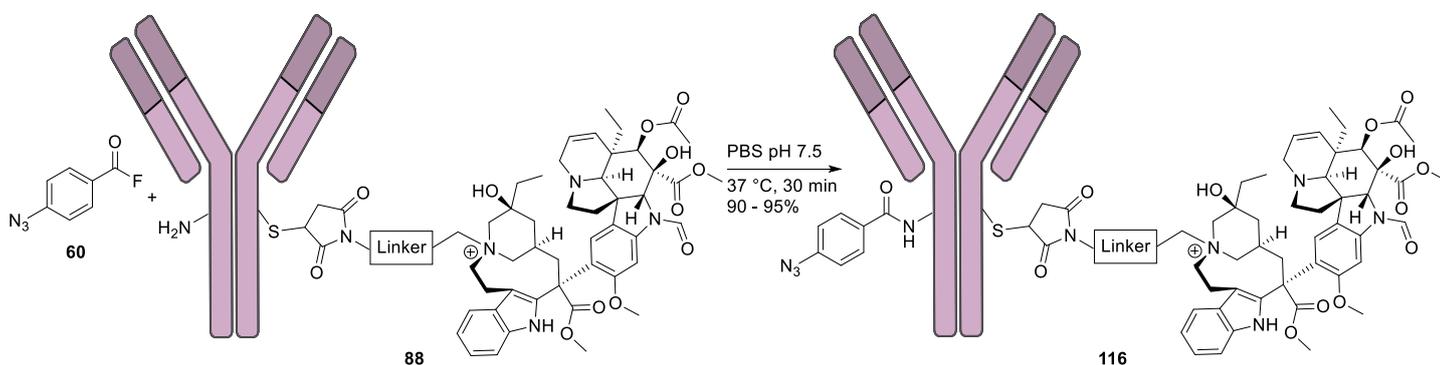


115

To a solution of  $N_3$ -trastuzumab-vincristine D4 **115** (1 equiv., 15 mg/mL in PBS pH 7.5, 33.3  $\mu$ L, 0.5 mg, 3.33 nmol) was added BCN-siRNA (synthesized following the same procedure used for T-siRNA) in RNase-free water (2 equiv., 15  $\mu$ L, 6.66 nmol) and the reaction mixture was incubated at 25  $^{\circ}$ C for 36 h.

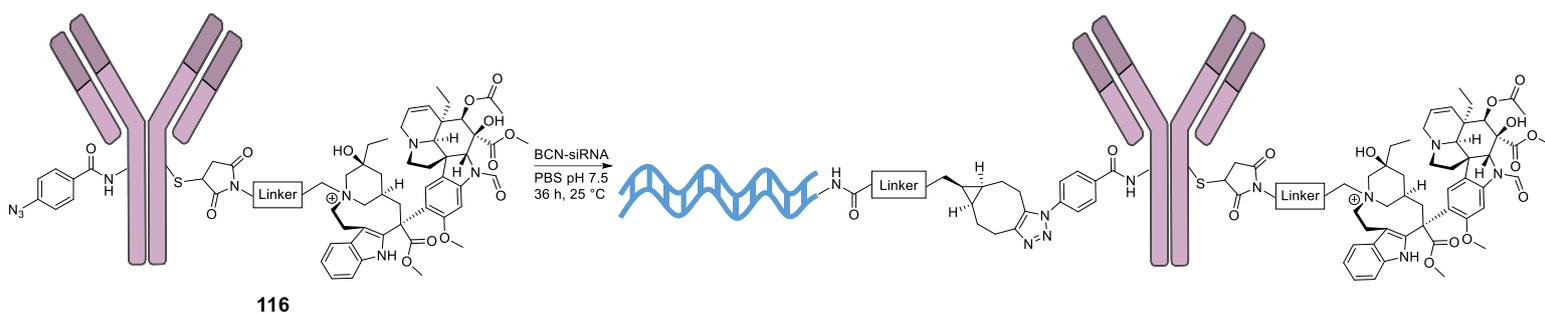
The mixture was purified by size exclusion chromatography (Akta, S200, DPBS 1X as eluent,  $rt = 10$  mL). Fractions containing the product were concentrated by centrifugation (Vivaspin 500  $\mu$ L, 50 kDa MWCO, 12 minutes, 15 000 g) and filtered through centrifuge tube filters (Corning<sup>®</sup> Costar<sup>®</sup> Spin-X<sup>®</sup>, 0.22  $\mu$ m, 1 minute, 15 000 g). Protein concentration was determined by BCA assay and afforded the conjugated trastuzumab.

#### Dual conjugation with T-vincristine D8 **88**



To a solution of T-vincristine D8 **88** (1 equiv., 5 mg/ml in PBS pH 7.5, 220  $\mu$ L, 1.1 mg, 7.10 nmol) was added azidobenzoyl fluoride **60** (2 equiv., 20 mM in DMSO, 0.71  $\mu$ L, 14.20 nmol) and the mixture was incubated at 37  $^{\circ}$ C for 30 min.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 7.5 and afforded  $N_3$ -trastuzumab-vincristine **116** with 90 – 95% yield.



116

To a solution of N<sub>3</sub>-trastuzumab-vincristine D8 **116** (1 equiv., 15 mg/mL in PBS pH 7.5, 33.3  $\mu$ L, 0.5 mg, 3.23 nmol) was added BCN-siRNA (synthesized following the same procedure used for T-siRNA) in RNase-free water (2 equiv., 15  $\mu$ L, 6.45 nmol) and the reaction mixture was incubated at 25 °C for 36 h.

The mixture was purified by size exclusion chromatography (Akta, S200, DPBS 1X as eluent, rt = 10 mL). Fractions containing the product were concentrated by centrifugation (Vivaspin 500  $\mu$ L, 50 kDa MWCO, 12 minutes, 15 000 g) and filtered through centrifuge tube filters (Corning® Costar® Spin-X®, 0.22  $\mu$ m, 1 minute, 15 000 g). Protein concentration was determined by BCA assay and afforded the conjugated trastuzumab.

Experiments were performed with trastuzumab-vincristine D4 **87** and D8 **88** ; BCN-siPARP3 **75** and BCN-siSCR:

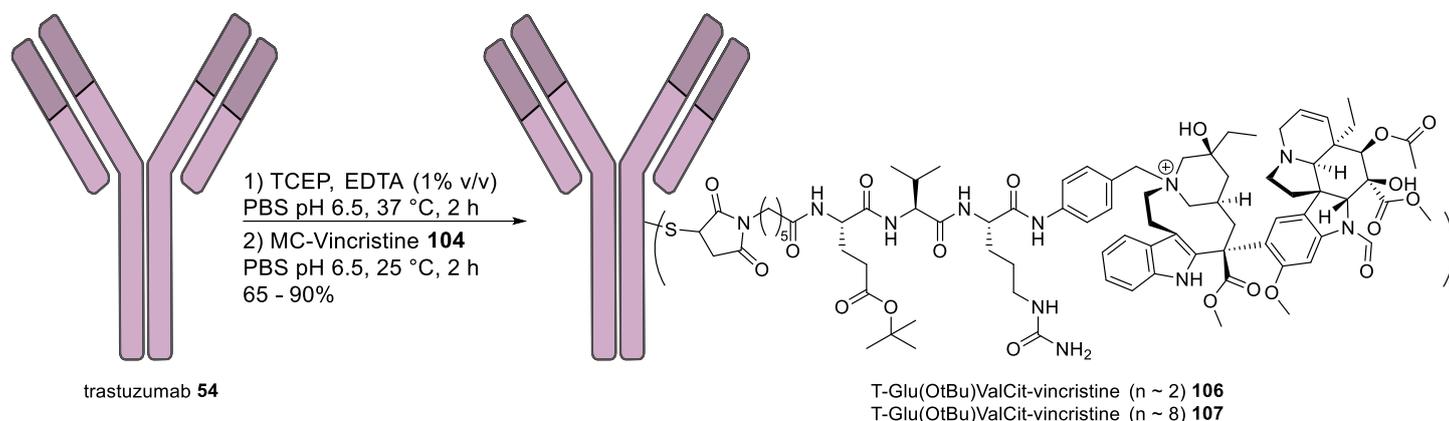
siPARP3-trastuzumab-vincristine D4 **117** : 2.33 mg/mL, 0.163 mg, 0.96 nmol, 29%.

siPARP3-trastuzumab-vincristine D8 **118** : 1.61 mg/mL, 0.113 mg, 0.645 nmol, 20%.

siSCR-trastuzumab-vincristine D4 **119** : 1.85 mg/mL, 0.129 mg, 0.762 nmol, 23%.

siSCR-trastuzumab-vincristine D8 **120** : 0.569 mg/mL, 0.040 mg, 0.228 nmol, 7%.

#### Bioconjugation of MC-Glu(OtBu)ValCit-vincristine **104**



trastuzumab **54**

T-Glu(OtBu)ValCit-vincristine (n ~ 2) **106**  
T-Glu(OtBu)ValCit-vincristine (n ~ 8) **107**

### **Bioconjugation of vincristine 104 on partially reduced antibodies**

To a solution of trastuzumab **54** (1 equiv., 5 mg/ml, 100  $\mu$ L, 0.5 mg, 3.45 nmol) in PBS pH 6.5 with EDTA 1% v/v (solution of 0,5 M), was added TCEP (2 equiv., 10 mM in H<sub>2</sub>O mQ, 0.69  $\mu$ L, 6.9 nmol) and the mixture was incubated at 37 °C for 2 h.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 6.5 to give a solution of partially reduced antibody.

Directly after, MC-Glu(OtBu)ValCit-vincristine **104** (20 equiv., 10 mM in DMSO, 6.9  $\mu$ L, 69 nmol) was added and the mixture was incubated at 25 °C for 2 h under argon atmosphere.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 7.5 to give a solution of antibody-vincristine.

Buffer was exchanged on viva spin to afforded **106** the final solution in PBS pH 7.5 with 70 - 80% yield (concentrations were measured by BCA assays).

DoC was determined by native ESI-MS (avDAR  $\sim$  2).

### **Bioconjugation of vincristine 104 on totally reduced antibodies**

To a solution of trastuzumab **54** (1 equiv., 5 mg/ml, 100  $\mu$ L, 0.5 mg, 3.45 nmol) in PBS pH 6.5 with EDTA 1% v/v (solution of 0,5 M), was added TCEP (20 equiv., 10 mM in H<sub>2</sub>O mQ, 6.9  $\mu$ L, 69 nmol) and the mixture was incubated at 37 °C for 2 h.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 6.5 to give a solution of partially reduced antibody.

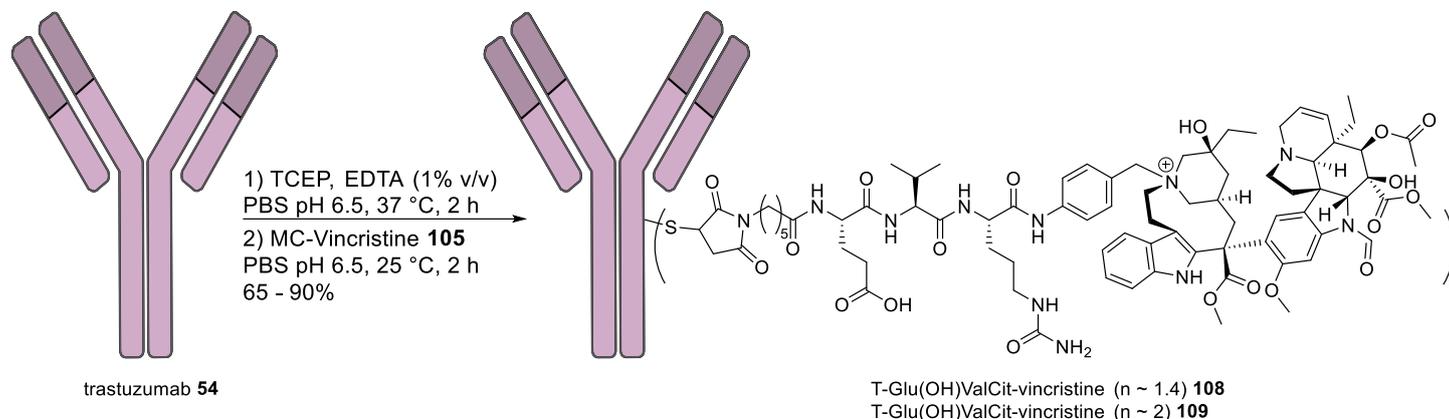
Directly after, MC-Glu(OtBu)ValCit-vincristine **104** (20 equiv., 10 mM in DMSO, 6.9  $\mu$ L, 69 nmol) was added and the mixture was incubated at 25 °C for 2 h under argon atmosphere.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 7.5 to give a solution of antibody-vincristine.

Buffer was exchanged on viva spin to afforded **107** the final solution in PBS pH 7.5 with 70 – 80% yield (concentrations were measured by BCA assays).

DoC was determined by native ESI-MS (avDAR  $\sim$  8).

## Bioconjugation of MC-Glu(OH)ValCit-vincristine **105**



### Bioconjugation of vincristine **105** on partially reduced antibodies

To a solution of antibody (1 equiv., 5 mg/ml, 100  $\mu$ L, 0.5 mg, 3.45 nmol) in PBS pH 6.5 with EDTA 2% v/v (solution of 0,5 M), was added TCEP (2 equiv., 10 mM in H<sub>2</sub>O mQ, 0.69  $\mu$ L, 6.9 nmol) and the mixture was incubated at 37 °C for 3 h.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 6.5 to give a solution of partially reduced antibody.

Directly after, MC-Glu(OH)ValCit-vincristine **105** (20 equiv., 10 mM in DMSO, 6.9  $\mu$ L, 69 nmol) was added and the mixture was incubated at 25 °C for 2 h under argon atmosphere.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 7.5 to give a solution of antibody-vincristine.

Buffer was exchanged on viva spin to afforded **108** the final solution in PBS pH 7.5 with 80% yield (concentrations were measured by BCA assays).

DoC was determined by native ESI-MS (avDAR ~ 1.5).

### Bioconjugation of vincristine **105** on totally reduced antibodies

To a solution of antibody (1 equiv., 5 mg/ml, 100  $\mu$ L, 0.5 mg, 3.45 nmol) in PBS pH 6.5 with EDTA 2% v/v (solution of 0,5 M), was added TCEP (20 equiv., 10 mM in H<sub>2</sub>O mQ, 6.9  $\mu$ L, 69 nmol) and the mixture was incubated at 37 °C for 3 h.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 6.5 to give a solution of partially reduced antibody.

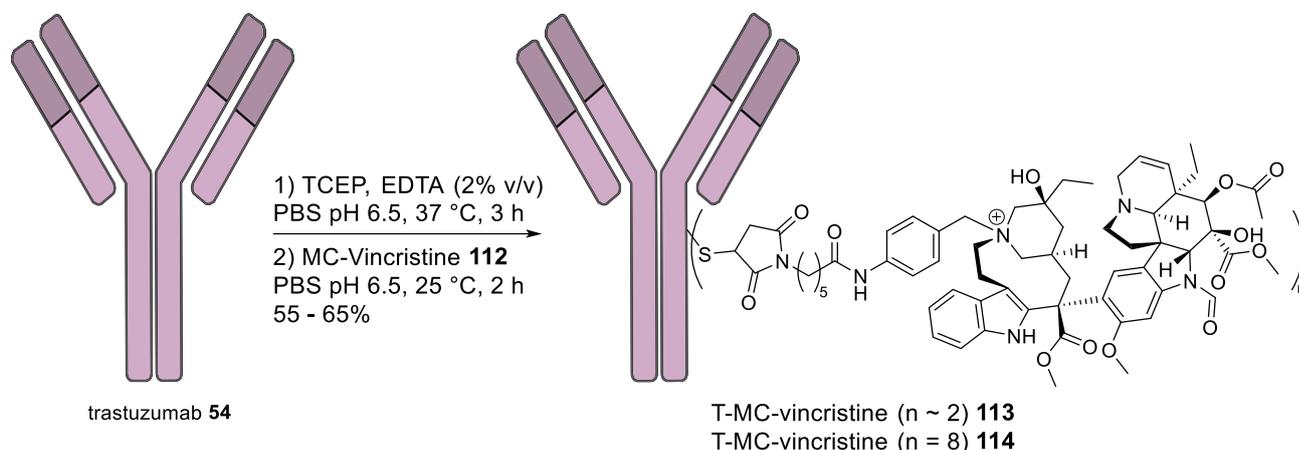
Directly after, MC-Glu(OH)ValCit-vincristine **105** (20 equiv., 10 mM in DMSO, 6.9  $\mu$ L, 69 nmol) was added and the mixture was incubated at 25 °C for 2 h under argon atmosphere.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 7.5 to give a solution of antibody-vincristine.

Buffer was exchanged on viva spin to afforded **109** the final solution in PBS pH 7.5 with 90% yield (concentrations were measured by BCA assays).

DoC was determined by native ESI-MS (avDAR ~ 2).

#### Bioconjugation of MC-PAB-vincristine **112**



#### Bioconjugation of vincristine **112** on partially reduced antibodies

To a solution of trastuzumab **54** (1 equiv., 10 mg/ml, 50  $\mu$ L, 0.5 mg, 3.45 nmol) in PBS pH 6.5 with EDTA 2% v/v (solution of 0,5 M), was added TCEP (2 equiv., 10 mM in H<sub>2</sub>O mQ, 0.69  $\mu$ L, 6.9 nmol) and the mixture was incubated at 37 °C for 3 h.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 6.5 to give a solution of partially reduced antibody.

Directly after, MC-PAB-vincristine **112** (14 equiv., 10 mM in DMSO, 4.8  $\mu$ L, 48.3 nmol) was added and the mixture was incubated at 25 °C for 2 h under argon atmosphere.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 7.5 to give a solution of antibody-vincristine.

Buffer was exchanged on viva spin to afforded **113** the final solution in PBS pH 7.5 with 50% yield (concentrations were measured by BCA assays).

DoC was determined by native ESI-MS (avDAR ~ 2.6).

#### Bioconjugation of vincristine **112** on totally reduced antibodies

To a solution of trastuzumab **54** (1 equiv., 10 mg/ml, 50  $\mu$ L, 0.5 mg, 3.45 nmol) in PBS pH 6.5 with EDTA 2% v/v (solution of 0,5 M), was added TCEP (20 equiv., 10 mM in H<sub>2</sub>O mQ, 6.9  $\mu$ L, 69 nmol) and the mixture was incubated at 37 °C for 3 h.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 6.5 to give a solution of partially reduced antibody.

Directly after, MC-PAB-vincristine **112** (14 equiv., 10 mM in DMSO, 4.8  $\mu$ L, 48.3 nmol) was added and the mixture was incubated at 25 °C for 2 h under argon atmosphere.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 7.5 to give a solution of antibody-vincristine.

Buffer was exchanged on viva spin to afforded **114** the final solution in PBS pH 7.5 with 60% yield (concentrations were measured by BCA assays).

DoC was determined by native ESI-MS (DAR = 8).

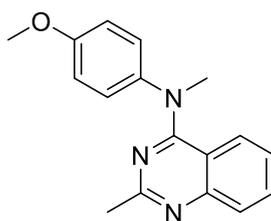
# Développement de nouveaux ADCs conjugués à la vérubuline, une nouvelle classe de charge thérapeutique

## Introduction

Les ADCs sont composés d'une charge thérapeutique cytotoxique conjuguée à un anticorps grâce à un linker et représentent une classe émergente d'outils thérapeutiques permettant le ciblage spécifique de cellules cancéreuses<sup>276</sup>. Ainsi les anticorps vont permettre la délivrance spécifique de la charge thérapeutique directement au sein des cellules ciblées tout en limitant son exposition systémique.<sup>277</sup> Cela permet de diminuer les effets secondaires néfastes comparés à une chimiothérapie classique en réduisant le contact avec les cellules saines.<sup>278</sup>

Parmi les douze ADCs approuvés par la FDA, sept d'entre eux sont conjugués à des inhibiteurs de la polymérisation des microtubules. Cependant, ces charges thérapeutiques sont uniquement des maytansines (Kadcyla<sup>®</sup> **11** et Elahere<sup>®</sup> **13**) ou des auristatines (Adcetris<sup>®</sup> **4**, Polivy<sup>®</sup> **5**, Padcev<sup>®</sup> **6**, Tivdak<sup>®</sup> **7** et Blenrep<sup>®</sup> **18**) qui sont des composés hydrophobes.<sup>279,280</sup> Lorsqu'elles sont conjuguées à la surface des protéines, cela entraîne une modification de la polarité de l'ADC, menant à des problèmes de stabilité et d'agrégation.<sup>281</sup> De plus, ces composés hydrophobes sont sujets aux pompes à efflux telle que la glycoprotéine-P, responsable du développement de résistance des cellules cancéreuses.<sup>282</sup>

La génération d'ADCs équipés de nouvelles charges thérapeutiques est une stratégie nécessaire pour le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses car le choix actuel de drogues est limité et nécessiterait une diversification, avec l'émergence de nouveaux composés possédant des propriétés pharmacochimiques variées.<sup>283</sup> L'utilisation de molécules hydrophiles de faible poids moléculaire permettrait de diminuer les problèmes d'agrégation et de résistance.<sup>284</sup> Dans ce but, nous avons décidé d'évaluer la vérubuline **28**, une petite molécule cytotoxique hydrophile faisant partie de la famille des poisons mitotiques.<sup>285</sup>



Vérubuline **28**

Figure 101 : Structure de la vérubuline **28**

La vérubuline **28** est une molécule de synthèse composée d'un cœur quinazoline lié à un groupement phénolique par une amine tertiaire (Figure 101).<sup>286</sup> Elle a été développée par Myriad Pharmaceutical et c'est un inhibiteur de la polymérisation des microtubules pouvant également agir en endommageant les vaisseaux sanguins tumoraux irréguliers.<sup>163,287</sup>

La vérubuline **28** est capable de se lier au site de liaison de la colchicine, présent sur la tubuline- $\beta$ , empêchant ainsi la transition de la phase G2 à la phase M de la division cellulaire et induisant la mort cellulaire de la cellule tumorale ainsi que des cellules endothéliales des vaisseaux

sanguins tumoraux.<sup>288, 289, 290</sup> Ces altérations vont provoquer des occlusions des vaisseaux sanguins tumoraux, bloquant ainsi la circulation menant à des nécroses internes à l'environnement tumoral.<sup>291</sup>

Cette molécule **28** possède une activité cytotoxique d'environ 2 nM sur un panel de lignées cellulaires.<sup>292</sup> N'étant pas un substrat des glycoprotéines-P, la vérubuline **28** ne perd donc pas en efficacité lorsque des pompes à efflux sont surexprimées, ce qui présente un grand intérêt pour lutter contre les mécanismes de résistance.<sup>293</sup>

Cependant, les études cliniques sur cette molécule ont été stoppées car elle présentait une toxicité systémique trop importante notamment au niveau cardiovasculaire.<sup>294</sup> De plus, elle a également montré une haute toxicité envers les tissus sains. Malgré cela, la vérubuline **28** reste une molécule cytotoxique très efficace avec un grand intérêt contre les cancers, notamment les cancers du cerveau.<sup>295</sup> Ainsi, il serait possible de réduire ses effets néfastes en la vectorisant, ce qui diminuerait le ciblage non-spécifique tout en conservant son activité cytotoxique.

C'est pour cela que nous avons décidé lors de cette thèse de vectoriser la vérubuline **28** grâce à un anticorps modèle, le trastuzumab **54**, ciblant le récepteur HER2 surexprimé sur des cellules de cancer du sein, les cellules SKBR3. Pour ce faire, la vérubuline **28** sera modifiée avec un linker comportant un motif maléimide, permettant une étape de conjugaison cystéine. Afin de déterminer le point d'accroche optimal pour l'incorporation du linker, nous avons étudié l'influence de la modification de la vérubuline **28** sur plusieurs sites d'attache potentiels.

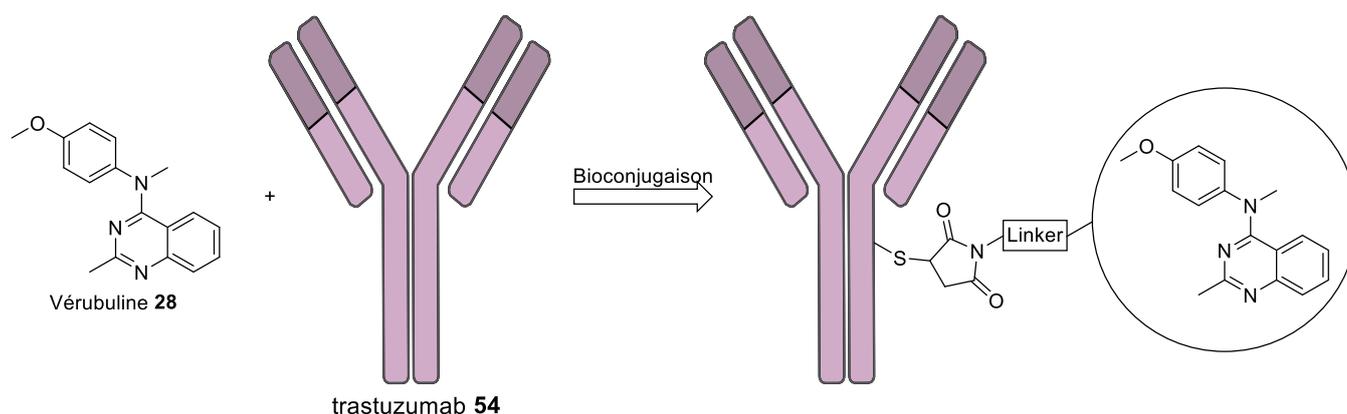


Figure 102 : Stratégie de vectorisation de la vérubuline **28** sur le trastuzumab **54**, formant ainsi de nouveaux ADCs porteurs d'un nouveau type de charge thérapeutique

## Résultats et discussions

### Synthèse de la vérubuline **28**

La vérubuline **28** a été synthétisée en trois étapes et a été obtenue avec un rendement global de 35%. Dans un premier temps, une molécule d'antranilonitrile **121** a été condensée avec du diméthylacétamide **122** en présence de trichlorure de phosphore (ou  $\text{POCl}_3$ ), via une réaction de type Vilsmeier-Haack, menant à la formation de l'amidine **123** avec un rendement de 97%. Une molécule de *p*-anisidine **124** a été ensuite additionnée sur le groupement nitrile, avant de subir une cyclisation intramoléculaire par addition sur le motif amidine suivie de l'élimination de diméthylamine,

conduisant au tricyclic **125** avec un rendement de 50%. Enfin, cet intermédiaire **125** a été *N*-méthylé en présence de iodométhane, menant à la vérubuline **28** avec un rendement 73%.

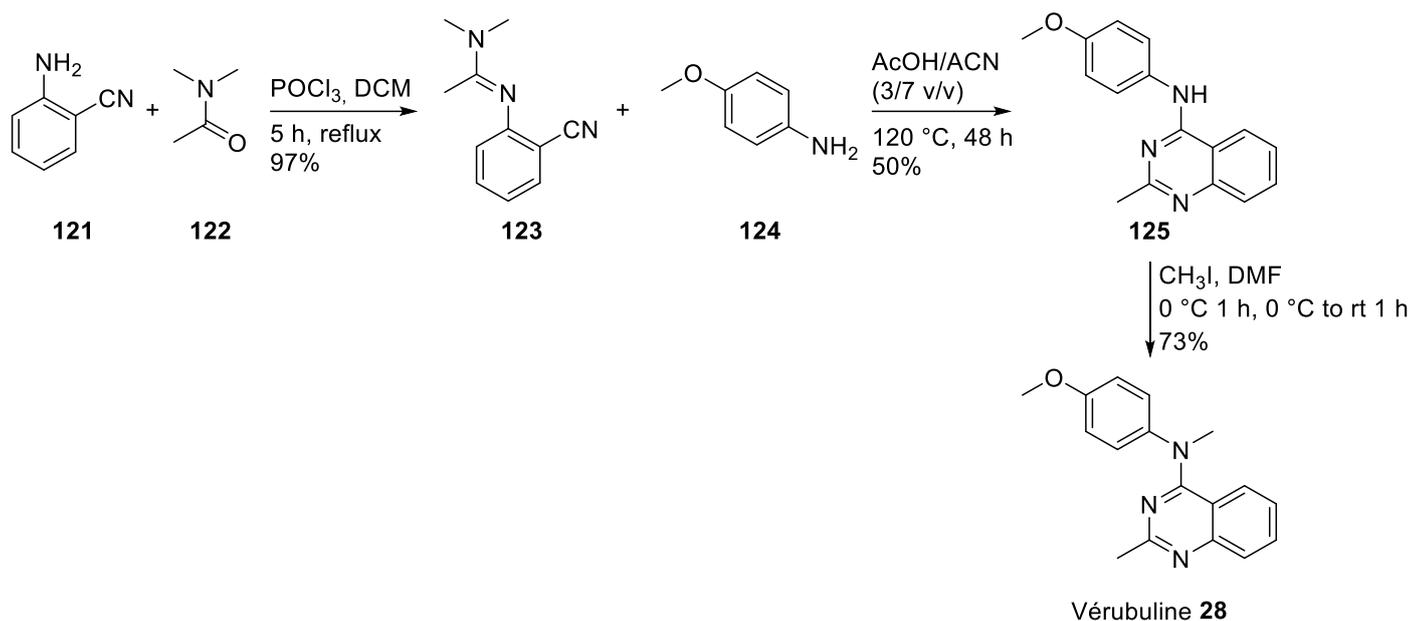


Figure 103 : Synthèse de la vérubuline **28** en trois étapes à partir d'anthranilonitrile **121** commercial

### Evaluation des potentiels sites de modification de la vérubuline **28**

Afin de développer une méthode de conjugaison efficace pour la vérubuline **28**, il a été nécessaire de trouver une position de modification sur la molécule afin de pouvoir y incorporer un linker. Trois positions ont été évaluées : la position 1 avec la modification du phénol, la position 2 avec la modification de l'amine tertiaire et la position 3 avec la modification du méthyle de la quinazoline.

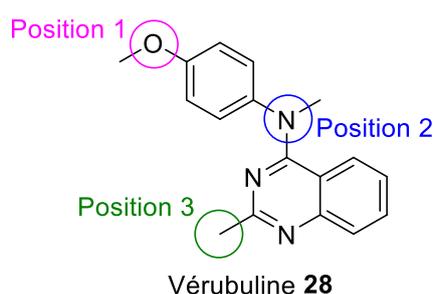


Figure 104 : Positions de la vérubuline **28** pouvant être modifiées afin d'y incorporer un linker. La position 1 représente une modification du phénol, la position 2 représente une modification de l'amine tertiaire. La position 3 représente une modification de le méthyle de la quinazoline.

### Modification du phénol de la vérubuline **28**

Afin de créer un point d'accroche sur la vérubuline **28** et d'y incorporer un linker, des analogues ont été synthétisés en modifiant la position 1 de la vérubuline **28**. Pour ce faire, cette dernière a été déméthylée en présence de tribromure de bore menant à l'obtention de l'analogue phénol **126** avec

un rendement quantitatif. Ensuite, cet analogue **126** a été fonctionnalisé avec un PEG<sub>4</sub> activé par un groupement tosyle en présence d'une base grâce à une réaction de substitution nucléophile menant à l'analogue **127** avec rendement de 97%.

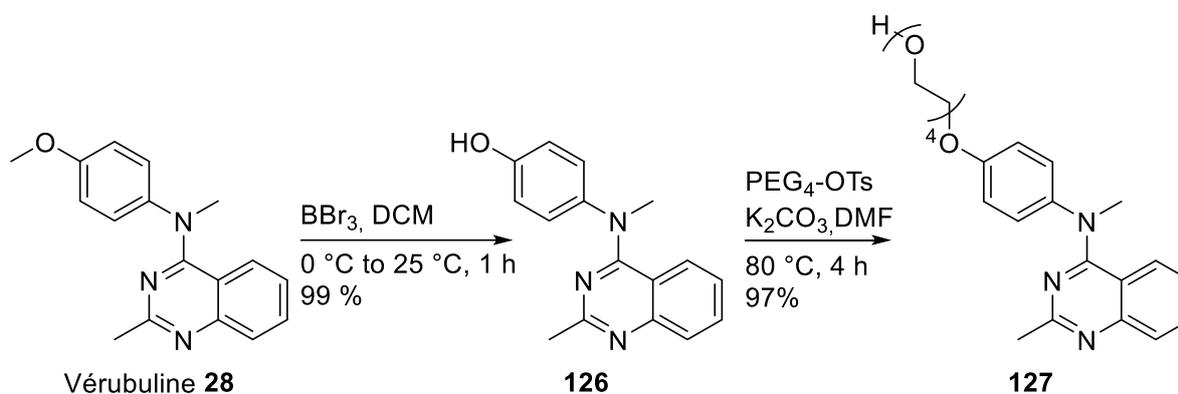


Figure 105 : Synthèse des analogues desméthylés **126** et **127** formés à partir de la vérubuline **28** synthétisée précédemment

#### Evaluation *in vitro* sur les cellules SKBR3

Ces trois molécules **28**, **126** et **127** ont été testées *in vitro* sur les cellules SKBR3 par un test de viabilité cellulaire WST-1 après 72 h d'incubation. Les concentrations de drogue ont été variées de 0,1 à 100 nM afin de déterminer si les molécules possédaient une activité cytotoxique satisfaisante pour être utilisées en tant que charge thérapeutique d'ADC. Ainsi, la vérubuline **28** possède une IC<sub>50</sub> d'environ 1 nM sur les cellules SKBR3, ce qui était attendu au vu du profil de cytotoxicité général de cette molécule. Cependant, les analogues **126** et **127** n'ont pas démontré de cytotoxicité sur les cellules avec des IC<sub>50</sub> supérieur 100 nM, ce qui ne permet pas la mort cellulaire à des concentration de l'ordre du nanomolaire (Figure 106). Ces résultats montrent que le groupement méthoxy semble nécessaire à l'activité de la vérubuline **28** et que cette position ne pourra pas être modifiée afin d'y incorporer un linker.

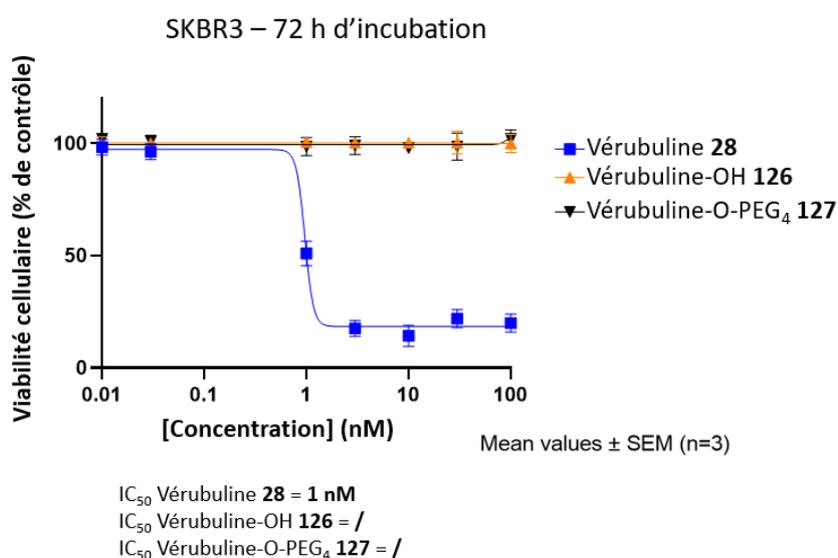


Figure 106 : Evaluation *in vitro* de la vérubuline **28** et des analogues **126** et **127** sur les cellules SKBR3. Après 72 h d'incubation à différentes concentrations, le pourcentage de viabilité cellulaire a été déterminé par un test WST-1.

### Stratégie d'alkylation quaternaire

Nous avons ensuite décidé d'utiliser la stratégie de Staben, *et al.* afin d'incorporer un linker par une étape d'alkylation quaternaire sur la position 2 de la vérubuline **28**.<sup>162</sup> Cette stratégie repose sur l'utilisation d'un chlorure de benzyle en présence de DIPEA et de TBAI afin d'alkyler des drogues d'intérêt possédant une amine tertiaire.

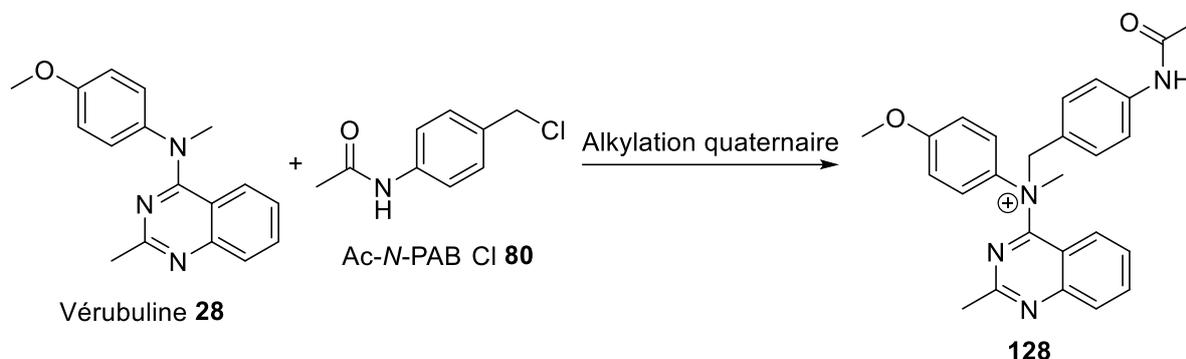


Figure 107 : Stratégie d'alkylation quaternaire envisagée de la vérubuline **28** à l'aide de l'analogue **80** afin d'obtenir l'ammonium **128**

Nous avons utilisé l'analogue Ac-N-PAB Cl **80** synthétisé dans le chapitre « Bioconjugaison de la vincristine **22** » afin de procéder à des tests d'alkylation. D'abord, nous avons décidé de nous affranchir de l'utilisation de DIPEA. En effet, cette base étant une amine tertiaire, son utilisation pourrait interférer en étant alkylée à la place de la vérubuline **28**. Ensuite, les proportions molaires de vérubuline **28** et de Ac-N-PAB Cl **80** ont été fixées à 2 équivalents pour 1 équivalent respectivement afin de maximiser la conversion du chlorure de benzyle. Plusieurs conditions expérimentales ont été testées, notamment en modifiant la concentration de vérubuline **28**, la température ou l'utilisation et la quantité d'activateur (TBAI ou DMAP). L'utilisation de DMAP permettrait de former un intermédiaire alkylé Ac-N-PAB-DMAP réactif. Toutes ces conditions ont été reportées dans le Tableau 7. Enfin, les conditions utilisées dans le chapitre « Bioconjugaison de la vincristine **22** » n'ont pas été évaluées ici car l'utilisation d'une base inorganique était employée pour déprotoner la vincristine **22**, l'amine tertiaire de la vérubuline **28** n'a quant à elle pas de proton.

Tableau 7 : Conditions testées afin de procéder à l'alkylation quaternaire de la vérubuline **28** en présence de AC-N-PAB Cl **80** et d'un activateur. Les proportions molaires ont été fixées à 2 équivalents de vérubuline **28** pour 1 équivalent de Ac-N-PAB Cl **80**. Les concentrations, la température ainsi que l'équivalence d'activateur ont été évalués à différents temps dans le but d'obtenir une conversion en ammonium **128**

Concentration de vérubuline (M)	Température (°C)	Activateur	Equivalent d'activateur	Conversion à 48 h
0,25	25	TBAI	0,5	/
0,25	40	TBAI	0,5	/
0,25	25	TBAI	0,5	/
0,5	25	TBAI	0,5	/
0,25	25	DMAP	0,5	/
0,25	40	DMAP	0,5	/
0,5	25	DMAP	2	/
0,5	25	DMAP	2	/

Cependant, aucune de ces conditions ne nous a permis d'obtenir l'ammonium **128** désiré car aucune conversion n'a été observée. Nous avons donc décidé d'utiliser une autre stratégie, la synthèse d'analogue possédant des fonctions nucléophiles pouvant être utilisées afin d'y incorporer un linker.

#### Synthèse d'analogues présentant une fonction nucléophile sur la position quinazoline de la vérubuline **28**

Dans le but de synthétiser des analogues composés d'une fonction nucléophile permettant l'incorporation d'un linker, la modification d'autres parties de la vérubuline **28** a été envisagée.

D'abord, l'intermédiaire amine secondaire **125** en position 2 sera évalué *in vitro* afin de déterminer si le méthyle est nécessaire à l'activité cytotoxique. Ensuite, des modifications ont été apportées sur la position 3 de la vérubuline **28**.

#### Synthèse de l'analogue vérubuline-CH<sub>2</sub>-OH **135**

Nous avons décidé dans un premier temps de synthétiser un analogue fonctionnalisé avec un alcool primaire en position 3 de la vérubuline **28**. Pour cela, il nous a fallu employer une autre voie de synthèse. Premièrement, une molécule de chloroacétonitrile **130** a été condensée en milieu basique sur l'aniline du 2-aminobenzoïque **129** par une réaction d'addition nucléophile sur le carbone du groupement cyano. L'intermédiaire formé a été cyclisé de façon intra-moléculaire après une réaction d'addition-élimination sur l'acide carboxylique, menant à un départ d'eau. L'intermédiaire **131** a été obtenu avec un rendement moyen de 57%. L'aromatisation de la molécule **131** a ensuite été opérée

en milieu basique avant de substituer la fonction hydroxy nouvellement générée par un atome de chlore en présence de POCl<sub>3</sub>, menant à la molécule **132**. Cette dernière a été fonctionnalisée avec de la 4-méthoxy-*N*-méthylaniline **133** par une réaction de substitution nucléophile en condition acide, menant à l'obtention du composé chloré **134** avec un rendement de 86%. Enfin, la molécule **134** a été modifiée afin d'incorporer la fonction hydroxy par une réaction d'hydrolyse en condition basique, menant à l'obtention de la molécule finale **135** avec un rendement de 40% (Figure 108). L'analogue **135** a été obtenu avec un rendement global de 19% sur quatre étapes.

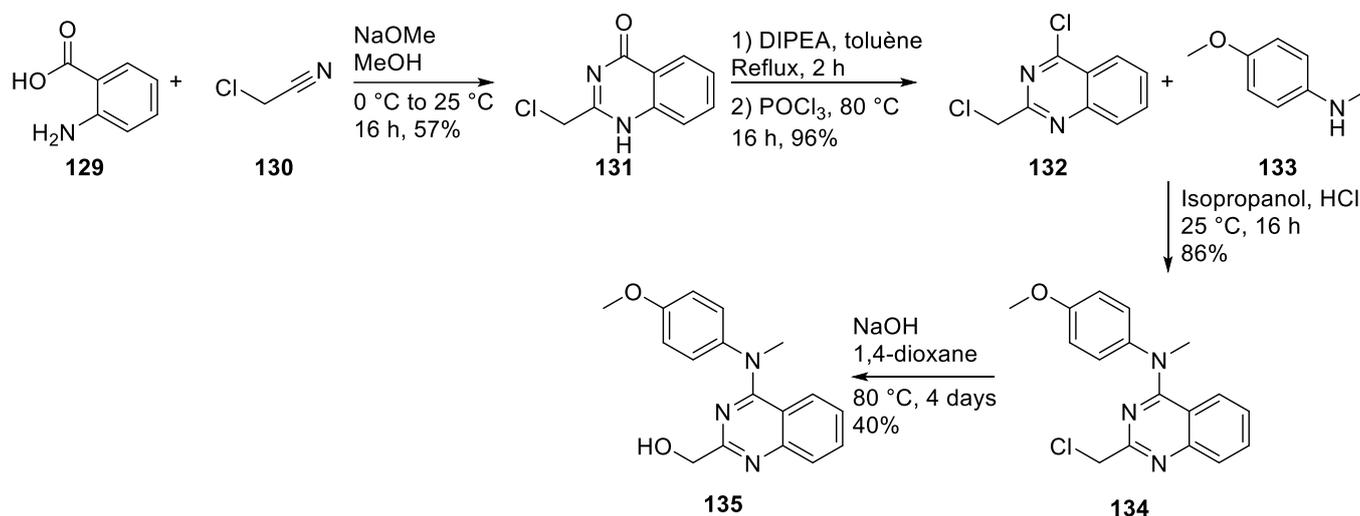


Figure 108 : Synthèse de l'analogue vérubuline-CH<sub>2</sub>-OH **135** en quatre étapes à partir d'acide 2-aminobenzoïque **129** commercial

#### Synthèse de l'analogue vérubuline-NH-Me **139**

Un autre analogue **139** fonctionnalisé avec un groupement méthylamine sur la position 3 a été synthétisé. D'abord, la forme diénole de la quinazolinédione **136** a été générée en conditions basiques et grâce à une aromatisation avant d'activer la molécule par du trichlorure de phosphore par une substitution nucléophile. Cette molécule **137**, peu stable car facilement hydrolysable, a été obtenue avec un rendement de 97% et a été utilisée telle quelle sans étape de purification. Le composé dichloré **137** a été fonctionnalisé avec de la 4-méthoxy-*N*-méthylaniline **133** en présence d'une base menant à l'obtention de l'intermédiaire **138** avec un rendement de 82%. Enfin, la vérubuline-NH-Me **139** a été obtenue après une étape de substitution nucléophile en présence de méthylamine avec un rendement de 67% (Figure 109). L'analogue **139** a été obtenu avec un rendement global de 53% sur trois étapes.

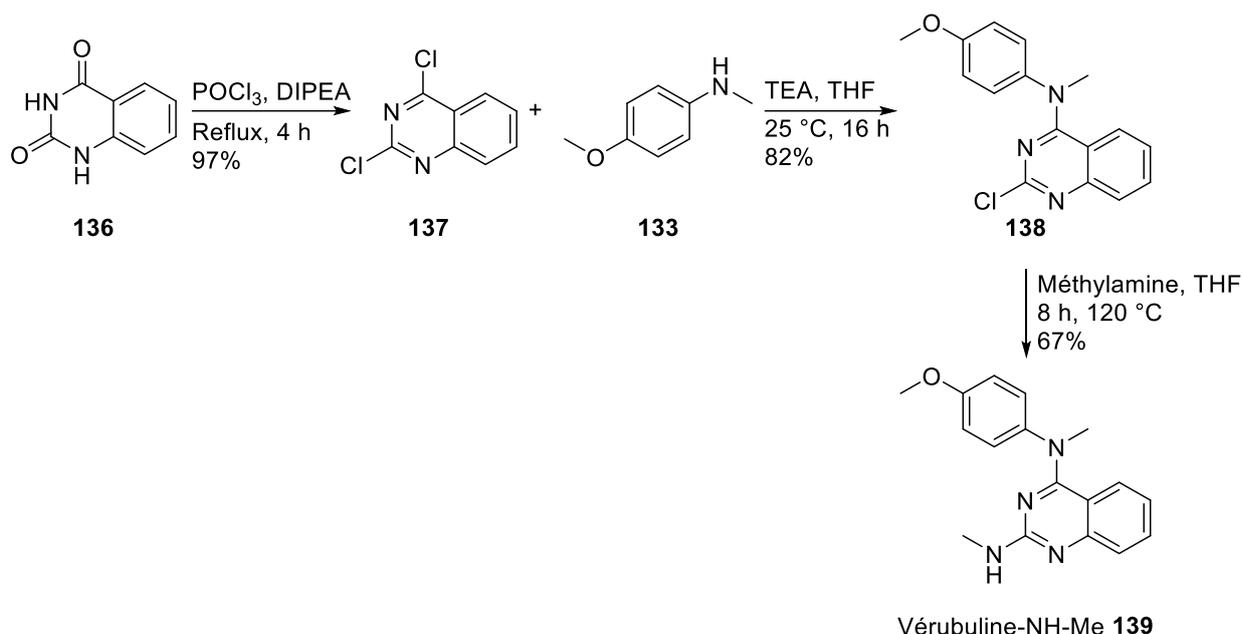


Figure 109 : Synthèse de l'analogue véribuline-NH-Me **139** en trois étapes à partir de 2,4(1H, 3H)-quinazolinédione **136** commercial

#### Evaluation *in vitro* des analogues fonctionnalisés de la véribuline **28**

Les différents analogues de la véribuline **28** avec une fonction réactive ont été évalués *in vitro* sur les cellules SKBR3 par un test de viabilité cellulaire WST-1 après 72 h d'incubation. Les analogues composés d'une fonction nucléophile **125**, **135** et **139** ont été évalués en même temps que les intermédiaires électrophiles **134** et **138**. Enfin, l'activité cytotoxique de toutes ces molécules a été comparée à celle de la véribuline **28**.

L'intermédiaire **125** possédant une amine secondaire ne s'est pas révélé efficace, avec une activité supérieure à 100 nM, traduisant le fait que le méthyle présent sur cette amine est nécessaire à l'activité cytotoxique. L'intermédiaire électrophile **138** ne possède pas non plus une activité cytotoxique suffisante, supérieure à 100 nM ; cependant l'intermédiaire électrophile **135** CH<sub>2</sub>-Cl présentait une bonne efficacité, ainsi ce composé sera investigué ultérieurement. Les analogues nucléophiles **135** et **139** ont présenté une activité cytotoxique satisfaisante, entre 3 et 10 nM, faisant de ces molécules des composés intéressants à vectoriser (Figure 110).

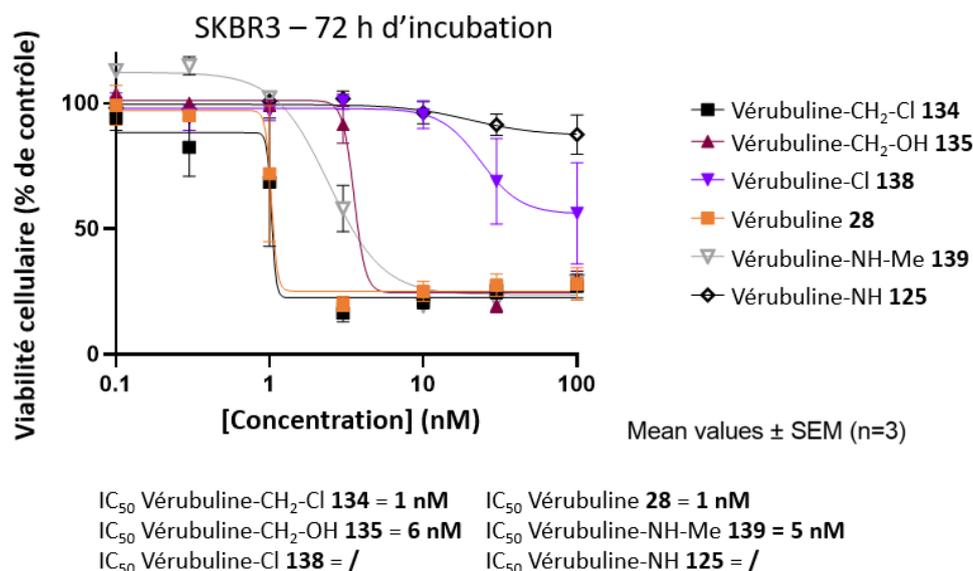


Figure 110 : Evaluation *in vitro* de la vérubuline **28** et de ses analogues sur les cellules SKBR3. Après 72 h d'incubation à différentes concentrations, le pourcentage de viabilité cellulaire a été déterminé par un test WST-1.

Nous avons donc décidé d'utiliser les analogues **135** et **139** afin d'y incorporer un linker en vue de les conjuguer sur l'anticorps trastuzumab et de tester leur efficacité *in vitro* sur les cellules SKBR3. Les  $IC_{50}$  de la vérubuline **28** et de tous ses analogues ont été rapportés dans le Tableau 8.

Tableau 8 :  $IC_{50}$  de la vérubuline **28** et de ses analogues évalués par WST-1 sur les cellules SKBR3 après 72 h d'incubation

Molécules	$IC_{50}$ (nM)
Vérubuline <b>28</b>	1
Vérubuline-OH <b>126</b>	>100
Vérubuline-O-PEG <sub>4</sub> <b>127</b>	>100
Vérubuline-NH <b>125</b>	>100
Vérubuline-CH <sub>2</sub> -Cl <b>134</b>	1
Vérubuline-CH <sub>2</sub> -OH <b>135</b>	6
Vérubuline-Cl <b>138</b>	>100
Vérubuline-NH-Me <b>139</b>	5

## Bioconjugaison de la vérubuline-CH<sub>2</sub>-OH **135**

### Incorporation d'un linker non-clivable sur la vérubuline-CH<sub>2</sub>-OH **135**

La vérubuline-CH<sub>2</sub>-OH **135** a été fonctionnalisée avec un linker MC **3** qui a été incorporé grâce à une liaison ester. Nous avons choisi ce linker car il est possible que la liaison ester soit clivée en présence d'estérases dans le milieu cellulaire. L'analogue **135** a été mis en présence du linker **3**, formant ainsi la molécule MC-O-vérubuline **140** par une réaction d'addition-élimination. Cette

molécule a été obtenue avec un rendement de 91% et est fonctionnalisée avec un motif maléimide, permettant directement sa bioconjugaison sur un anticorps (Figure 111).

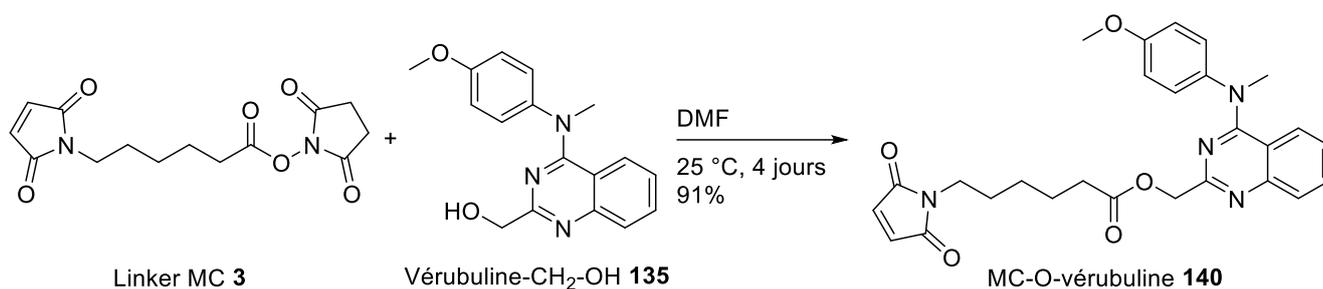


Figure 111 : Synthèse du MC-O-vérubuline **140** à partir de vérubuline-CH<sub>2</sub>-OH **135** synthétisé précédemment

#### Bioconjugaison du MC-O-vérubuline **140**

La MC-O-vérubuline **140** a été conjuguée sur l'anticorps trastuzumab **54** par une étape de conjugaison cystéine grâce à une addition de Michael des thiolates sur le motif maléimide. Les ponts disulfures du trastuzumab ont été réduits (partiellement ou totalement, en fonction du DAR désiré) en utilisant du TCEP, dans un tampon PBS à un pH de 6,5 contenant 1% v/v d'EDTA et permettant l'obtention de deux ADC trastuzumab-vérubuline (T-MC-O-vérubuline) avec deux DAR différents, le T-MC-O-vérubuline D4 **141** et le T-MC-O-vérubuline D8 **142** (Figure 112).

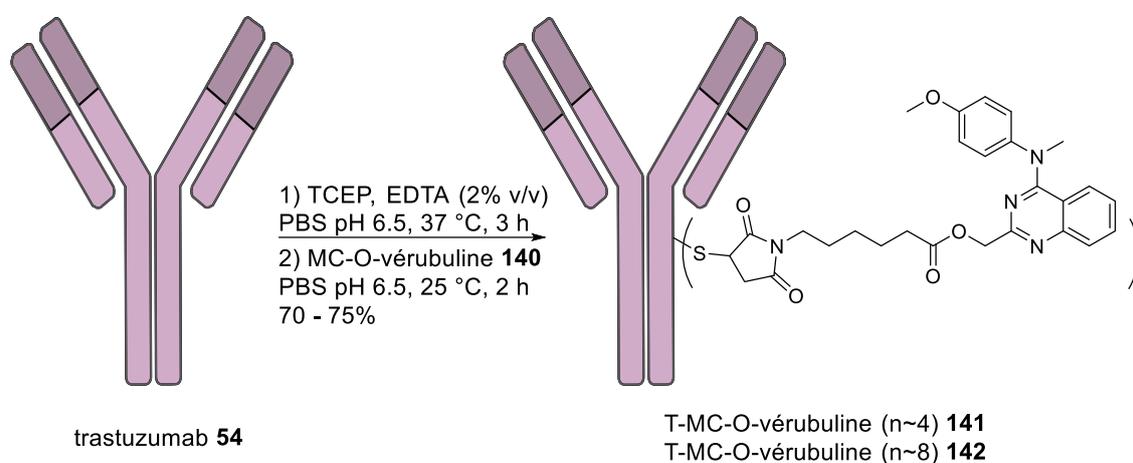


Figure 112 : Bioconjugaison du MC-O-vérubuline **140** sur l'anticorps trastuzumab **54**

Ces ADCs ont été filtrés sur des filtres SpinX (membrane en acétate de cellulose avec un diamètre de pores de 0,22  $\mu\text{M}$ ) afin d'éliminer les traces de bactéries et ont été obtenus avec des rendements allant de 70% à 75%.

Ils ont été ensuite analysés par spectrométrie de masse ESI native. Cependant, ces analyses ont démontré une mauvaise stabilité des conjugués car les spectres de masse présentent des mélanges très hétérogènes. Les spectres de masse présentaient un incrément de 203 Da répété plusieurs fois (Figure 113). Cet incrément correspond à la taille du linker, menant vers l'hypothèse que la liaison ester

a été hydrolysée, aboutissant à la déconjugaison de la drogue, ou à une instabilité due à l'analyse et à une fragmentation de cette liaison.

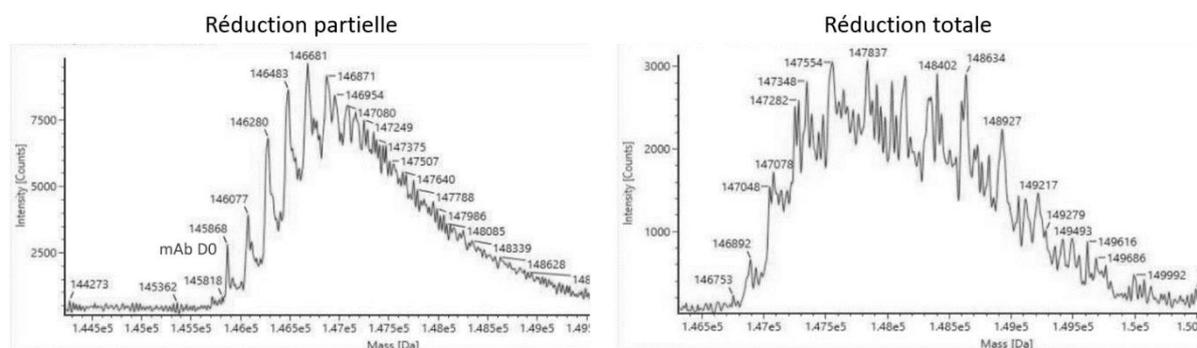


Figure 113 : Analyses de masse des conjugués **141** et **142**

*Evaluation in vitro des ADCs vérubuline sur les cellules SKBR3 et MDA-MB-231*

Malgré cette mauvaise stabilité, ces ADCs ont tout de même été évalués *in vitro* sur les cellules SKBR3 directement après l'étape de bioconjugaison. Ils ont été incubés pendant 72 h sur les cellules SKBR3 et MDA-MB-231. Ces tests de viabilité cellulaire ont montré que le T-MC-O-vérubuline D4 **141** et D8 **142** présentaient bien une activité cytotoxique de l'ordre du nanomolaire. Cependant, aucune sélectivité n'a été observée ; l'activité cytotoxique des composés étant similaire sur les cellules HER2 positives et négatives. Ceci tend à prouver l'instabilité du linker ester et la libération de vérubuline **135** dans le milieu, menant à une absence de sélectivité. De plus, le contrôle vérubuline-CH<sub>2</sub>-OH **135** présente une activité plus faible sur ce set d'analyse ; ce composé étant sûrement peu stable en solution dans du DMSO car ces résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus précédemment (Figure 114).

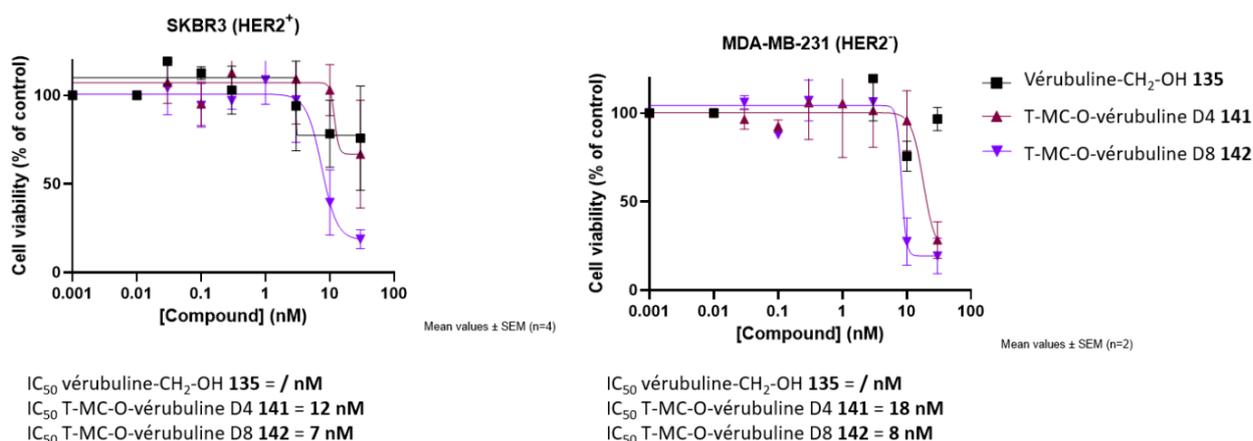


Figure 114 : Evaluation *in vitro* des conjugués **141** et **142** par des tests de viabilité cellulaire sur des cellules SKBR3 et MDA-MB-231. Après 72 h d'incubation à différentes concentrations, le pourcentage de viabilité cellulaire a été déterminé par un test WST-1.

## Conclusion

Pour conclure, la vérubuline **28** a été synthétisée afin d'évaluer son activité cytotoxique sur une lignée cellulaire modèle, la lignée SKBR3. Elle a présenté une très bonne efficacité, traduite par une IC<sub>50</sub> d'environ 1 nM. Afin de développer une méthode de bioconjugaison adéquate, il a été décidé dans un premier temps d'utiliser une stratégie d'alkylation quaternaire via l'utilisation du Ac-N-PAB Cl **80** afin de voir s'il était possible de modifier la vérubuline **28** dans le but de former l'ammonium **128**. Cependant cette stratégie s'est révélée inefficace car aucune conversion n'a été observée malgré les différentes conditions expérimentales testées. Nous avons donc, dans un deuxième temps, déméthylé la vérubuline **28** afin de libérer une fonction phénol pouvant être utilisée comme point d'accroche afin d'évaluer si l'utilisation d'un linker clivable pourrait être envisagée. Nous avons ensuite modifié cette fonction à l'aide d'un PEG<sub>4</sub> activé afin d'évaluer l'influence que pourrait avoir un linker non-clivable sur cette molécule. Malheureusement, ces analogues **126** et **127** n'ont pas démontré d'activité cytotoxique sur les cellules SKBR3 lors d'un test de viabilité cellulaire WST-1. Dans un troisième temps, nous avons synthétisé des analogues porteurs de fonctions nucléophiles facilitant l'incorporation d'un linker. Ainsi, deux analogues ont été synthétisés : l'un porteur d'une fonction alcool primaire **135** et l'autre porteur d'un motif méthylamine secondaire **139**. Ces molécules ont démontré de bonnes activités cytotoxiques et sont donc de bonnes candidates à la vectorisation par anticorps. Par conséquent, nous avons modifié la vérubuline-CH<sub>2</sub>-OH **135** avec un linker non-clivable **3**. L'ester **140** ainsi formé a été utilisé afin d'être bioconjugué sur l'anticorps trastuzumab **54**. Cependant, les immunoconjugués **141** et **142** se sont révélés non-sélectifs. Les évaluations *in vitro* ont révélé une activité cytotoxique de l'ordre du nanomolaire sur les cellules SKBR3, HER2 positives, mais également sur une lignée MDA-MB-231, HER2 négative. De plus, ces composés ont montré une très mauvaise stabilité, sûrement due à l'hydrolyse de la liaison ester.

Cependant, afin de générer des ADCs stables et efficaces, l'analogue vérubuline-NH-Me **139** semble être un bon candidat. Cette molécule est composée d'une amine secondaire pouvant être modifiée en vue d'y incorporer un linker. Dans le but de bioconjuguer cette molécule, nous prévoyons de tester différents linkers, clivables et non-clivables, qui seront attachés à la vérubuline-NH-Me **139** à l'aide d'une liaison amide ou carbamate. Ainsi, ces liaisons, plus stables qu'un lien ester, nous permettraient d'obtenir des immunoconjugués stables dont l'activité cytotoxique sera évaluée *in vitro*.

## Partie expérimentale

### Material and methods.

All reagents were obtained from commercial sources and used without prior purifications. Dry solvents were obtained from Merck. Unless otherwise indicated, reactions were carried out under an argon atmosphere in flame-dried glassware with magnetic stirring. Air and/or moisture-sensitive liquids were transferred via syringe. Organic solutions were concentrated by rotary evaporation at 40-60 °C. Volume ratios (v/v) are indicated when referring to mixtures of solvents (e.g. DCM/MeOH 95:5). Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed using plates aluminium sheets (silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Ref. 1.05554). Visualization was achieved under a 254 or 365 nm UV light and by immersion in an appropriate staining solution. Silica gel for column chromatography was purchased from Merck (Geduran® Si 60, 40-63 µm).

NMR: <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded at 23 °C on Bruker Avance III - 400 MHz / 500 MHz spectrometers. Recorded shifts are reported in parts per million (δ) and calibrated using residual nondeuterated solvent. Data are represented as follows: chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad, app = apparent), coupling constant (*J*, Hz), integration and assignment for <sup>1</sup>H NMR data.

Analytical LC-MS analyses were carried out on Waters ARC separations module equipped with Waters 2998 PDA UV detector, Waters Acquity QDa mass detector and XBridge®, 3.5 µm, C18, 50 x 4.6 mm column. The flow rate was 1 mL/min and the solvent system was composed as follows: solvent A: 0.05% TFA in water; solvent B: acetonitrile. The gradient run was: 0 to 5 min. – 5% to 95% B; 5 to 6 min. – 95% B; 6 to 7 min. – 5% B. Mass detector was operated in positive MS Scan mode with 600 °C probe temperature, 1.5 kV capillary voltage and 10 V cone voltage.

High resolution mass spectra (HRMS) were obtained using an Agilent Q-TOF 6520.

IR spectra were recorded in a Thermo-Nicolet FT/IR-380 spectrometer. Spectra were interpreted with OMNIC 9 software and are reported in cm<sup>-1</sup>. The abbreviations used are w (weak), m (medium), s (strong).

Melting points (Mp) were measured with a Stuart Scientific Melting point apparatus SMP3.

The concentration in antibody and antibody conjugates was determined either by UV absorbance using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) or using a BCA Protein Assay Kit (Ref. 23225, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Antibody deglycosylation was achieved with Remove-iT® Endo S (New England Biolabs, Ipswich, U.S.A.).

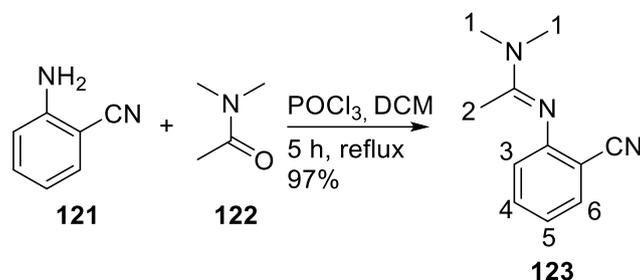
Size Exclusion Chromatography hyphenated to non-denaturing Mass Spectrometry The BioAccord system (Waters, Manchester, UK) comprising a binary solvent manager, a sample manager cooled at 8 °C, a column oven maintained at room temperature and an UV detector operating at 280 nm and 214 nm hyphenated to the ACQUITY RDa detector was used for the online SEC-native MS instrumentation. Around twenty micrograms of antibody were loaded on the ACQUITY UPLC Protein BEH SEC column (2.1 x 150 mm, 1.7 µm particle size, 200 Å pore size) from Waters (Manchester, UK) using 0.100 mL/min flow rate and isocratic elution of 100 mM ammonium acetate (NH<sub>4</sub>OAc) at pH 6.9 for a 6 minutes total run. The ACQUITY RDa detector (TOF analyzer) was operated in positive mode with a capillary voltage

of 1.5 kV while sample cone and desolvation temperature were set to 120 or 160 V (cystein or lysine conjugate) and 250 °C, respectively. Acquisitions were performed under full scan mode and high mass range (400–7,000 m/z) with 2 Hz scan rate. The mass spectrometer was calibrated using the ACQUITY RDa Detector Calibrant and Wash Kit (Waters, Manchester, UK, ref. 186009013). The ACQUITY RDa Waters connect LockMass Kit (Waters, Manchester, UK, ref. 186009298) was used before and after each injection in order to compensate for mass variations due to temperature changes in the laboratory. UNIFI Scientific Information System (Waters, Manchester, UK) was used as a single solution to encompass data acquisition and processing. Average DoC values were calculated using equation (1):

$$DoC = \frac{(\sum_{k=0}^8 k \times intensity\ DoCk)}{\sum_{k=0}^8 intensity\ DoCk} \quad (1)$$

These results were derived from the relative peak intensities measured from deconvoluted mass spectra, following a method developed and validated by the Cianféroni group.<sup>275</sup>

### Synthesis of (*E*)-*N'*-(2-cyanophenyl)-*N,N*-dimethylacetimidamide **123**



Dimethylacetamide **122** (1 equiv., 1,05 mL, 11.28 mmol) and POCl<sub>3</sub> (1.1 equiv., 1.16 mL, 12.4 mmol) were dissolved in DCM (40 mL) and the mixture was allowed to stir 30 min at 25 °C. Then anthranilonitrile **121** (1.5 equiv., 2 g, 16.92 mmol) was added and the mixture was allowed to stir at reflux for 5 h. The reaction mixture was cooled down to room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. Cold water (70 mL) is added and the pH was adjusted to 8 with NaOH (1 M) and the aqueous layer was extracted with DCM (3x100 mL). Organic layers were combined, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by chromatographic column (eluent, 100% EtOAc) and afforded **123** with 97% yield (2.05 g, 10.97 mmol) as a white solid.

**TLC:** R<sub>f</sub> (EtOAc 3:7 cyclohexane) = 0.32.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 7.49 (ddd, *J* = 7.7, 1.4, 1H, H<sub>3</sub>), 7.39 (ddd, *J* = 8.2, 7.7, 1.4 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6.94 (td, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 6.81 – 6.77 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 3.07 (s, 6H, H<sub>1</sub>), 1.90 (s, 3H, H<sub>2</sub>).

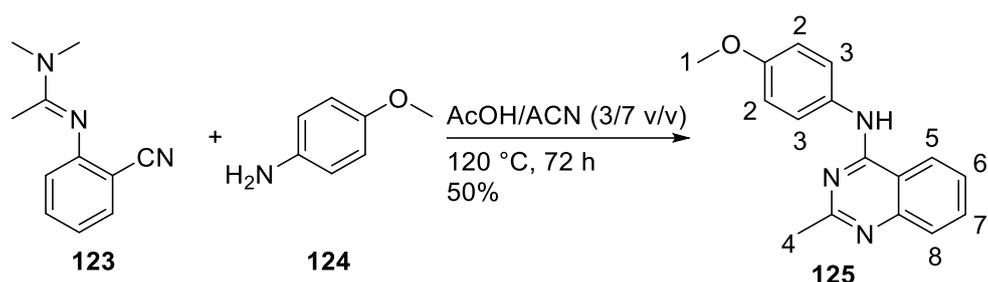
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 157.8, 155.6, 133.2, 132.8, 123.5, 121.3, 118.6, 105.9, 38.2, 15.4.

**ν<sub>max</sub> (thin film) /cm<sup>-1</sup>:** 2929, w), 2799 (w), 2214 (s), 1582 (s), 1549 (s), 1463 (m), 1441 (m), 1412 (m), 1395 (s), 1363 (s), 1314 (m), 1291 (m), 1218 (m), 1191 (m), 1168 (m), 1099 (w), 1060 (w), 1043 (w), 1021 (m), 960 (w), 874 (w), 838 (w), 784 (m), 755 (s), 721 (w), 594 (w), 565 (m), 519 (m), 487 (m), 456 (w).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 188.1182, found 188.1186.

**Melting point:** 73.9 °C.

## Synthesis of verubulin-NH **125**



To a solution of (*E*)-*N'*-(2-cyanophenyl)-*N,N*-dimethylacetimidamide **123** (1 equiv., 400 mg, 2.14 mmol) in 10 mL of AcOH/ACN (3/7 v/v) was added *p*-anisidine **124** (1.1 equiv., 289.6 mg, 2.35 mmol) and the solution was stirred at 120 °C for 72 h. The reaction mixture was cooled down to room temperature and the solvent was removed under reduced pressure. 50 mL of EtOAc was added, the organic layer was washed with NaHCO<sub>3</sub> (3x50 mL, aq., sat.), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by chromatographic column (eluent, DCM 1:1 EtOAc) and afforded **125** with 50% yield (289.2 mg, 1.09 mmol) as a white solid.

**TLC:** R<sub>f</sub> (DCM 1:1 EtOAc) = 0.45.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 7.90 – 7.84 (m, 1H, H8), 7.81 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H, H5), 7.71 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.2 Hz, 1H, H7), 7.69 – 7.63 (m, 2H, H2), 7.43 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.2 Hz, 1H, H6), 6.97 – 6.89 (m, 2H, H3), 3.81 (s, 3H, H1), 2.66 (s, 3H, H4).

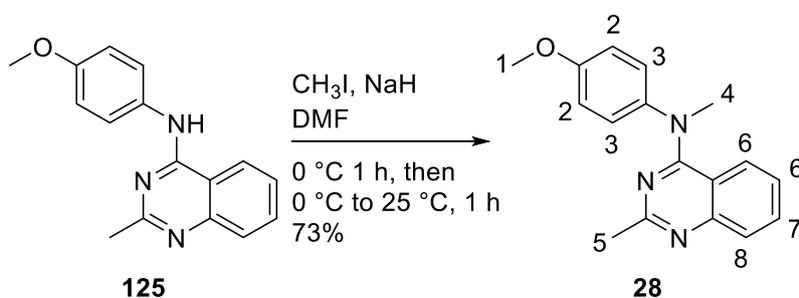
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 164.1, 157.5, 156.5, 150.2, 132.8, 131.5, 127.8, 125.5, 123.3, 120.5, 114.2, 113.1, 55.5, 26.5.

**v<sub>max</sub> (thin film) /cm<sup>-1</sup>:** 3052 (w), 3003 (w), 2914 (w), 2837 (w), 1645 (w), 1615 (m), 1598 (m), 1558 (m), 1509 (s), 1464 (m), 1441 (m), 1421 (m), 1406 (m), 1384 (s), 1353 (m), 1299 (m), 1235 (s), 1222 (s), 1182 (m), 1170 (m), 1131 (w), 1104 (m), 1029 (m), 1029 (w), 999 (w), 882 (w), 854 (w), 822 (w), 793 (m), 768 (m), 756 (m), 713 (w), 678 (m), 644 (m), 627 (w), 565 (m), 522 (m), 512 (m), 464 (w), 442 (w).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 266.1288, found 266.1294.

**Melting point:** 189.4 °C.

## Synthesis of Verubulin **28**



Verubulin-NH **125** (1equiv., 100 mg, 0.38 mmol) was dissolved in DMF (10 mL) and was cooled down to 0 °C. Sodium hydride 60% in mineral oil (2 equiv., 29 mg, 0.76 mmol) and iodomethane (24 equiv., 1.4 mL, 9.12 mmol) were added and the solution was stirred at 0 °C for 1 h and warmed to 25 °C for 1 h. Reaction was quenched by addition of water (0.5 mL) and diluted with EtOAc (50 mL). The organic layer was washed with water (1x50 mL) and brine (5x50 mL, aq., sat.), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by chromatographic column (eluent, 100% EtOAc) and afforded **28** with 73% yield (77 mg, 0.28 mmol) as a light brown solid.

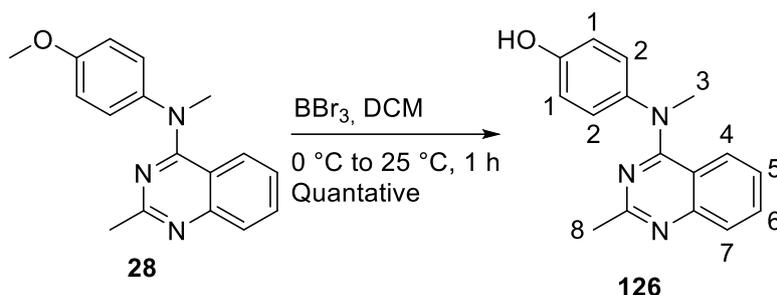
**TLC:** Rf (100% EtOAc) = 0.38.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 7.75 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H8), 7.51 (ddd, *J* = 8.4, 6.5, 1.7 Hz, 1H, H7), 7.13 – 7.07 (m, 2H, H2), 7.02 – 6.93 (m, 2H, H6), 6.90 (dd, *J* = 7.3, 5.1 Hz, 2H, H3), 3.82 (s, 3H, H1), 3.58 (s, 3H, H4), 2.72 (s, 3H, H5).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 163.2, 161.6, 157.9, 151.8, 141.4, 131.7, 127.4, 127.2, 126.2, 123.9, 115.2, 114.6, 55.5, 42.7, 26.4.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 280.1444, found 280.1451.

#### Synthesis of Verubulin-OH **126**



Verubulin **28** (1 equiv., 89 mg, 0.319 mmol) was dissolved in DCM (5 mL) and was cooled down to 0 °C. Boron tribromide (4 equiv., 123 μL, 1.275 mmol) was added slowly and the solution was stirred 1 h at 25 °C. Reaction was followed with LC-MS by addition of 10 μL of reaction media in 190 mL of methanol to quench the reaction. After all starting material was consumed, methanol (2 mL) was added to quench the reaction at 0 °C. The mixture was diluted with water (10 mL) and extracted twice with DCM (30 mL) then twice with EtOAc (30 mL). Organic layers were combined and washed with brine (aq., sat., 60 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The residue was triturated in Et<sub>2</sub>O and afforded **126** with a quantitative yield (84 mg, 0.317 mmol) as a yellow solid.

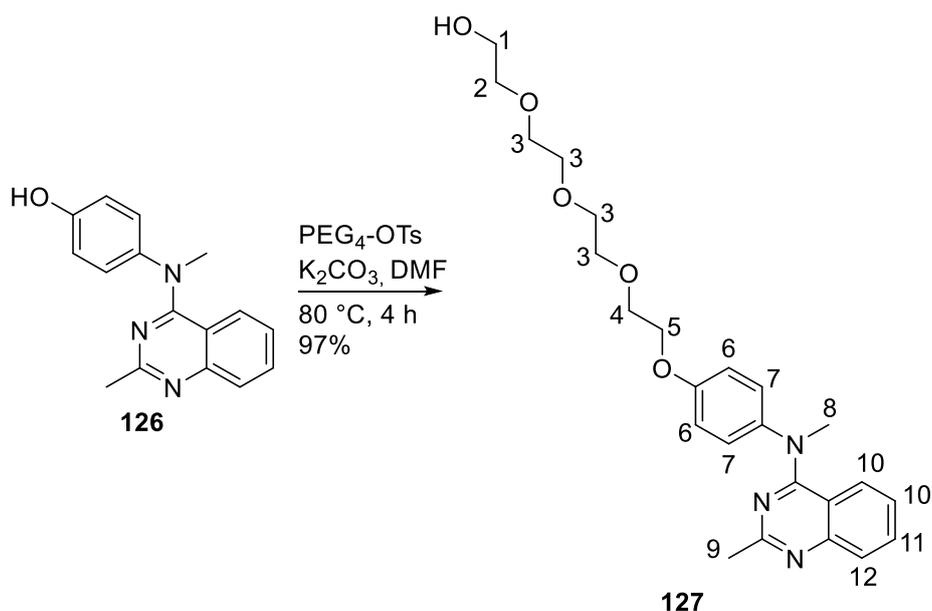
**TLC:** Rf (100% EtOAc) = 0.38.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>, δ ppm):** 7.82 (ddd, *J* = 8.4, 7.1, 1.2 Hz, 1H, H6), 7.68 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H, H7), 7.28 – 7.22 (m, H1 & H4), 7.08 – 6.90 (m, 3H, H2 & H5), 3.81 (s, 3H, H3), 2.77 (s, 3H, H8).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 162.3, 161.3, 159.9, 141.7, 137.4, 136.4, 128.9, 128.6, 127.8, 119.7, 118.4, 113.6, 44.9, 22.4.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 266.1288, found 266.1301.

## Synthesis of Verubulin-O-PEG<sub>4</sub> **127**



Verubulin-OH **126** (1.05 equiv., 11.9 mg, 0.045 mmol), PEG<sub>4</sub>-OTs (1 equiv., 14.9 mg, 0.043) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.5 equiv., 14 mg, 0.101 mmol) were dissolved in DMF (2 mL) and the mixture was allowed to stir 4 h at 80 °C. Solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in a mix of water (10 mL) and DCM (10 mL). Aqueous layer was extracted with DCM (3 x 20 mL). The combined organic phases were washed with a solution of NaOH 10% (aq., 20 mL), with water (20 mL) and brine (aq., sat., 3 x 20 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography (eluent, 100% EtOAc, then DCM 95:5 MeOH) and afforded **126** with 97% yield (18.3 mg, 0.042 mmol) as a yellow oil.

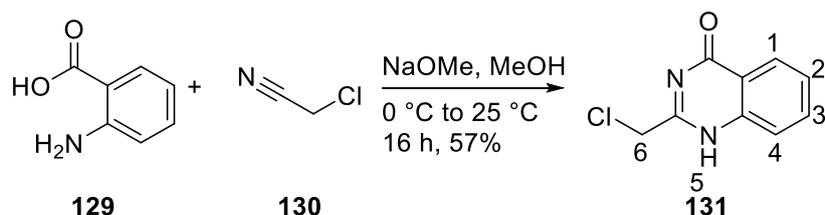
**TLC:** R<sub>f</sub> (100% EtOAc) = 0.38.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>, δ ppm):** 7.64 (dd, *J* = 8.3, 1.0 Hz, 1H, H12), 7.56 (ddd, *J* = 8.3, 5.6, 2.6 Hz, 1H, H11), 7.16 – 7.13 (m, 2H, H6), 7.00 (m, 4H, H7 & H10), 4.17 – 4.12 (m, 2H, H5), 3.88 – 3.82 (m, 2H, H1), 3.73 – 3.70 (m, 2H, H4), 3.69 – 3.62 (m, 8H, H3), 3.57 (s, 3H, H8), 3.55 (dd, *J* = 5.5, 4.0 Hz, 2H, H2), 2.64 (s, 3H, H9).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub> δ ppm):** 163.0, 161.6, 157.8, 150.8, 140.9, 131.9, 127.3, 126.2, 125.7, 123.99, 115.7, 114.1, 72.3, 70.3, 70.2, 70.2, 70.0, 69.4, 67.5, 60.8, 24.4.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> [M+H<sup>+</sup>] 442.2336, found 442.2372.

## Synthesis of 2-(chloromethyl)quinazolin-4(1H)-one **131**



NaOMe (1.1 equiv., 864 mg, 15.99 mmol) was dissolved in methanol (16 mL) and was allowed to stir at 0 °C. Chloroacetonitrile **130** (3 equiv., 2.8 mL, 43.8 mmol) was added dropwise over 30 min at 0 °C.

A solution of anthranilic acid **129** (1 equiv., 2 g, 14.59 mmol) in MeOH (4 mL) was added dropwise over 30 min at 0 °C and the mixture was allowed to stir 16 h at 25 °C. The final product appeared as a white precipitate. The precipitate was filtered and washed with cold water. The pure compound was dried under reduced pressure and afforded **131** with 57% yield (1.61 g, 8.27 mmol) as a white solid.

**TLC:** Rf (EtOAc 4:6 cyclohexane) = 0.29.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):** 12.58 (s, 1H, H5), 8.12 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H, H1), 7.83 (td, *J* = 8.1, 7.3, 1.4 Hz, 1H, H3), 7.68 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H4), 7.55 (td, *J* = 8.1, 7.3, 1.4 Hz, 1H, H2), 4.55 (s, 2H, H6).

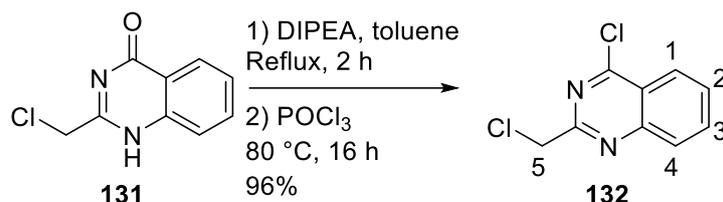
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):** 161.5, 152.3, 148.2, 134.6, 127.3 (2C), 125.9, 121.2, 43.2.

**$\nu_{\max}$  (thin film) /cm<sup>-1</sup>:** 3041 (br), 2809 (m), 1680 (s), 1607 (s), 1563 (w), 1513 (w), 1467 (m), 1453 (m), 1343 (w), 1328 (s), 1267 (m), 1253 (m), 1157 (m), 1132 (w), 1031 (w), 1006 (m), 941 (w), 898 (m), 864 (m), 775 (s), 755 (m), 694 (s), 686 (s), 637 (m), 597 (m), 576 (w), 534 (w), 493 (w), 469 (w), 430 (w).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H<sup>+</sup>] 195.0320, found 195.0326.

**Melting point:** 251.0 °C.

#### Synthesis of 4-chloro-2-(chloromethyl)quinazoline **132**



To a solution of 2-(chloromethyl)quinazolin-4(1H)-one **131** (1 equiv., 1 g, 5.14 mmol) in toluene (20 mL) was added DIPEA (1.5 equiv., 1.35 mL, 7.72 mmol) and the mixture was allowed to stir at reflux for 2 h. The mixture was cooled down to 80 °C and phosphoryl chloride (1.5 equiv., 0.72 mL, 7.71 mmol) was added to the warm solution. The mixture was allowed to stir 16 h at 80 °C. The reaction media was cooled down to room temperature and diluted with EtOAc (50 mL). The organic layer was washed with water (20 mL), citric acid 1 M (4 x 20 mL, aq.), water (20 mL), NaHCO<sub>3</sub> (20 mL, aq., sat.), brine (20 mL, aq., sat.), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure. The pure product was dried under reduced pressure and afforded **132** with 96% yield (1.06 g, 4.92 mmol) as a brown solid.

**TLC:** Rf (EtOAc 1:9 cyclohexane) = 0.37.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):** 8.29 (ddd, *J* = 8.4, 1.4, 1.3 Hz, 1H, H1), 8.12 – 8.05 (m, H4), 7.99 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.3 Hz, 1H, H3), 7.76 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.3 Hz, 1H, H2), 4.85 (s, 2H, H5).

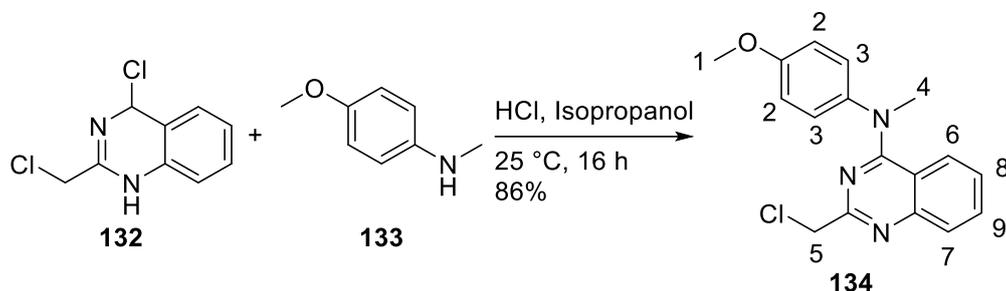
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):** 163.4, 160.9, 151.4, 135.5, 129.5, 128.9, 125.9, 122.7, 46.9.

**$\nu_{\max}$  (thin film) /cm<sup>-1</sup>:** 3065 (w), 3020 (w), 2967 (w), 1611 (m), 1556 (s), 1504 (w), 1480 (s), 1458 (m), 1425 (m), 1382 (m), 1339 (m), 1325 (m), 1299 (s), 1252 (m), 1215 (m), 1162 (w), 1150 (w), 1131 (w), 1020 (w), 992 (m), 945 (m), 917 (m), 870 (w), 842 (w), 819 (w), 796 (w), 766 (s), 751 (s), 679 (m), 639 (s), 605 (m), 543 (w), 527 (w), 501 (w), 471 (m).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H<sup>+</sup>] 212.9981, found 212.9979.

**Melting point:** 106.3 °C.

#### Synthesis of verubulin-CH<sub>2</sub>-Cl **134**



4-chloro-2-(chloromethyl)quinazoline **132** (1 equiv., 300 mg, 1.39 mmol) and 4-methoxy-*N*-methylaniline **133** (1.1 equiv., 210.5 mg, 1.53 mmol) were dissolved in isopropanol (5 mL). Concentrated HCl (12 M in water, 90  $\mu$ L) was added and the mixture was stirred 16 h at 25 °C resulting of a yellow precipitate. The precipitate was filtered and washed with cold isopropanol. The pure product was dried under reduced pressure and afforded **134** with 86% yield (373 mg, 1.19 mmol) as a yellow solid.

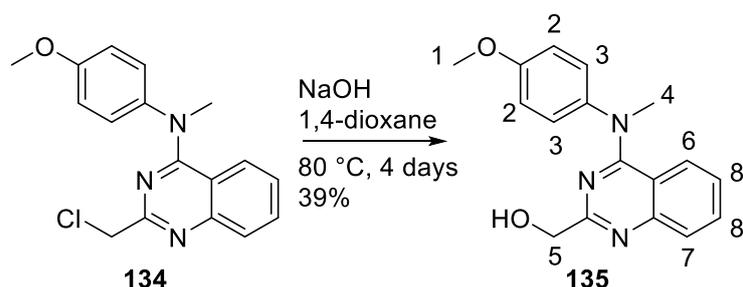
**TLC:** R<sub>f</sub> (EtOAc 2:8 cyclohexane) = 0.34.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):**  $\delta$  8.25 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, H7), 7.52 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, H9), 7.02 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H, H2), 6.97 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, H8), 6.84 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H, H3), 6.56 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, H6), 4.84 (s, 2H, H5), 3.68 (s, 3H, H1), 3.62 (s, 3H, H4).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 161.1, 160.4, 157.4, 140.8, 136.9, 135.5, 127.8, 127.4, 126.8, 121.5, 116.3, 112.6, 55.9, 45.0, 41.8.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>3</sub>O<sup>+</sup> [M+H<sup>+</sup>] 314.1055, found 314.1061.

#### Synthesis of verubulin-CH<sub>2</sub>-OH **135**



Verubulin-CH<sub>2</sub>-Cl **134** (1 equiv., 150 mg, mmol) was dissolved in 1,4-dioxane (7 mL). NaOH (2 M, 2.2 mL) was added and the mixture was stirred 4 days at 80 °C. The cooled crude product was diluted with EtOAc (50 mL), washed once with water (50 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by chromatographic column (eluent, EtOAc 1:1 cyclohexane) and afforded **135** with 39% yield (55.1 mg, 0.19 mmol) as a yellow solid.

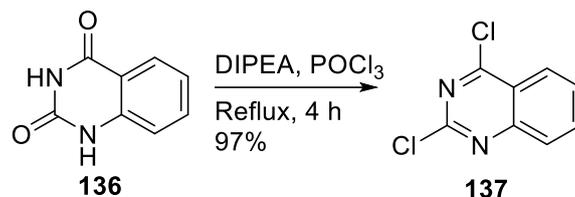
**TLC:** R<sub>f</sub> (EtOAc 4:6 cyclohexane) = 0.30.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 7.77 (dt, *J* = 8.3, 1.0 Hz, 1H, H7), 7.56 (dt, *J* = 8.3, 4.1 Hz, 1H, H6), 7.17 – 7.08 (m, 2H, H2), 7.05 – 6.97 (m, 2H, H3), 6.96 – 6.89 (m, 2H, H8), 4.79 (s, 2H, H5), 3.84 (s, 3H, H1), 3.59 (s, 3H, H4).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, , CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 163.3, 161.7, 158.5, 151.2, 141.0, 132.3, 127.7, 127.5, 126.6, 124.6, 115.6, 115.5, 64.5, 55.7, 43.0.

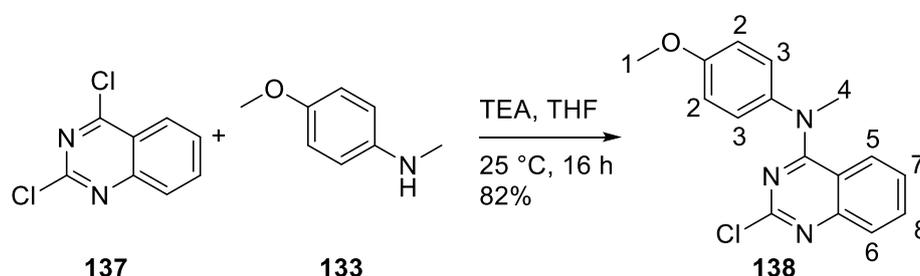
**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H<sup>+</sup>] 296.1394, found 296.1400.

### Synthesis of 2,4-dichloroquinazoline **137**



To a round bottom flask containing benzoyleneurea **136** (1 equiv., 200 mg, 1.23 mmol) were added phosphoryl chloride (5 mL) and DIPEA (2 equiv., 430 μL, 2.47 mmol). The reaction was allowed to stir at reflux for 4 h. The reaction was allowed to cooled down to room temperature and excess of phosphoryl chloride was removed by evaporation under reduced pressure. Cold water was added to the residue, the resulting suspension was filtered and washed with water to afford **137** as a white solid (237 mg, 1.19 mmol, 97%). Due to the instability of this compound, it was used as-it-is with no further purification.

### Synthesis of verubulin-Cl **138**



To a solution of 2,4-dichloroquinazoline **137** (1.1 equiv., 237 mg, 1.19 mmol) in THF (5 mL) was added TEA (1.7 equiv., 256.5 μL, 1.84 mmol) and 4-methoxy-*N*-methylaniline **133** (1 equiv., 148.4 mg, 1.08 mmol). The reaction was allowed to stir 16 h at 25 °C. 20 mL of DCM was added, organic layer was washed once with brine (aq., sat., 20 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatographic column (eluent, EtOAc 1:9 cyclohexane) and afforded **138** with 82% yield (72% over two steps) (264 mg, 0.88 mmol) as a pale yellow solid.

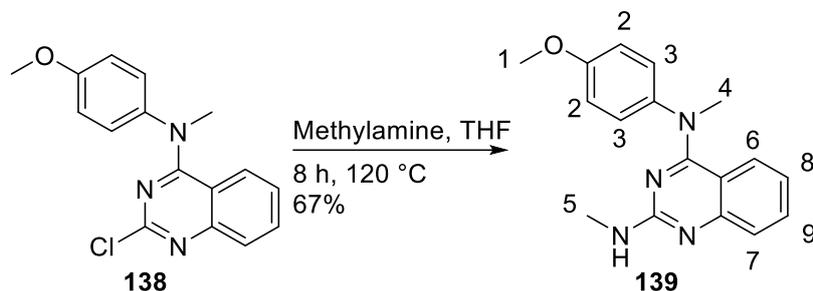
**TLC:** R<sub>f</sub> (EA 1:9 cyclohexane) = 0.3.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** δ 7.76 – 7.70 (m, 1H, H, H6), 7.55 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.5 Hz, 1H, H8), 7.18 – 7.11 (m, 2H, H2), 7.00 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.5 Hz, 1H, H5), 6.96 – 6.93 (m, 2H, H3), 6.91 (ddd, *J* = 8.4, 1.5, 1.5 Hz, 1H, H7), 3.85 (s, 3H, H1), 3.60 (s, 3H, H4).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, , CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 162.7, 158.9, 156.6, 152.9, 140.1, 132.8, 127.7, 127.6, 126.5, 125.1, 115.6, 114.9, 55.7, 43.4.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>3</sub>O<sup>+</sup> [M+H<sup>+</sup>] 300.0898, found 300.0907.

### Synthesis of verubulin-NH-Me **139**



Verubulin-Cl **138** (1 equiv., 100 mg, 0.33 mmol) was added to a solution of methylamine in THF (2 M, 2 mL, 12 equiv., 4 mmol) and the reaction was allowed to stir 8 h at 120 °C (microwave). Solvent was removed under reduced pressure and crude product was dissolved with 20 mL of EtOAc. Organic layer was washed one with brine (aq., sat., 20 mL), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatographic column (eluent: EtOAc 1:1 cyclohexane, then 100% EtOAc) and afforded **139** with 67% yield (64 mg, 0.22 mmol) as a white/yellow solid.

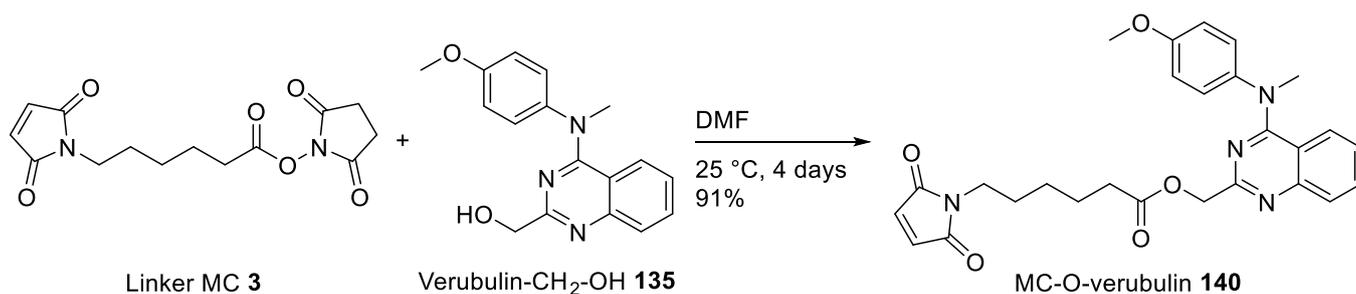
**TLC:** R<sub>f</sub> (100% EtOAc) = 0.22

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** δ 7.45 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 1H, H7), 7.37 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.4 Hz, 1H, H9), 7.13 – 7.08 (m, 2H, H2), 6.92 – 6.88 (m, 2H, H3), 6.86 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 1H, H6), 6.67 (ddd, *J* = 8.4, 6.8, 1.4 Hz, 1H, H8), 3.83 (s, 3H, H1), 3.51 (s, 3H, H4), 3.11 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H, H5).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, , CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** δ 162.7, 159.3, 158.0, 153.3, 141.7, 132.1, 127.4, 126.9, 125.2, 120.4, 115.2, 112.6, 55.6, 42.9, 28.6.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sup>+</sup> [M+H<sup>+</sup>] 295.1553, found 295.1561.

### Synthesis of MC-O-verubulin **140**

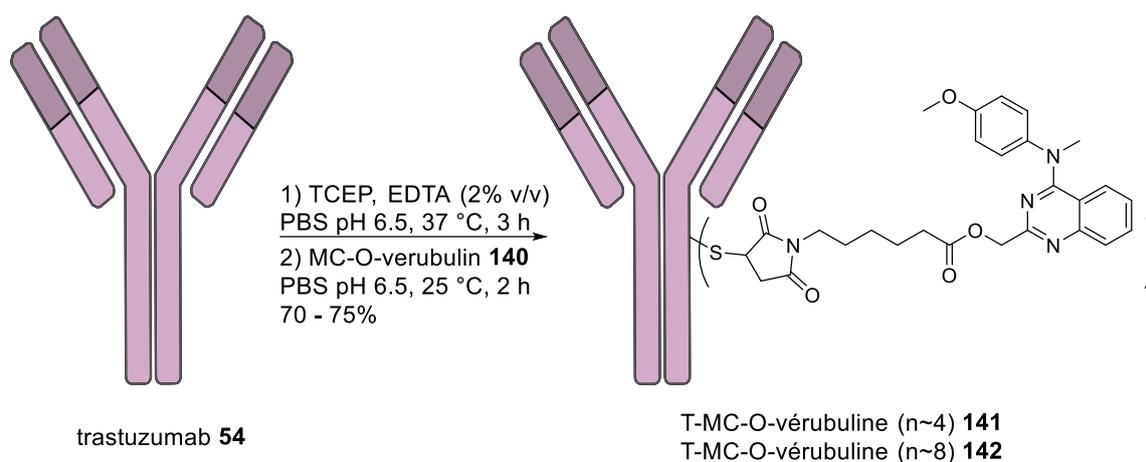


Verubulin-CH<sub>2</sub>-OH **135** (1 equiv., 10 mg, 0.034 mmol) and linker MC **3** (1.2 equiv., 12.6 mg, 0.041 mmol) were dissolved in DMF (300 μL) and the mixture was allowed to stir for 4 days at 25 °C. Reaction media was concentrated under reduced pressure. Crude product was purified by chromatographic column (eluent EtOAc 1:1 cyclohexane) and afforded **140** with 91 % yield (15.1 mg, 0.031 mmol) as a yellow oil.

**TLC:** R<sub>f</sub> (EtOAc 1:1 cyclohexane) = 0.35.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>)** calcd for C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> [M+H<sup>+</sup>] 489.2132, found 489.2150.

## Bioconjugaison of MC-O-verubulin 140



### Bioconjugation of MC-O-verubulin 140 on partially reduced antibodies

To a solution of trastuzumab **54** (1 equiv., 5 mg/ml, 100  $\mu$ L, 0.5 mg, 3.45 nmol) PBS pH 6.5 with EDTA (solution of 0,5 M) 1% v/v, was added TCEP (2 equiv., 10 mM in H<sub>2</sub>O mQ, 0.69  $\mu$ L, 6.9 nmol) and the mixture was incubated at 37 °C for 3 h. Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 6.5 to give a solution of partially reduced antibody.

Directly after, MC-O-verubulin **140** (20 equiv., 20 mM in DMSO, 3.45  $\mu$ L, 69 nmol) was added and the mixture was incubated at 25 °C for 2 h under argon atmosphere.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 7.5 to give a solution of antibody-verubulin.

Buffer was exchanged on viva spin to afforded **141** the final solution in PBS pH 7.5 with 70% yield (concentrations were measured by BCA assays). DoC was determined by native ESI-MS.

### Bioconjugation of MC-O-verubulin 140 on totally reduced antibodies

To a solution of trastuzumab **54** (1 equiv., 5 mg/ml, 100  $\mu$ L, 0.5 mg, 3.45 nmol, PBS pH 6.5 with EDTA (solution of 0,5 M) 1% v/v, was added TCEP (20 equiv., 10 mM in H<sub>2</sub>O mQ, 6.9  $\mu$ L, 69 nmol) and the mixture was incubated at 37 °C for 3 h.

Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 6.5 to give a solution of partially reduced antibody.

Directly after, MC-O-verubulin **140** (20 equiv., 20 mM in DMSO, 3.45  $\mu$ L, 69 nmol) was added and the mixture was incubated at 25 °C for 2 h under argon atmosphere. Excess of reagent was removed by gel filtration chromatography using Bio-spin P-30 columns (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) pre-equilibrated with PBS pH 7.5 to give a solution of antibody-verubulin.

Buffer was exchanged on viva spin to afforded **142** the final solution in PBS pH 7.5 with 75% yield (concentrations were measured by BCA assays). DoC was determined by native ESI-MS.

## Conclusion Générale

### Projet 1 : Développement d'anticorps bi-conjugués porteurs d'agents ciblant PARP3 et de molécules cytotoxiques pour le ciblage des cancers du sein triple négatif

Notre stratégie de thérapie combinatoire, entre le Me0328 **49** et l'étoposide **50**, a d'abord été évaluée, mais s'est avérée inefficace sur nos cellules. L'action de l'inhibiteur **49** ne permettait pas de générer une bonne inhibition de l'enzyme et l'action de l'étoposide **50** ne s'est pas vue améliorée en combinaison avec le siPARP3 **53**. Une autre combinaison a alors été évaluée, mettant en avant le fait que la déplétion de PARP3 par l'action du siPARP3 **53** potentialisait les effets cytotoxiques de la vincristine **22** sur nos cellules modèles. En se basant sur ces résultats, des anticorps conjugués au siPARP3 **53** ont été synthétisés et caractérisés. Le conjugué T-siPARP3 **77** a permis une déplétion de PARP3 de 80% à 100 nM, menant à une potentialisation des effets de la vincristine **22** libre d'un facteur 10. Ensuite, deux conjugués trastuzumab-vincristine ont été générés avec succès (l'un avec un DAR moyen de 4, l'autre avec un DAR homogène de 8) et ont montré une excellente cytotoxicité de 0,03 nM et 0,01 nM respectivement, ce qui est 20 fois plus toxique que la vincristine **22** seule. Ce résultat nous démontre que la vectorisation de la vincristine **22** permet d'augmenter fortement son activité cytotoxique, grâce à une meilleure internalisation. De plus, un ADC avec un DAR homogène après une réduction totale a été synthétisé, montrant qu'il est possible avec la vincristine **22** de pallier les problèmes d'hétérogénéité rencontrés avec les ADCs classiques tout en obtenant une activité cytotoxique encore meilleure. Afin d'évaluer les effets des conjugués anticorps-vincristine *in vivo*, un linker tripeptidique basé sur un motif Glu-Val-Cit a été synthétisé et utilisé pour la fonctionnalisation de la vincristine **22**. De nouveaux ADCs ont été générés et sont actuellement en phase d'études sur des modèles de souris xénotreffées.

A la suite de ces résultats prometteurs, nous avons décidé de produire un anticorps conjugué à la fois à la vincristine **22** et au siPARP3 **53**. Ainsi, les méthodes de conjugaison ont été opérées de façon successive sur un même anticorps, le trastuzumab **54**, et nous avons pu générer ces double-conjugués. Cependant, leur évaluation *in vitro* n'a pas pu permettre d'observer une réelle potentialisation, sûrement due à une mauvaise déplétion de PARP3 par le conjugué à de faibles concentrations et à des soucis de cinétique entre le siPARP3 **53** et la vincristine **22**. Afin d'améliorer la déplétion de PARP3, il serait possible de modifier différents paramètres tels que la proportion siPARP3/vincristine par anticorps, notamment en diminuant la quantité de vincristine conjuguée.

Une autre perspective serait de remplacer le siPARP3 **53** par un autre composé efficace à de plus faibles doses et fonctionnant par un mode d'action de nature catalytique. Dans ce but, il serait possible de générer des PROTACs (pour *proteolysis-targeting chimeras*) ciblant PARP3. Les PROTACs sont des molécules bi-fonctionnalisées permettant la dégradation de protéines par le système ubiquitine-protéasome. Cette stratégie pourrait nous permettre de nous affranchir de l'utilisation de siRNA, qui nécessite de grandes concentrations (par rapport au trastuzumab-vincristine) car les PROTACs fonctionnent de manière catalytique, donc à de faibles concentrations.

## Projet 2 : Développement de nouveaux ADCs conjugués à la véрубuline, une nouvelle classe de charge thérapeutique

Afin de développer une nouvelle classe de charges thérapeutiques hydrophiles, nous nous sommes penchés sur l'étude de la véрубuline **28**, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules. Cette molécule **28** a été synthétisée et différentes stratégies ont été mises en œuvre afin d'y incorporer un linker permettant sa vectorisation. Il s'avère que des analogues fonctionnalisés avec des groupements nucléophiles sont prometteurs, car ces groupements permettent d'avoir un point d'accroche sur la véрубuline **28** tout en conservant son activité. Deux molécules ont alors été générées en modifiant le motif quinazoline. Le premier analogue **135**, comportant un alcool primaire en position 3, a été fonctionnalisé avec un linker **3** via une liaison ester clivable ; permettant l'isolement d'un premier dérivé conjugable **140** de la véрубuline **28**. Cependant, après conjugaison, des soucis de stabilité dus à la fragilité de la liaison ester ont été observés par spectrométrie de masse. Ces premiers ADCs **141** et **142** ne sont donc pas révélés efficaces, ne permettant ni une sélectivité de cellules grâce à l'anticorps, ni une réelle augmentation de la cytotoxicité. Ainsi, le second analogue **139**, comportant une amine secondaire, a été synthétisé et permettrait, via la formation d'une liaison amide ou carbamate, d'obtenir des molécules plus stables. Des essais de conjugaison de ce dérivé sont en cours.

## Références

1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin* **71**, 209–249 (2021).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Harbeck, N. & Gnant, M. Breast cancer. *The Lancet* **389**, 1134–1150 (2017).
4. Suhail, Y. *et al.* Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Systems* **9**, 109–127 (2019).
5. Donepudi, M. S., Kondapalli, K., Amos, S. J. & Venkateshan, P. Breast cancer statistics and markers. *J Cancer Res Ther* **10**, 506–511 (2014).
6. McDonald, E. S., Clark, A. S., Tchou, J., Zhang, P. & Freedman, G. M. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. *J Nucl Med* **57**, 9S-16S (2016).
7. Nicolini, A., Carpi, A., Ferrari, P., Mario Biava, P. & Rossi, G. Immunotherapy and Hormone-therapy in Metastatic Breast Cancer: A Review and an Update. *CDT* **17**, 1127–1139 (2016).
8. Al-Hilli, Z. & Wilkerson, A. Breast Surgery. *Surgical Clinics of North America* **101**, 845–863 (2021).
9. Weber, W. P. *et al.* Standardization of oncoplastic breast conserving surgery. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* **43**, 1236–1243 (2017).
10. Osborne, M. P. & Borgen, P. I. Role of Mastectomy in Breast Cancer. *Surgical Clinics of North America* **70**, 1023–1046 (1990).
11. Veronesi, U., Boyle, P., Goldhirsch, A., Orecchia, R. & Viale, G. Breast cancer. *The Lancet* **365**, 1727–1741 (2005).
12. Wilson, D. J. Exercise for the Patient after Breast Cancer Surgery. *Seminars in Oncology Nursing* **33**, 98–105 (2017).
13. Fisusi, F. A. & Akala, E. O. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. *PNT* **7**, 3–23 (2019).

14. Tao, J. J., Visvanathan, K. & Wolff, A. C. Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *The Breast* **24**, S149–S153 (2015).
15. Montemurro, F., Nuzzolese, I. & Ponzzone, R. Neoadjuvant or adjuvant chemotherapy in early breast cancer? *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **21**, 1071–1082 (2020).
16. Provenzano, E. Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer: Moving Beyond Pathological Complete Response in the Molecular Age. *ama* **50**, 88 (2021).
17. Arter, C., Trask, L., Ward, S., Yeoh, S. & Bayliss, R. Structural features of the protein kinase domain and targeted binding by small-molecule inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* **298**, 102247 (2022).
18. García-Cárceles, J., Caballero, E., Gil, C. & Martínez, A. Kinase Inhibitors as Underexplored Antiviral Agents. *J. Med. Chem.* **65**, 935–954 (2022).
19. Bradley, J. A. & Mendenhall, N. P. Novel Radiotherapy Techniques for Breast Cancer. *Annu. Rev. Med.* **69**, 277–288 (2018).
20. Castaneda, S. A. & Strasser, J. Updates in the Treatment of Breast Cancer with Radiotherapy. *Surgical Oncology Clinics of North America* **26**, 371–382 (2017).
21. Taylor, C. W. & Kirby, A. M. Cardiac Side-effects From Breast Cancer Radiotherapy. *Clinical Oncology* **27**, 621–629 (2015).
22. Lipsett, A., Barrett, S., Haruna, F., Mustian, K. & O’Donovan, A. The impact of exercise during adjuvant radiotherapy for breast cancer on fatigue and quality of life: A systematic review and meta-analysis. *The Breast* **32**, 144–155 (2017).
23. Drăgănescu, M. & Carmocan, C. Hormone Therapy in Breast Cancer. *chr* **112**, 413 (2017).
24. Nayfield, S. G. Tamoxifen’s role in chemoprevention of breast cancer: An update. *J. Cell. Biochem.* **59**, 42–50 (1995).
25. Barchiesi, G. *et al.* Neoadjuvant Endocrine Therapy in Breast Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives. *IJMS* **21**, 3528 (2020).

26. El Sayed, R. *et al.* Endocrine and Targeted Therapy for Hormone-Receptor-Positive, HER2-Negative Advanced Breast Cancer: Insights to Sequencing Treatment and Overcoming Resistance Based on Clinical Trials. *Front. Oncol.* **9**, 510 (2019).
27. Radecka, B. & Litwiniuk, M. Breast cancer in young women. *Ginekol Pol* **87**, 659–663 (2016).
28. Kim, M. Y. Breast Cancer Metastasis. in *Translational Research in Breast Cancer* (eds. Noh, D.-Y., Han, W. & Toi, M.) vol. 1187 183–204 (Springer Singapore, 2021).
29. Shepard, H. M., Jin, P., Slamon, D. J., Pirot, Z. & Maneval, D. C. Herceptin. in *Therapeutic Antibodies* (eds. Chernajovsky, Y. & Nissim, A.) vol. 181 183–219 (Springer Berlin Heidelberg, 2008).
30. Howie, L. J. *et al.* FDA Approval Summary: Pertuzumab for Adjuvant Treatment of HER2-Positive Early Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* **25**, 2949–2955 (2019).
31. Markham, A. Margetuximab: First Approval. *Drugs* **81**, 599–604 (2021).
32. Strebhardt, K. & Ullrich, A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer* **8**, 473–480 (2008).
33. Tang, Y. *et al.* Impact of IgG subclass on molecular properties of monoclonal antibodies. *mAbs* **13**, 1993768 (2021).
34. Wang, W., Singh, S., Zeng, D. L., King, K. & Nema, S. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **96**, 1–26 (2007).
35. Landry, J. P., Ke, Y., Yu, G.-L. & Zhu, X. D. Measuring affinity constants of 1450 monoclonal antibodies to peptide targets with a microarray-based label-free assay platform. *Journal of Immunological Methods* **417**, 86–96 (2015).
36. Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispens, T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
37. Canfield, S. M. & Morrison, S. L. The binding affinity of human IgG for its high affinity Fc receptor is determined by multiple amino acids in the CH2 domain and is modulated by the hinge region. *Journal of Experimental Medicine* **173**, 1483–1491 (1991).

38. Spiteri, V. A. *et al.* Solution structure of deglycosylated human IgG1 shows the role of CH2 glycans in its conformation. *Biophysical Journal* **120**, 1814–1834 (2021).
39. Cymer, F., Beck, H., Rohde, A. & Reusch, D. Therapeutic monoclonal antibody N-glycosylation – Structure, function and therapeutic potential. *Biologicals* **52**, 1–11 (2018).
40. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
41. Todd, P. A. & Brogden, R. N. Muromonab CD3: A Review of its Pharmacology and Therapeutic Potential. *Drugs* **37**, 871–899 (1989).
42. Smith, S. L. Ten Years of Orthoclone OKT3 (Muromonab-CD3): A Review. *Journal of Transplant Coordination* **6**, 109–121 (1996).
43. Buss, N. A., Henderson, S. J., McFarlane, M., Shenton, J. M. & de Haan, L. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Current Opinion in Pharmacology* **12**, 615–622 (2012).
44. Borrebaeck, C. A. K., Malmberg, A.-C. & Ohlin, M. Does endogenous glycosylation prevent the use of mouse monoclonal antibodies as cancer therapeutics? *Immunology Today* **14**, 477–479 (1993).
45. Ober, R. J., Radu, C. G., Ghetie, V. & Ward, E. S. Differences in promiscuity for antibody–FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *International Immunology* **13**, 1551–1559 (2001).
46. Foster, R. H. & Wiseman, L. R. Abciximab: An Updated Review of its Use in Ischaemic Heart Disease. *Drugs* **56**, 629–665 (1998).
47. Kurosawa, K., Lin, W. & Ohta, K. Chimeric Antibodies. in *Human Monoclonal Antibodies* (ed. Steinitz, M.) vol. 1060 139–148 (Humana Press, 2014).
48. Pierpont, T. M., Limper, C. B. & Richards, K. L. Past, Present, and Future of Rituximab—The World’s First Oncology Monoclonal Antibody Therapy. *Front. Oncol.* **8**, 163 (2018).
49. Shirley, M. Daclizumab: A Review in Relapsing Multiple Sclerosis. *Drugs* **77**, 447–458 (2017).

50. Harding, F. A., Stickler, M. M., Razo, J. & DuBridge, R. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: Residual immunogenicity resides in the CDR regions. *mAbs* **2**, 256–265 (2010).
51. Lu, R.-M. *et al.* Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci* **27**, 1 (2020).
52. Bielekova, B. Daclizumab Therapy for Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **9**, a034470 (2019).
53. Ledsgaard, L., Kilstrup, M., Karatt-Vellatt, A., McCafferty, J. & Laustsen, A. Basics of Antibody Phage Display Technology. *Toxins* **10**, 236 (2018).
54. Hammers, C. M. & Stanley, J. R. Antibody Phage Display: Technique and Applications. *Journal of Investigative Dermatology* **134**, 1–5 (2014).
55. Alfaleh, M. A. *et al.* Phage Display Derived Monoclonal Antibodies: From Bench to Bedside. *Front. Immunol.* **11**, 1986 (2020).
56. Ledsgaard, L. *et al.* Advances in antibody phage display technology. *Drug Discovery Today* **27**, 2151–2169 (2022).
57. McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552–554 (1990).
58. Weinblatt, M. E. *et al.* Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: The ARMADA trial. *Arthritis & Rheumatism* **48**, 35–45 (2003).
59. Liu, J. K. H. The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations. *Annals of Medicine and Surgery* **3**, 113–116 (2014).
60. Lichtenstein, L. *et al.* Infliximab-Related Infusion Reactions: Systematic Review. *ECCOJC* **9**, 806–815 (2015).
61. Blauvelt, A. Safety of secukinumab in the treatment of psoriasis. *Expert Opinion on Drug Safety* **15**, 1413–1420 (2016).

62. Matera, M. G., Rogliani, P., Calzetta, L. & Cazzola, M. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of reslizumab in asthma. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **14**, 239–245 (2018).
63. Kaplon, H., Crescioli, S., Chenoweth, A., Visweswaraiyah, J. & Reichert, J. M. Antibodies to watch in 2023. *mAbs* **15**, 2153410 (2023).
64. Zhang, J., Huang, D., Saw, P. E. & Song, E. Turning cold tumors hot: from molecular mechanisms to clinical applications. *Trends in Immunology* **43**, 523–545 (2022).
65. Fu, Z., Li, S., Han, S., Shi, C. & Zhang, Y. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther* **7**, 93 (2022).
66. Drago, J. Z., Modi, S. & Chandarlapaty, S. Unlocking the potential of antibody–drug conjugates for cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **18**, 327–344 (2021).
67. Bouchard, H., Viskov, C. & Garcia-Echeverria, C. Antibody–drug conjugates—A new wave of cancer drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **24**, 5357–5363 (2014).
68. Jain, N., Smith, S. W., Ghone, S. & Tomczuk, B. Current ADC Linker Chemistry. *Pharm Res* **32**, 3526–3540 (2015).
69. Peters, C. & Brown, S. Antibody–drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Bioscience Reports* **35**, e00225 (2015).
70. Hattori, M., Frazier, J. & Miles, H. T. Poly(8-aminoguanilyc acid): formation of ordered self-structures and interaction with poly(cytidylic acid). *Biochemistry* **14**, 5033–5045 (1975).
71. Hall, E. J. THE BYSTANDER EFFECT: *Health Physics* **85**, 31–35 (2003).
72. Staudacher, A. H. & Brown, M. P. Antibody drug conjugates and bystander killing: is antigen-dependent internalisation required? *Br J Cancer* **117**, 1736–1742 (2017).
73. Ali, S. *et al.* The EMA Review of Mylotarg (Gemtuzumab Ozogamicin) for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *The Oncologist* **24**, e171–e179 (2019).

74. Xu, Q., He, S. & Yu, L. Clinical Benefits and Safety of Gemtuzumab Ozogamicin in Treating Acute Myeloid Leukemia in Various Subgroups: An Updated Systematic Review, Meta-Analysis, and Network Meta-Analysis. *Front. Immunol.* **12**, 683595 (2021).
75. Lambert, J. *et al.* Gemtuzumab ozogamicin for *de novo* acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label, phase III ALFA-0701 trial. *Haematologica* **104**, 113–119 (2019).
76. Tong, J. T. W., Harris, P. W. R., Brimble, M. A. & Kavianinia, I. An Insight into FDA Approved Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules* **26**, 5847 (2021).
77. Heo, Y.-A. Mirvetuximab Soravtansine: First Approval. *Drugs* (2023) doi:10.1007/s40265-023-01834-3.
78. Tanimoto, T. *et al.* Differences in drug approval processes of 3 regulatory agencies: a case study of gemtuzumab ozogamicin. *Invest New Drugs* **31**, 473–478 (2013).
79. Makuch, R. W. & Shi, R. Comparison of Drug Approvals in Europe Versus the United States: An Analysis of Discrepancies Between Drug Products Reviewed by EMA and FDA. *Ther Innov Regul Sci* **48**, 362–366 (2014).
80. Norsworthy, K. J. *et al.* FDA Approval Summary: Mylotarg for Treatment of Patients with Relapsed or Refractory CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia. *The Oncologist* **23**, 1103–1108 (2018).
81. Mohyuddin, G. R., Banerjee, R., Alam, Z., Berger, K. E. & Chakraborty, R. Rethinking mechanisms of neurotoxicity with BCMA directed therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **166**, 103453 (2021).
82. Manzano, A. & Ocaña, A. Antibody-Drug Conjugates: A Promising Novel Therapy for the Treatment of Ovarian Cancer. *Cancers* **12**, 2223 (2020).
83. Sornay, C., Vaur, V., Wagner, A. & Chaubet, G. An overview of chemo- and site-selectivity aspects in the chemical conjugation of proteins. *R. Soc. open sci.* **9**, 211563 (2022).

84. Zhao, P. *et al.* Recent advances of antibody drug conjugates for clinical applications. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **10**, 1589–1600 (2020).
85. Chaubet, G., Thoreau, F. & Wagner, A. Recent, non-classical, approaches to antibody lysine modification. *Drug Discovery Today: Technologies* **30**, 21–26 (2018).
86. Jackson, D. Y. Processes for Constructing Homogeneous Antibody Drug Conjugates. *Org. Process Res. Dev.* **20**, 852–866 (2016).
87. Sang, H. *et al.* Conjugation Site Analysis of Lysine-Conjugated ADCs. in *Antibody-Drug Conjugates* (ed. Tumej, L. N.) vol. 2078 235–250 (Springer US, 2020).
88. Datta-Mannan, A. *et al.* The Properties of Cysteine-Conjugated Antibody-Drug Conjugates Are Impacted by the IgG Subclass. *AAPS J* **20**, 103 (2018).
89. You, J., Zhang, J., Wang, J. & Jin, M. Cysteine-Based Coupling: Challenges and Solutions. *Bioconjugate Chem.* **32**, 1525–1534 (2021).
90. Ponziani, S. *et al.* Antibody-Drug Conjugates: The New Frontier of Chemotherapy. *IJMS* **21**, 5510 (2020).
91. Sheyi, R., de la Torre, B. G. & Albericio, F. Linkers: An Assurance for Controlled Delivery of Antibody-Drug Conjugate. *Pharmaceutics* **14**, 396 (2022).
92. Mckertish, C. M. & Kayser, V. Advances and Limitations of Antibody Drug Conjugates for Cancer. *Biomedicines* **9**, 872 (2021).
93. Walles, M., Connor, A. & Hainzl, D. ADME and Safety Aspects of Non-cleavable Linkers in Drug Discovery and Development. *CTMC* **17**, 3463–3475 (2018).
94. Bargh, J. D., Isidro-Llobet, A., Parker, J. S. & Spring, D. R. Cleavable linkers in antibody–drug conjugates. *Chem. Soc. Rev.* **48**, 4361–4374 (2019).
95. Salomon, P. L. *et al.* Optimizing Lysosomal Activation of Antibody–Drug Conjugates (ADCs) by Incorporation of Novel Cleavable Dipeptide Linkers. *Mol. Pharmaceutics* **16**, 4817–4825 (2019).

96. Dal Corso, A., Cazzamalli, S., Gébleux, R., Mattarella, M. & Neri, D. Protease-Cleavable Linkers Modulate the Anticancer Activity of Noninternalizing Antibody–Drug Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **28**, 1826–1833 (2017).
97. Edupuganti, V. V. S. R., Tyndall, J. D. A. & Gamble, A. B. Self-immolative Linkers in Prodrugs and Antibody Drug Conjugates in Cancer Treatment. *PRA* **16**, 479–497 (2021).
98. Khongorzul, P., Ling, C. J., Khan, F. U., Ihsan, A. U. & Zhang, J. Antibody–Drug Conjugates: A Comprehensive Review. *Molecular Cancer Research* **18**, 3–19 (2020).
99. Li, C. *et al.* Clinical pharmacology of vc-MMAE antibody–drug conjugates in cancer patients: learning from eight first-in-human Phase 1 studies. *mAbs* **12**, 1699768 (2020).
100. Al Shaer, D., Al Musaimi, O., Albericio, F. & de la Torre, B. G. 2019 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals* **13**, 40 (2020).
101. Baah, S., Laws, M. & Rahman, K. M. Antibody–Drug Conjugates—A Tutorial Review. *Molecules* **26**, 2943 (2021).
102. Su, Z. *et al.* Antibody–drug conjugates: Recent advances in linker chemistry. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **11**, 3889–3907 (2021).
103. Forman, H. J., Zhang, H. & Rinna, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine* **30**, 1–12 (2009).
104. Kennedy, L., Sandhu, J. K., Harper, M.-E. & Cuperlovic-Culf, M. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules* **10**, 1429 (2020).
105. Matés, J. M., Campos-Sandoval, J. A., de los Santos-Jiménez, J. & Márquez, J. Glutaminases regulate glutathione and oxidative stress in cancer. *Arch Toxicol* **94**, 2603–2623 (2020).
106. Chari, R. V. J., Miller, M. L. & Widdison, W. C. Antibody-Drug Conjugates: An Emerging Concept in Cancer Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 3796–3827 (2014).
107. Goundry, W. R. F. & Parker, J. S. Payloads for Antibody–Drug Conjugates. *Org. Process Res. Dev.* **26**, 2121–2123 (2022).

108. Hafeez, U., Parakh, S., Gan, H. K. & Scott, A. M. Antibody–Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules* **25**, 4764 (2020).
109. Lafanechère, L. The microtubule cytoskeleton: An old validated target for novel therapeutic drugs. *Front. Pharmacol.* **13**, 969183 (2022).
110. Florian, S. & Mitchison, T. J. Anti-Microtubule Drugs. in *The Mitotic Spindle* (eds. Chang, P. & Ohi, R.) vol. 1413 403–421 (Springer New York, 2016).
111. Goodson, H. V. & Jonasson, E. M. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, a022608 (2018).
112. Chen, H., Lin, Z., Arnst, K., Miller, D. & Li, W. Tubulin Inhibitor-Based Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules* **22**, 1281 (2017).
113. Haider, K., Rahaman, S., Yar, M. S. & Kamal, A. Tubulin inhibitors as novel anticancer agents: an overview on patents (2013-2018). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **29**, 623–641 (2019).
114. Tagawa, S. *et al.* Microtubule inhibitor-based antibody–drug conjugates for cancer therapy. *OTT* 2227 (2014) doi:10.2147/OTT.S46887.
115. Kupchan, S. M. *et al.* Tumor inhibitors. LXXIII. Maytansine, a novel antileukemic ansa macrolide from *Maytenus ovatus*. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 1354–1356 (1972).
116. Prota, A. E. *et al.* A new tubulin-binding site and pharmacophore for microtubule-destabilizing anticancer drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 13817–13821 (2014).
117. Lopus, M. *et al.* Maytansine and Cellular Metabolites of Antibody-Maytansinoid Conjugates Strongly Suppress Microtubule Dynamics by Binding to Microtubules. *Molecular Cancer Therapeutics* **9**, 2689–2699 (2010).
118. Zhao, R. Y. *et al.* Synthesis and Evaluation of Hydrophilic Linkers for Antibody–Maytansinoid Conjugates. *J. Med. Chem.* **54**, 3606–3623 (2011).
119. Kovtun, Y. V. *et al.* Antibody-Maytansinoid Conjugates Designed to Bypass Multidrug Resistance. *Cancer Research* **70**, 2528–2537 (2010).

120. Trock, B. J., Leonessa, F. & Clarke, R. Multidrug Resistance in Breast Cancer: a Meta-analysis of MDR1/gp170 Expression and Its Possible Functional Significance. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **89**, 917–931 (1997).
121. Rubin, S. C. *et al.* Expression of P-glycoprotein in epithelial ovarian cancer: Evaluation as a marker of multidrug resistance. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **163**, 69–73 (1990).
122. Criscitiello, C., Morganti, S. & Curigliano, G. Antibody–drug conjugates in solid tumors: a look into novel targets. *J Hematol Oncol* **14**, 20 (2021).
123. Lambert, J. M. & Chari, R. V. J. Ado-trastuzumab Emtansine (T-DM1): An Antibody–Drug Conjugate (ADC) for HER2-Positive Breast Cancer. *J. Med. Chem.* **57**, 6949–6964 (2014).
124. Delgado, J. *et al.* The EMA review of trastuzumab emtansine (T-DM1) for the adjuvant treatment of adult patients with HER2-positive early breast cancer. *ESMO Open* **6**, 100074 (2021).
125. Verma, S. *et al.* Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* **367**, 1783–1791 (2012).
126. Ponte, J. F. *et al.* Mirvetuximab Soravtansine (IMGN853), a Folate Receptor Alpha–Targeting Antibody–Drug Conjugate, Potentiates the Activity of Standard of Care Therapeutics in Ovarian Cancer Models. *Neoplasia* **18**, 775–784 (2016).
127. Moore, K. N. *et al.* Phase 1 dose-escalation study of mirvetuximab soravtansine (IMGN853), a folate receptor  $\alpha$ -targeting antibody–drug conjugate, in patients with solid tumors: Mirvetuximab Soravtansine Phase 1 Study. *Cancer* **123**, 3080–3087 (2017).
128. Moore, K. N. *et al.* Phase III, randomized trial of mirvetuximab soravtansine versus chemotherapy in patients with platinum-resistant ovarian cancer: primary analysis of FORWARD I. *Annals of Oncology* **32**, 757–765 (2021).
129. Singh, S. B. Discovery and Development of Dolastatin 10-Derived Antibody Drug Conjugate Anticancer Drugs. *J. Nat. Prod.* **85**, 666–687 (2022).

130. Akaiwa, M., Dugal-Tessier, J. & Mendelsohn, B. A. Antibody–Drug Conjugate Payloads; Study of Auristatin Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **68**, 201–211 (2020).
131. Bai, R., Petit, G. R. & Hamel, E. Dolastatin 10, a powerful cytostatic peptide derived from a marine animal. *Biochemical Pharmacology* **39**, 1941–1949 (1990).
132. Bai, R., Pettit, G. R. & Hamel, E. Structure-activity studies with chiral isomers and with segments of the antimitotic marine peptide dolastatin 10. *Biochemical Pharmacology* **40**, 1859–1864 (1990).
133. Park *et al.* Pharmacokinetic and Metabolism Studies of Monomethyl Auristatin F via Liquid Chromatography-Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Molecules* **24**, 2754 (2019).
134. Bai, R. *et al.* Direct Photoaffinity Labeling by Dolastatin 10 of the Amino-terminal Peptide of  $\beta$ -Tubulin Containing Cysteine 12. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 30731–30740 (2004).
135. Miyazaki, K. *et al.* Synthesis and Antitumor Activity of Novel Dolastatin 10 Analogs. *Chem. Pharm. Bull.* **43**, 1706–1718 (1995).
136. Waight, A. B. *et al.* Structural Basis of Microtubule Destabilization by Potent Auristatin Anti-Mitotics. *PLoS ONE* **11**, e0160890 (2016).
137. Wang, Y.-J. *et al.* Marine Antibody–Drug Conjugates: Design Strategies and Research Progress. *Marine Drugs* **15**, 18 (2017).
138. Li, F. *et al.* Intracellular Released Payload Influences Potency and Bystander-Killing Effects of Antibody-Drug Conjugates in Preclinical Models. *Cancer Research* **76**, 2710–2719 (2016).
139. Moquist, P. N. *et al.* Novel Auristatins with High Bystander and Cytotoxic Activities in Drug Efflux–positive Tumor Models. *Molecular Cancer Therapeutics* **20**, 320–328 (2021).
140. Bryden, F. *et al.* Impact of cathepsin B-sensitive triggers and hydrophilic linkers on *in vitro* efficacy of novel site-specific antibody–drug conjugates. *Org. Biomol. Chem.* **16**, 1882–1889 (2018).
141. Moskowitz, C. H. *et al.* Five-year PFS from the AETHERA trial of brentuximab vedotin for Hodgkin lymphoma at high risk of progression or relapse. *Blood* **132**, 2639–2642 (2018).

142. Lynch, R. C. *et al.* **Polatuzumab vedotin with infusional chemotherapy (Pola-DA-EPCH-R) for untreated aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas.** *Blood Advances* bloodadvances.2022009145 (2022) doi:10.1182/bloodadvances.2022009145.
143. Powles, T. *et al.* Enfortumab Vedotin in Previously Treated Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med* **384**, 1125–1135 (2021).
144. Coleman, R. L. *et al.* Efficacy and safety of tisotumab vedotin in previously treated recurrent or metastatic cervical cancer (innovaTV 204/GOG-3023/ENGOT-cx6): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology* **22**, 609–619 (2021).
145. Ferreri, C. J. & Lee, H. C. Antibody Drug Conjugates in Multiple Myeloma. *Cancer J* **28**, 488–495 (2022).
146. Yu, B., Jiang, T. & Liu, D. BCMA-targeted immunotherapy for multiple myeloma. *J Hematol Oncol* **13**, 125 (2020).
147. Cardinali, G., Cardinali, G. & Centurelli, G. The Catharanthus Roseus (Vinca Rosea) Alkaloids: A New Glass of Stathmokinetic Agents. *Acta genet. med. gemellol.* **17**, 197–208 (1968).
148. Barnett, C. J. *et al.* Structure-activity relationships of dimeric Catharanthus alkaloids. 1. Deacetyl vinblastine amide (vindesine) sulfate. *J. Med. Chem.* **21**, 88–96 (1978).
149. Fahy, J. Modifications in the upper or Velbenamine Part of the Vinca Alkaloids have Major Implications for Tubulin Interacting Activities. *CPD* **7**, 1181–1197 (2001).
150. Bennouna, J., Delord, J.-P., Campone, M. & Nguyen, L. Vinflunine: A New Microtubule Inhibitor Agent. *Clinical Cancer Research* **14**, 1625–1632 (2008).
151. Martino, E. *et al.* Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **28**, 2816–2826 (2018).
152. M. Lucas, D., C. Still, P., Bueno Perez, L., R. Grever, M. & Douglas Kinghorn, A. Potential of Plant-Derived Natural Products in the Treatment of Leukemia and Lymphoma. *CDT* **11**, 812–822 (2010).

153. Csuka, O., Sugár, J., Pályi, I. & Somfai-Relle, S. The Mode of Action of Vinca Alkaloids. *Oncology* **37**, 83–87 (1980).
154. Ngan, V. K., Bellman, K., Hill, B. T., Wilson, L. & Jordan, M. A. Mechanism of Mitotic Block and Inhibition of Cell Proliferation by the Semisynthetic *Vinca* Alkaloids Vinorelbine and Its Newer Derivative Vinflunine. *Mol Pharmacol* **60**, 225–232 (2001).
155. Prakash, V. & Timasheff, S. N. Mechanism of interaction of vinca alkaloids with tubulin: catharanthine and vindoline. *Biochemistry* **30**, 873–880 (1991).
156. Testi, S. *et al.* Vincristine-induced bystander effect in human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **789**, 39–47 (2016).
157. Thomas-Schoemann, A. *et al.* Bystander effect of vinorelbine alters antitumor immune response. *Int. J. Cancer* **129**, 1511–1518 (2011).
158. Iqbal, S. *et al.* Vinca alkaloid binding to P-glycoprotein occurs in a processive manner. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1864**, 184005 (2022).
159. Bates, D. & Eastman, A. Microtubule destabilising agents: far more than just antimetabolic anticancer drugs: MDA mechanisms of action. *Br J Clin Pharmacol* **83**, 255–268 (2017).
160. Laguzza, B. C. *et al.* New antitumor monoclonal antibody-vinca conjugates LY203725 and related compounds: design, preparation, and representative in vivo activity. *J. Med. Chem.* **32**, 548–555 (1989).
161. Tsuchikama, K. & An, Z. Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. *Protein Cell* **9**, 33–46 (2018).
162. Staben, L. R. *et al.* Targeted drug delivery through the traceless release of tertiary and heteroaryl amines from antibody–drug conjugates. *Nature Chem* **8**, 1112–1119 (2016).
163. Mahal, K. *et al.* Effects of the Tumor-Vasculature-Disrupting Agent Verubulin and Two Heteroaryl Analogues on Cancer Cells, Endothelial Cells, and Blood Vessels. *ChemMedChem* **9**, 847–854 (2014).

164. Lindberg, A. *et al.* Preliminary Evaluations of [<sup>11</sup>C]Verubulin: Implications for Microtubule Imaging With PET. *Front. Neurosci.* **15**, 725873 (2021).
165. Brain Tumor Investigational Consortium (BTIC) *et al.* A phase 2 trial of verubulin for recurrent glioblastoma: a prospective study by the brain tumor investigational consortium (BTIC). *J Neurooncol* **118**, 335–343 (2014).
166. Fu, Y. & Ho, M. DNA damaging agent-based antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Antibody Therapeutics* **1**, 43–53 (2018).
167. Elmroth, K. Cleavage of cellular DNA by calicheamicin  $\gamma$ 1. *DNA Repair* **2**, 363–374 (2003).
168. Nicolaou, K. C., Hale, C. R. H. & Nilewski, C. A Total Synthesis Trilogy: Calicheamicin  $\gamma$  1<sup>1</sup>, Taxol<sup>®</sup>, and Brevetoxin A. *Chem Record* **12**, 407–441 (2012).
169. Walker, S., Landovitz, R., Ding, W. D., Ellestad, G. A. & Kahne, D. Cleavage behavior of calicheamicin gamma 1 and calicheamicin T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 4608–4612 (1992).
170. Breiner, B., Kaya, K., Roy, S., Yang, W.-Y. & Alabugin, I. V. Hybrids of amino acids and acetylenic DNA-photocleavers: optimising efficiency and selectivity for cancer phototherapy. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 3974 (2012).
171. Bernt, K. M. *et al.* Eradication of CD19<sup>+</sup> Leukemia by Targeted Calicheamicin  $\theta$ . *Bioconjugate Chem.* **20**, 1587–1594 (2009).
172. Nicolaou, K. C. *et al.* Uncialamycin-based antibody–drug conjugates: Unique enediyne ADCs exhibiting bystander killing effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **118**, e2107042118 (2021).
173. Walter, R. B. *et al.* CD33 expression and P-glycoprotein–mediated drug efflux inversely correlate and predict clinical outcome in patients with acute myeloid leukemia treated with gemtuzumab ozogamicin monotherapy. *Blood* **109**, 4168–4170 (2007).
174. Yu, B. & Liu, D. Gemtuzumab ozogamicin and novel antibody-drug conjugates in clinical trials for acute myeloid leukemia. *Biomark Res* **7**, 24 (2019).
175. Paul, S., Rausch, C. R., Kantarjian, H. & Jabbour, E. J. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia with inotuzumab ozogamicin. *Future Oncology* **13**, 2233–2242 (2017).

176. Li, Q.-Y., Zu, Y.-G., Shi, R.-Z. & Yao, L.-P. Review Camptothecin: Current Perspectives. *CMC* **13**, 2021–2039 (2006).
177. Champoux, J. J. DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 369–413 (2001).
178. Pourquier, P. & Pommier, Y. Topoisomerase I-mediated DNA damage. in *Advances in Cancer Research* vol. 80 189–216 (Elsevier, 2001).
179. Gao, R. *et al.* Effects of Modification of the Active Site Tyrosine of Human DNA Topoisomerase I. *Biochemistry* **45**, 8402–8410 (2006).
180. Pommier, Y., Nussenzweig, A., Takeda, S. & Austin, C. Human topoisomerases and their roles in genome stability and organization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 407–427 (2022).
181. Venditto, V. J. & Simanek, E. E. Cancer Therapies Utilizing the Camptothecins: A Review of the *in Vivo* Literature. *Mol. Pharmaceutics* **7**, 307–349 (2010).
182. Liu, L. F. *et al.* Mechanism of Action of Camptothecin. *Annals of the New York Academy of Sciences* **922**, 1–10 (2006).
183. Yamato, M. *et al.* DS-7300a, a DNA Topoisomerase I Inhibitor, DXd-Based Antibody–Drug Conjugate Targeting B7-H3, Exerts Potent Antitumor Activities in Preclinical Models. *Molecular Cancer Therapeutics* **21**, 635–646 (2022).
184. Ogitani, Y. *et al.* DS-8201a, A Novel HER2-Targeting ADC with a Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor, Demonstrates a Promising Antitumor Efficacy with Differentiation from T-DM1. *Clinical Cancer Research* **22**, 5097–5108 (2016).
185. Li, W. *et al.* Synthesis and Evaluation of Camptothecin Antibody–Drug Conjugates. *ACS Med. Chem. Lett.* **10**, 1386–1392 (2019).
186. Yaegashi, T. *et al.* Synthesis and Antitumor Activity of 20(S)-Camptothecin Derivatives. A-Ring-Substituted 7-Ethylcamptothecins and Their E-Rig-Modified Water-Soluble Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 2518–2525 (1994).

187. Ogitani, Y., Hagihara, K., Oitate, M., Naito, H. & Agatsuma, T. Bystander killing effect of DS - 8201a, a novel anti-human epidermal growth factor receptor 2 antibody–drug conjugate, in tumors with human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneity. *Cancer Sci* **107**, 1039–1046 (2016).
188. Modi, S. *et al.* Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* **387**, 9–20 (2022).
189. Mitani, S. & Kawakami, H. Emerging Targeted Therapies for HER2 Positive Gastric Cancer That Can Overcome Trastuzumab Resistance. *Cancers* **12**, 400 (2020).
190. Nagai, Y., Oitate, M., Shiozawa, H. & Ando, O. Comprehensive preclinical pharmacokinetic evaluations of trastuzumab deruxtecan (DS-8201a), a HER2-targeting antibody-drug conjugate, in cynomolgus monkeys. *Xenobiotica* **49**, 1086–1096 (2019).
191. Yuan, S., Yu, B. & Liu, H.-M. New drug approvals for 2019: Synthesis and clinical applications. *European Journal of Medicinal Chemistry* **205**, 112667 (2020).
192. Rugo, H. S., Bianchini, G., Cortes, J., Henning, J.-W. & Untch, M. Optimizing treatment management of trastuzumab deruxtecan in clinical practice of breast cancer. *ESMO Open* **7**, 100553 (2022).
193. Farhat, F. S. A general review of the role of irinotecan (CPT11) in the treatment of gastric cancer. *Med Oncol* **24**, 137–146 (2007).
194. Xu, Y. & Villalona-Calero, M. A. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Annals of Oncology* **13**, 1841–1851 (2002).
195. Goldenberg, D. M. & Sharkey, R. M. Antibody-drug conjugates targeting TROP-2 and incorporating SN-38: A case study of anti-TROP-2 sacituzumab govitecan. *mAbs* **11**, 987–995 (2019).
196. Tagen, M. *et al.* P-Glycoprotein, but not Multidrug Resistance Protein 4, Plays a Role in the Systemic Clearance of Irinotecan and SN-38 in Mice. *DML* **4**, 195–201 (2010).

197. Spring, L. M. *et al.* Sacituzumab Govitecan for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Overview and Management of Potential Toxicities. *The Oncologist* **26**, 827–834 (2021).
198. Mantaj, J., Jackson, P. J. M., Rahman, K. M. & Thurston, D. E. From Anthramycin to Pyrrolobenzodiazepine (PBD)-Containing Antibody-Drug Conjugates (ADCs). *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 462–488 (2017).
199. Leimgruber, W., Stefanović, V., Schenker, F., Karr, A. & Berger, J. Isolation and Characterization of Anthramycin, a New Antitumor Antibiotic. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 5791–5793 (1965).
200. Hartley, J. A. *et al.* Pre-clinical pharmacology and mechanism of action of SG3199, the pyrrolobenzodiazepine (PBD) dimer warhead component of antibody-drug conjugate (ADC) payload tesirine. *Sci Rep* **8**, 10479 (2018).
201. Zammarchi, F. *et al.* ADCT-402, a PBD dimer–containing antibody drug conjugate targeting CD19-expressing malignancies. *Blood* **131**, 1094–1105 (2018).
202. Zinzani, P. L. & Minotti, G. Anti-CD19 monoclonal antibodies for the treatment of relapsed or refractory B-cell malignancies: a narrative review with focus on diffuse large B-cell lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **148**, 177–190 (2022).
203. Alshaer, W. *et al.* siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. *European Journal of Pharmacology* **905**, 174178 (2021).
204. Dong, Y., Siegwart, D. J. & Anderson, D. G. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **144**, 133–147 (2019).
205. Noland, C. L., Ma, E. & Doudna, J. A. siRNA Repositioning for Guide Strand Selection by Human Dicer Complexes. *Molecular Cell* **43**, 110–121 (2011).
206. Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S. D. Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* **115**, 209–216 (2003).
207. Dana, H. *et al.* Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int J Biomed Sci* **13**, 48–57 (2017).
208. Hu, B. *et al.* Therapeutic siRNA: state of the art. *Sig Transduct Target Ther* **5**, 101 (2020).

209. Sajid, M. I., Moazzam, M., Kato, S., Yeseom Cho, K. & Tiwari, R. K. Overcoming Barriers for siRNA Therapeutics: From Bench to Bedside. *Pharmaceuticals* **13**, 294 (2020).
210. Dugal-Tessier, J., Thirumalairajan, S. & Jain, N. Antibody-Oligonucleotide Conjugates: A Twist to Antibody-Drug Conjugates. *JCM* **10**, 838 (2021).
211. Friedrich, M. & Aigner, A. Therapeutic siRNA: State-of-the-Art and Future Perspectives. *BioDrugs* **36**, 549–571 (2022).
212. Nejadmoghaddam, M.-R. *et al.* Antibody-Drug Conjugates: Possibilities and Challenges. *Avicenna J Med Biotechnol* **11**, 3–23 (2019).
213. Chudasama, V., Maruani, A. & Caddick, S. Recent advances in the construction of antibody–drug conjugates. *Nature Chem* **8**, 114–119 (2016).
214. Cao, M. *et al.* Site-specific antibody-drug conjugate heterogeneity characterization and heterogeneity root cause analysis. *mAbs* **11**, 1064–1076 (2019).
215. Lyon, R. P. *et al.* Reducing hydrophobicity of homogeneous antibody-drug conjugates improves pharmacokinetics and therapeutic index. *Nat Biotechnol* **33**, 733–735 (2015).
216. Nussinov, R., Tsai, C.-J. & Jang, H. Anticancer drug resistance: An update and perspective. *Drug Resistance Updates* **59**, 100796 (2021).
217. Robey, R. W. *et al.* Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer* **18**, 452–464 (2018).
218. Waghray, D. & Zhang, Q. Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Cancer Treatment: Miniperspective. *J. Med. Chem.* **61**, 5108–5121 (2018).
219. Liu-Kreyche, P. *et al.* Lysosomal P-gp-MDR1 Confers Drug Resistance of Brentuximab Vedotin and Its Cytotoxic Payload Monomethyl Auristatin E in Tumor Cells. *Front. Pharmacol.* **10**, 749 (2019).
220. Chalouni, C. & Doll, S. Fate of Antibody-Drug Conjugates in Cancer Cells. *J Exp Clin Cancer Res* **37**, 20 (2018).

221. Lambert, J. M. & Morris, C. Q. Antibody–Drug Conjugates (ADCs) for Personalized Treatment of Solid Tumors: A Review. *Adv Ther* **34**, 1015–1035 (2017).
222. Madshus, I. H. & Stang, E. Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *Journal of Cell Science* **122**, 3433–3439 (2009).
223. Barok, M., Joensuu, H. & Isola, J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res* **16**, 3378 (2014).
224. Maqbool, M., Bekele, F. & Fekadu, G. Treatment Strategies Against Triple-Negative Breast Cancer: An Updated Review. *BCTT Volume* **14**, 15–24 (2022).
225. Yin, L., Duan, J.-J., Bian, X.-W. & Yu, S. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res* **22**, 61 (2020).
226. Ismail-Khan, R. & Bui, M. M. A Review of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Control* **17**, 173–176 (2010).
227. Won, K. & Spruck, C. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). *Int J Oncol* **57**, 1245–1261 (2020).
228. Medina, M. A. *et al.* Triple-Negative Breast Cancer: A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies. *IJERPH* **17**, 2078 (2020).
229. Chambon, P., Weill, J. D. & Mandel, P. Nicotinamide mononucleotide activation of a new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **11**, 39–43 (1963).
230. Morales, J. *et al.* Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in Cancer and Other Diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **24**, 15–28 (2014).
231. Amé, J.-C., Spenlehauer, C. & de Murcia, G. The PARP superfamily: Review articles. *Bioessays* **26**, 882–893 (2004).

232. Ba, X. & Garg, N. J. Signaling Mechanism of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) in Inflammatory Diseases. *The American Journal of Pathology* **178**, 946–955 (2011).
233. Vyas, S. *et al.* Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Nat Commun* **5**, 4426 (2014).
234. Ray Chaudhuri, A. & Nussenzweig, A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 610–621 (2017).
235. Fisher, A. E. O., Hochegger, H., Takeda, S. & Caldecott, K. W. Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Accelerates Single-Strand Break Repair in Concert with Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase. *Mol Cell Biol* **27**, 5597–5605 (2007).
236. Ossovskaya, V., Koo, I. C., Kaldjian, E. P., Alvares, C. & Sherman, B. M. Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types. *Genes & Cancer* **1**, 812–821 (2010).
237. Ossovskaya, V., Koo, I. C., Kaldjian, E. P., Alvares, C. & Sherman, B. M. Upregulation of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Triple-Negative Breast Cancer and Other Primary Human Tumor Types. *Genes & Cancer* **1**, 812–821 (2010).
238. Rose, M., Burgess, J. T., O’Byrne, K., Richard, D. J. & Bolderson, E. PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 564601 (2020).
239. Silver, D. P. & Livingston, D. M. Mechanisms of BRCA1 Tumor Suppression. *Cancer Discovery* **2**, 679–684 (2012).
240. Ayub, S. G. *et al.* Mutational analysis of the BRCA2 gene in breast carcinoma patients of Kashmiri descent. *Molecular Medicine Reports* **9**, 749–753 (2014).
241. Dziadkowiec, K. N., Gąsiorowska, E., Nowak-Markwitz, E. & Jankowska, A. PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting. *pm* **4**, 215–219 (2016).
242. Cortesi, L., Rugo, H. S. & Jackisch, C. An Overview of PARP Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer. *Targ Oncol* **16**, 255–282 (2021).

243. Hassan, S., Esch, A., Liby, T., Gray, J. W. & Heiser, L. M. Pathway-Enriched Gene Signature Associated with 53BP1 Response to PARP Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* **16**, 2892–2901 (2017).
244. Rodriguez-Vargas, J. M., Nguekeu-Zebaze, L. & Dantzer, F. PARP3 comes to light as a prime target in cancer therapy. *Cell Cycle* **18**, 1295–1301 (2019).
245. Pavese, F. *et al.* BRCA Mutation Status in Triple-Negative Breast Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy: A Pivotal Role for Treatment Decision-Making. *Cancers* **14**, 4571 (2022).
246. Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital Ostrava, Czech Republic, Romanová, M. & Klát, J. Adverse events of PARP inhibitors. *Ceska Gynekol* **86**, 54–60 (2021).
247. Li, H. *et al.* PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications. *Mol Cancer* **19**, 107 (2020).
248. Kim, D. & Nam, H. J. PARP Inhibitors: Clinical Limitations and Recent Attempts to Overcome Them. *IJMS* **23**, 8412 (2022).
249. Han, Y., Yu, X., Li, S., Tian, Y. & Liu, C. New Perspectives for Resistance to PARP Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer. *Front. Oncol.* **10**, 578095 (2020).
250. Johansson, M. A Human Poly(ADP-ribose) Polymerase Gene Family (ADPRTL): cDNA Cloning of Two Novel Poly(ADP-ribose) Polymerase Homologues. *Genomics* **57**, 442–445 (1999).
251. Boehler, C. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 2783–2788 (2011).
252. Beck, C. *et al.* PARP3, a new therapeutic target to alter Rictor/mTORC2 signaling and tumor progression in BRCA1-associated cancers. *Cell Death Differ* **26**, 1615–1630 (2019).
253. Beck, C. *et al.* PARP3 affects the relative contribution of homologous recombination and nonhomologous end-joining pathways. *Nucleic Acids Research* **42**, 5616–5632 (2014).
254. Lindgren, A. E. G. *et al.* PARP Inhibitor with Selectivity Toward ADP-Ribosyltransferase ARTD3/PARP3. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1698–1703 (2013).

255. Mascaux, C. *et al.* A systematic review of the role of etoposide and cisplatin in the chemotherapy of small cell lung cancer with methodology assessment and meta-analysis. *Lung Cancer* **30**, 23–36 (2000).
256. Nitiss, J. L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer* **9**, 327–337 (2009).
257. Banerji, S. & Los, M. Important differences between topoisomerase-I and -II targeting agents. *cbt* **5**, 965–966 (2006).
258. Slade, D. Mitotic functions of poly(ADP-ribose) polymerases. *Biochemical Pharmacology* **167**, 33–43 (2019).
259. Peshkin, B. N., Alabek, M. L. & Isaacs, C. BRCA1/2 mutations and triple negative breast cancers. *BD* **32**, 25–33 (2011).
260. Nowsheen, S., Cooper, T., Stanley, J. A. & Yang, E. S. Synthetic Lethal Interactions between EGFR and PARP Inhibition in Human Triple Negative Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* **7**, e46614 (2012).
261. Nguekeu-Zebaze, L. *et al.* PARP3 supervises G9a-mediated repression of adhesion and hypoxia-responsive genes in glioblastoma cells. *Sci Rep* **12**, 15534 (2022).
262. McKeage, K. & Perry, C. M. Trastuzumab: A Review of its Use in the Treatment of Metastatic Breast Cancer Overexpressing HER2. *Drugs* **62**, 209–243 (2002).
263. Meresse, P., Dechaux, E., Monneret, C. & Bertounesque, E. Etoposide: Discovery and Medicinal Chemistry. *CMC* **11**, 2443–2466 (2004).
264. Toki, B. E., Cervený, C. G., Wahl, A. F. & Senter, P. D. Protease-Mediated Fragmentation of *p*-Amidobenzyl Ethers: A New Strategy for the Activation of Anticancer Prodrugs. *J. Org. Chem.* **67**, 1866–1872 (2002).
265. Martino, E. *et al.* Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **28**, 2816–2826 (2018).

266. Shemchuk, L. A., Chernykh, V. P. & Krysiuk, O. S. Reaction of anthranilic acid amides with cyclic anhydrides. *Russ J Org Chem* **42**, 382–387 (2006).
267. Ferreira de Freitas, R. *et al.* Identification and Structure–Activity Relationship of HDAC6 Zinc-Finger Ubiquitin Binding Domain Inhibitors. *J. Med. Chem.* **61**, 4517–4527 (2018).
268. Dovgan, I. *et al.* Acyl Fluorides: Fast, Efficient, and Versatile Lysine-Based Protein Conjugation via Plug-and-Play Strategy. *Bioconjugate Chem.* **28**, 1452–1457 (2017).
269. Bouzide, A. & Sauv e, G. Silver(I) Oxide Mediated Highly Selective Monotosylation of Symmetrical Diols. Application to the Synthesis of Polysubstituted Cyclic Ethers. *Org. Lett.* **4**, 2329–2332 (2002).
270. Sun, L., Peng, G., Niu, H., Wang, Q. & Li, C. A Highly Chemoselective and Rapid Chlorination of Benzyl Alcohols under Neutral Conditions. *Synthesis* **2008**, 3919–3924 (2008).
271. Kim, Hyung-Woo *et al.* Facile Chlorination of Benzyl Alcohols Using 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) and Sulfonyl Chlorides. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **31**, 3434–3436 (2010).
272. Dorywalska, M. *et al.* Molecular Basis of Valine-Citrulline-PABC Linker Instability in Site-Specific ADCs and Its Mitigation by Linker Design. *Molecular Cancer Therapeutics* **15**, 958–970 (2016).
273. Anami, Y. *et al.* Glutamic acid–valine–citrulline linkers ensure stability and efficacy of antibody–drug conjugates in mice. *Nat Commun* **9**, 2512 (2018).
274. Mondal, D., Ford, J. & Pinney, K. G. Improved Methodology for the Synthesis of a Cathepsin B Cleavable Dipeptide Linker, Widely Used in Antibody–Drug Conjugate Research. *Tetrahedron Letters* **59**, 3594–3599 (2018).
275. Debaene, F. *et al.* Innovative Native MS Methodologies for Antibody Drug Conjugate Characterization: High Resolution Native MS and IM-MS for Average DAR and DAR Distribution Assessment. *Anal. Chem.* **86**, 10674–10683 (2014).
276. Beck, A., Dumontet, C. & Joubert, N. Les immunoconjugués en oncologie: Les nouvelles stratégies en développement. *Med Sci (Paris)* **35**, 1043–1053 (2019).

277. Fu, Z., Li, S., Han, S., Shi, C. & Zhang, Y. Antibody drug conjugate: the “biological missile” for targeted cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther* **7**, 93 (2022).
278. Joubert, N., Beck, A., Dumontet, C. & Denevault-Sabourin, C. Antibody–Drug Conjugates: The Last Decade. *Pharmaceuticals* **13**, 245 (2020).
279. Tagawa, S. *et al.* Microtubule inhibitor-based antibody–drug conjugates for cancer therapy. *OTT* 2227 (2014) doi:10.2147/OTT.S46887.
280. Heo, Y.-A. Mirvetuximab Soravtansine: First Approval. *Drugs* **83**, 265–273 (2023).
281. Buecheler, J. W., Winzer, M., Tonillo, J., Weber, C. & Gieseler, H. Impact of Payload Hydrophobicity on the Stability of Antibody–Drug Conjugates. *Mol. Pharmaceutics* **15**, 2656–2664 (2018).
282. Liu-Kreyche, P. *et al.* Lysosomal P-gp-MDR1 Confers Drug Resistance of Brentuximab Vedotin and Its Cytotoxic Payload Monomethyl Auristatin E in Tumor Cells. *Front. Pharmacol.* **10**, 749 (2019).
283. Conilh, L., Sadilkova, L., Viricel, W. & Dumontet, C. Payload diversification: a key step in the development of antibody–drug conjugates. *J Hematol Oncol* **16**, 3 (2023).
284. Tang, H. *et al.* The Analysis of Key Factors Related to ADCs Structural Design. *Front. Pharmacol.* **10**, 373 (2019).
285. Bates, D. & Eastman, A. Microtubule destabilising agents: far more than just antimetabolic anticancer drugs: MDA mechanisms of action. *Br J Clin Pharmacol* **83**, 255–268 (2017).
286. Lockman, J. W., Klimova, Y., Anderson, M. B. & Willardsen, J. A. Synthesis of Substituted Quinazolines: Application to the Synthesis of Verubulin. *Synthetic Communications* **42**, 1715–1723 (2012).
287. Arnst, K. E. *et al.* Current advances of tubulin inhibitors as dual acting small molecules for cancer therapy. *Med Res Rev* **39**, 1398–1426 (2019).
288. Lu, Y., Chen, J., Xiao, M., Li, W. & Miller, D. D. An Overview of Tubulin Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site. *Pharm Res* **29**, 2943–2971 (2012).

289. Lindberg, A. *et al.* Preliminary Evaluations of [<sup>11</sup>C]Verubulin: Implications for Microtubule Imaging With PET. *Front. Neurosci.* **15**, 725873 (2021).
290. Mahal, K. *et al.* Effects of the Tumor-Vasculature-Disrupting Agent Verubulin and Two Heteroaryl Analogues on Cancer Cells, Endothelial Cells, and Blood Vessels. *ChemMedChem* **9**, 847–854 (2014).
291. Chase, D. M., Chaplin, D. J. & Monk, B. J. The development and use of vascular targeted therapy in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* **145**, 393–406 (2017).
292. Banerjee, S., Hwang, D.-J., Li, W. & Miller, D. Current Advances of Tubulin Inhibitors in Nanoparticle Drug Delivery and Vascular Disruption/Angiogenesis. *Molecules* **21**, 1468 (2016).
293. Kasibhatla, S. *et al.* MPC-6827: A Small-Molecule Inhibitor of Microtubule Formation That Is Not a Substrate for Multidrug Resistance Pumps. *Cancer Research* **67**, 5865–5871 (2007).
294. Yan, W. *et al.* SKLB060 Reversibly Binds to Colchicine Site of Tubulin and Possesses Efficacy in Multidrug-Resistant Cell Lines. *Cell Physiol Biochem* **47**, 489–504 (2018).
295. Grossmann, K. F. *et al.* Phase I trial of verubulin (MPC-6827) plus carboplatin in patients with relapsed glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* **110**, 257–264 (2012).

## Développement d'anticorps mono- ou bi-conjugués innovants pour le ciblage des cancers du sein triple négatifs

### Résumé

Les cancers du sein triple négatifs, un sous-type de cancer du sein présentant un déficit de trois récepteurs communément utilisés en thérapie, représentent un important défi thérapeutique en raison de leur mauvais pronostic dû à d'importants risques de récurrence, dont 40% des patients sont victimes malgré les traitements actuels. De plus, le taux de survie des patients ne dépasse pas les 13 mois environ après l'apparition de métastases. L'objectif de ce projet est de développer une stratégie induisant la mort de ces cellules cancéreuses grâce à une thérapie ciblée et combinée. Celle-ci repose sur la création d'un nouveau système thérapeutique synergique, basé sur l'utilisation d'une molécule cytotoxique et d'un agent inhibiteur d'une nouvelle cible intracellulaire, impliquée dans la réparation de l'ADN et dans la progression mitotique, l'enzyme PARP3. La stratégie explorée dans ce projet est de générer un conjugué anticorps-médicaments sur lequel sera conjugué un petit ARN interférant ciblant PARP3 (siPARP3), ainsi qu'une molécule cytotoxique, la vincristine un poison mitotique. Ces deux molécules thérapeutiques seront alors délivrées spécifiquement directement dans les cellules du cancer du sein triple négatif. Dans un premier temps, nous nous sommes concentré sur la mono-conjugaison du siPARP3 ou de la vincristine. Puis, dans un deuxième temps, les méthodes de mono-conjugaison utilisées ont été appliquées de façon séquentielle afin de générer un anticorps bi-conjugué siPARP3-vincristine.

**Mots-clés :** cancer du sein triple négatif, anticorps, bioconjugaison, conjugués anticorps-médicaments, PARP3, petit ARN interférant, vincristine, synergie.

### Summary

Triple negative breast cancers, a subtype of breast cancer with a lack of three receptors commonly used in therapy, represent a major therapeutic challenge because of a high risk of recurrence, that can affect 40% of patients despite current treatments. Moreover, the survival rate of victims does not exceed 13 months after the metastases appearance. The objective of this project is to develop a strategy to induce cancer cells death by a targeted and combined therapy. This strategy is based on the generation of a new synergistic system composed of a cytotoxic molecule and an agent that can deplete a new intracellular target involved in DNA repair and mitotic progression, the enzyme PARP3. The strategy explored in this project is to generate an antibody-drug conjugate that will be conjugate with a siRNA targeting PARP3 (siPARP3) and a cytotoxic molecule, the vincristine a mitotic poison. These two therapeutic molecules will be specifically delivered directly into triple negative breast cancer cells. First, we focused on the mono-conjugation of siPARP3 or vincristine. Then, the mono-conjugation methods were applied sequentially in order to generate a bi-conjugated siPARP3-vincristine antibody.

**Keywords:** triple negative breast cancer, antibody, bioconjugation, antibody-drug conjugates, PARP3, siRNA, vincristine, synergy.