

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/114071 A2

(43) Date de la publication internationale
22 septembre 2011 (22.09.2011)

PCT

- (51) Classification internationale des brevets :
C07K 5/02 (2006.01) A61K 38/12 (2006.01)
C07K 5/12 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)
C07K 7/64 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2011/050552
- (22) Date de dépôt international :
17 mars 2011 (17.03.2011)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
1051899 17 mars 2010 (17.03.2010) FR
- (71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
UNIVERSITÉ DE PICARDIE JULES VERNE [FR/FR]; Chemin du Thil, F-80025 Amiens Cedex 1 (FR). CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE [FR/FR]; 2, place Victor Pauchet, F-80080 Amiens (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : SONNET, Pascal [FR/FR]; 7, rue de la Cavée, F-80480 Pont de Metz (FR). DA NASCIMENTO, Sophie [FR/FR]; 5, rue des Combattants d'A.F.N., F-80800 Hamelet (FR). AMANT, Carole [FR/FR]; 203, boulevard de Saint-Quentin, F-80090 Amiens (FR). OUROUDA, Roger [FR/FR]; 95, rue Jules Barni, F-80000 Amiens (FR). ROCHETTE, Jacques [FR/FR]; 11, allée de Suède, F-91300 Massy (FR).
- (74) Mandataires : RIPAULT, Damien et al.; c/o S.A FEDIT-LORIOT, 38, avenue Hoche, F-75008 Paris (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : SYNTHETIC CYCLOPEPTIDE, PREPARATION PROCESS AND USES

(54) Titre : CYCLOPEPTIDE SYNTHETIQUE, PROCEDE DE PREPARATION ET UTILISATIONS

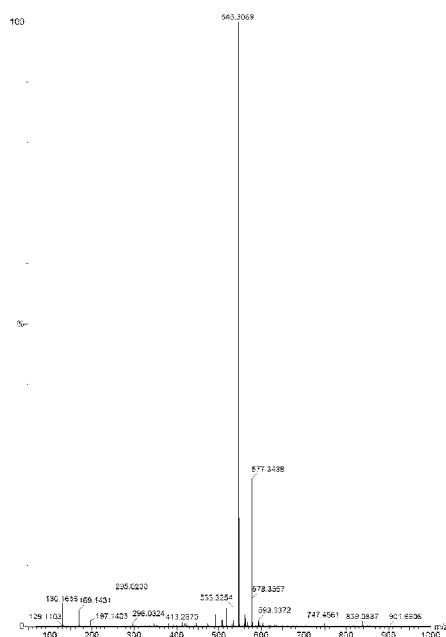


Figure 2

(57) Abstract : The invention relates to a novel synthetic cyclopeptide, to the process for preparing same and to the uses thereof in the prevention or treatment of an angiogenesis-related disease. The invention also relates to a pharmaceutical composition comprising a cyclopeptide according to the invention.

(57) Abrégé : L'invention concerne un nouveau cyclopeptide synthétique, son procédé de préparation et ses utilisations dans la prévention ou le traitement d'une maladie associée à l'angiogenèse. L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un cyclopeptide selon l'invention.



WO 2011/114071 A2



SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,

Publiée :

— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g)*

CYCLOPEPTIDE SYNTHETIQUE PROCEDE DE PREPARATION ET UTILISATIONS

DESCRIPTION

5

Domaine Technique

La présente invention se rapporte à un nouveau cyclopeptide synthétique, à son procédé de préparation et à ses utilisations dans la prévention ou le traitement d'une maladie associée à l'angiogenèse.

10 L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un cyclopeptide selon l'invention.

Dans la description ci-dessous, les références entre crochets [] renvoient à la liste des références présentées à la fin du texte.

Etat de la technique

15 La vasculogenèse et l'angiogenèse sont des processus responsables de la formation du système circulatoire, première unité fonctionnelle lors du développement de l'embryon. Contrairement à la vasculogenèse, l'angiogenèse implique la croissance de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants.

20 L'angiogenèse est un processus indispensable pour la mise en place du système vasculaire chez l'embryon, la cicatrisation et le développement de l'endomètre utérin.

Au contraire, l'angiogenèse dans des conditions physiopathologiques, participe au développement de la polyarthrite rhumatoïde, à la dégénérescence maculaire chez l'adulte, à la croissance tumorale et à la dissémination
25 métastatique. Dans le contexte pathologique, l'angiogenèse joue un rôle prépondérant dans la néovascularisation des tumeurs. Les cellules tumorales sont capables d'envahir le tissu normal avoisinant, en le remaniant puis, de migrer à distance pour former des métastases. Par ailleurs, la vascularisation
30 tumorale étant anormale et tortueuse, elle réduit la distribution de molécules thérapeutiques.

L'angiogenèse est régulée par des facteurs pro- et anti-angiogéniques. Parmi les facteurs pro-angiogéniques, figurent le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ou VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor en anglais), qui est un puissant mitogène pour les cellules endothéliales, le facteur
5 de croissance des fibroblastes 1 ou FGF-1 (Fibroblast Growth Factor 1 en anglais) et le facteur de croissance des fibroblastes 2 ou FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2 en anglais).

L'activité du VEGF est souvent augmentée de façon marquée dans une vaste gamme de cellules tumorales, notamment dans le cancer du rein, du
10 sein, de l'ovaire, de l'estomac, du poumon, de la vessie, des tumeurs de la tête et du cou, et dans le glioblastome.

Les agents anti-angiogéniques actuellement commercialisés ciblent la production des agents mitogènes endothéliaux, les agents mitogènes eux-mêmes, leurs récepteurs, ou encore les voies de signalisation associées à ces
15 agents et les molécules d'adhésion cellulaire, comme les intégrines. Il existe un grand nombre d'anticorps monoclonaux utilisés dans le cadre de l'inhibition de la vascularisation tumorale. En général, chaque anticorps monoclonal est spécifique d'un cancer donné, c'est-à-dire de l'organe et de la cause de la formation de la tumeur. Les principaux anticorps monoclonaux sont le
20 bevacizumab (Avastin[®]), le cétuximab (Erbix[®]), le rituximab (Mabthéra[®]) et le trastuzumab (Herceptin[®]). Ces traitements actuels anti-angiogéniques possèdent des effets indésirables tels que l'hypertension pulmonaire, l'hypersensibilité, la toxicité cardiaque et la perforation gastro-intestinale. Par conséquent, la recherche et le développement de nouvelles molécules
25 structurellement plus simples que ces anticorps, avec de meilleurs profils au niveau des voies d'administration, de biodisponibilités, des effets secondaires, de coût de production restent d'actualité.

Dans le cas particulier du cancer du sein, les œstrogènes sont considérés comme des hormones impliquées dans la formation et la croissance de
30 tumeurs de la glande mammaire. Parmi tous les composés qui ont été évalués, de nombreux phyto-œstrogènes tels que la génistéine (flavonoïde) ont montré *in vitro*, des propriétés œstrogéniques et/ou anti-angiogéniques selon leur classe. Ces composés se fixent aux récepteurs œstrogéniques des cellules du

sein, des ovaires ou de l'endomètre par exemple, contribuant à la régulation des mécanismes de reproduction cellulaire par initiation d'une transcription œstrogéno-dépendante. De même, il a été observé que des analogues d'œstrogènes ou des composés dotés de propriétés œstrogéniques possédaient également une activité pro ou anti-angiogénique. Ainsi, le 2-méthoxyestradiol est un dérivé œstrogénique capable de prévenir la formation de nouveaux vaisseaux. Les propriétés œstrogéniques d'autres analogues de phytoestrogènes appelés ségétalines, extraits des graines de *Vaccaria segetalis*, ont également été étudiées.

10 Les progrès récents des connaissances scientifiques sur l'angiogenèse tumorale mettent en évidence qu'un traitement anti-angiogénique offrirait une nouvelle modalité pour maîtriser la croissance tumorale chez les patients atteints de cancer. Parmi tous les acteurs moléculaires impliqués dans l'activation de l'angiogenèse, le VEGF a fait la preuve de son efficacité dans
15 pratiquement tous les modèles expérimentaux de mesure d'activité de l'angiogenèse.

L'invention a donc pour objet de fournir une nouvelle molécule anti-angiogénique présentant une plus grande efficacité par rapport aux molécules anti-angiogéniques existantes.

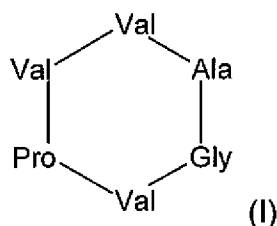
20 En outre, il y a aussi un réel besoin de disposer d'une nouvelle molécule anti-angiogénique, présentant des caractéristiques suivantes :

- ne possédant pas les effets délétères sur la fonction endothéliale physiologique observées avec les molécules actuelles ;
- structurellement plus simples que des molécules déjà existantes
25 comme par exemple les anticorps ;
- capables de se lier au VEGF ;
- présentant de meilleurs profils au niveau de voies d'administration, de biodisponibilités et/ou des effets secondaires ;
- ayant une mise en œuvre facile, reproductible et de coût réduit ;
- 30 - capables de normaliser la vascularisation tumorale et de faciliter l'accès des molécules thérapeutiques à la tumeur, avant de détruire complètement le réseau vasculaire tumoral ;

- capables d'inhiber la croissance des tumeurs hormono-dépendantes telles que les cancers du sein ;
- pouvant être utilisées dans le traitement d'un grand nombre de tumeurs de types différents ; et/ou
- 5 - permettant la mise en place d'un traitement pour faire régresser la tumeur dans des conditions moins drastiques que celles liées aux traitements actuels.

Description de l'invention

La présente invention a précisément pour but de répondre à ces besoins
10 en fournissant un cyclopeptide de formule (I) :



dans laquelle

- Ala représente l'alanine ;
- Gly représente la glycine ;
- 15 ▪ Val représente la valine ;
- Pro représente la proline

ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

Dans le cadre de la présente invention, le terme « sels pharmaceutiquement acceptables » comprend les sels préparés avec des
20 acides ou bases, non toxiques, en fonction des substituants présents sur les composés. Lorsque les composés de l'invention comportent des fonctions acides, les sels correspondants peuvent être obtenus par addition d'une base organique ou inorganique sur le composé en présence éventuellement d'un solvant de préférence inerte. Des exemples de sel d'addition d'une base
25 peuvent être les sels de sodium, potassium, calcium, ammonium, amino (organique), ou magnésium. Lorsque les composés de l'invention comportent des fonctions basiques, les sels correspondants peuvent être obtenus par addition d'un acide organique ou inorganique éventuellement dans un solvant de préférence inerte. Des exemples de sels d'additions d'acide inorganique

peuvent être les sels hydrochlorique (ou chlorhydrate), hydrobromique, nitrique, carbonique, monohydrogénocarbonique, phosphorique, monohydrogénéphosphorique, dihydrogénéphosphorique, sulfurique, monohydrogénéosulfurique hydroiodique. Des exemples de sels d'additions
 5 d'acide organique peuvent être les sels acétique, propionique, isobutyrique, maléique (ou maléate), malonique, benzoïque, oxalique (ou oxalate), glucuronique (ou glucuronate) succinique, subérique, fumarique (ou fumarate), lactique, mandélique, phthalique, benzènesulfonique, p-tolylsulfonique, citrique, tartarique, méthanesulfonique.

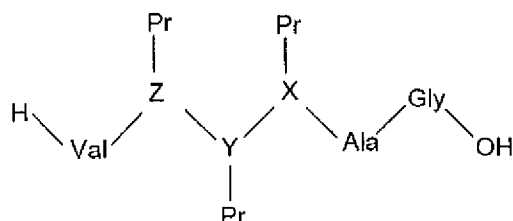
10 Les acides aminés formant le cyclopeptide de formule (I), selon l'invention sont reliés entre-eux par une liaison peptidique.

Le cyclopeptide selon l'invention à activité anti-angiogénique, peut offrir plusieurs avantages par rapport aux thérapies anticancéreuses classiques notamment une spécificité d'action anti-tumorale, une accessibilité plus facile
 15 de la cible, un risque moins élevé de résistance, une efficacité dans le traitement d'association avec des anticancéreux classiques, et possibilité de chimioprophylaxie.

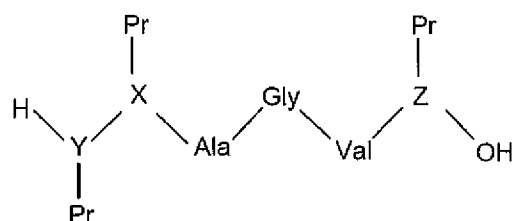
En outre, les inventeurs ont mis en évidence une acité anti-angiogénique directe du cyclopeptide selon l'invention, au contraire de la ségétaline A naturelle. En effet, le cyclopeptide selon l'invention est en mesure d'entraver
 20 directement la migration cellulaire et la formation des tubes capillaires de cellules endothéliales, contrairement à la ségétaline naturelle.

L'invention concerne également le procédé de préparation d'un
 25 cyclopeptide de formule (I), dans lequel :

a) on cyclise, un composé de formule (IV) ou (V) :



(IV)



(V)

dans laquelle : Ala est l'alanine; Gly est la glycine ; Val est la valine ; X est la valine ; Y est la valine ; et Z est la proline,

• Pr est un groupe protecteur choisi dans le groupe comprenant l'acétamidométhyle (Acm), l'allyloxy-carbonyl (Alloc), le t-butyloxy-carbonyl (Boc), le benzyloxyméthyle (Bom), le 2-(4-biphénylyl) propyl(2)oxy-carbonyl (Bpoc), le 2-bromobenzyloxy-carbonyl (Br-Z), le butoxyméthyle (Bum), l'acide benzoïque (Bz), le benzyle (Bzl), le dichlorobenzyle (Cl₂Bzl), le 2-chlorobenzyloxy-carbonyl (ClZ), le N-[1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)éthyle] (Dde), le dithia-succinyle (Dts), le 4-méthoxybenzyle (Mbzl), le 4 méthylbenzyle (MeBzl), le méthoxybenzyle (Mob), le 4-méthoxy-2,3,6-triméthylbenzene sulfonyl (Mtr), le mésitylène-2-sulfonyl (Mts), le 2-nitro-phénylsulfényle (Nps), le benzyle ester (OBzl), le tert-butyle ester (O-tBu), 2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf), le 2,2,5,7,8,-pentaméthyl-chroman-6-sulfonyl (Pmc), le tert-butyle (tBu), le 2,4,6-triméthoxybenzyle (Tmob), le triphénylméthyle (trityle ou trt),
15 en présence d'un agent de cyclisation ;

b) on clive les groupes protecteurs des différents composés X, Y, Z, pour récupérer les composés X, Y,Z de départ.

Par « groupe protecteur », on entend un groupe introduit dans une molécule afin d'empêcher des réactions secondaires de se produire dans la suite de la synthèse et/ou pour obtenir une certaine chimiosélectivité.

Les groupes protecteurs sont, en général, inertes dans les conditions réactionnelles choisies. Une fois la ou les réaction(s) menée(s) à bien en présence des groupes protecteurs, ces derniers sont éliminés pour revenir aux molécules de départ (déprotection).

Dans le cadre de la présente invention, on entend par « agent de cyclisation », un composé permettant la formation d'un composé organique cyclique par la création d'une liaison, entre les molécules organiques, apportant les éléments constitutifs de ce cycle. Dans la présente invention, l'agent de cyclisation permet la formation d'une liaison peptidique entre l'extrémité C-terminale de la glycine et l'extrémité N-terminale de la valine présentes dans le composé linéaire de formule (IV), et entre l'extrémité C-terminale du composé

Z et l'extrémité *N*-terminale du composé Y présents dans le composé linéaire de formule (V), pour conduire au cyclopeptide de formule (I).

Le choix des conditions expérimentales notamment la nature de l'agent de cyclisation, sa concentration et le choix des deux acides aminés impliqués dans la cyclisation, sont importants afin d'éviter la racémisation des molécules
5 constitutives des composés de formules (IV) et (V), et la formation de dimères à partir du composé de formule (IV) ou (V). Le choix des conditions expérimentales précitées permet, en outre, d'obtenir une cyclisation régiosélective.

10 Les azotures phosphorylés se sont révélés être des agents de cyclisation particulièrement intéressants. On peut citer par exemple l'azoture de diphénylphosphoryle (DPPA), le bromo-tris-pyrrolidino
phosphoniumhexafluorophosphate (PyBrOP), le *O*-benzotriazole-*N,N,N',N'*-tétraméthyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU), le benzotriazole-1-yl-oxy-
15 tris-(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate (BOP), la *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI), le dicyclohexylcarbodiimide (DCC), le 3-(diéthoxyphosphoryloxy)-3*H*-benzo[d][1,2,3] triazin-4-one (DEPBT), la *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC), l'hydrochlorure de 1-éthyl-3-(3-
diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC.HCl), le 2-(1*H*-7-azabenzotriazol-1-yl)-
20 1,1,3,3-tétraméthyl uronium hexafluorophosphate de méthanaminium (HAUT), le *N*-hydroxybenzotriazole anhydre (HOBt), l'hydroxy-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazine
(HOObt), le 1*H*-benzotriazolium 1-
[bis(diméthylamino)méthylène]-5-chloro-hexafluorophosphate (1-),3-oxyde
(HCTU), le 6-chloro-1-hydroxybenzotriazole (Cl-HOBt), le *O*-(benzotriazol-1-yl)-
25 *N,N,N',N'*-tétraméthyluronium tétrafluoroborate (TBTU), le 4,5-dicyanoimidazole.

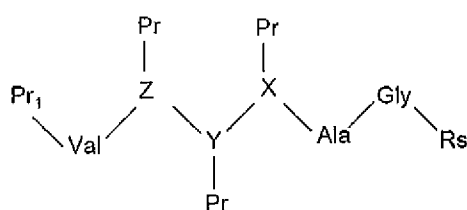
Comme indiqué, la concentration de l'agent de cyclisation est un paramètre important dans la réaction de cyclisation. Par exemple, dans le cas de la cyclisation d'un composé de formule (IV), il a été observé qu'une
30 concentration comprise entre $2 \cdot 10^{-4}$ et 10^{-4} M conduit au cyclopeptide de formule (I), avec des concentrations très faibles voire nulles du dimère correspondant.

La réaction de cyclisation peut avoir lieu dans un solvant organique aprotique. A ce titre, on peut citer par exemple l'acétonitrile, le dichlorométhane ou le diméthylformamide.

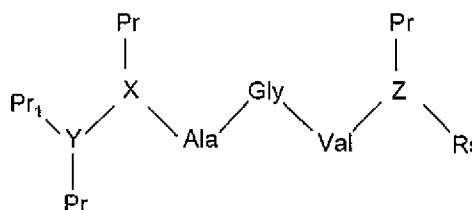
Le composé de formule (I) peut être obtenu à l'issue de l'étape b), après le clivage des groupes protecteurs Pr des composés (IV) ou (V). Le clivage ou la coupure peut se faire dans des conditions acides et/ou basiques variées et connues de l'homme du métier.

La réaction de déprotection de l'étape b) peut éventuellement être suivie d'une étape de lavage et/ou de purification.

Les composés (IV) et (V) peuvent être obtenus respectivement, à partir des composés de formule (VI) et (VII) :



(VI)



(VII)

dans lesquels ::

- Pr, Pr₁ sont des groupes protecteurs choisis, indépendamment l'un de l'autre, dans le groupe comprenant l'acétamidométhyle (Acm), l'allyloxy-carbonyle (Alloc), le t-butyloxy-carbonyle (Boc), le benzyloxyméthyle (Bom), le 2-(4-biphényl) propyl(2)oxy-carbonyle (Bpoc), le 2-bromobenzyloxy-carbonyle (Br-Z), le butoxyméthyle (Bum), l'acide benzoïque (Bz), le benzyle (Bzl), le dichlorobenzyle (Cl₂Bzl), le 2-chlorobenzyloxy-carbonyle (ClZ), le N-[1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)éthyle] (Dde), le dithia-succinyle (Dts), le chlorure de fluorénylméthoxy-carbonyle (Fmoc), le 4-méthoxybenzyle (Mbzl), le 4-méthylbenzyle (MeBzl), le méthoxybenzyle (Mob), le 4-méthoxy-2,3,6-triméthylbenzène sulfonyle (Mtr), le mésitylène-2-sulfonyle (Mts), le 2-nitro-phénylsulfényle (Nps), le benzyle ester (OBzl), le tert-butyle ester (OtBu), le 2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyle (Pbf), le 2,2,5,7,8-pentaméthyl-chroman-6-sulfonyle (Pmc), le tert-butyle (tBu), le 2,4,6-triméthoxybenzyle (Tmob), le triphénylméthyle (trityle ou trt) ;

5 - Rs est une résine choisie dans le groupe comprenant la résine SASRIN, SASRIN-2-pyridylthiocarbonate, la résine WANG, la résine 2-chlorotriyle, la résine TENTAGEL, la résine WANG-TENTAGEL, la résine Wang-PEG, la résine benzhydrylamine, la résine polystyrène-NH₂, la résine Merrifield, la résine 4-méthylbenzhydrylamine (MBHA-résine, PAL-MBHA-résine), la résine 4-hydroxyméthylbenzylamide-synbeads, la résine 4-hydroxyméthylphenoxyacétylamidométhylpolystyrène (HMPA-résine) ; après clivage du groupe protecteur Pr₁ et de la résine Rs.

10 Le groupe protecteur Pr₁ qui est en général lié à l'extrémité N-terminale de la valine et du composé Y, et la résine Rs qui est en général liée à l'extrémité C-terminale de la glycine et du composé Z, peuvent être successivement clivés dans des conditions opératoires différentes.

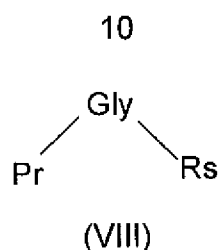
15 Dans une variante de l'invention, les composés (IV) et (V) sont obtenus après clivages successifs du groupe protecteur Pr₁ et de la résine Rs des composés de formule (VI) et (VII), respectivement.

20 Par « résine », on entend un support (co)polymérique utilisé en synthèse en phase solide. En général, ce sont des (co)polymères réticulés fonctionnalisés insolubles mais capables de gonfler dans les solvants utilisés. A titre d'exemple, le clivage ou la coupure de la liaison Gly – Rs ou (Z)-Rs, après clivage ou coupure de la liaison Pr₁-Val ou de la liaison Pr₁-Y, permet de libérer le composé de formule (VI) ou (VII) de son support de synthèse. Le composé résultant de ce clivage est récupéré dans le filtrat.

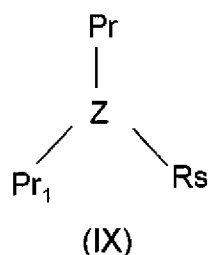
25 Le clivage ou la coupure peut se faire dans des conditions acides et/ou basiques douces. A titre d'exemple de conditions acides douces, on peut citer l'emploi d'acide trifluoroacétique (TFA) à 1% (clivage ou coupure de la liaison Gly – Rs ou (Z)-Rs). Le clivage dans des conditions basiques douces peut se faire par exemple en présence d'une amine primaire et secondaire comme la pipéridine (clivage ou coupure de la liaison Pr₁-Val ou de la liaison Pr₁-Y).

30 A leur tour, les composés (VI) et (VII), peuvent être préparés par couplages successifs.

 Ainsi, on peut préparer le composé (VI) par le couplage successif entre un composé de formule (VIII) :



et Ala-Pr₁, (Pr-X)-Pr₁, (Pr-Y)-Pr₁, (Pr-Z)-Pr₁, Val--Pr₁ respectivement, et
 5 le composé (VII) par le couplage successif entre un composé de formule (IX) :



et Val-Pr₁, Gly-Pr₁, Ala-Pr₁, (Pr-X)-Pr₁, (Pr-Y)-Pr₁, respectivement, où Ala, Gly,
 10 Val, X, Y, Z, Pr et P₁ sont tels que définis précédemment en présence d'un agent de couplage.

L'utilisation d'une résine Rs dans les composés (VIII) et (IX) permet la
 synthèse respectivement des composés de formule (VI) et (VII) sur support
 15 solide suivant les méthodes déjà publiées [2].

La synthèse sur support solide met en jeu un support constitué d'un
 (co)polymère (résine) insoluble, inerte dans les conditions de la synthèse. En
 revanche, ces polymères (résines) ont la particularité de gonfler dans les
 solvants utilisés, ce qui assure une bonne diffusion des réactifs. Dans la
 20 présente invention, Gly ou (Pr-Z) sont fixés sur la résine, avantageusement, par
 une liaison covalente. Les Ala-Pr₁, (Pr-X)-Pr₁, (Pr-Y)-Pr₁, (Pr-Z)-Pr₁, Val-Pr₁
 dans le cas de (VI), et les Val-Pr₁, Gly-Pr₁, Ala-Pr₁, (Pr-X)-Pr₁, (Pr-Y)-Pr₁ dans
 le cas de (VII), sont ajoutés en solution, souvent en large excès, sur la résine.
 Après chaque ajout, le composé synthétisé reste lié au (co)polymère insoluble
 25 (résine) et pourra être facilement séparé des excès de réactif(s) et des solvants
 par exemple par simple filtration. Le groupement Pr₁ est ensuite clivé. Ce
 processus peut être répété autant de fois que nécessaire jusqu'à ce que les
 composés (VI) et (VII) soient synthétisés. La liaison qui relie ces composés (VI)

et (VII) au (co)polymère (résine) ainsi que le groupe protecteur Pr₁ sont alors clivés et le produit de la réaction est récupéré dans le filtrat.

L'agent de couplage peut être choisi dans le groupe comprenant par exemple le bromo-tris-pyrrolidino phosphoniumhexafluorophosphate (PyBrOP), le O-benzotriazole-*N,N,N',N'*-tétraméthyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU), le benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate (BOP), la *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI), le dicyclohexylcarbodiimide (DCC), le 3-(diéthoxy-phosphoryloxy)-3H-benzo[d][1,2,3] triazin-4-one (DEPBT), la *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC), l'hydrochlorure de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC.HCl), le 2-(1*H*-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyl uronium hexafluorophosphate de méthanaminiium (HAUT), le *N*-hydroxybenzotriazole anhydre (HOBT), l'hydroxy-3,4-dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazine (HOOBT), le 1*H*-benzotriazolium 1-[bis(diméthylamino)méthylène]-5chloro-,hexafluorophosphate (1-),3-oxyde (HCTU), le 6-chloro-1-hydroxybenzotriazole (Cl-HOBT), le O-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium tétrafluoroborate (TBTU), le 4,5-dicyanoimidazole.

Le cyclopeptide selon l'invention peut être utilisé directement ou sous forme d'une composition pharmaceutique le contenant, pour son utilisation comme médicament.

L'invention a donc pour objet des médicaments comprenant un cyclopeptide selon l'invention.

Un autre objet de la présente invention est une composition pharmaceutique comprenant un cyclopeptide tel que défini précédemment et éventuellement un ou plusieurs excipient(s) pharmaceutiquement acceptable(s).

Les excipients sont habituellement des éléments sans activité thérapeutique qui entrent dans la composition d'un médicament ou qui sont utilisés pour sa fabrication. L'excipient a pour fonction d'améliorer l'aspect ou le goût, d'assurer la conservation, de faciliter la mise en forme et l'administration du médicament. Il sert aussi à acheminer le principe actif vers son site d'action et à contrôler son absorption par l'organisme. Selon la forme pharmaceutique et le mode d'administration souhaités, différents excipients peuvent être

utilisés. L'homme du métier est en mesure de choisir les excipients appropriés selon la forme pharmaceutique et le mode d'administration désirés.

La composition pharmaceutique selon l'invention peut être préparée par des procédés connus.

5 La quantité de cyclopeptide directement administrée ou comprise dans les compositions pharmaceutiques est une quantité thérapeutiquement effective. Par quantité effective ou quantité thérapeutiquement effective, on entend une quantité de cyclopeptide tel quel ou comprise dans une composition pharmaceutique, qui conduit à l'effet prophylactique ou thérapeutique désiré.
10 Ladite quantité effective peut être déterminée de manière expérimentale par des procédures pharmaceutiques standards.

Afin d'obtenir l'effet prophylactique ou thérapeutique désiré, la dose de principe actif peut varier entre 0,1 µg et 200 mg par kg de poids du corps par jour. Bien que ces dosages soient des exemples de situation moyenne, il peut y
15 avoir des cas particuliers où des dosages plus élevés ou plus faibles soient plus appropriés. De tels dosages font partie de l'invention. Selon la pratique habituelle, le dosage approprié à chaque patient est déterminé par le médecin selon le mode d'administration, le poids et la réponse dudit patient.

Les modes d'administration peuvent inclure par exemple la voie orale, sublinguale, rectale, topique, nasale, pulmonaire, oculaire, intestinale et
20 parentérale. L'administration parentérale peut comprendre par exemple l'administration intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intrapéritonéale, intra-artérielle, intra-articulaire, intracisternale, intradermique, intra-lésionnelle, intra-oculaire, intrapleurale, intrathécale, intra-utérine, et intraventriculaire.
25 L'indication thérapeutique à traiter ainsi que les propriétés physicochimiques et biologiques de la composition permettent de déterminer la voie d'administration et la formulation les plus appropriées. Différentes formulations et systèmes d'administration sont décrits dans l'état de la technique.

Les compositions pharmaceutiques peuvent être sous forme de libération
30 instantanée, libération contrôlée, ou à libération retard. Les formulations les plus couramment utilisées sont par exemple, des solutions, des suspensions, des (micro-)émulsions, des pommades, des gels, des patchs, des comprimés,

des dragées, des capsules molles et dures, des implants, des poudres amorphes ou cristallines, et des formulations lyophilisées.

La formulation appropriée dépend du mode d'administration choisi. Par exemple, pour une administration parentérale par injection, les compositions
5 sont habituellement stériles et peuvent être présentées sous forme de dose unitaire comme par exemple sous forme d'ampoules, de seringues, de stylos d'injection, ou des flacons à doses multiples. Les compositions peuvent être sous forme de suspensions, de solutions ou émulsions dans un véhicule aqueux ou gras et contenir des tampons physiologiquement compatibles
10 comme par exemple, du phosphate, de l'histidine, ou du citrate pour ajuster le pH de la formulation, des agents de tonicité comme par exemple le chlorure de sodium ou le dextrose, des agents de viscosité, des agents de suspension, des agents de dispersions, des surfactants, des antioxydants, des polymères biocompatibles, des agents chélatants, des conservateurs. Selon le site
15 d'injection, le véhicule peut contenir de l'eau, une huile végétale ou synthétique et/ou des co-solvants organiques. Dans certains cas, comme dans le cas d'un produit lyophilisé ou un concentré, la formulation parentérale peut être reconstituée ou diluée préalablement à son administration. Dans le cas de
20 formulations injectables à effet retard, la composition selon l'invention peut être sous forme de suspension de nano/micro particules avec des polymères comme matrice. D'autres formulations à effet retard peuvent être sous forme d'implants ou de pompes. Pour une administration transmucoale ou nasale, des formulations solides, semi-solides ou des patchs peuvent être préférés. Pour une administration orale, la composition peut être formulée sous une
25 forme liquide ou solide et en tant que formulation à libération instantanée ou contrôlée/à retard notamment sous forme de granulés, de comprimés, de dragées, de capsules molles et dures, de liquides, de gels, de suspensions et des émulsions.

Le cyclopeptide tel que défini précédemment, peut être utilisé pour la
30 fabrication d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie associée à l'angiogenèse.

Un objet de l'invention concerne le cyclopeptide selon l'invention ou une composition pharmaceutique telle que définie précédemment, pour la prévention ou le traitement d'une maladie associée à l'angiogénèse.

Plus particulièrement, l'invention concerne le cyclopeptide selon
5 l'invention ou la composition pharmaceutique telle que définie précédemment, pour la prévention ou le traitement d'une maladie associée à l'angiogénèse choisie dans le groupe comprenant la croissance tumorale (tumeur de colon, sein, foie, rein et prostate), la dissémination métastatique (tumeur de colon, sein, foie, rein et prostate), les hémangiomes, la polyarthrite rhumatoïde,
10 l'endométriose, l'athérosclérose, la rétinopathie diabétique et la dégénérescence maculaire.

L'invention concerne plus particulièrement encore, le cyclopeptide selon l'invention ou la composition pharmaceutique telle que définie précédemment, pour la prévention ou le traitement de la croissance tumorale (colon, sein, foie,
15 rein et prostate).

L'administration du cyclopeptide de l'invention permet d'abord de normaliser la vascularisation tumorale et de faciliter l'accès des molécules thérapeutiques à la tumeur et ensuite de détruire complètement le réseau vasculaire tumoral.

20 Le cyclopeptide de l'invention peut être utilisé en thérapie, notamment en oncothérapie, chez le mammifère et en particulier chez l'homme.

Le terme « mammifère » désigne tout mammifère. A titre d'exemple, on peut citer les animaux domestiques comme les chiens et les chats ; les animaux de ferme comme les porcs, les bovins, les moutons et les chèvres ;
25 les animaux comme les souris et les rats ; les primates comme les singes, les chimpanzés ; et l'homme.

L'invention concerne en outre, le cyclopeptide de l'invention ou la composition pharmaceutique telle que définie précédemment, pour la prévention ou le traitement de l'ostéoporose.

30 L'invention concerne le cyclopeptide de l'invention pour son application comme médicament dans la prévention ou le traitement d'une maladie associée à la formation des tubes capillaires de cellules endothéliales.

L'invention concerne également l'utilisation du cyclopeptide pour empêcher la formation des tubes capillaires de cellules endothéliales.

Contrairement à l'art antérieur, le cyclopeptide selon l'invention possède une action anti-angéogénique directe sur la migration cellulaire et la formation
5 des tubes capillaires des cellules endothéliales.

La présente invention, selon un autre de ses aspects, concerne également une méthode de prévention ou de traitement des pathologies ci-dessus indiquées qui comprend l'administration d'un cyclopeptide selon l'invention ou d'une composition pharmaceutique le comprenant.

10 **Brève description des figures**

- La figure 1 représente de le spectre de masse haute-résolution du composé SA (ségétaline A).

Masse Haute Résolution : Calculée pour $C_{31}H_{43}N_7NaO_6$: 632,3173. Trouvée : 632,3157

15 - La figure 2 représente le spectre de masse haute-résolution du composé SP1.

Masse Haute Résolution Calculée pour $C_{25}H_{42}N_6NaO_6$ 545,3064. Trouvée : 545,3069

- La figure 3A représente le spectre de masse haute-résolution du composé
20 SP2.

Masse Haute Résolution : Calculée pour $C_{22}H_{34}N_6NaO_7$: 517,2387. Trouvée : 517,2401

- La figure 3B représente le spectre de masse haute-résolution du composé S1.

25 Masse Haute Résolution. Calculée pour $C_{23}H_{38}N_6NaO_6$: 517,2728. Trouvée : 517,2751 (S1 = $517.2728 \pm 4,4$ ppm).

- Les figures 4A et 4B représentent l'effet des milieux conditionnés (MC) sur la prolifération des cellules endothéliales.

Les cellules HUVEC ont été traitées pendant 48 heures par les MC préparés à partir des surnageant de culture des cellules MCF7 (figure 4A) ou avec MC
30 préparés à partir des surnageants de culture des cellules MDA-MB-231 (figure 4B), préalablement traitées pendant 48h par SA et SP1 (10^{-12} à 10^{-5} M). Le

potentiel inhibiteur de SA et SP1 sur la prolifération cellulaire a été évalué par rapport à la condition 10% de sérum foetal bovin (FBS). Les cellules non traitées ont été utilisées comme témoin basal. Les barres blanches représentent le taux de prolifération cellulaire en réponse aux MC traités avec différentes concentrations de SP1. Les barres noires représentent le taux de prolifération cellulaire en réponse aux MC traités avec différentes concentrations de SA. La ligne en pointillé délimite le taux de prolifération cellulaire par rapport au témoin basal. Les résultats sont exprimés en variation de la densité optique (DO), lue à 450 et à 570 nm. Les valeurs correspondent à la moyenne des DO \pm SEM de chaque concentration testée (n=3) * p<0,05, **p<0,01 ***p<0,001 versus contrôle.

- La figure 5A représente l'analyse de la phosphorylation des voies de signalisation impliquées dans la migration et la survie cellulaire (AKT-1) dans les cellules endothéliales de cordon ombilical humain (HUVEC), en réponse au MC obtenus à partir des cellules MCF7.

Les cellules HUVEC en culture sont traitées par les MC préparés à partir des surnageants des cellules MCF7, cellules préalablement traitées par différentes concentrations de SA et SP1 (10^{-11} à 10^{-5} M). Les cellules HUVEC sont ensuite récupérées et lysées à 5 min de traitement. Les histogrammes affichés représentent le résultat normalisé par le rapport P-Akt / t-Akt. Les données sont exprimées en unités arbitraires. p-Akt (phospho Akt), t-Akt (total Akt), T0 (témoin basal).

Les résultats sont exprimés en fonction des concentrations et les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM de chaque concentration testée (n=3) * p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001, versus contrôle.

- La figure 5B représente l'analyse de la phosphorylation des voies de signalisation impliquées dans la migration et la survie cellulaire (AKT-1) dans les cellules endothéliales de cordon ombilical humain (HUVEC), en réponse au MC obtenus à partir des cellules MDA-MB-231.

Les cellules HUVEC en culture sont traitées par les MC préparés à partir des surnageants des cellules MDA-MB-231, cellules préalablement traitées par différentes concentrations de SA et SP1 (10^{-11} à 10^{-5} M). Les cellules HUVEC sont ensuite récupérées et lysées à 5 min de traitement. Les histogrammes

affichés représentent le résultat normalisé par le rapport p-Akt / t-Akt. Les données sont exprimées en unités arbitraires. p-Akt (phospho Akt), t-Akt (total Akt), T0 (témoin basal). Les résultats sont exprimés en fonction des concentrations et les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM de chaque concentration testée (n=3) * p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001, versus contrôle.

- La figure 5C représente l'analyse de la phosphorylation des voies de signalisation impliquées dans la prolifération (ERK1/2) dans les cellules endothéliales de cordon ombilical humain (HUVEC), en réponse au MC obtenus à partir des cellules MCF7.

10 Les cellules HUVEC en culture sont traitées par les MC préparés à partir des surnageants des cellules MCF7 cellules préalablement traitées par différentes concentrations de SA et SP1 (10^{-11} à 10^{-5} M). Les cellules HUVEC sont ensuite récupérées et lysées à 5 min de traitement. Les histogrammes affichés
15 représentent le résultat normalisé par le rapport p-Erk / t-Erk. Les données sont exprimées en unités arbitraires. p-Erk (phospho Erk), t-Erk(total Erk), T0 (témoin basal). Les résultats sont exprimés en fonction des concentrations et les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM de chaque concentration testée (n=3) * p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001, versus contrôle.

- La figure 5D représente l'analyse de la phosphorylation des voies de
20 signalisation impliquées dans la prolifération (ERK1/2) dans les cellules endothéliales de cordon ombilical humain (HUVEC), en réponse au MC obtenus à partir des cellules MDA-MB-231.

Les cellules HUVEC en culture sont traitées par les MC préparés à partir des surnageants des cellules MDA-MB-231 cellules préalablement traitées par
25 différentes concentrations de SA et SP1 (10^{-11} à 10^{-5} M). Les cellules HUVEC sont ensuite récupérées et lysées à 5 min de traitement. Les histogrammes affichés représentent le résultat normalisé par le rapport p-Erk / t-Erk. Les données sont exprimées en unités arbitraires. p-Erk (phospho Erk), t-Erk (total Erk), T0 (témoin basal). Les résultats sont exprimés en fonction des
30 concentrations et les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM de chaque concentration testée (n=3) * p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001, versus contrôle.

- La figure 6A représente l'effet des cyclopeptides SP1 et SA sur la sécrétion du VEGFA par les cellules MCF7.

Les cellules ont été traitées pendant 48 h avec différentes concentrations de SA ou SP1 (10^{-12} à 10^{-5} M). Les cellules non traitées représentent le témoin basal tandis que les cellules traitées avec différentes concentrations de E_2 ($17\text{-}\beta$ estradiol) (10^{-5} à 10^{-12} M) représentent, le contrôle positif. La courbe reliant les losanges (ligne supérieure) représente les différentes concentrations du VEGFA des cellules traitées par E_2 . La courbe reliant les carrés (ligne moyenne) correspond aux différentes concentrations du VEGFA des cellules traitées par SP1. La courbe reliant les triangles (ligne inférieure) correspond aux différentes concentrations du VEGFA des cellules traitées par SA. La droite en pointillée représente le niveau du taux de sécrétion du VEGFA par les cellules traitées par le milieu de culture seul (contrôle basal). Les résultats sont exprimés en fonction des concentrations et les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM de chaque concentration testée (n=3) * p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001, versus contrôle.

15 - La figure 6B représente l'effet des cyclopeptides SP1 et SA sur la sécrétion du VEGFA par les cellules MDA-MB-231.

Les cellules ont été traitées pendant 48 h avec différentes concentrations de SA ou SP1 (10^{-12} à 10^{-5} M). Les cellules non traitées représentent le témoin basal tandis que les cellules traitées avec différentes concentrations de E_2 (10^{-5} à 10^{-12} M) représentent le contrôle positif. La courbe reliant les losanges (ligne supérieure) représente les différentes concentrations du VEGFA des cellules traitées par E_2 . La courbe reliant les carrés (ligne moyenne) correspond aux différentes concentrations du VEGFA des cellules traitées par SP1. La courbe reliant les triangles (ligne inférieure) correspond aux différentes concentrations du VEGFA des cellules traitées par SA. La droite en pointillée représente le niveau du taux de sécrétion du VEGFA par les cellules traitées par le milieu de culture seul (contrôle basal). Les résultats sont exprimés en fonction des concentrations et les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM de chaque concentration testée (n=3) * p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001, versus contrôle.

30 - La figure 6C représente l'effet inhibiteur des cyclopeptides SP1 et SA sur la sécrétion du VEGFA par les cellules MCF-7, en présence de E_2 (10^{-9} M).. Les cellules ont été traitées pendant 48 h avec différentes concentrations de SA ou SP1 (10^{-12} à 10^{-5} M) en présence d'une quantité fixe de E_2 (10^{-9} M). Les

cellules traitées avec différentes concentrations de E_2 uniquement (10^{-5} à 10^{-12} M), représente le contrôle positif. Les barres blanches représentent les différentes concentrations du VEGFA des cellules traitées par E_2 . Les barres grises représentent les différentes concentrations du VEGFA des cellules traitées par SP1+ E_2 . Les barres noires représentent les différentes concentrations du VEGFA des cellules traitées par SA+ E_2 . Les résultats sont exprimés en fonction des concentrations (E_2 , SP1+ E_2 et SA+ E_2) et les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM de chaque concentration de VEGF observée ($n=3$) * $p<0.05$, ** $p<0.01$ *** $p<0.001$ versus contrôle. (E_2 : 17 β estradiol).

- La figure 6D représente l'effet inhibiteur des cyclopeptides SP1, SA et S1 sur la sécrétion du VEGFA par les cellules MDA-MB-231, en présence de E_2 (10^{-9} M).

Les cellules ont été traitées pendant 48 h avec différentes concentrations de SA ou SP1 (10^{-12} à 10^{-5} M) en présence d'une quantité fixe de E_2 (10^{-9} M)... Les cellules traitées avec différentes concentrations de E_2 uniquement (10^{-5} à 10^{-12} M), représente le contrôle positif. Les barres blanches représentent les différentes concentrations du VEGFA des cellules traitées par E_2 . Les barres grises représentent les différentes concentrations du VEGFA des cellules traitées par SP1+ E_2 . Les barres noires représentent les différentes concentrations du VEGFA des cellules traitées par SA+ E_2 . Les résultats sont exprimés en fonction des concentrations (E_2 , SP1+ E_2 et SA+ E_2) et les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM de chaque concentration de VEGF observée ($n=3$) * $p<0.05$, ** $p<0.01$ *** $p<0.001$ versus contrôle. (E_2 : 17 β estradiol).

- La figure 6E représente l'effet des cyclopeptides SP1 et S1 sur la sécrétion du VEGFA par les cellules MCF7.

Les cellules ont été traitées pendant 48 h avec différentes concentrations de SP1 ou S1 (10^{-12} à 10^{-5} M). Les cellules non traitées représentent le témoin basal (noté 0) tandis que les cellules traitées avec 10^{-9} M de E_2 représentent le contrôle positif. Les barres blanches représentent la concentration du VEGFA des cellules traitées par E_2 . Les barres de couleur gris clair représentent la concentration du VEGFA des cellules non traitées (contrôle basal). Les barres

de couleur gris foncé représentent les différentes concentrations du VEGFA des cellules traitées par les différentes de S1 (10^{-12} à 10^{-5} M). Les barres noires représentent les différentes concentrations du VEGFA des cellules traitées par les différentes de SP1 (10^{-12} à 10^{-5} M). La droite en pointillée représente le niveau du taux de sécrétion du VEGFA par les cellules traitées par le milieu de culture seul (contrôle basal). Les résultats sont exprimés en fonction des concentrations des différentes molécules testées et les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM de chaque concentration testée (n=3) * p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001, versus contrôle.

10 - La figure 6F représente l'effet des cyclopeptides SP1 et S1 sur la sécrétion du VEGFA par les cellules MDA-MB-231.

Les cellules ont été traitées pendant 48 h avec différentes concentrations de S1 ou SP1 (10^{-12} à 10^{-5} M). Les cellules non traitées représentent le témoin basal (noté 0) tandis que les cellules traitées avec 10^{-9} M de E₂ représentent le contrôle positif. Les barres blanches représentent la concentration du VEGFA des cellules traitées par E₂. Les barres de couleur gris clair représentent la concentration du VEGFA des cellules non traitées (contrôle basal). Les barres de couleur gris foncé représentent les différentes concentrations du VEGFA des cellules traitées par les différentes de S1 (10^{-12} à 10^{-5} M). Les barres noires représentent les différentes concentrations du VEGFA des cellules traitées par les différentes de SP1 (10^{-12} à 10^{-5} M). La droite en pointillée représente le niveau du taux de sécrétion du VEGFA par les cellules traitées par le milieu de culture seul (contrôle basal). Les résultats sont exprimés en fonction des concentrations des différentes molécules testées et les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM de chaque concentration testée (n=3) * p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001, versus contrôle.

25 - La figure 7A représente l'analyse de l'expression de l'ARNm de VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ et VEGF₁₈₉ dans les cellules MCF-7 en réponse au traitement par SA et SP1.

30 Les cellules ont été traitées pendant 6 h avec SA et SP1 (10^{-5} M). Les cellules non traitées représentent le contrôle basal (0) tandis que les cellules traitées avec E₂ (10^{-9} M) représentent le contrôle positif. Les barres blanches caractérisent le taux d'expression de l'ARNm de l'isoforme VEGF₁₂₁, les barres

grises le taux d'expression de l'ARNm de l'isoforme VEGF₁₆₅ et les barres noires le taux d'expression de l'ARNm de l'isoforme VEGF₁₈₉. Les résultats sont exprimés en fonction des traitements (E₂, SP1 et SA) et correspondent à la moyenne ± SEM du taux relatif d'expression de l'ARNm des différentes isoformes du VEGFA, (n=3) * p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001 versus contrôle.

- La figure 7B représente l'analyse de l'expression de l'ARNm de VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ et VEGF₁₈₉ dans les cellules MBA-MB-231 en réponse au traitement par SA et par SP1.

Les cellules ont été traitées pendant 6 h avec SA et SP1 (10⁻⁵ M). Les cellules non traitées représentent le contrôle basal (0) tandis que les cellules traitées avec E₂ (10⁻⁹ M) représentent le contrôle positif. Les barres blanches caractérisent le taux d'expression de l'ARNm de l'isoforme VEGF₁₂₁, les barres grises le taux d'expression de l'ARNm de l'isoforme VEGF₁₆₅ et les barres noires le taux d'expression de l'ARNm de l'isoforme VEGF₁₈₉. Les résultats sont exprimés en fonction des traitements (E₂, SP1 et SA) et correspondent à la moyenne ± SEM du taux relatif d'expression de l'ARNm des différentes isoformes du VEGFA, (n=3) * p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001 versus contrôle.

- Les figures 8A et 8C représentent le test de différenciation des HUVEC en Matrigel[®].

Les cellules ont été traitées pendant 16 heures par différentes concentrations de SA et SP1 (10⁻⁶ à 10⁻⁵ M). Deux témoins ont été utilisés : la génistéine à 30 µg/mL, inhibitrice de la différenciation des HUVEC en Matrigel[®] et de la migration des HUVEC, et l'EGF à 50 ng/mL, activateur de la différenciation des HUVEC en Matrigel[®] et de la migration des HUVEC. Les cellules non traitées ont été utilisées comme témoin basal (cellules en culture dans du milieu de culture supplémenté de 10% FBS seul). Gen signifie la génistéine et EGF signifie le facteur de croissance endothéliale (Endothelial Growth Factor en anglais). La figure 8C représente la quantification de la longueur des myotubes observés dans chaque condition par rapport à la longueur des myotubes observés dans le témoin basal.

- La figure 8B représente l'évaluation de l'activité anti-angiogénique des cyclopeptides SA et S1 par le test de migration des HUVEC.

Les cellules ont été traitées pendant 16 heures par différentes concentrations de SA et SP1 (10^{-6} à 10^{-5} M). Deux témoins ont été utilisés : la génistéine à 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, inhibitrice de la différenciation des HUVEC en Matrigel[®] et de la migration des HUVEC, et l'EGF à 50 ng/mL , activateur de la différenciation des HUVEC en Matrigel[®] et de la migration des HUVEC. Les cellules non traitées ont été
5 utilisées comme témoin basal (cellules en culture dans du milieu de culture supplémenté de 10% FBS seul). (Gen signifie génistéine ; EGF signifie le facteur de croissance épidermique).

10

EXEMPLES

Solvants et réactifs

Les résines Fmoc-Gly-Sasrin et Fmoc-Pro-Sasrin utilisées dans les exemples sont commercialisées par la société Bachem.

La synthèse peptidique a été réalisée sur support solide sur un
15 synthétiseur de peptide Applied Biosystem 433A commercialisé par la société Applied Biosystem.

Le mélange du *O*-benzotriazole-*N,N,N',N'*-tétraméthyl-uronium-hexafluorophosphate (HBTU) et du *N*-hydroxybenzotriazole anhydre (HOBt), en solution dans du diméthylformamide (DMF) est commercialisé par la société Applied
20 Biosystem.

Les acides aminés Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH utilisés dans les exemples proviennent des sociétés Bachem et Iris Biotech.

La *N,N*-diisopropyléthylamine (DIEA) dans de la *N*-méthylpyrrolidinone (NMP), et la NMP proviennent de la société Applied Biosystem. La pipéridine, l'acide trifluoroacétique (TFA), le dichlorométhane (DCM) et l'acétonitrile sont commercialisés par les sociétés Acros et Applied Biosystem.

L'azoture de diphénylphosphoryl azide (DPPA), le DIEA, l'éther diéthylique, le méthanol et le palladium sur charbon sont commercialisés par
30 les sociétés Sigma et Acros.

Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres ^1H and ^{13}C ont été réalisés sur un instrument Bruker Avance 500. Les déplacements chimiques des protons (δ ppm) ont été calibrés par rapport au tétraméthylsilane. Les constantes de couplage sont données en Hertz.

5 Les spectres sont effectués dans des solvants deutérés provenant des fournisseurs Aldrich et SDS ou Eurisotop.

Spectrométrie de masse

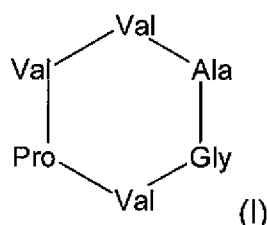
10 Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre Micromass-Waters Q-TOF Ultima, dans des solvants de qualité « pour Analyse ».

Chromatographie

15 Les analyses par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), ont été réalisées sur une chaîne Shimadzu avec une colonne analytique C18 prosphère 100A (4,6 x 250mm 5 μ : débit 1 ml/min) commercialisée par Alltech-Grace avec un détecteur UV (220 nm). Un gradient de deux solvants A (eau/TFA : 100/0,1) et B (acétonitrile/eau/TFA : 80/20/0,1) a été utilisé.

20 Les purifications par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP), ont été réalisées sur une colonne semi-préparative C18 (prosphère 100A 10 x 250mm 5 μ : débit 2-3 ml/min) commercialisée par Alltech-Grace avec un détecteur UV (220 nm).

25 **Exemple 1 : Préparation du cyclopeptide de formule (I) selon l'invention (cyclopeptide SP1)**



30 Le peptide linéaire $\text{H}_2\text{N-Val-Pro-Val-Val-Ala-Gly-OH}$ est synthétisé, à partir de la Fmoc-Gly-Sasrin, selon les méthodes de synthèse peptidique sur support

solide sur un synthétiseur de peptide Applied Biosystem 433A (1 équivalent, 0,1 mM) [3].

Après activation de la fonction acide à l'aide d'un mélange HBTU et de 0,5M HOBt en solution dans du DMF, dix équivalents d'acides aminés Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Val-OH sont successivement additionnés à la Fmoc-Gly-Sasrin en présence de DIEA dans de la *N*-méthylpyrrolidinone (NMP). Après chaque couplage peptidique, le groupe Fmoc situé à l'extrémité *N*-terminale du dernier acide aminé couplé à la résine est clivé à l'aide d'une solution de NMP à 20% de pipéridine. 148 mg de peptide-résine sont obtenus.

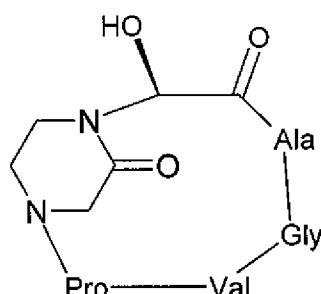
La résine Sasrin est ensuite clivée du peptide linéaire ainsi obtenu à l'aide d'une solution d'acide trifluoroacétique à 1% dans du dichlorométhane pendant 45 minutes à température ambiante (20°C). Après filtration et élimination de la résine, le peptide linéaire est obtenu sous forme d'une huile incolore après élimination sous vide du solvant. Le peptide linéaire (49 mg) est cyclisé à une concentration de $2 \cdot 10^{-4}$ M dans l'acétonitrile en présence de 34 eq de DIEA et de 3 eq de DPPA, sous argon, jusqu'à disparition complète du peptide linéaire (48h) à température ambiante. La réaction est suivie par Chromatographie Liquide Haute Performance (Shimadzu, colonne analytique C18 prosphère 100A 4,6 x 250mm 5 μ (Alltech-Grace), avec un gradient de solvants (A : eau/TFA : 100/0,1 ; B : acétonitrile/eau/TFA : 80/20/0,1). Après élimination du solvant sous vide, 60 mg de peptide cyclique impur sont obtenus après précipitation à l'éther di-éthylique et filtration. Un produit pâteux est obtenu.

Une purification par CLHP est enfin réalisée sur une colonne semi-préparative C18 prosphère 100A 10 x 250mm 5 μ (Alltech-Grace). Après lyophilisation, le cyclopeptide SP1 est obtenue sous la forme d'une poudre blanche.

Masse : 22,7 mg ; Rendement : 49%.

Masse Haute Résolution. Calculée pour $C_{25}H_{42}N_6NaO_6$: 545,3064. Trouvée : 545,3069 (SP1 = $545,3069 \pm 1,1$ ppm, figure 2).

Exemple comparatif 1 : Préparation du cyclopeptide (SP2)



Le peptide linéaire H₂N-Ala-Gly-Val-Pro-OH est synthétisé, à partir de la
5 Fmoc-Pro-Sasrin, selon les méthodes de synthèse peptidique sur support
solide sur un synthétiseur de peptide Applied Biosystem 433A (1 équivalent,
0,1 mM) [3]. Dix équivalents des acide-aminés Fmoc-Val-OH, Fmoc-Gly-OH,
Fmoc-Ala-OH sont successivement additionnés à la H₂N-Pro-résine en
présence de DIEA dans de la *N*-méthylpyrrolidinone, après activation de la
10 fonction acide à l'aide d'un mélange HBTU et de 0,5M HOBt en solution dans
du DMF. Après chaque couplage peptidique, le groupe Fmoc situé à l'extrémité
N-terminale du dernier amino-acide couplé à la résine est clivé à l'aide d'une
solution de NMP à 20% de piperidine. 161 mg de peptide-résine sont obtenus.

Le peptide linéaire H₂N-pipérazinone-Ala-Gly-Val-Pro-OH est obtenu par
15 couplage de deux équivalents de pipérazinone [4] avec un composé de formule
(III) dans laquelle q=1, R₈=O, R₆=R₇=H, R₅=Ph-CH₂O, avec un équivalent du
peptide-résine H₂N-Ala-Gly-Val-Pro-OH, à une concentration 7.10⁻³M, dans
l'acétonitrile, en présence de 34 équivalents de DIEA et 3 équivalents de DPPA
en phase solide. La solution est agitée à température ambiante (20°C) sous
20 atmosphère d'argon pendant 48 heures. Après élimination sous vide du
solvant, la déprotection du groupement Boc et le clivage de la résine se font
simultanément à l'aide d'un mélange 50/50 de TFA/DCM pendant 2 heures.

Après filtration de la résine et élimination sous pression réduite des
solvants, la cyclisation du peptide linéaire H₂N-pipérazinone-Ala-Gly-Val-Pro-
25 OH est effectuée à une concentration de 2.10⁻⁴ M dans l'acétonitrile en
présence de 34 équivalents de DIEA et de 3 équivalents de DPPA, sous argon,
jusqu'à disparition complète du peptide linéaire (48h) à température ambiante
(20°C). La réaction est suivie par Chromatographie Liquide Haute Performance

(Shimadzu, colonne analytique C18 prosphère 100A 4,6 x 250mm 5 μ (Alltech-Grace), avec un gradient de solvants (A : eau/TFA : 100/0,1 ; B : acétonitrile/eau/TFA : 80/20/0,1).

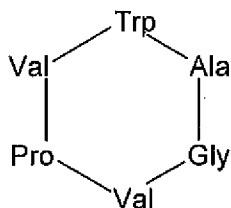
Après élimination du solvant sous vide, le brut est directement purifié par
5 CLHP sur une colonne semi-préparative C18 prosphère 100A 10 x 250mm 5 μ
(Alltech-Grace). Après lyophilisation, le cyclopeptide protégé SP2 (15,2 mg) est
obtenu sous la forme d'une huile. Enfin, la déprotection du groupe benzyle est
réalisée par hydrogénolyse dans le méthanol en présence de 10% de
10 palladium sur charbon. Après filtration et élimination sous vide du solvant, une
huile jaune est obtenue.

Masse : 12,5 mg ; Rendement : 18%.

Masse Haute Résolution. Calculée pour C₂₂H₃₄N₆NaO₇: 517,2387. Trouvée :
517,2401(SP2 = 517,2401 \pm 2.7 ppm, figure 3 A).

15

Exemple comparatif 2 : Préparation de la ségétaline A (cyclopeptide SA)



20

Le peptide linéaire H₂N-Val-Pro-Val-Trp(boc)-Ala-Gly-OH est synthétisé, à
partir de la Fmoc-Gly-Sasrin, selon les méthodes de synthèse peptidique sur
support solide sur un synthétiseur de peptide Applied Biosystem 433A (1
équivalent, 0,1 mM) [3].

Après activation de la fonction acide à l'aide d'un mélange HBTU et de
0,5M HOBt en solution dans du DMF, dix équivalents d'acide-aminés Fmoc-
Ala-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Val-OH sont
successivement additionnés, à la Fmoc-Gly-Sasrin en présence de *N,N*-
diisopropyléthylamine (DIEA) dans de la *N*-méthylpyrrolidinone (NMP). Après
30 chaque couplage peptidique, le groupe Fmoc situé à l'extrémité *N*-terminale du

dernier acide aminé couplé à la résine est clivé à l'aide d'une solution de NMP à 20% de pipéridine. 125 mg de résine-peptide (HO-Val-Pro-Val-Trp(boc)-Ala-Gly-Sasrin) ont été obtenus.

Le peptide linéaire ainsi obtenu est clivé de la résine Sasrin à l'aide d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) à 1% dans du dichlorométhane pendant 5 45 minutes à température ambiante (20°C). Après filtration de la résine, le peptide linéaire est récupéré dans le filtrat.

Après élimination sous vide du solvant, 41,6 mg de peptide protégé sont obtenus sous forme d'une huile incolore. Le peptide linéaire est cyclisé à une concentration de $2 \cdot 10^{-4}$ M dans l'acétonitrile en présence de 34 équivalents (eq) de DIEA et de 3 eq de DPPA, sous argon, jusqu'à disparition complète du peptide linéaire (48h) à température ambiante (20°C). La réaction est suivie par Chromatographie Liquide Haute Performance (Shimadzu, colonne analytique C18 prosphère 100A 4,6 x 250mm 5 μ (Alltech-Grace), avec un gradient de solvants (A : eau/TFA : 100/0,1 ; B : acétonitrile/eau/TFA : 80/20/0,1). 15

Après élimination du solvant sous vide, le peptide cyclique protégé est obtenu. Le groupement Boc de la chaîne du tryptophane du peptide cyclique est clivé à l'aide d'une solution de TFA à 50% dans le dichlorométhane. Après élimination sous vide du solvant, le peptide cyclique est filtré après addition d'éther diéthylique. 20

Un produit pâteux est obtenu. Une purification par CLHP est enfin réalisée sur une colonne semi-préparative C18 prosphère 100A 10 x 250mm 5 μ (Alltech-Grace). Après lyophilisation, la ségétaline A est obtenue sous la forme d'une poudre blanche.

25 Masse: 10,1 mg ; Rendement : 29%.

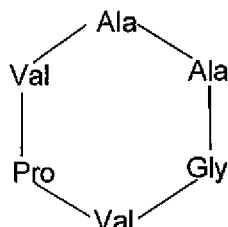
Masse Haute Résolution. Calculée pour $C_{31}H_{43}N_7NaO_6$: 632,3173. Trouvée : 632,3157 (SA = $632,3157 \pm 2.5$ ppm, figure 1).

30 1H NMR (500 MHz, [2H_6]-DMSO, δ ppm relatif au tétraméthylsilane, J (Hz)): Gly₁, 3,32 (1H, H α , m), 3,66 (1H, H α , m), 7,44 (1H, H_{NH}, m). Val₂, 0,82 (3H, H γ , d, 6,8), 0,95 (3H, H γ , d, 6,7), 2,11 (1H, H β , m), 4,51 (1H, H α , dd, 8,7 , 4,9), 7,42 (1H, H_{NH}, m). Pro₃, 1,68 (1H, H γ , m), 1,91 (1H, H γ , m), 1,94 (1H, H β , m), 2,05

(1H, H β , m), 3,57 (1H, H δ , m), 3,59 (1H, H δ , m), 4,35 (1H, H α , d, 8,0). Val₄, 0,75 (3H, H γ , d, 6,2), 0,77 (3H, H γ , d, 6,2), 2,05 (1H, H β , m), 4,13 (1H, H α , t, 9,8), 7,31 (1H, H_{NH}, d, 9,8). Trp₅, 3,10 (1H, H β , dd, 16,5 ; 7,7), 3,12 (1H, H β , dd, 16,5 , 7,7), 4,26 (1H, H α , m), 6,98 (1H, H₆, t, 7,8), 7,07 (1H, H₅, t, 7,8), 7,14
 5 (1H, H₂, s), 7,34 (1H, H₇, d, 7,8), 7,55 (1H, H₄, d, 7,8), 8,49 (1H, H_{NH}, d, 5,7), 10,88 (1H, H_{1-NH}, s). Ala₆, 1,14 (3H, H β , d, 7,0), 3,69 (1H, H α , m), 8,92 (1H, H_{NH}, d, 6,3).

¹³C NMR (125 MHz, [²H₆]-DMSO, δ ppm relatif au tétraméthylsilane): Gly₁, 43,6 (C α), 169,3 (CO). Val₂, 56,0 (C α), 30,5 (C β), 18,2 et 20,3 (C γ), 171,6 (CO).
 10 Pro₃, 61,1 (C α), 32,1 (C β), 22,2 (C γ), 47,66 (C δ), 172,3 (CO). Val₄, 60,1 (C α), 30,8 (C β), 19,4 et 20,0 (C γ), 173,4 (CO). Trp₅, 56,4 (C α), 26,8 (C β), 122,2, 110,0, 119,2, 121,9, 119,2, 112,1, 136,9 et 127,9 (C aromatique), 173,7 (CO). Ala₆, 50,9 (C α), 16,2 (C β), 171,9 (CO).

15 **Exemple comparatif 3 : Préparation d'un cyclopeptide, analogue de la ségétaline A (cyclopeptide S1)**



20 Le peptide linéaire H₂N-Val-Pro-Val-Ala-Ala-Gly-OH est synthétisé, à partir de la Fmoc-Gly-Sasrin, selon les méthodes de synthèse peptidique sur support solide sur un synthétiseur de peptide Applied Biosystem 433A (1 équivalent, 0,1 mM) [3].

Après activation de la fonction acide à l'aide d'un mélange HBTU et de
 25 0,5M HOBt en solution dans du DMF, dix équivalents d'acides aminés Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Val-OH sont successivement additionnés à la Fmoc-Gly-Sasrin en présence de DIEA dans de la *N*-méthylpyrrolidinone (NMP). Après chaque couplage peptidique, le groupe Fmoc situé à l'extrémité *N*-terminale du dernier acide aminé couplé à la

résine est clivé à l'aide d'une solution de NMP à 20% de pipéridine. 103 mg de peptide-résine sont obtenus.

La résine Sasrin est ensuite clivée du peptide linéaire ainsi obtenu à l'aide d'une solution d'acide trifluoroacétique à 1% dans du dichlorométhane pendant 5 45 minutes à température ambiante (20°C). Après filtration et élimination de la résine, le peptide linéaire est obtenu sous forme d'une huile incolore après élimination sous vide du solvant. Le peptide linéaire (34 mg) est cyclisé à une concentration de $2 \cdot 10^{-4}$ M dans l'acétonitrile en présence de 34 eq de DIEA et de 3 eq de DPPA, sous argon, jusqu'à disparition complète du peptide linéaire 10 (48h) à température ambiante. La réaction est suivie par Chromatographie Liquide Haute Performance (Shimadzu, colonne analytique C18 prosphère 100A 4,6 x 250mm 5 μ (Alltech-Grace), avec un gradient de solvants (A : eau/TFA : 100/0,1 ; B : acétonitrile/eau/TFA : 80/20/0,1). Après élimination du solvant sous vide, 42 mg de peptide cyclique impur sont obtenus après 15 précipitation à l'éther di-éthylique et filtration. Un produit pâteux est obtenu.

Une purification par CLHP est enfin réalisée sur une colonne semi-préparative C18 prosphère 100A 10 x 250mm 5 μ (Alltech-Grace). Après lyophilisation, le cyclopeptide S1 est obtenu sous la forme d'une (poudre 20 pateuse légèrement beige).

Masse : 14.75 mg ; Rendement : 45%.

Masse Haute Résolution. Calculée pour $C_{23}H_{39}N_6NaO_6$: 517,2728. Trouvée : 517.2751 (S1 = $517.2728 \pm 4,4$ ppm, figure 3B).

25

Exemple 3 : Tests biologiques

Les tests ont portés sur les cyclopeptides SP1 selon l'invention, SA et S1, et ont pour but de comparer l'activité angiogénique de SP1, SA et S1. Le cyclopeptide SP1 a démontré une résistance importante à l'hydrolyse acide. Ce 30 dernier solubilisé, à une concentration de 10^{-3} M, dans une solution d'acide chlorhydrique à 0,5 M, à température ambiante (20°C), est retrouvé inchangé à 72% au bout de 7 jours, contre 98% dans les mêmes conditions en solution aqueuse uniquement.

3-1. Préparation

a) Cyclopeptides utilisés

Les tests ont portés sur les cyclopeptides SP1, SA et S1, plus
5 particulièrement avec l'objectif de comparer l'activité anti-angiogénique du
cyclopeptide synthétique SP1 par rapport à celle du cyclopeptide naturel SA
ainsi que le cyclopeptide synthétique S1.

Le cyclopeptide SP1 a démontré une résistance importante à l'hydrolyse
acide. Ce dernier solubilisé, à une concentration de 10^{-3} M, dans une solution
10 d'acide chlorhydrique à 0,5 M, à température ambiante (20°C), est retrouvé
inchangé à 72% au bout de 7 jours, contre 98% dans les mêmes conditions en
solution aqueuse uniquement.

b) Cellules utilisées

15 Les trois peptides, après solubilisation dans l'eau à une concentration de
 10^{-3} M, ont été testés à des concentrations allant de 10^{-12} à 10^{-5} M sur différents
types de cultures cellulaires :

- (i) de cellules endothéliales de cordon ombilical humain (HUVEC), et
- (ii) de cellules d'adénocarcinome mammaire humain : MCF7 et MDA-
20 MB231.

Les cordons ont été obtenus dans le service de gynécologie obstétrique et
médecine de la reproduction du Centre de Gynécologie Obstétrique d'Amiens
(CGO).

Les HUVECs sont mises en culture dans le milieu M199 (Eurobio, France)
25 complet qui est un milieu M199 supplémenté de

- 20% de sérum fœtal bovin (FBS ; Abcys, France),
- 1% de 200 mM glutamine stabilisée (GIBCO, France),
- 1% de pénicilline/streptomycine (concentrations finales de 100
UI/ml et 100µg/mL respectivement) (Invitrogen, France), et
- 30 - 2ml de Supplément de Croissance de Cellules Endothéliales
(ECGS ; PromoCell, France).

Les MFC7 sont des cellules d'adénocarcinome mammaire humain
hormono-dépendant qui expriment les deux récepteurs aux œstrogènes (ER_{α} +

et ER β +). Ces cellules ont un faible pouvoir métastatique. Les cellules MDA-MB231, non hormonodépendantes, sont des cellules à fort pouvoir métastatique qui n'expriment qu'un seul récepteur aux oestrogènes, le récepteur β (ER α - et ER β +). Les MCF7 et les MDA-MB231 proviennent de
5 l'American Type Culture Collection (ATCC).

3-2. Test de prolifération, de cytotoxicité cellulaire et de mesure de la concentration de VEGF synthétisé

a) Test de prolifération, et de cytotoxicité

Les cellules HUVECs, ont été utilisées pour évaluer l'activité anti-angiogénique des cyclopeptides SP1 et SA en étudiant leurs effets directs sur
10 la prolifération, la différenciation et la migration de ces cellules dans un premier temps..

Dans un deuxième temps, les cellules MCF7 et MDA-MB-231 ont été utilisées pour évaluer l'activité anti-angiogénique indirecte des cyclopeptides
15 SP1 et SA en étudiant d'une part, leur effet direct sur la prolifération cellulaire de ces cellules (pour SP1 et SA) et d'autre part, leur effet indirect sur les cellules endothéliales en ciblant plus particulièrement le VEGFA (pour SP1, SA et S1).. VEGFA est un facteur de croissance proangiogénique synthétisé et sécrété par ces deux lignées cellulaires MCF7 et MDA-MB231.

20 Pour tester l'effet direct sur la prolifération et la cytotoxicité cellulaire, deux conditions expérimentales ont été utilisées :

- (i) à 0% de sérum foetal bovin (FBS) : cette condition permet d'évaluer l'effet activateur des cyclopeptides SP1 et SA sur la prolifération cellulaire.
- 25 (ii) à 10% de sérum foetal bovin (FBS) : cette condition permet d'évaluer l'effet inhibiteur des cyclopeptides SP1 et SA sur la prolifération cellulaire.

Il apparait que ni SP1 ni SA ne modifient la prolifération des HUVEC, MCF7 et MDA-MB-231 (tests de prolifération en milieu normal).

30

b) Mesure de la sécrétion du VEGFA

Le dosage du VEGFA sécrété a été réalisé sur les cultures cellulaires (MCF7 ou MDA-MB-231), après synchronisation du cycle cellulaire en phase

G1 pendant 24h et traitement pendant 48h avec les différentes concentrations des cyclopeptides SP1, SA et S1 (10^{-12} à 10^{-5} M) préparées extemporanément dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) sans rouge de phénol (Invitrogen, France) et supplémenté avec 10% de sérum foetal bovin (FBS ;Abcys, France). Chaque concentration de cyclopeptide SP1, SA et S1 est testée trois fois. Le 17- β -estradiol (E_2), utilisé comme contrôle positif [5] (Sigma, France), induit la sécrétion du VEGFA par les cellules MCF7 et les cellules MDA-MB-231 (figures 6A, 6B, 6E et 6F). SP1 et SA présentent des IC_{50} comprises entre 10^{-8} et 10^{-9} M (figures 6A et 6B). S1 à des concentrations de 10^{-12} M à 10^{-5} M ne modifie pas la sécrétion du VEGFA par les MCF7 et les MDA-MB-231 par rapport au condition basale (cellules cultivées dans du DMEM supplémenté de 10%FBS sans aucun traitement)..

Les cellules MCF7 et MDA-MB-231 ont été traitées par différentes concentrations de SP1 et SA (10^{-12} à 10^{-5} M) pendant 48 heures. Les surnageants de ces cultures sont récupérés et appelés milieux conditionnés (MC). Un test de prolifération sur les cellules HUVEC traitées par ces milieux conditionnés a été réalisé dans les mêmes conditions que le test de prolifération cellulaire en milieu de culture normal (figure 4). Les cellules HUVEC non traitées ont été utilisées comme contrôle basal.

L'effet inhibiteur de SP1 et SA sur la sécrétion du VEGF préalablement induite par E_2 a également été évalué (figures 6C à 6D). Ainsi, les cellules (MCF7 et MDA-MB-231) ont été traitées pendant 48h avec des concentrations fixes de SP1 et SA (10^{-6} ou 10^{-5} M) en présence de concentrations variables de E_2 (10^{-12} à 10^{-5} M). Le taux de VEGFA sécrété a ensuite été dosé avec le kit Quantikine® ELISA de détection du VEGF humain (R&D, France).

c) Analyse de la phosphorylation de AKT-1 et ERK1/2

L'analyse des voies de signalisation PI3K/AKT et ERK1/2 a été réalisée par Western Blot. AKT-1 et ERK1/2 sont des sérine/thréonine kinases suractivées dans de nombreux cancers humains [6], [7]. Les voies de signalisation PI3K/AKT et ERK1/2 sont des voies de signalisation impliquées dans la prolifération (ERK1/2), la migration et la survie cellulaire (PI3K/AKT) [8], [9].

Pour analyser la phosphorylation de AKT-1 et ERK1/2 (figures 5A à 5D), les cellules HUVEC mises en culture dans du milieu M199 (Eurobio, France) sans rouge de phénol, ont été privées de sérum pendant une heure pour déphosphoryler Akt-1 et ERK1/2. Les cellules HUVEC ont été ensuite traitées pendant 5, 15 et 30 minutes dans des MC composés du M199 sans rouge de phénol supplémentés avec 10% de FBS et 20% de surnageant de culture de MCF7 ou MDA-MB-231 préalablement traitées avec des cyclopeptides SP1 et SA (10^{-12} à 10^{-5} M). Les cellules HUVEC non traitées ont été utilisées comme contrôle basal. Parallèlement, un test de prolifération sur ces cellules HUVEC traitées par ces milieux conditionnés a été réalisé dans les mêmes conditions que celles du test de prolifération cellulaire en milieu de culture normal (figure 4).

3-3. Analyse de l'activité des cyclopeptides SP1 et SA sur l'expression des transcrits du VEGFA et de ses isoformes

L'analyse de l'activité des cyclopeptides SP1 et SA sur l'expression des trois isoformes du VEGFA (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ et VEGF₁₈₉) a également été réalisée par réaction de RT-PCR quantitative.

Les cellules (MCF7 et MDA-MB231) sont traitées avec 10^{-5} M de cyclopeptides SP1 et SA pendant 6, 8, 12, 16, ou 20 h (figures 7A et 7B). Le 17- β -estradiol (E₂) est utilisé comme contrôle positif et les cellules non traitées comme contrôle basal. Les ARN sont extraits en utilisant le kit « TriPure Isolation Reagent » (Eurobio, France). L'ADNc est synthétisé en utilisant le kit « AB Applied Biosystems » selon les instructions du fournisseur. Les ADNc sont ensuite stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Pour quantifier l'expression de l'ARNm codant pour les trois principaux isoformes de VEGFA (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ et VEGF₁₈₉), le thermocycler ABI PRISM 7009 HT (Applied Biosystems) a été utilisé. L'amplification spécifique de chaque séquence a été réalisée exclusivement avec des amorces spécifiques de chaque isoforme. Les amorces de VEGFA (Fisher Bioblock, Invitrogen, France) ont déjà été validées [10], [11]. Les amorces β 2-microglobuline ont été utilisées comme contrôle interne.

3-4. Tests de différenciation cellulaire (formation de tube en Matrigel®)

La différenciation des cellules endothéliales pour former des vaisseaux peut être induite *in vitro* en cultivant les cellules endothéliales en présence de différents composants de la matrice extracellulaire, comme des gels bi- ou tri-dimensionnels de collagène I ou de fibrine, ou du Matrigel®. Les cellules endothéliales cultivées sur Matrigel® (Basement Membrane Matrix, BD, USA) peuvent former des structures de type capillaire en à peine 6 heures, ce qui rend ce test adapté à la recherche de molécules antiangiogéniques [12]. Ces tests de différenciation cellulaire ont été réalisés sur les HUVEC (figure 8A). Les cellules sont aussitôt traitées dans 500 µL de Matrigel® contenant différentes concentrations des cyclopeptides SP1 et SA (10^{-12} à 10^{-5} M), deux conditions « contrôle positif » ont été effectuées avec 50 ng/mL d'EGF (Endothelial Growth Factor en anglais), et 30 µg/mL de génistéine (contrôle négatif) (figure 8A) [13]. Les cellules non traitées ont été utilisées comme « contrôle basal » (noté 10% de FBS sur les Figures 8A-8C).

La formation de tubes est quantifiée par des techniques d'analyses d'images, permettant notamment de mesurer le nombre et la longueur des tubes ou l'aire couverte par le réseau de capillaires [14]. La Figure 8C présente le résultat obtenu par ce test, dans laquelle les valeurs correspondent à la longueur en mm des tubes capillaires \pm SEM ; et chaque concentration est testé trois fois (n=3) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0.001 versus contrôle.

On peut observer que la formation des tubes est fortement inhibée par SP1. Par conséquent, le cyclopeptide SP1 a un effet significatif sur la formation des tubes capillaire de cellules endothéliales.

3-5. Tests de migration des cellules endothéliales

Des tests de migration des cellules endothéliales (cellules HUVEC) ont été réalisées afin d'établir le potentiel chimioattractant des cyclopeptides SP1 et SA. La migration vers un facteur proangiogénique est une étape clé du processus d'angiogenèse. Le test de migration ou test de blessure *in vitro* permet d'estimer l'effet d'une molécule sur la migration des cellules endothéliales.

Le principe de ce test repose sur le retrait d'une fine bande de cellules endothéliales confluentes de la boîte de culture et le dénombrement des cellules qui migrent dans l'espace libéré par la blessure. Les cellules sont ensemencées dans 500 μL de milieu M199 complet à raison de $5 \cdot 10^5$ cellules par puits dans des plaques de 24 puits. La plaque est incubée 24h en étuve thermostagée à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO_2 . Après 24h, les cellules confluentes à 100% sont lavées une fois avec du tampon phosphate salin (PBS venant de phosphate buffered saline). La blessure est alors réalisée. Les photos contrôles sont prises avant et après la blessure. Les cellules sont ensuite traitées avec 250 μL des différentes concentrations des cyclopeptides SA et SP1 (10^{-12} à 10^{-5} M) préparées extemporanément dans du milieu M199 sans rouge de phénol supplémenté de 10% de FBS. Chaque concentration est testée trois fois. La plaque est incubée pendant 24h, dans les mêmes conditions que lors du premier jour. Les photos sont prises à l'objectif x 4 après 8h, 16h et 24h en utilisant une vidéo caméra JVC Ky-F50 connectée au logiciel VisioL et montée sur un microscope Leica (France) (figure 8B).

En contrôle, nous avons utilisé les mêmes contrôles que lors du test de Matigel[®], 50ng/mL d'EGF (activateur de la migration) et 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de génistéine (inhibiteur de la migration cellulaire), les cellules non traitées ont été utilisées comme contrôle basal [13].

3-6. Résultats de l'activité anti-angiogénique des cyclopeptides

a) Quelque soit la concentration testée (10^{-12} à 10^{-5} M), les cyclopeptides SP1 et SA n'affectent pas la prolifération des trois types cellulaires testés (HUVEC, MCF7, MDA-MB-231). Ceci démontre l'absence d'activité cytotoxique par absence d'effet direct sur la prolifération des cellules endothéliales ainsi que sur les cellules cancéreuses, pour les cyclopeptides SP1 et SA. Ce résultat est très intéressant car contrairement aux traitements anti-angiogéniques actuels qui présentent une cytotoxicité sur les cellules endothéliales pouvant conduire à des effets indésirables tels que l'hypertension pulmonaire, l'hypersensibilité, la toxicité cardiaque et la perforation gastro-intestinale, les cyclopeptides SP1 et SA ne présentent pas d'activité cytotoxique direct sur la prolifération des cellules endothéliales.

En ce qui concerne la prolifération des cellules endothéliales en milieux conditionnés (MC), il apparaît que les MC obtenus à partir des cellules MCF7 et MDA-MB231 traitées par les cyclopeptides SP1 et SA présentent une activité inhibitrice sur la prolifération des HUVEC par rapport aux MC obtenus à partir des cellules MCF7 et MDA-MB231 non traitées. A des concentrations comprises entre 10^{-8} et 10^{-5} M, SP1 et SA inhibent de 20 à 26% la prolifération des HUVEC en présence de MC issus des cultures de cellules de MDA-MB-231 ou de MCF7 (26% environ pour MDA-MB-231 et 20% pour des cellules MCF7). Cette activité laisse penser à un effet des cyclopeptides sur la production de facteurs de croissance proangiogéniques sécrétées par les deux types de cellules (MCF7 et MDA-MB-231). L'inhibition de la production de ces facteurs proangiogéniques pourrait expliquer l'activité indirecte de SP1 et SA sur la prolifération des HUVEC.

b) Parmi ces facteurs inhibés, le VEGFA est une cible de choix. Cette étude montre que les MC ont été capables d'inhiber l'activation de la voie PI3K/AKT (figures 5A à 5D) impliquée dans la survie cellulaire et la voie ERK 1/2 impliquée dans la prolifération des cellules endothéliales (HUVEC). L'analyse des résultats indique une réduction significative de la phosphorylation de Akt-1 et Erk 1/2 dans les HUVEC par les MC pour des concentrations de 10^{-7} à 10^{-5} M.

Dans le cadre de cette étude, les cyclopeptides ont démontré un potentiel inhibiteur sur la phosphorylation de AKT-1 et ERK 1/2, similaire à des inhibiteurs de tyrosine kinase. Cet effet inhibiteur est très rapide.

c) Un facteur de croissance angiogénique sécrété par les cellules cancéreuses (MCF7 et MDA-MB-231) qui induit la prolifération des cellules endothéliales par les voies de signalisation PI3K/Akt et Erk1/2 a été bien décrit dans la littérature : il s'agit du VEGFA. L'efficacité de SP1 et SA sur la sécrétion, la synthèse et la transcription du VEGFA ont été étudiés. Il a ainsi pu être démontré que les cyclopeptides SP1 et SA ont également un excellent potentiel inhibiteur sur de la transcription de l'ARNm du VEGFA dans les cellules d'adénocarcinome mammaire. Les effets inhibiteurs de SP1 et SA sur la transcription de l'ARNm du VEGFA se caractérisent par une réduction significative de la sécrétion du VEGFA (figures 6A à 6D). Contrairement à SP1

et SA, S1 n'a pas montré aucun effet significatif sur la sécrétion du VEGFA (figures 6E et 6F).

d) De plus, les cyclopeptides SP1 et SA inhibent significativement, dans les cellules MCF7, la transcription de l'ARNm des isoformes diffusibles VEGF₁₂₁ et VEGF₁₆₅ et non pas la transcription de l'isoforme ancrée dans la membrane plasmique : l'isoforme VEGF₁₈₉. Dans les cellules MDA-MB-231, les cyclopeptides SP1 et SA se sont révélés actifs sur l'inhibition des trois principaux isoformes du VEGFA (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ et VEGF₁₈₉) (figures 7A et 7B).

10 C'est un résultat important car l'isoforme VEGF₁₂₁ est considéré comme l'un des facteurs les plus tumorigènes dans le cancer du sein et est l'isoforme prépondérante dans la progression tumorale.

La réduction de la sécrétion du VEGFA dans les cellules MCF7 ne touche que les isoformes VEGF₁₂₁ et VEGF₁₆₅ contrairement aux cellules MDA-MB-231 où les trois isoformes sont concernés. Cette inhibition a été observée avec les cyclopeptides SP1 et SA pour des concentrations relativement fortes avec des IC₅₀ significatives.

e) Une activité anti-angiogénique directe et spécifique du cyclopeptide SP1 a été mise en évidence. Il a été démontré que le cyclopeptide SP1 à des concentrations de 10⁻⁶ à 10⁻⁵M est en mesure d'entraver directement la migration cellulaire et la formation des tubes capillaires de cellules endothéliales contrairement à la ségétaline A (figures 8A et 8B). Ce résultat est comparable à celui décrit dans la littérature avec la génistéine mais a des plus fortes concentrations (30 µg/ml) [15]. La SA cependant, contrairement à SP1 n'a montré aucun effet significatif sur la formation des tubes capillaires et la migration des cellules endothéliales.

3-7. Conclusion

30 Les différents résultats anti-angiogéniques obtenus sur les cyclopeptides SP1 selon l'invention et SA, démontrent bien la présence d'un effet anti-angiogénique indirect qui passe par une diminution de la synthèse de l'ARNm du VEGFA. SP1 et SA présentent des IC₅₀ comprises entre 10⁻⁸ et 10⁻⁹ M pour

la sécrétion du VEGFA. Les résultats montrent que les cyclopeptides SP1 selon l'invention et SA n'ont pas d'effet cytotoxique sur les cellules endothéliales. Ces cyclopeptides sont relativement stables à l'hydrolyse ce qui peut permettre d'envisager une action pharmacologique suffisamment longue.

5

Contrairement à SA, le cyclopeptide synthétique SP1 possède en outre une action anti-angiogénique directe sur la migration cellulaire et la formation des tubes capillaires de cellules endothéliales. Par conséquent, le cyclopeptide synthétique SP1 selon l'invention est donc simple et d'accès facile. Il possède
10 une forte activité anti-angiogénique directe et indirecte sans toxicité endothéliale. Le contrôle de sa synthèse permet, en fonction des composants introduits, de disposer d'une molécule possédant une action indirecte et/ou directe sur l'angiogenèse ce qui ouvre des perspectives thérapeutiques intéressantes notamment dans les traitements des maladies associées à
15 l'angiogenèse.

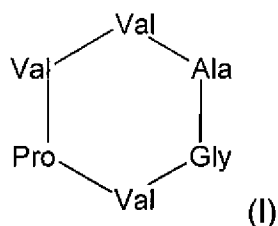
Listes des références

- [1] P. Zhao et al, Tetrahedron Letters, vol. 49, Issue 18, pp. 2951–2955, 2008.
- [2] I.W. James, Tetrahedron, vol 55, Issue 16, pp. 4855-4946, 1999.
- [3] P. Sonnet et al, Tetrahedron Letters, vol. 42, pp. 1681–1683, 2001 ; P.
5 Sonnet et al, Tetrahedron Letters, 44, pp. 3293–3296, 2003.
- [4] N. Franceschini, P. Sonnet, D. Guillaume, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, 3(5),
787-793.
- [5] Buteau-Lozano, H., M. Ancelin, et al. (2002). "Transcriptional regulation of
vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast
10 cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and
beta." *Cancer Res* 62(17): 4977-84.
- [6] Sun, M., J. E. Paciga, et al. (2001). "Phosphatidylinositol-3-OH Kinase
(PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by
estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and
15 PI3K." *Cancer Res* 61(16): 5985-91.
- [7] Sun, M., G. Wang, et al. (2001). "AKT1/PKBalpha kinase is frequently
elevated in human cancers and its constitutive activation is required for
oncogenic transformation in NIH3T3 cells." *Am J Pathol* 159(2): 431-7.
- [8] Nurcombe, V., C. E. Smart, et al. (2000). "The proliferative and migratory
20 activities of breast cancer cells can be differentially regulated by heparan
sulfates." *J Biol Chem* 275(39): 30009-18.
- [9] Vercoutter-Edouart, A., J. Lemoine, et al. (2000). "The mitogenic signaling
pathway for fibroblast growth factor-2 involves the tyrosine phosphorylation
of cyclin D2 in MCF-7 human breast cancer cells." *FEBS Lett* 478(3): 209-
25 15.
- [10] Kellouche, S., S. Mourah, et al. (2007). "Platelets, thrombospondin-1 and
human dermal fibroblasts cooperate for stimulation of endothelial cell
tubulogenesis through VEGF and PAI-1 regulation." *Exp Cell Res* 313(3):
486-99.

- [11] Wellmann, S., T. Taube, et al. (2001). "Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology." *Clin Chem* 47(4): 654-60.
- [12] Benelli, R. and A. Albini (1999). "In vitro models of angiogenesis: the use
5 of Matrigel." *Int J Biol Markers* 14(4): 243-6.
- [13] Zilberberg, L., S. Shinkaruk, et al. (2003). "Structure and inhibitory effects on angiogenesis and tumor development of a new vascular endothelial growth inhibitor." *J Biol Chem* 278(37): 35564-73.
- [14] Taraboletti, G. and R. Giavazzi (2004). "Modelling approaches for
10 angiogenesis." *Eur J Cancer* 40(6): 881-9.
- [15] Fotsis, T., M. Pepper, et al. (1993). "Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(7): 2690-4.

REVENDICATIONS

1. Cyclopeptide de formule (I)



dans laquelle

- 5
- Ala représente l'alanine ;
 - Gly représente la glycine ;
 - Val représente la valine ;
 - Pro représente la proline
- ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

10

2. Composition pharmaceutique comprenant un cyclopeptide selon la revendication 1, et/ou un ou plusieurs excipient(s) pharmaceutiquement acceptable(s).

15 3. Cyclopeptide selon la revendication 1 ou la composition selon la revendication 2, pour son utilisation comme médicament.

4. Cyclopeptide selon la revendication 1 ou composition selon la revendication 2, pour son application comme médicament dans la prévention
20 ou le traitement d'une maladie associée à l'angiogenèse.

5. Cyclopeptide selon la revendication 1 ou composition selon la revendication 2, pour son application comme médicament dans la prévention
ou le traitement d'une maladie associée à l'angiogenèse choisie dans le groupe
25 comprenant la croissance tumorale (tumeur de colon, sein, foie, rein et prostate), la dissémination métastatique (tumeur de colon, sein, foie, rein et prostate), les hémangiomes, la polyarthrite rhumatoïde, l'endométriose, l'athérosclérose, la rétinopathie diabétique et la dégénérescence maculaire.

6. Cyclopeptide selon la revendication 1 ou composition selon la revendication 2, pour son application comme médicament dans la prévention ou le traitement de l'ostéoporose.

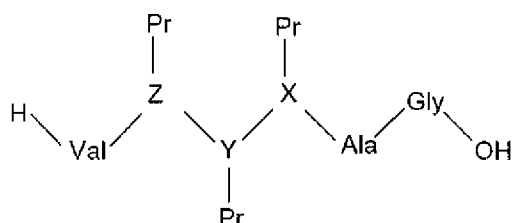
5 7. Cyclopeptide selon la revendication 1 ou composition selon la revendication 2,, pour son application comme médicament dans la prévention ou le traitement de la croissance tumorale du colon, du sein, du foie, du rein et de la prostate.

8. Cyclopeptide selon la revendication 1 ou composition selon la revendication
10 2, pour son application comme médicament dans la prévention ou le traitement d'une maladie associée à la formation des tubes capillaires de cellules endothéliales.

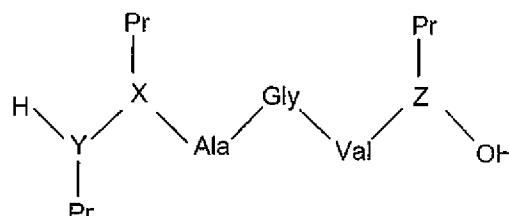
9. Utilisation du cyclopeptide selon la revendication 1, pour empêcher la
15 formation des tubes capillaires de cellules endothéliales.

10. Procédé de préparation d'un cyclopeptide de formule (I), selon la revendication 1, dans lequel :

a) on cyclise, un composé de formule (IV) ou (V) :



(IV)



(V)

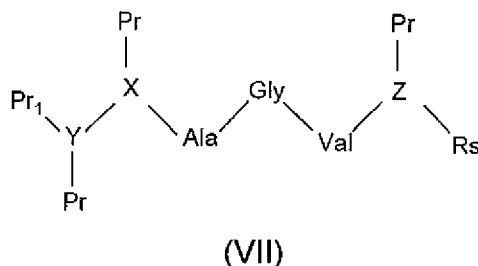
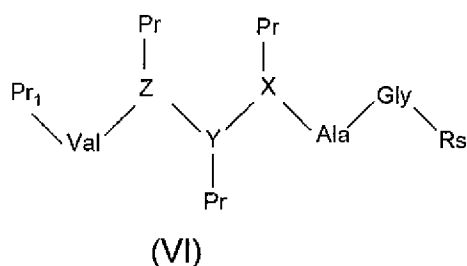
dans laquelle : Ala est l'alanine; Gly est la glycine ; Val est la valine ; X est la valine ; Y est la valine ; et Z est la proline,

25 Pr est un groupe protecteur choisi dans le groupe comprenant l'acétamidométhyle (Acm), l'allyloxycarbonyle (Alloc), le t-butyloxycarbonyle (Boc), le benzyloxyméthyle (Bom), le 2-(4-biphénylyl) propyl(2)oxycarbonyle (Bpoc), le 2-bromobenzyloxycarbonyle (Br-Z), le butoxyméthyle (Bum), l'acide benzoïque (Bz), le benzyle (Bzl), le dichlorobenzyle (Cl₂Bzl), le 2-

chlorobenzoyloxycarbonyle (ClZ), le *N*-[1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)éthyle] (Dde), le dithia-succinyle (Dts), le 4-méthoxybenzyle (Mbzl), le 4 méthylbenzyle (MeBzl), le méthoxybenzyle (Mob), le 4-méthoxy-2,3,6-triméthylbenzene sulfonyle (Mtr), le mésitylene-2-sulfonyle (Mts), le 2-nitro-phénylsulfényle (Nps), le benzyle ester (OBzl), le tert-butyle ester (O-tBu), 2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyle (Pbf), le 2,2,5,7,8,-pentaméthyl-chroman-6-sulfonyle (Pmc), le tert-butyle (tBu), le 2,4,6-triméthoxybenzyle (Tmob), le triphénylméthyle (trityle ou trt), en présence d'un agent de cyclisation ;

b) on clive les groupes protecteurs des différents composés X, Y, Z, pour récupérer les composés X, Y,Z de départ.

11. Procédé de préparation selon la revendication 6, dans lequel on obtient les composés (IV) et (V) respectivement, à partir des composés de formule (VI) et (VII) :



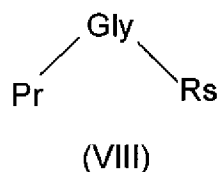
dans lesquels ;:

- Pr, Pr₁ sont des groupes protecteurs choisis, indépendamment l'un de l'autre, dans le groupe comprenant l'acétamidométhyle (Acm), l'allyloxycarbonyle (Alloc), le t-butyloxycarbonyle (Boc), le benzyloxyméthyle (Bom), le 2-(4-biphénylyl) propyl(2)oxycarbonyle (Bpoc), le 2-bromobenzoyloxycarbonyle (Br-Z), le butoxyméthyle (Bum), l'acide benzoïque (Bz), le benzyle (Bzl), le dichlorobenzyle (Cl₂Bzl), le 2-chlorobenzoyloxycarbonyle (ClZ), le *N*-[1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)éthyle] (Dde), le dithia-succinyle (Dts), le chlorure de fluorénylméthoxyloxycarbonyle (Fmoc), le 4-méthoxybenzyle (Mbzl), le 4 méthylbenzyle (MeBzl), le méthoxybenzyle (Mob), le 4-méthoxy-2,3,6-triméthylbenzene sulfonyle (Mtr), le mésitylene-2-sulfonyle (Mts), le 2-nitro-phénylsulfényle (Nps), le benzyle ester (OBzl), le tert-butyle ester (O-

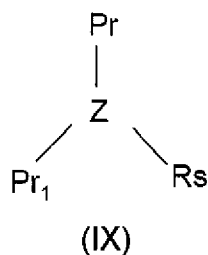
tBu), 2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyle (Pbf), le 2,2,5,7,8,-pentaméthyl-chroman-6-sulfonyle (Pmc), le tert-butyle (tBu), le 2,4,6-triméthoxybenzyle (Tmob), le triphénylméthyle (trityle ou trt) ;

▪ Rs est une résine choisie dans le groupe comprenant la résine SASRIN, SASRIN-2-pyridylthiocarbonate, la résine WANG, la résine 2-chlorotriptyle, la résine TENTAGEL, la résine WANG-TENTAGEL, la résine Wang-PEG, la résine benzhydramine, la résine polystyrène-NH₂, la résine Merrifield, la résine 4-méthylbenzhydramine (MBHA-résine, PAL-MBHA-résine), la résine 4-hydroxyméthylbenzylamide-synbeads, la résine 4-hydroxyméthylphenoxyacétamidométhylpolystyrène (HMPA-résine) ; après clivage du groupe protecteur Pr₁ et de la résine Rs.

12. Procédé de préparation selon la revendication 7, dans lequel on prépare le composé (VI) par le couplage successif entre un composé de formule (VIII) :



et Ala-Pr₁, (Pr-X)-Pr₁, (Pr-Y)-Pr₁, (Pr-Z)-Pr₁, Val--Pr₁ respectivement, et le composé (VII) par le couplage successif entre un composé de formule (IX) :



et Val-Pr₁, Gly-Pr₁, Ala-Pr₁, (Pr-X)-Pr₁, (Pr-Y)-Pr₁, respectivement, où Ala, Gly, Val, X, Y, Z, Pr et Pr₁ sont tels que définis à la revendication 10,

en présence d'un agent de couplage.

FIGURES

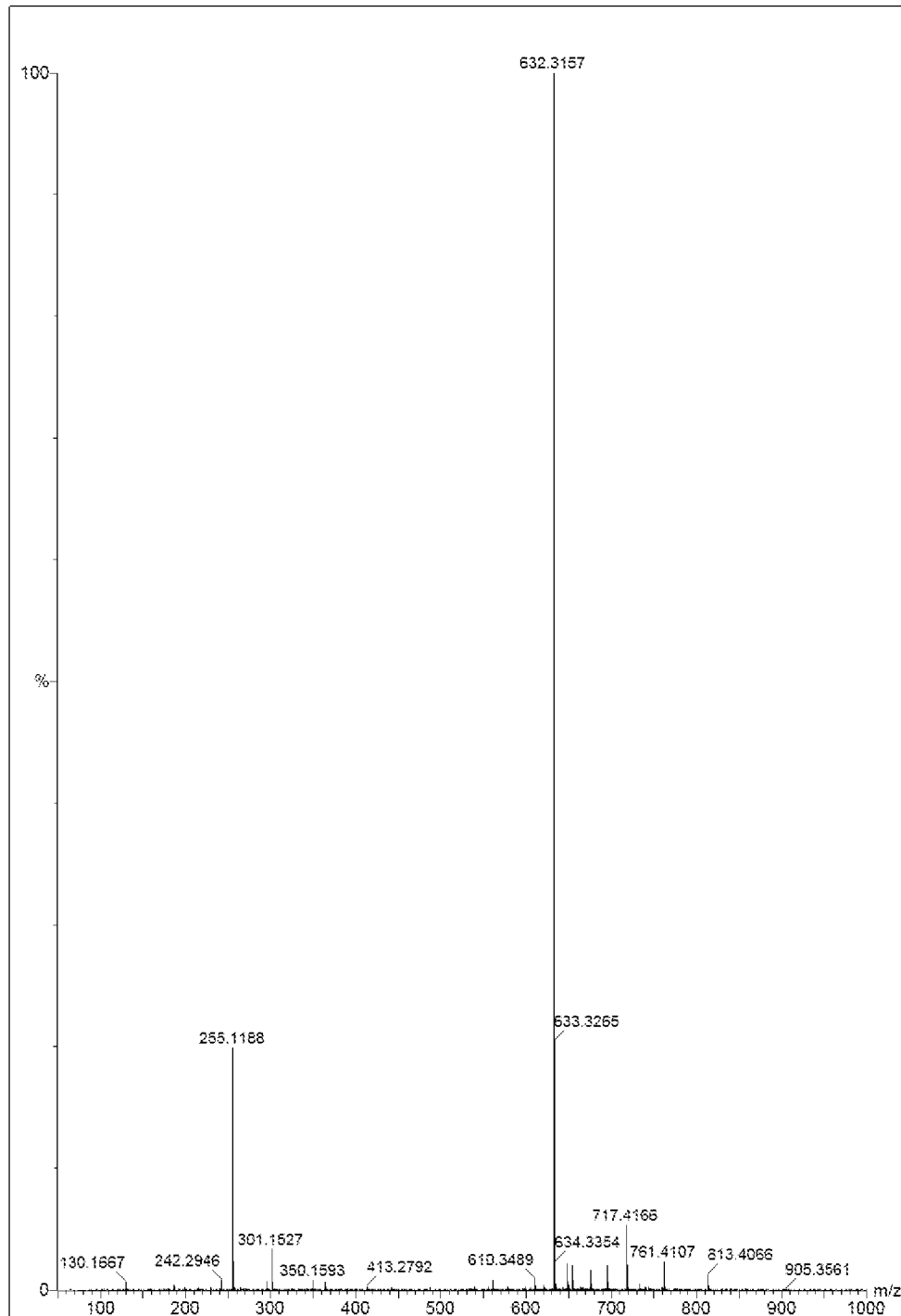


Figure 1

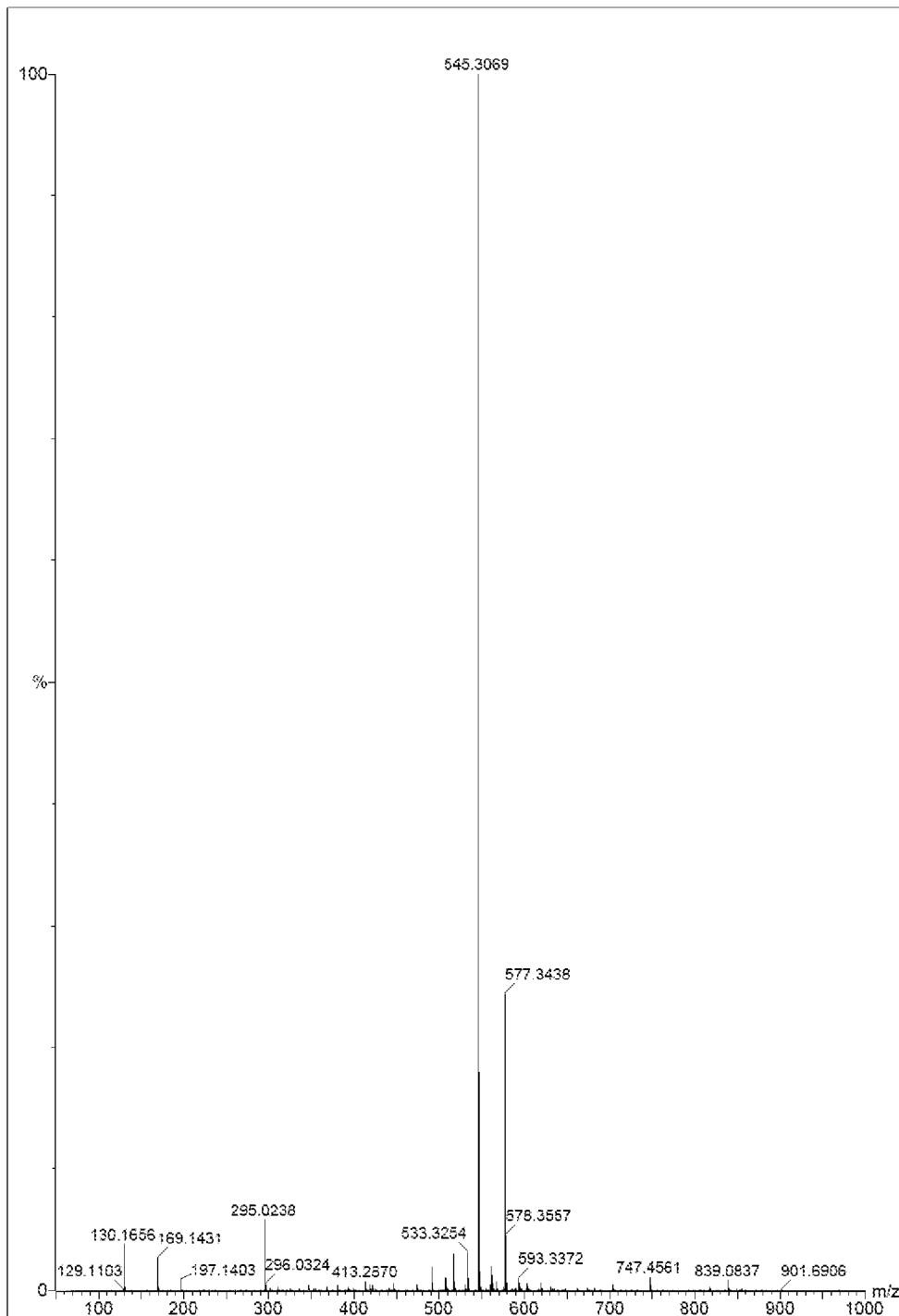


Figure 2

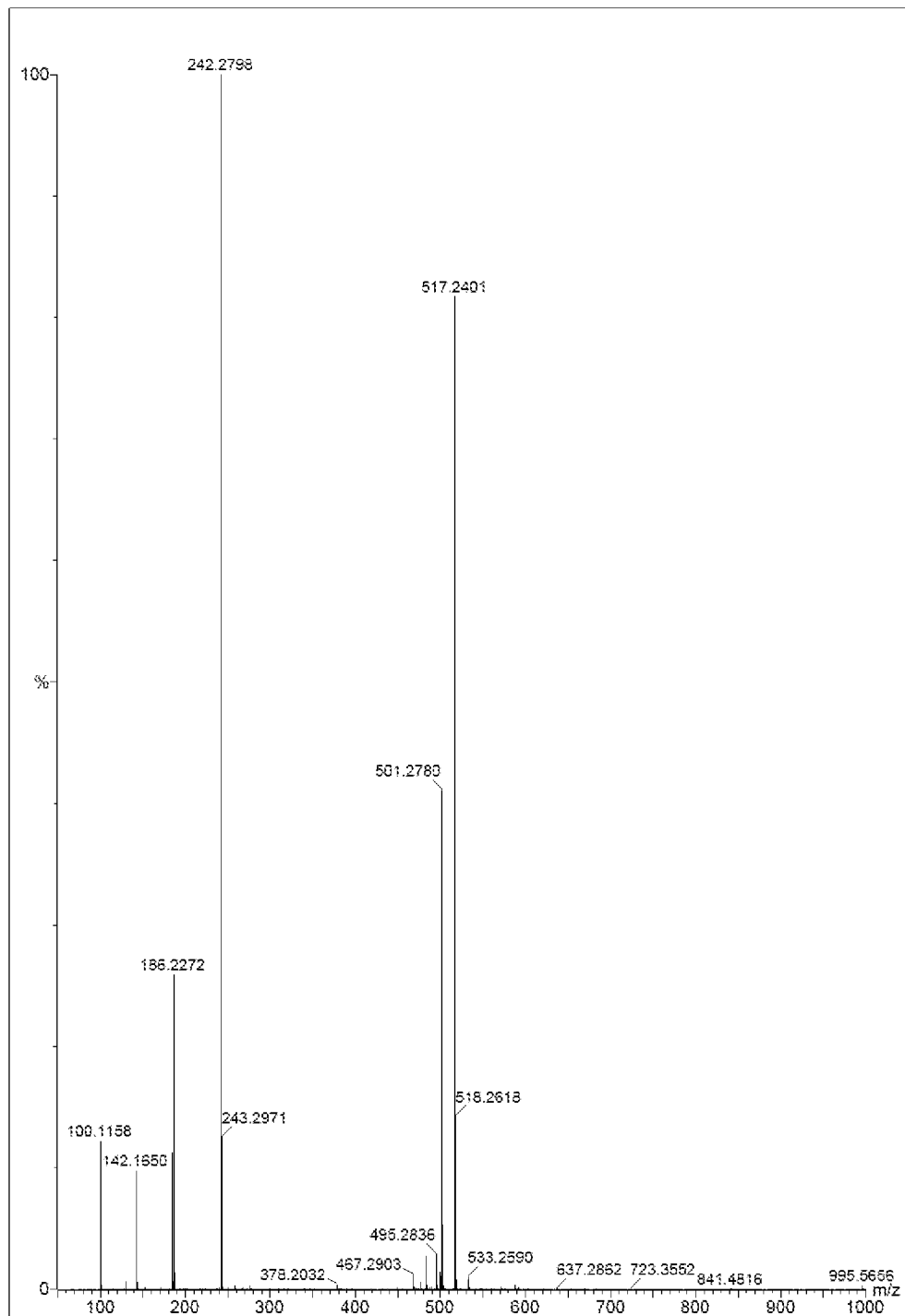


Figure 3A

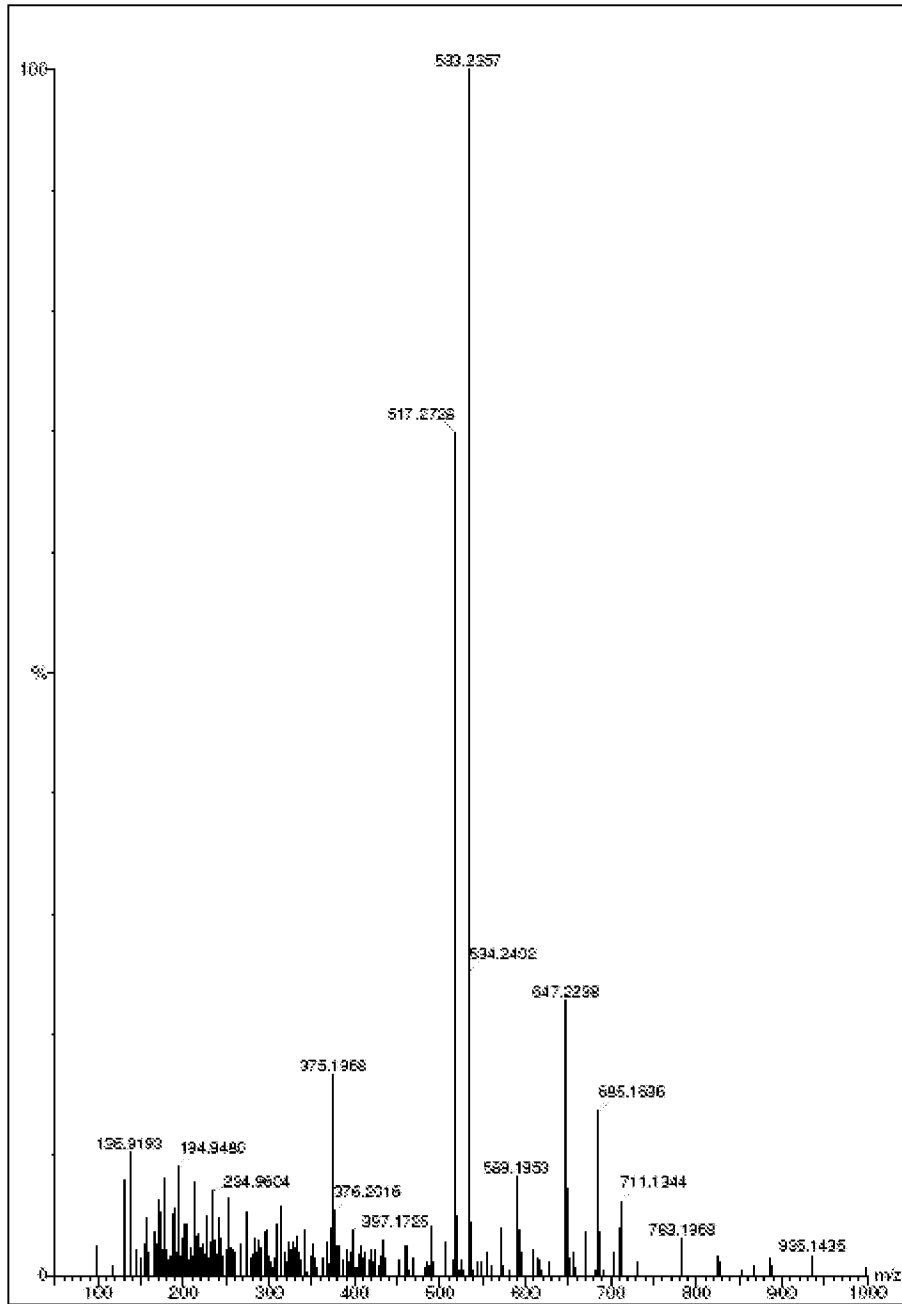


Figure 3B

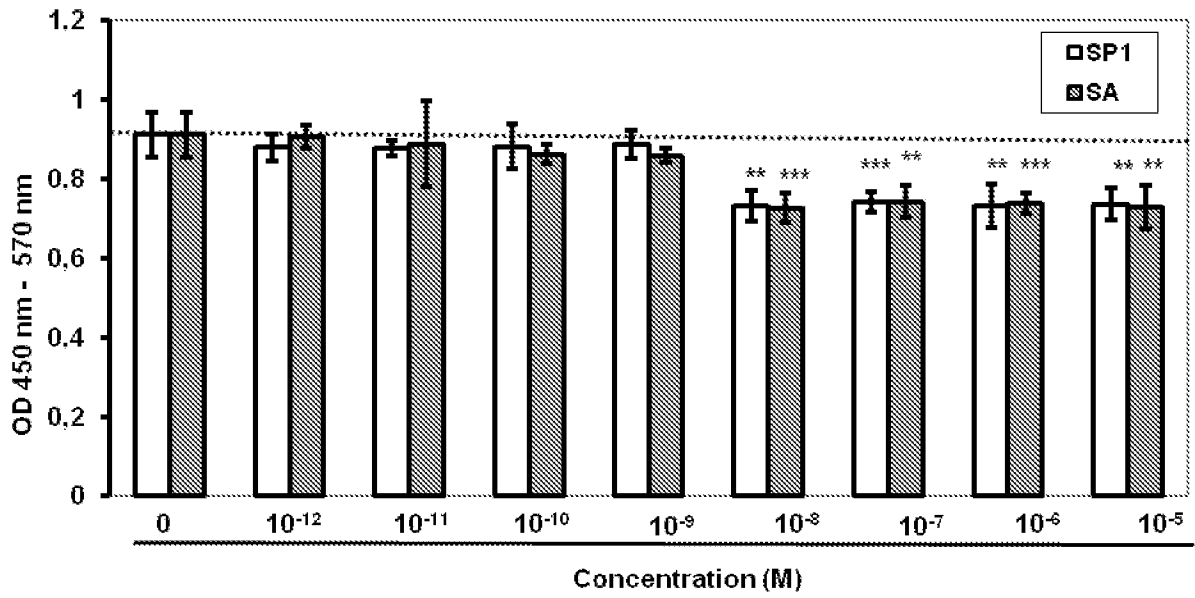


Figure 4A

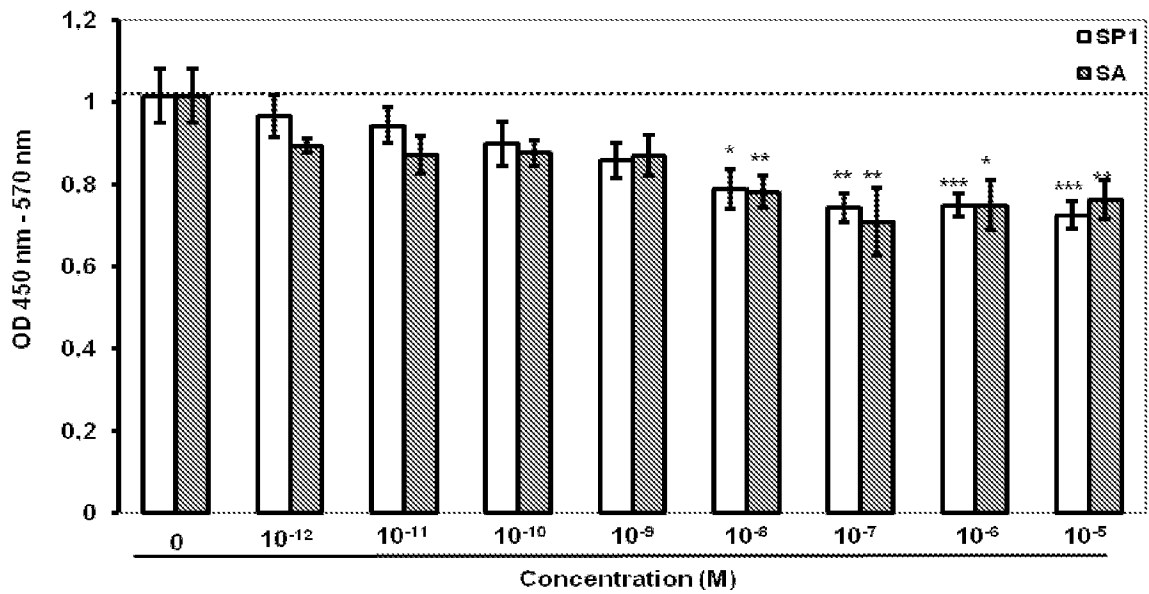


Figure 4B

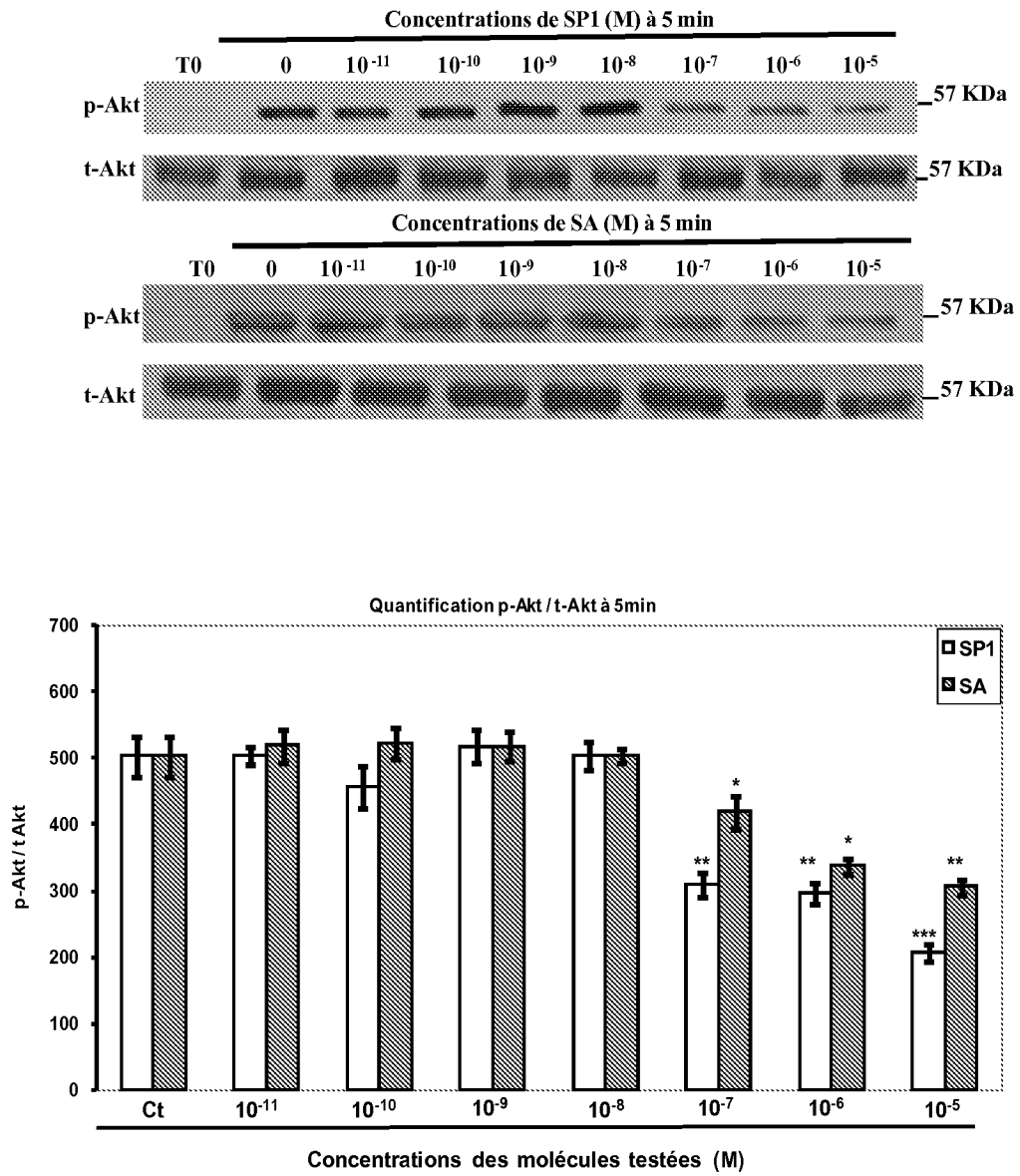


Figure 5A

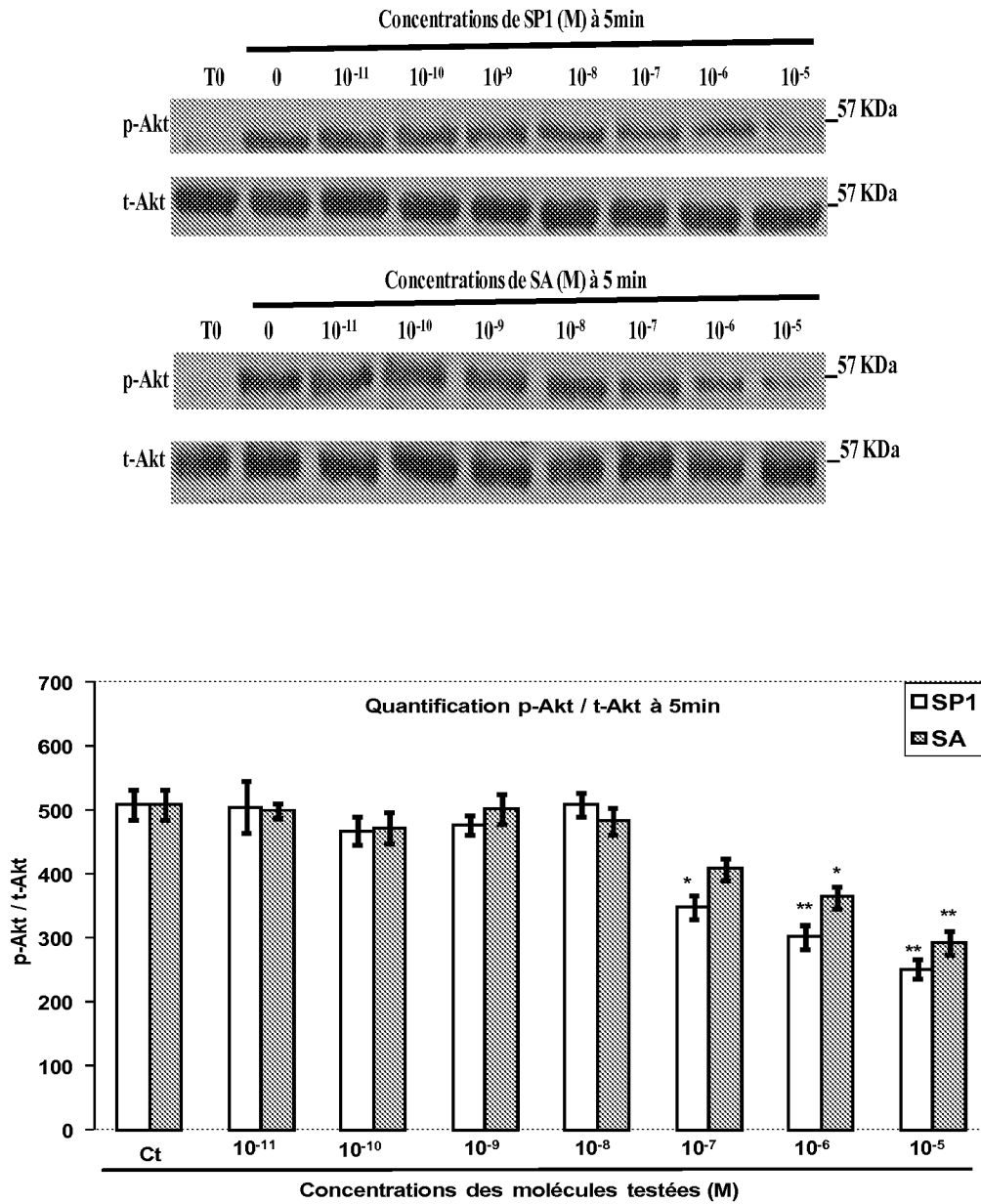


Figure 5B

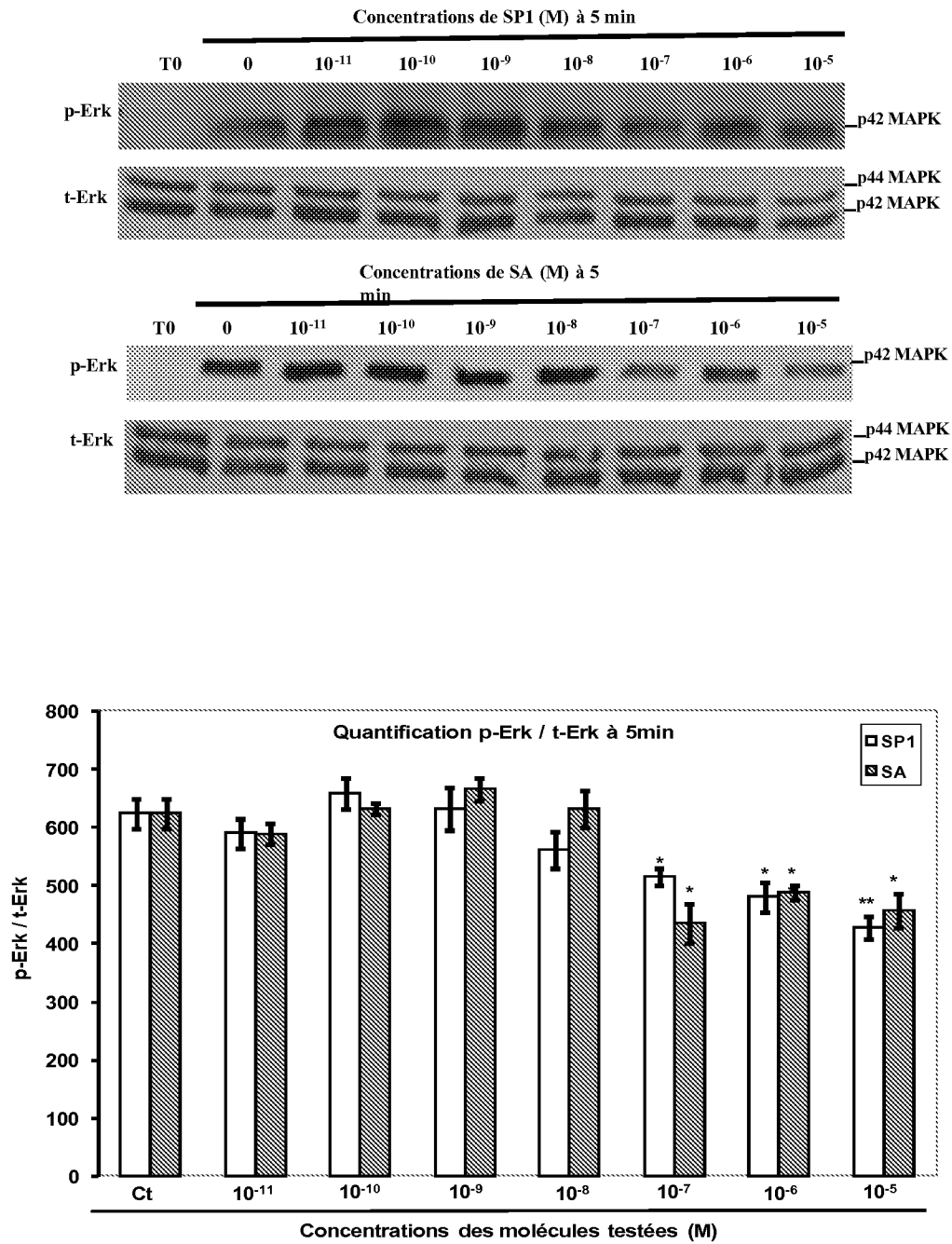


Figure 5C

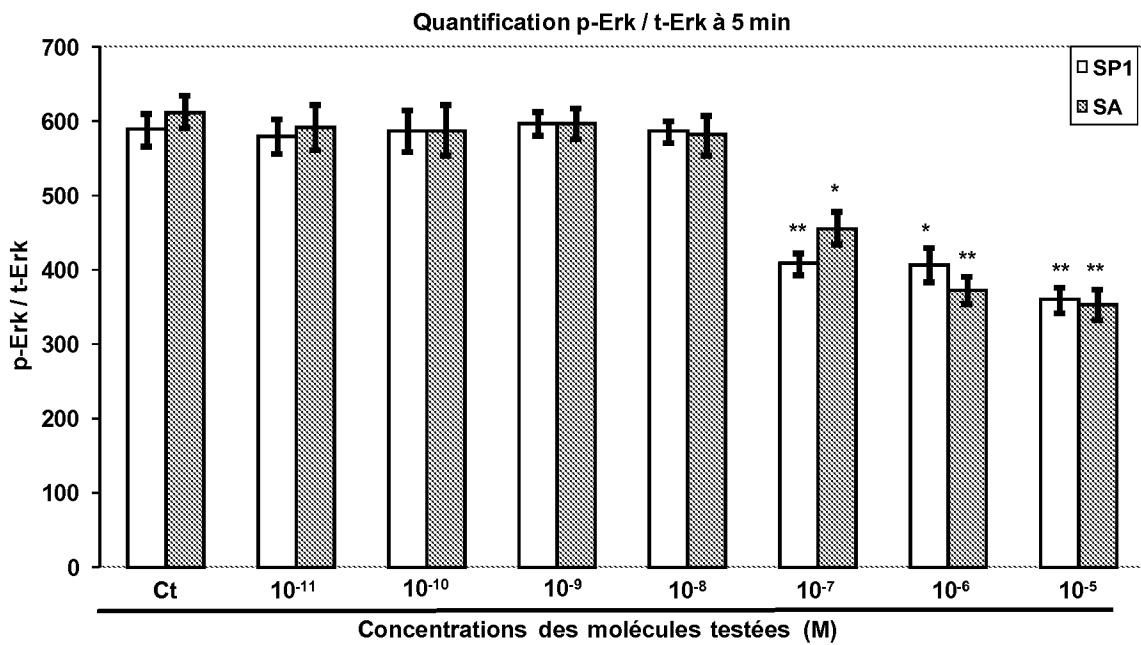
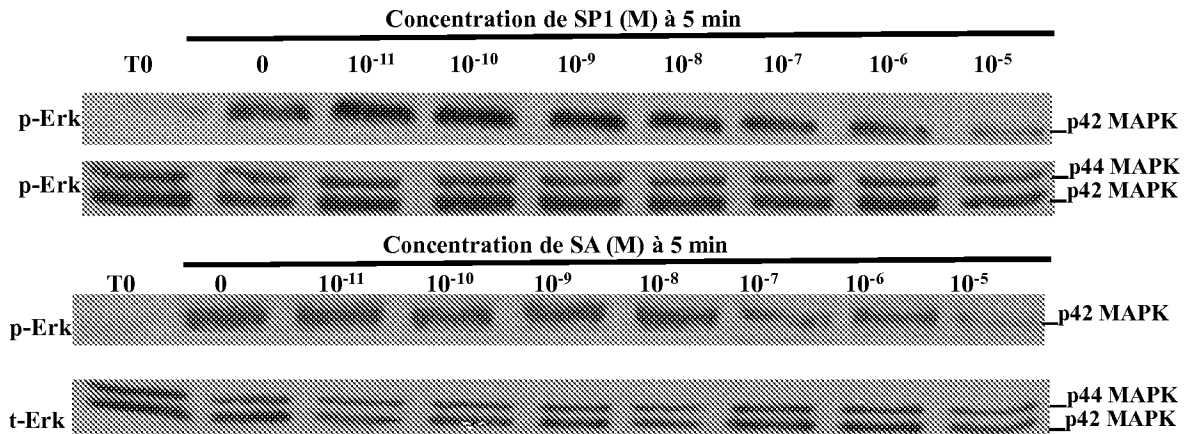


Figure 5D

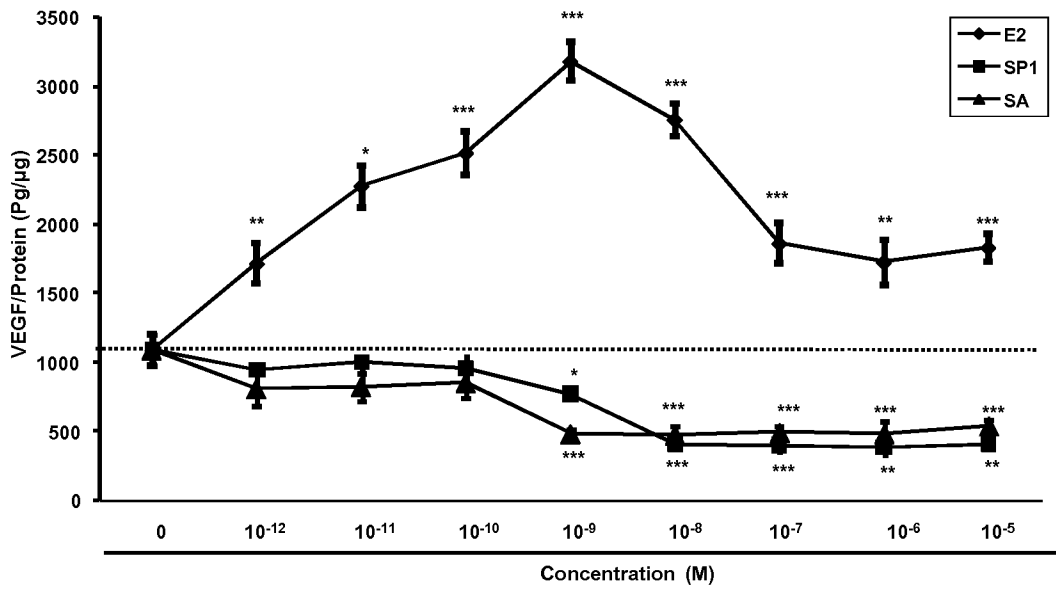


Figure 6A

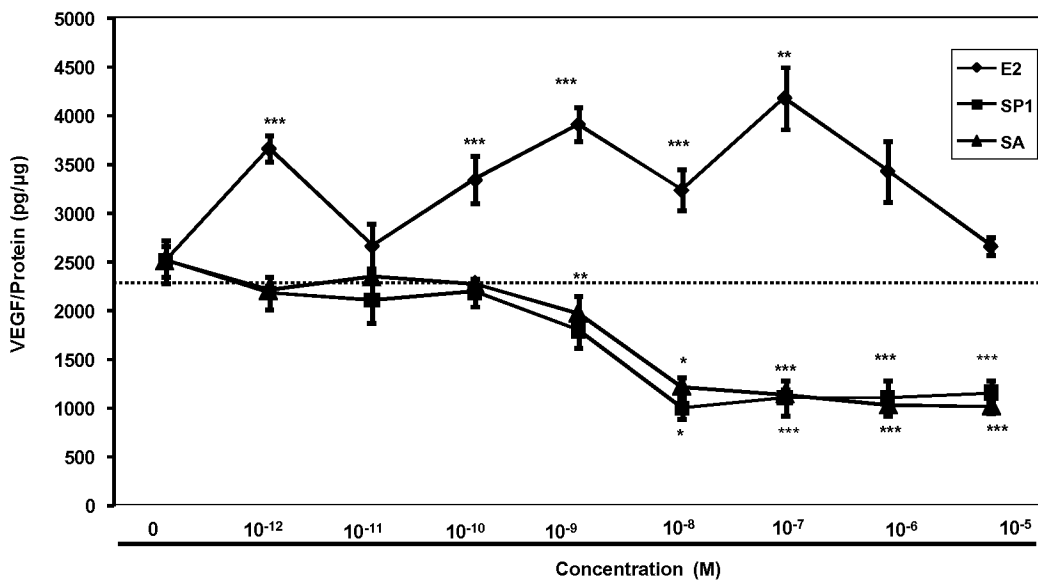


Figure 6B

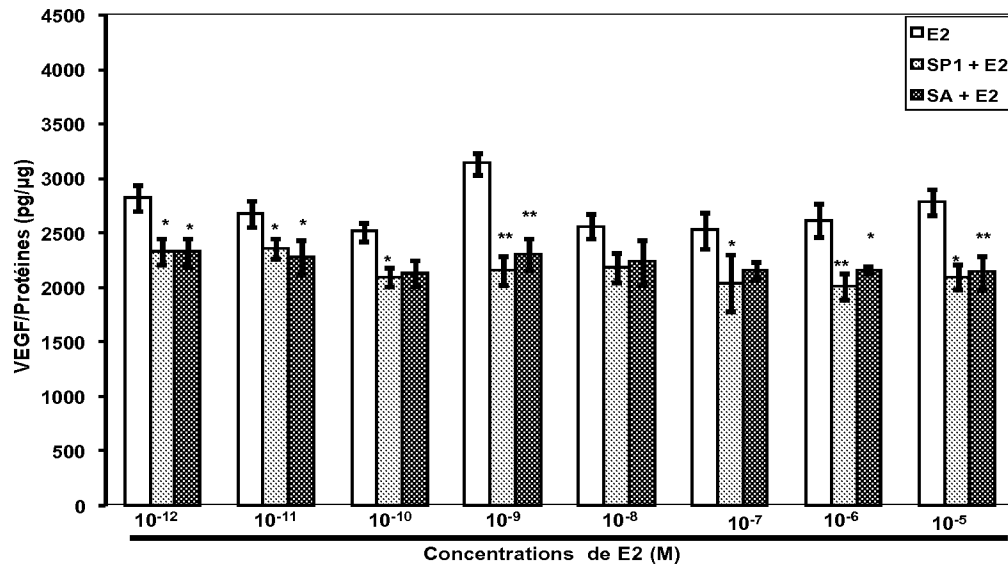


Figure 6C

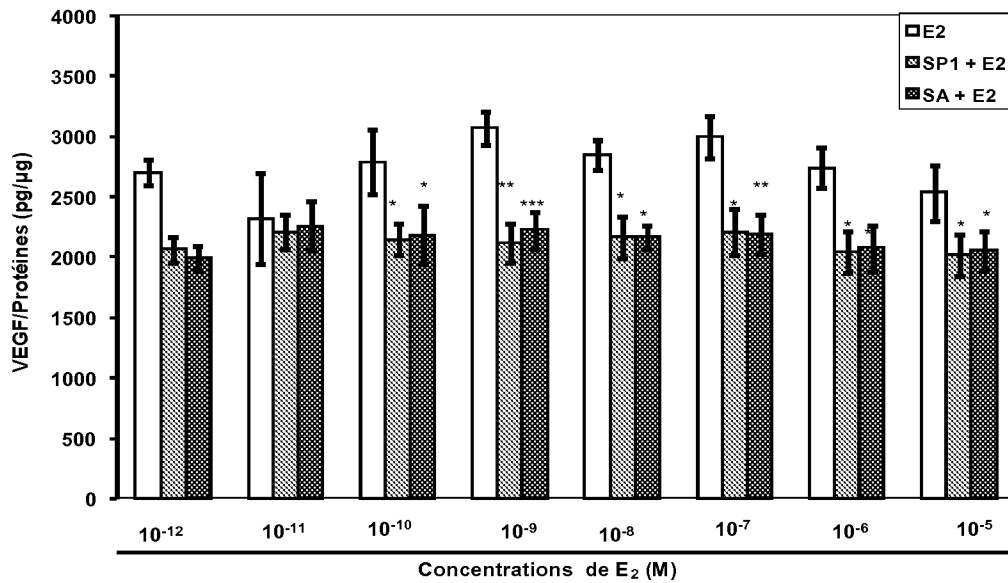


Figure 6D

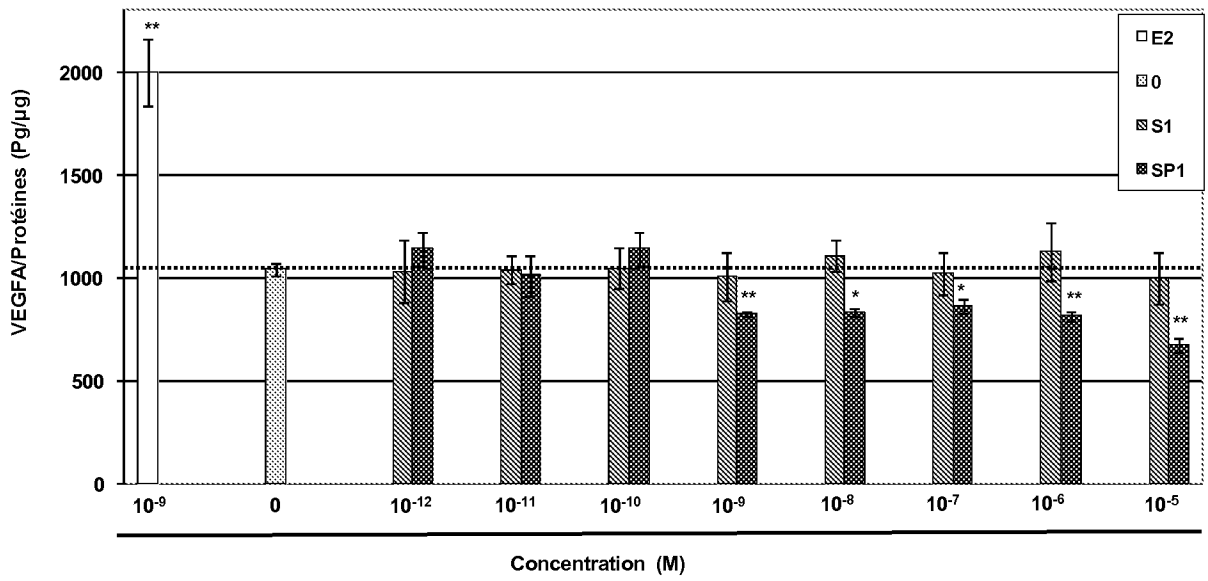


Figure 6E

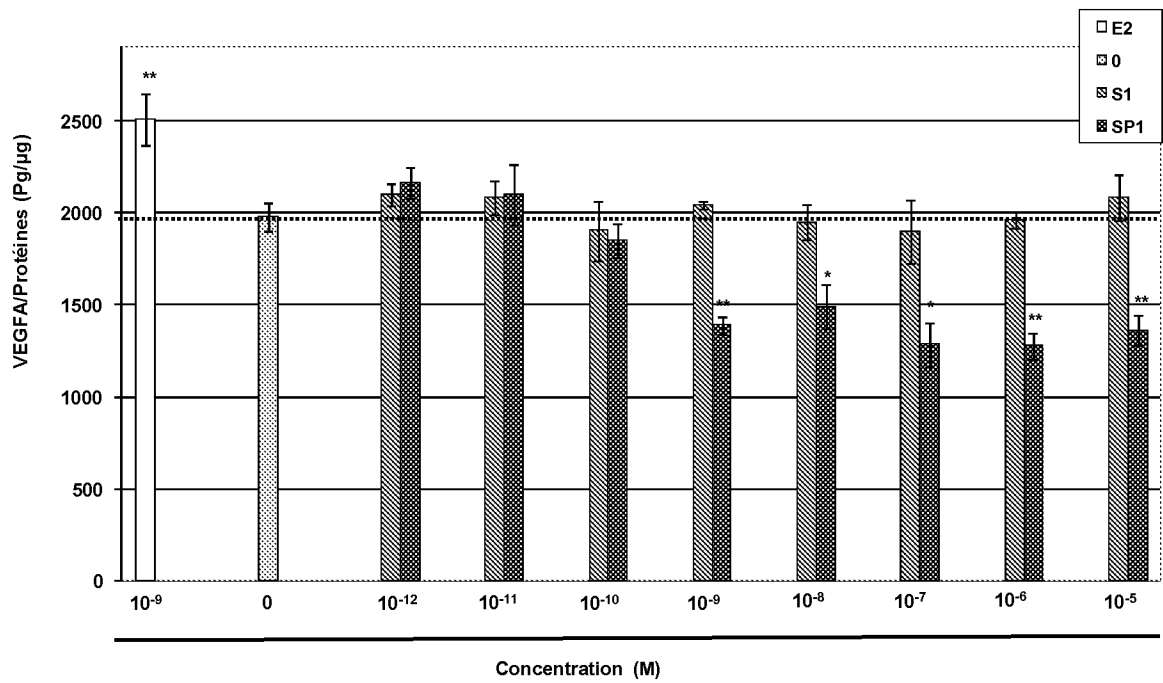


Figure 6F

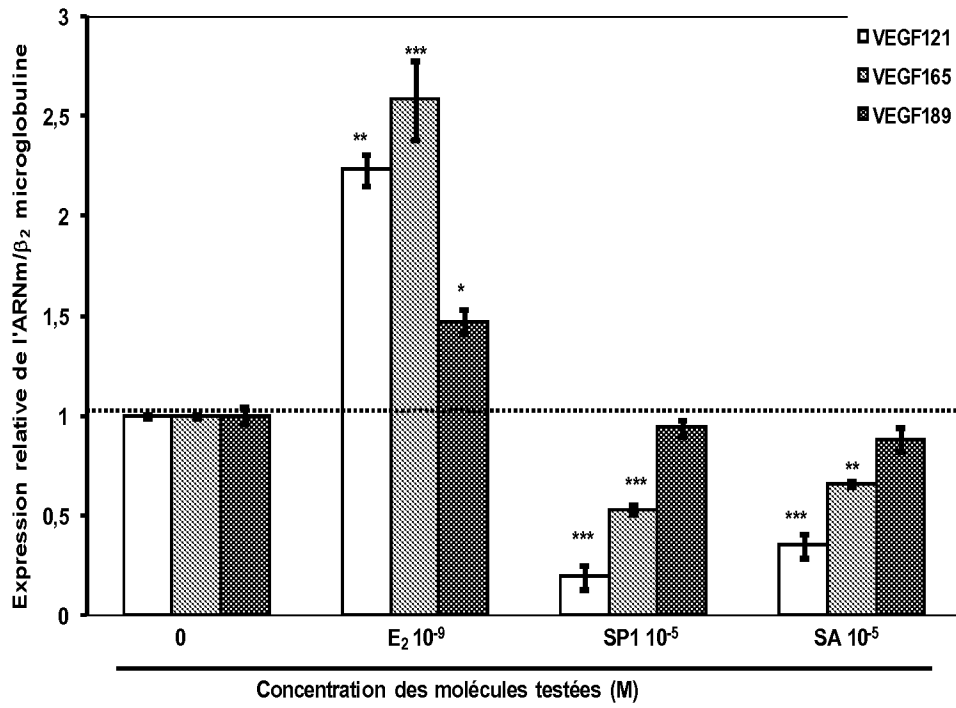


Figure 7A

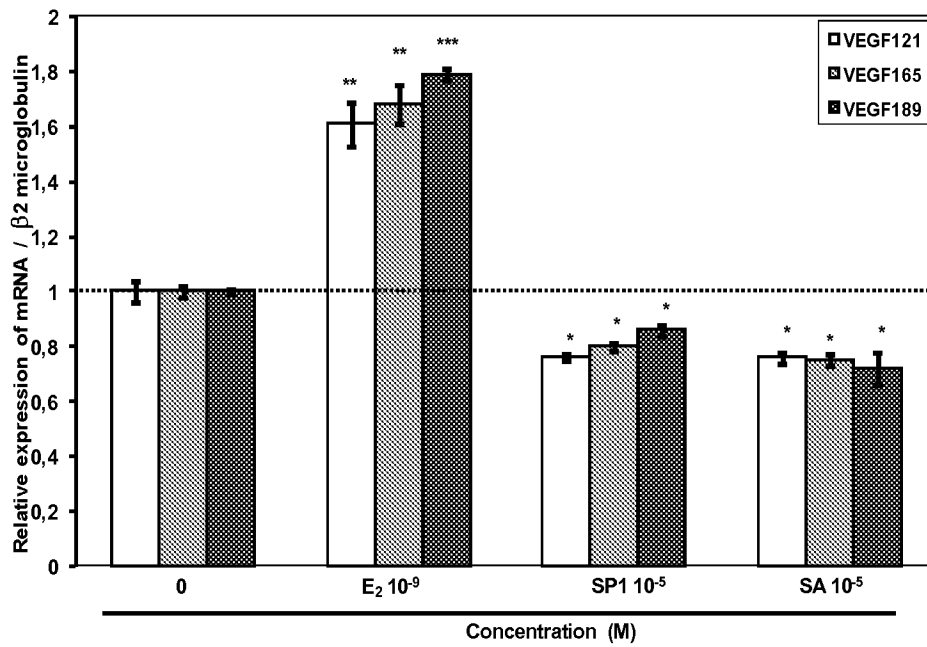


Figure 7B

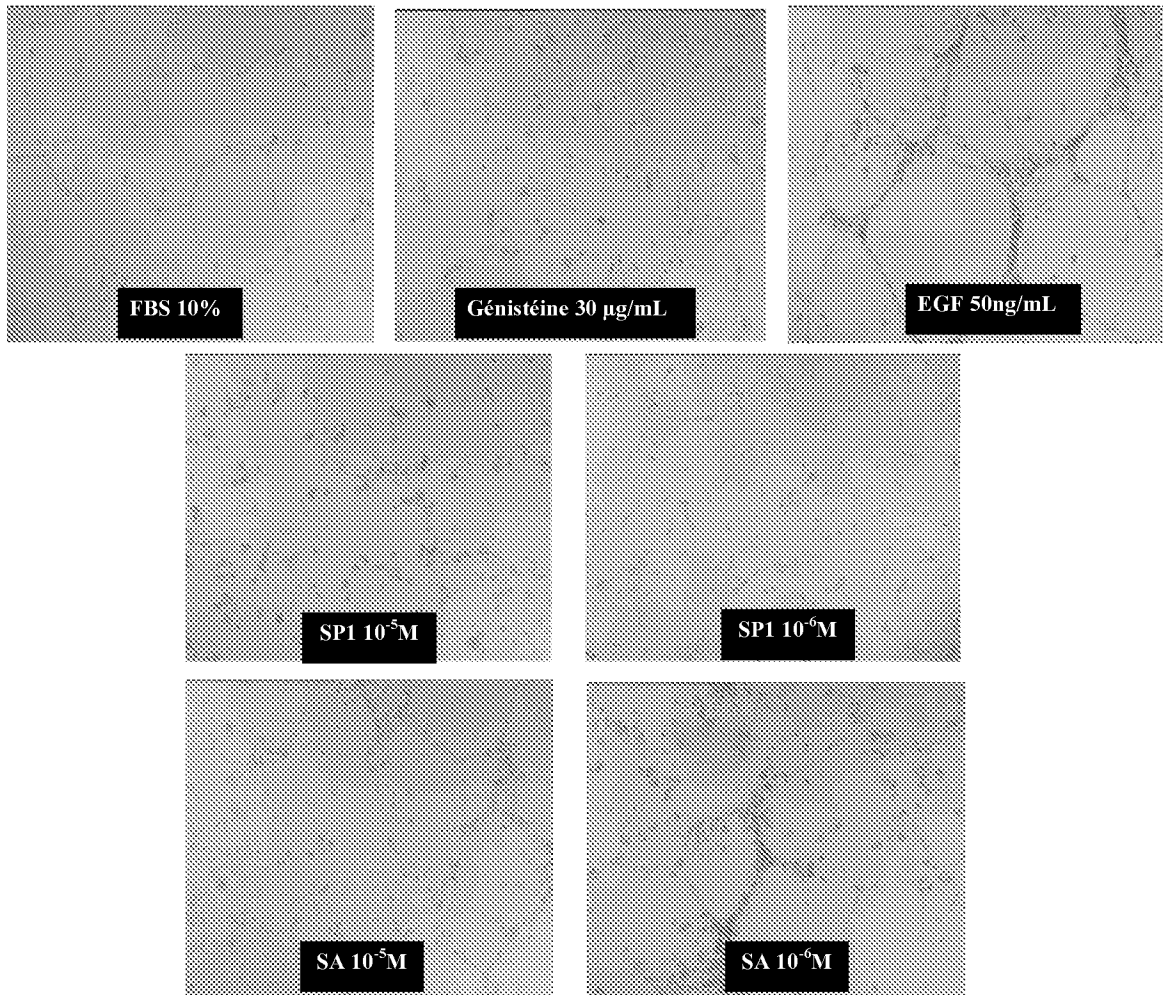


Figure 8A

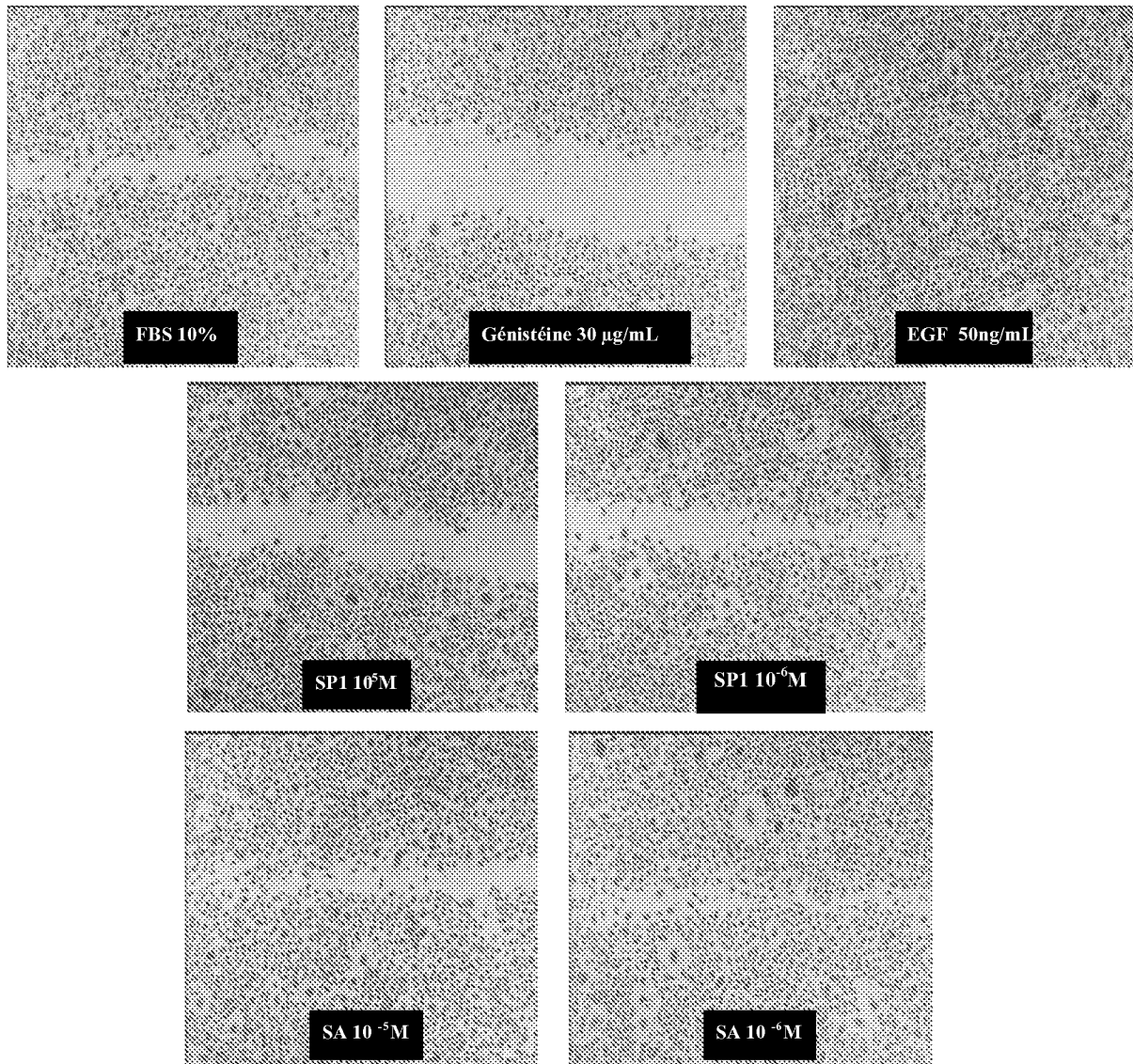


Figure 8B

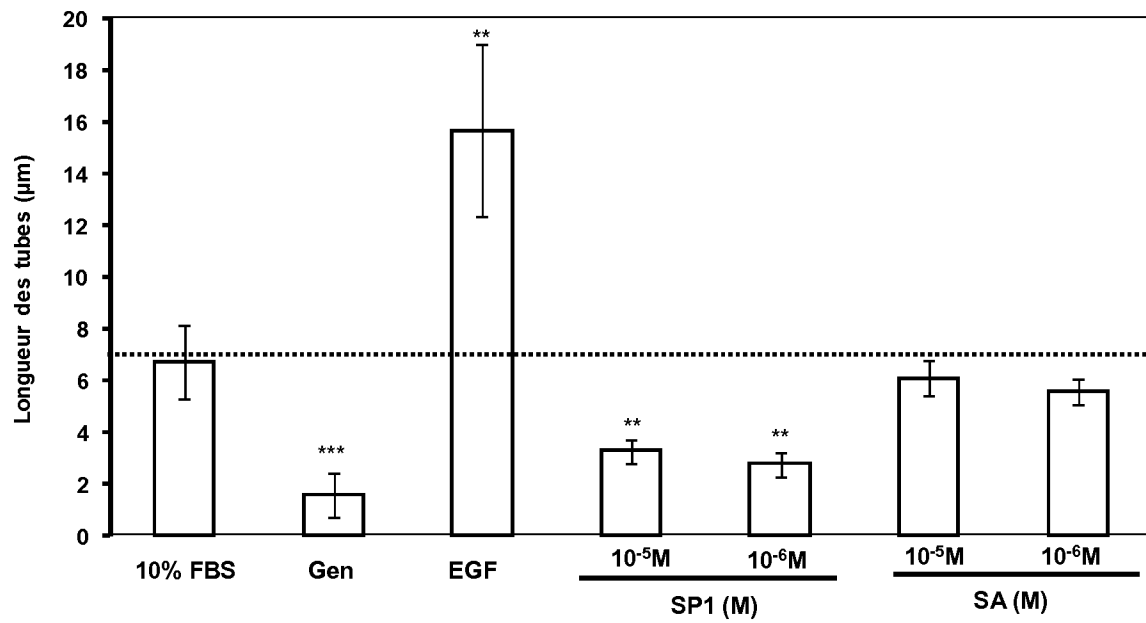


Figure 8C