

## Des isocombrétastatines aux bioconjugués thérapeutiques

**Résumé** En raison de sa simplicité chimique et de ses propriétés antitumorales remarquables, la combrétastatine A-4 (CA-4) a fait l'objet de nombreuses études de relation structure-activité. La découverte en 2007 de l'isocombrétastatine A-4 (isoCA-4), molécule stable, et la démonstration de son efficacité antitumorale via l'utilisation de nanoparticules multifonctionnelles ont constitué une étape déterminante vers la conception et la découverte de nouveaux agents antivasculaires. Des profils (bio)moléculaires inédits ont été mis en évidence avec des molécules originales où la double liaison a été remplacée par un atome d'azote et le noyau 3,4,5-triméthoxyphényle par un hétérocycle azoté. Ces recherches ont permis d'ouvrir des perspectives nouvelles dans un domaine d'actualité : les immunoconjugués cytotoxiques.

**Mots-clés** Combrétastatine A-4, isocombrétastatine A-4, analogues d'isocombrétastatine A-4, 1,1-diaryl(hétéroaryl)éthylènes, relation structure-activité, antitumoral, inhibiteurs de la tubuline, antiprolifératifs, agents antivasculaires.

**Abstract** From isocombrétastatins to therapeutic bioconjugates

Due to its chemical simplicity and remarkable antitumor properties, the combretastatin A-4 (CA-4) has been the subject of numerous structure-activity relationship studies. The discovery in 2007 of isocombrétastatin A-4 (isoCA-4), a stable molecule, and the demonstration of its antitumor efficacy through the use of multifunctional nanoparticles was a decisive step towards the design and discovery of novel vascular disrupting agents. Unprecedented (bio)molecular profiles have been highlighted with novel molecules where the double bond has been replaced by a nitrogen atom and the 3,4,5-trimethoxyphenyl ring by a nitrogen-containing heterocycle. These innovative results have opened up new perspectives in antibody-drug-conjugates.

**Keywords** Combretastatin A-4, isocombrétastatin A-4, isocombrétastatin analogs, 1,1-diaryl(heteroaryl)ethylenes, structure-activity relationships, anticancer, tubulin inhibitors, antiproliferative, vascular disrupting agents.

Les progrès récents accomplis dans le traitement des cancers avec l'arrivée des « thérapies ciblées » ont modifié de façon importante la prise en charge des patients. Dans ce contexte, normaliser, détruire ou déréguler la vascularisation tumorale sont donc les objectifs d'une nouvelle stratégie thérapeutique ciblée, qui suscite beaucoup d'espoirs.

Le concept de thérapie antivasculaire fut développé par J. Denekamp dans les années 1980 [1]. L'observation selon laquelle une obstruction physique des vaisseaux sanguins de tumeurs solides (par ligation ou clamp) entraînerait leur régression a conduit à l'idée que des agents ciblant sélectivement la vascularisation tumorale déclencheraient le même effet. Cette stratégie visant exclusivement les cellules endothéliales, génétiquement plus stables que les cellules cancéreuses, diminue le risque de résistance au traitement.

### Combrétastatine A-4

Les combrétastatines A (CA-1 à CA-6) sont des substances naturelles, isolées par G.R. Pettit de l'écorce d'un saule sud-africain, *Combretum caffrum* [2]. Parmi elles, la combrétastatine A-4 (CA-4, *figure 1*) est un stilbène de configuration *Z* substitué par deux noyaux aromatiques de type 3,4,5-triméthoxyphényle (cycle A) et 3-hydroxy-4-méthoxyphényle (cycle B). La structure cristallographique de ce dérivé (*Z*)-1,2-diaryléthylène révèle que la molécule n'est pas plane et se présente sous la forme d'une « pince à sucre » où les plans entre les deux cycles A et B forment un angle dièdre de 53° (*figure 1*).

La CA-4 est indiscutablement la molécule la plus prometteuse en raison de sa simplicité structurale et de ses propriétés antitumorales remarquables. Elle s'est avérée être à la fois un



Figure 1 - Structures de la CA-4, de sa prodrogue phosphate la CA-4P, et représentation de la CA-4 dans l'espace.

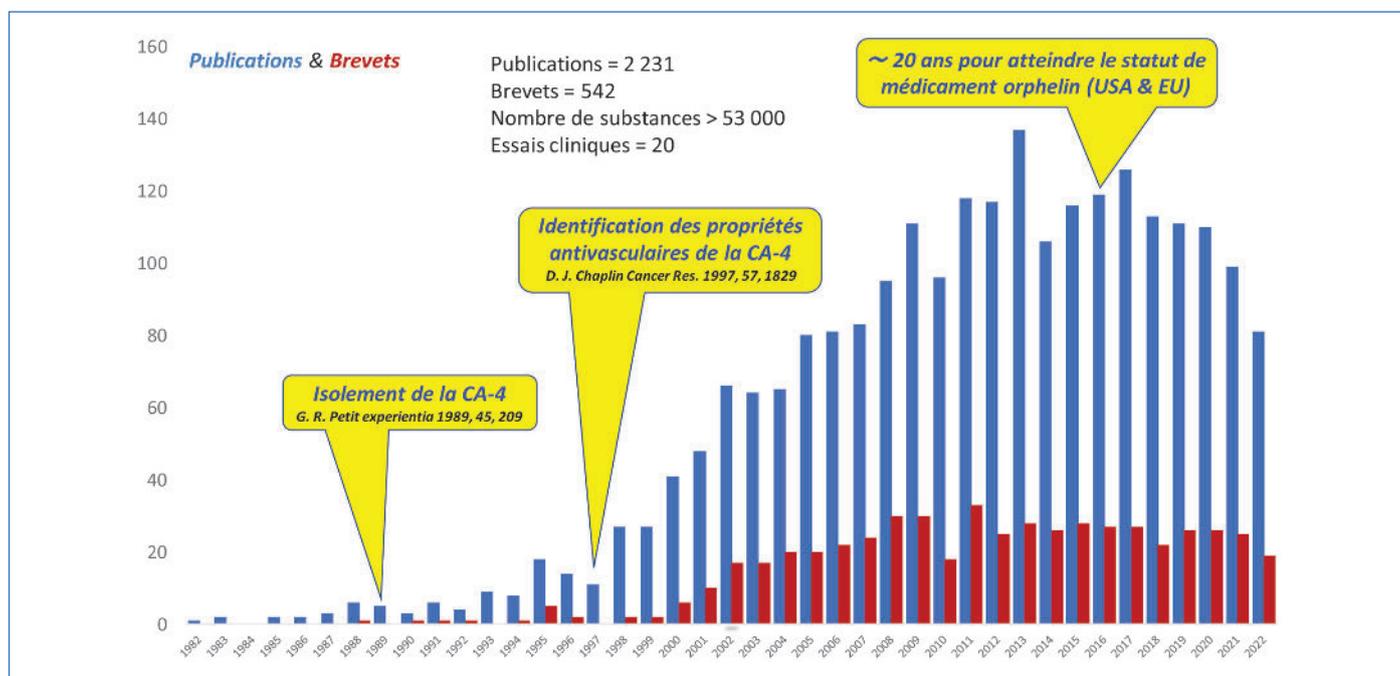


Figure 2 - Histogramme du nombre de publications (bleu) et brevets (rouge) se référant au mot « combretastatin » (oct. 2022, Scifinder).

puissant agent :

- antiprolifératif à des concentrations nanomolaires vis-à-vis de diverses lignées cellulaires cancéreuses humaines, y compris des multirésistantes ;
- antimitotique (empêchant la multiplication des cellules) en ciblant la tubuline ;
- et antivasculaire, en ciblant sélectivement la néovascularisation des tumeurs [3].

Bien que le mécanisme d'action de la CA-4 ne soit pas complètement élucidé à ce jour, des études montrent que l'inhibition de la polymérisation de la tubuline entraîne un changement morphologique des cellules endothéliales qui s'arrondissent et se détachent de la paroi des vaisseaux, provoquant une thrombose. Il en résulte un arrêt du flux sanguin, à l'origine d'une nécrose rapide, particulièrement marquée dans la région centrale des tumeurs, en général résistantes aux thérapies conventionnelles.

La découverte en 1997 des propriétés antivasculaires de la CA-4 est à l'origine d'un engouement important de chercheurs vis-à-vis de cette substance naturelle en vue de comprendre son mode d'action, décrypter la relation structure-activité (RSA), améliorer sa solubilité, et surtout s'affranchir des problèmes liés à sa stabilité.

Le problème d'hydrosolubilité de la CA-4 a été résolu via la préparation de la CA-4P (fosbrétabuline, Zybrestat<sup>®</sup>, figure 1), une prodrogue phosphate développée initialement par la société Oxigene, devenue ensuite Matheon Therapeutics en 2016, puis Oncotelic Therapeutics en 2020 [4]. La fosbrétabuline est le chef de file des agents antivasculaires ; il a reçu en 2016 en monothérapie le statut de médicament orphelin aux États-Unis et en Europe pour le traitement de tumeurs neuro-endocrines et du glioblastome multiforme.

En dépit de l'intérêt de la fosbrétabuline en clinique, le principal handicap de cette nouvelle classe thérapeutique (« first-in-class ») est l'isomérisation de la double liaison Z pendant le stockage, l'administration et le métabolisme conduisant à l'isomère inactif E [5]. Depuis l'identification des propriétés antivasculaires de la CA-4, de nombreuses études de RSA ont permis la synthèse d'un grand nombre d'analogues stables de

la CA-4 où la double liaison Z est incluse dans un hétérocycle [6], particulièrement azoté à cinq chaînons, aboutissant *in fine* à des molécules de plus en plus complexes et dont la synthèse n'est pas toujours aisée.

Pour une petite molécule aussi simple comme la CA-4, quel pourrait être l'apport scientifique d'une équipe académique dans ce domaine largement exploré par la communauté scientifique depuis 1997, comme en témoigne le nombre croissant de publications et brevets ? (> 2 770 articles/brevets, > 53 000 analogues synthétisés, ~ vingt essais cliniques ; voir figure 2).

Notre démarche a visé la modulation du lien carboné entre les cycles aromatiques A et B (lien en C1 à C6) [7-8], avec comme premiers objectifs de rechercher des molécules simples, stables et tout aussi actives que la CA-4 (voire plus puissantes !), et d'apporter une preuve de concept d'efficacité antitumorale *in vivo*.

### Isocombrétastatines

En 2007, le problème de l'isomérisation de la CA-4 a été définitivement résolu au sein du laboratoire avec la conception d'une structure où les deux noyaux aromatiques A et B sont pontés par un lien carboné d'hybridation  $sp^2$  [9] (figure 3).

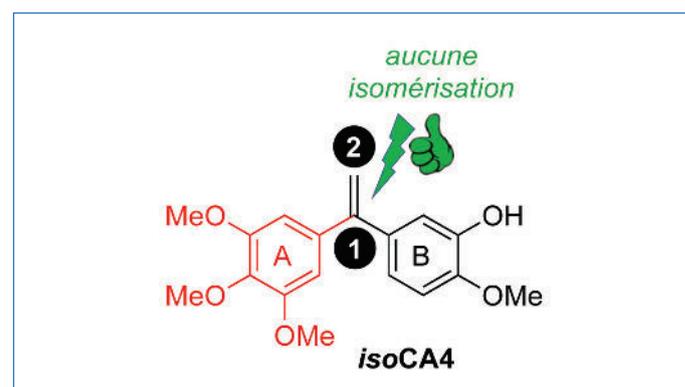


Figure 3 - Structure de l'isoCA-4.

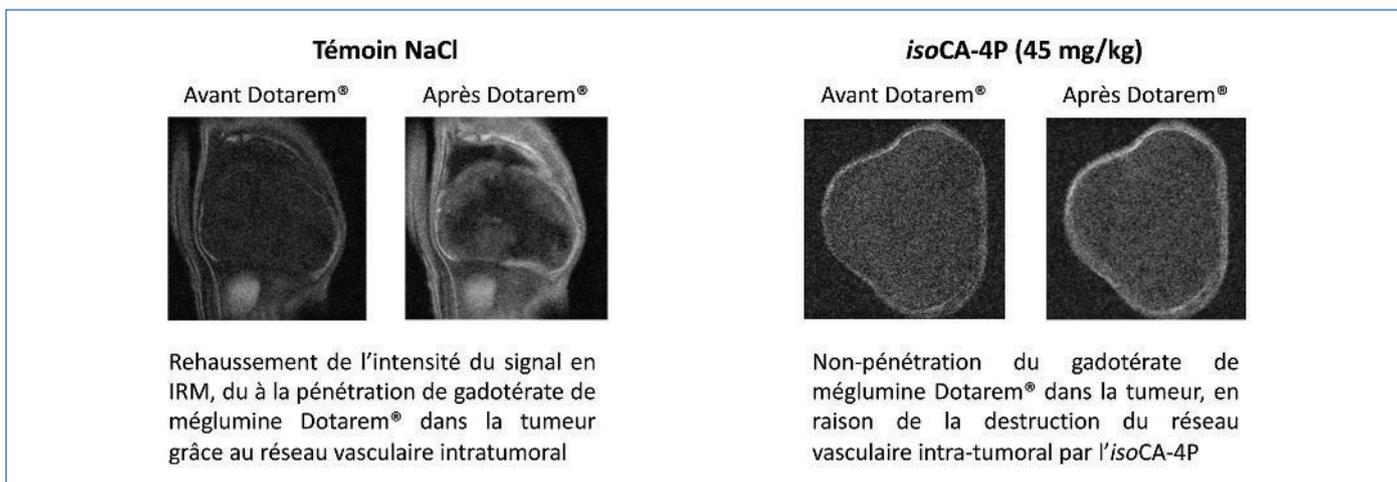


Figure 4 - IRM de la tumeur avant et après administration par voie intraveineuse de l'isoCA-4P (xénogreffes de souris nude par la lignée LS-174T).

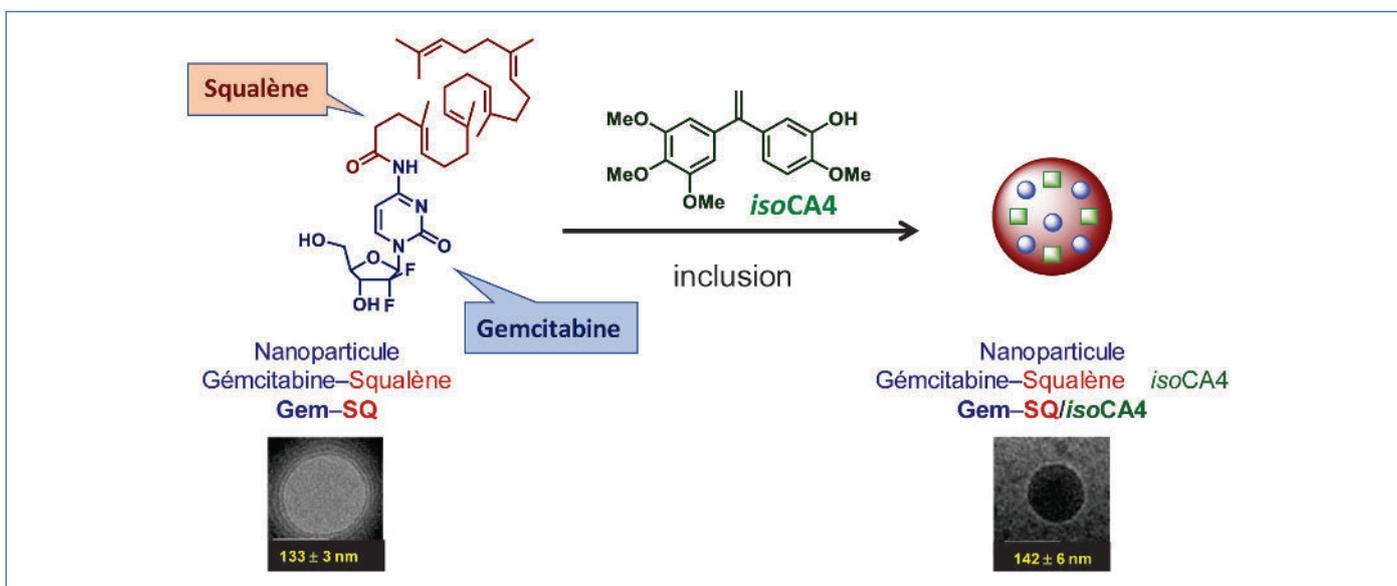


Figure 5 - Formation de la nanoparticule Gem-SQ/isoCA-4 multifonctionnelle et stable contenant l'isoCA-4 par inclusion.

Cette classe de molécules possédant un pharmacophore 1,1-diaryléthylène est nommée *isocombrétastatine*. L'isoCA-4 [10], premier représentant, constitue l'isomère le plus simple de cette série chimique stable [11], facile d'accès et caractérisée par un angle dièdre de 68°, voisin de celui de la molécule naturelle CA-4.

Nous avons démontré que le profil biologique de l'isoCA-4 est rigoureusement identique à celui de la molécule naturelle. *In vitro*, l'isoCA-4 est douée d'une activité antiproliférative à des concentrations nanomolaires ( $CI_{50} = 1-7$  nM) vis-à-vis de différentes lignées cellulaires tumorales humaines, incluant celles multi-résistantes (ex : MCF7R, HCT15R, HL60R). L'étude de son mécanisme d'action a montré que l'isoCA-4 inhibe l'assemblage de la tubuline, provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, induit l'apoptose dans une variété de lignées cellulaires cancéreuses humaines, et enfin détruit dans le modèle Matrigel™ les tubes vasculaires formés par les cellules endothéliales.

Ces travaux ont été à l'origine du label national « Équipe Labelisée Ligue Contre le Cancer ». Grâce à ce soutien, nous avons apporté la preuve de concept de :

- L'activité antivasculaire de l'isoCA-4 dans un modèle de xénogreffe de tumeurs humaines sur souris nude (lignée LS-174T, tumeur humaine de colon hyper vascularisée), après

administration intraveineuse de la prodrogue phosphate isoCA-4P, suivie de celle d'un agent de contraste IRM. L'absence de diffusion du gadotérate de méglumine Dotarem® au sein de la tumeur démontre sans ambiguïté l'effet antivasculaire recherché (figure 4).

- L'efficacité anticancéreuse de l'isoCA-4 (sans avoir à préparer une prodrogue de l'isoCA-4) en combinaison avec un agent de chimiothérapie conventionnelle. Dans cette perspective, nous avons fait appel au concept de « nanomédicaments squalénisés » (coll. Patrick Couvreur) qui représente une véritable plateforme pour la conception de nanomédicaments, moins toxiques et plus efficaces que les molécules parentes. Nous avons nanoprecipité l'isoCA-4 avec le composé antitumoral gemcitabine, conjugué à l'acide squalénique via une liaison covalente (Gem-SQ). En solution aqueuse exempte de surfactant, la Gem-SQ et l'isoCA-4 s'auto-assemblent de façon spontanée, formant des nanoparticules multifonctionnelles Gem-SQ/isoCA4 (ratio 1/1, taille environ 150 nm), où la nanoparticule est formée par inclusion de l'isoCA-4 hydrophobe [12] (figure 5).

L'étude des propriétés de ces nanoparticules multifonctionnelles Gem-SQ/isoCA-4 a révélé que ces nanomédicaments possèdent des propriétés remarquables en termes de taux de charge en principe actif par nanoparticule, de stabilité,

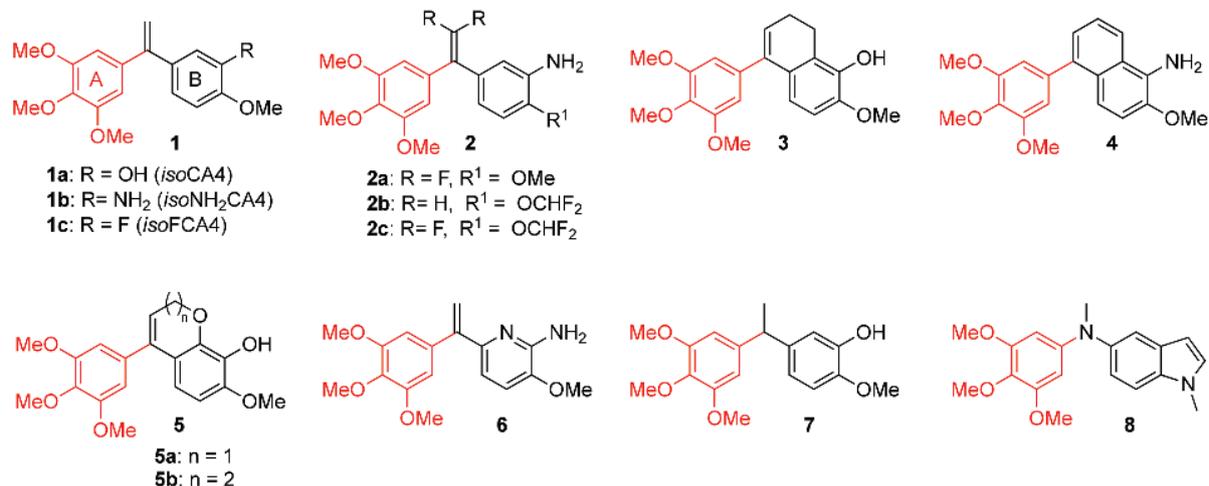
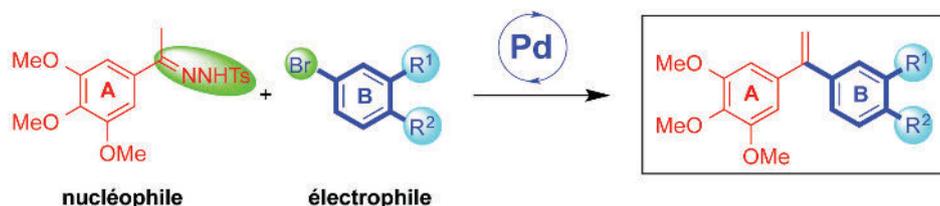


Figure 6 - Sélection de dérivés isocombréstatines actifs de première génération.

### Exploration de l'espace chimique autour du cycle B, aromatique ou hétéro-aromatique



### Exploration de l'espace chimique autour du cycle A, aromatique ou hétéro-aromatique

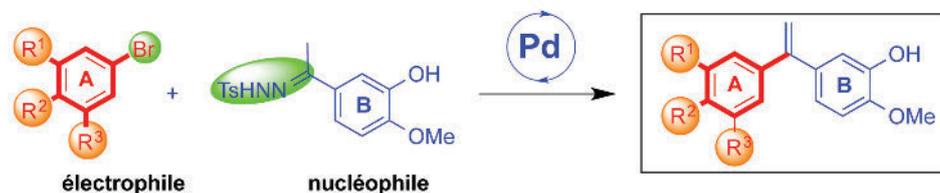


Figure 7 - Stratégie convergente de construction de motifs 1,1-diaryléthylènes.

de temps de demi-vie plasmatique, de biodisponibilité et de distribution cellulaire. L'efficacité antitumorale a été démontrée *in vivo* sur un modèle humain de cancer du côlon [12]. Les nanomédicaments Gem-SQ/*isoCA-4*, contenant deux principes actifs antitumoraux aux mécanismes d'action différents, ont entraîné une régression tumorale spectaculaire (93 %) et se sont révélés supérieurs à tous les autres traitements.

## Vers les molécules hétérocycliques de deuxième génération

### Dérivés de la première génération

Depuis l'identification de l'*isoCA-4*, les études de RSA appuyées par de la modélisation moléculaire et par la connaissance de l'angle dièdre ont permis de dégager les éléments structuraux nécessaires pour maintenir des propriétés biologiques similaires, voire supérieures à l'*isoCA4* [13]. La *figure 6* représente quelques-unes des molécules identifiées comme analogues simples biologiquement actifs de l'*isoCA-4*, possédant

des activités antiprolifératives à des concentrations nanomolaires ( $IC_{50} = 2-20$  nM), une capacité à inhiber la polymérisation de la tubuline à des concentrations micromolaires ( $IC_{50} = 1-3$   $\mu$ M) et une activité antivasculaire avérée (test Matrigel<sup>®</sup>) qui se manifeste dans des conditions expérimentales pour lesquelles n'est pas observée de toxicité vis-à-vis des cellules endothéliales [14].

Pour construire le squelette 1,1-diaryléthylène, nous avons développé une stratégie innovante basée sur le couplage d'un halogénure aromatique ou hétéro-aromatique avec un dérivé N-tosylhydrazone en tant que partenaire nucléophile facilement accessible, en présence d'une quantité catalytique (1 à 5 mol%) d'un complexe de palladium [15] (*figure 7*).

Grâce à cette approche, à la fois robuste et convergente, en faisant varier la nature du partenaire électrophile, des bibliothèques de molécules très variées ont été synthétisées. Les caractéristiques de cette approche sont : l'absence de préparer et d'utiliser des réactifs métalliques stœchiométriques, une facilité d'accès aux réactifs nucléophiles, la facilité de mise en œuvre des conditions opératoires, et l'obtention de rendements élevés.

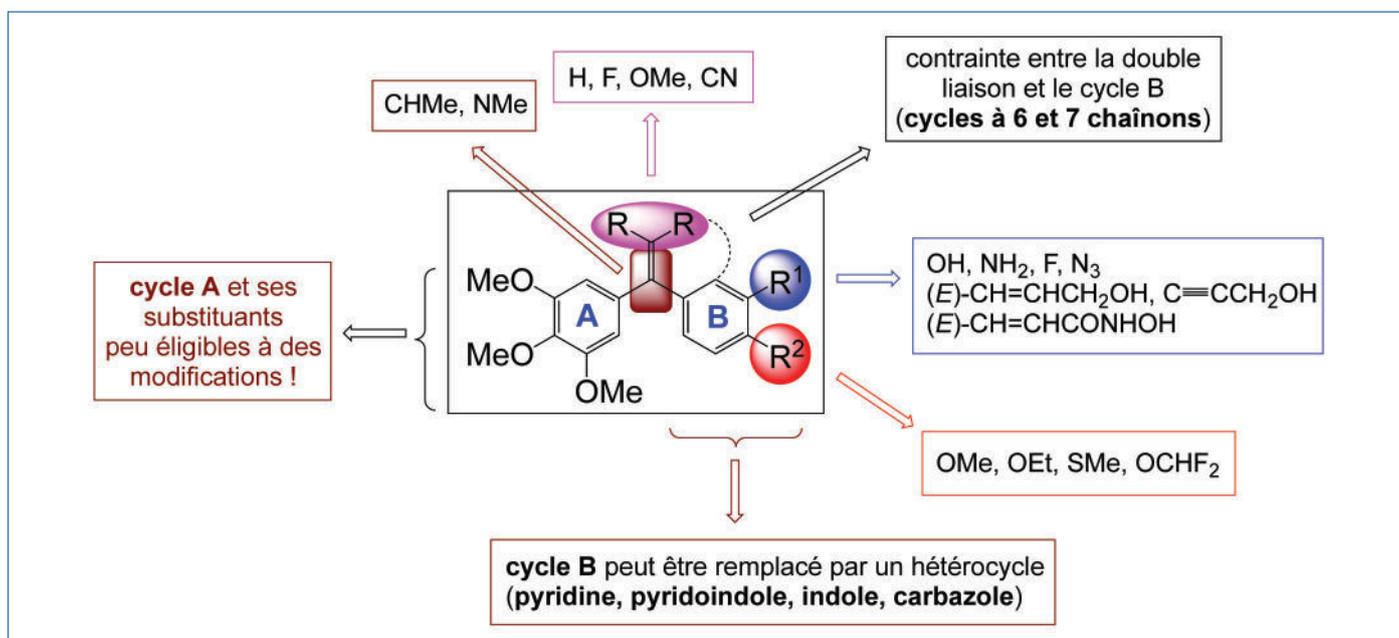


Figure 8 - Relation structure-activité des dérivés isocombréstatines.

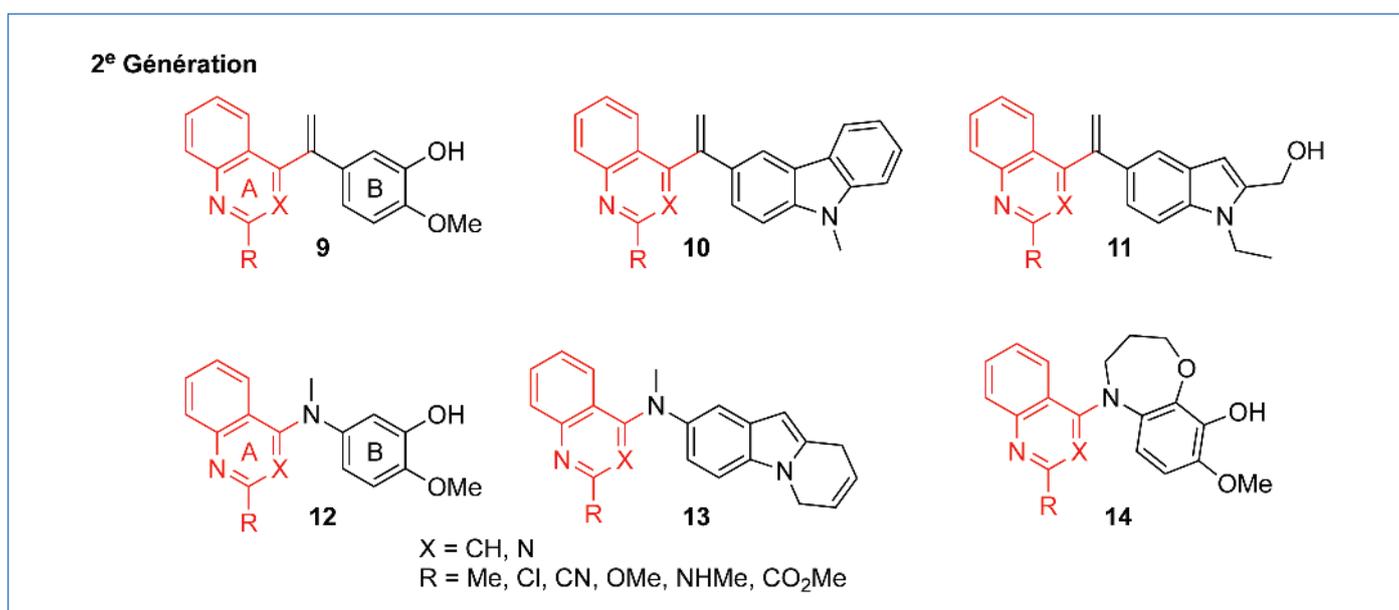


Figure 9 - Sélection de dérivés isocombréstatines actifs de deuxième génération portant un cycle A de type quinoléine ou quinazoline.

### Composés de la deuxième génération

Sur la base des RSA établies en séries chimiques de première génération (figure 8), notre ambition est ensuite d'identifier des composés actifs de deuxième génération comportant à la place du triméthoxyphényle un hétérocycle, afin de conférer aux nouvelles molécules des propriétés « drug-like », chimiquement stables en milieu acide, permettant une potentielle administration par voie orale. La caractéristique structurale commune aux composés 1-8 (figure 6) avec la CA-4 est la présence du cycle A triméthoxyphényle [14], un élément structural indispensable à l'activité antitumorale, peu éligible à des pharmacomodulations et qui semble être responsable de cardiotoxicité.

Les travaux conduits ont montré tout l'intérêt d'optimiser la structure chimique de l'isoCA-4 en remplaçant le cycle triméthoxyphényle par un hétérocycle (figure 9). Cette modification va à l'encontre des données de la littérature concernant

l'absolue présence du cycle A pour conserver une activité antitumorale. Des molécules de deuxième génération ont été identifiées [15] possédant un noyau A de type quinazoline [16] ou quinoléine [17] substitué, associé ou non à un autre hétérocycle [18-19], ou possédant une structure contrainte de type benzo[*b*][1,4]oxazépine [20]. L'étude des propriétés biologiques de certains représentants révèle :

- des activités antimitotiques et antivasculaires avérées à des concentrations nanomolaires ;
- des activités antiprolifératives à des concentrations picomolaires (vs nanomolaires pour les molécules de première génération), incluant sur des lignées résistantes surexprimant la P-gp ;
- un profil de stabilité microsomale et plasmatique meilleur que celui de l'isoCA-4 ;
- un index *in vitro* de sécurité cardiaque supérieur à celui de l'isoCA-4, un résultat très encourageant dans le cadre d'un développement préclinique.

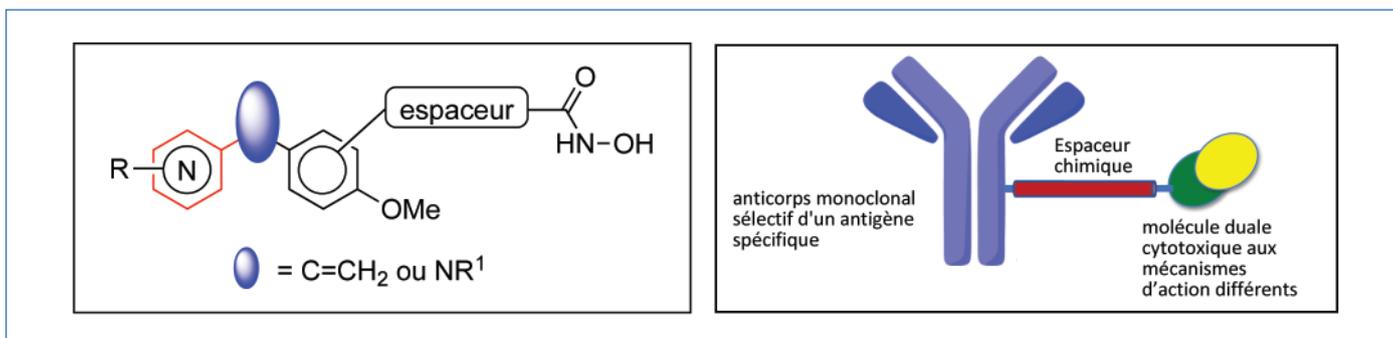


Figure 10 - Structure générale de molécules duales comportant un motif 1,1-diarylhétéroaryléthylène et une fonction acide hydroxamique chélatante nécessaire pour l'inhibition des HDAC et structure générale d'un immunoconjugué cytotoxique.

## Vers des molécules duales et des immunoconjugués cytotoxiques

Nos efforts ont ensuite porté sur l'identification de molécules antitumorales multicibles visant la régulation épigénétique (HDAC : histone désacétylase) et la vascularisation tumorale. Le rationnel sous-jacent est qu'un inhibiteur des HDAC permettrait, en induisant une relaxation de la chromatine, un meilleur accès de l'agent cytotoxique à sa cible. Des composés comportant au sein de leur structure une fonction acide hydroxamique, importante pour l'inhibition des HDAC, ont été préparés (figure 10). L'étude de l'influence de la nature de l'espaceur à la fois sur l'activité antiproliférative, l'inhibition de la polymérisation de la tubuline et l'inhibition des HDAC, a permis de définir un espaceur optimal pour maintenir les trois activités précitées [21-22]. Une preuve de concept d'efficacité antitumorale *in vivo* a été apportée avec une des molécules duales de cette série chimique aux potentiels de valorisation importants [23-25].

Dans le cadre d'un programme de maturation de la SATT Paris-Saclay [26], nos efforts portent actuellement sur le développement d'immunoconjugués cytotoxiques ou ADCC (« antibody dual drug conjugate »), une classe de médicaments biopharmaceutiques conçus comme une thérapie ciblée pour tuer les cellules tumorales tout en épargnant les cellules saines (figure 10). Nous nous intéressons également aux immunoconjugués où l'agent cytotoxique (« payload ») est une molécule duale douée à la fois de propriétés antivasculaire et immunostimulatrice.

L'originalité des résultats obtenus a conduit au dépôt de plusieurs brevets [27] et au transfert de licences à une société de biotechnologie qui vient d'être créée en décembre 2021 et dont les objectifs visent à développer de nouveaux médicaments dans les domaines des immunoconjugués et de l'immuno-oncologie.

[1] J. Denekamp, B. Hobson, Endothelial-cell proliferation in experimental tumours, *Br. J. Cancer*, **1982**, *46*, p. 711-720.

[2] G.R. Pettit *et al.*, Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4, *Experientia*, **1989**, *45*, p. 209-211.

[3] G.G. Dark *et al.*, Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature, *Cancer Res.*, **1997**, *57*, p. 1829-34.

[4] [www.oncotelic.com/pipeline](http://www.oncotelic.com/pipeline)

[5] S. Aprile *et al.*, In vitro metabolism study of combretastatin A-4 in rat and human liver microsomes, *Drug Metab. Dispos.*, **2007**, *35*, p. 2252-61.

[6] Z.S. Seddigi *et al.*, Recent advances in combretastatin based derivatives and prodrugs as antimetabolic agents, *MedChemComm*, **2017**, *8*, p. 1592-1603.

[7] N. L'Hermite *et al.*, Disproportionation reaction of diarylcarbinols: a versatile access to diarylmethanes speed up using microwave irradiation, *Tetrahedron*, **2006**, *62*, p. 11994-12002.

[8] C. Mousset *et al.*, Synthesis and antitumor activity of benzil compounds related to combretastatin A-4, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, p. 3266-71.

[9] M. Alami *et al.*, IsoCA-4 et analogues : puissants cytotoxiques, inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline, Fr. Patent 0754280, **2007** ; WO 2008/122620.

[10] S. Messaoudi *et al.*, IsoCombretastatins A versus combretastatins A: the forgotten isoCA-4 isomer as a highly promising cytotoxic and antitubulin agent, *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, p. 4538-42.

[11] A. Hamze *et al.*, Synthesis, biological evaluation of 1,1-diarylethylens as a novel class of antimetabolic agents, *ChemMedChem*, **2009**, *4*, p. 1912-24.

[12] A. Maksimenko, M. Alami *et al.*, Therapeutic modalities of squalenoyl nanocomposites in colon cancer: an ongoing search for improved efficacy, *ACS Nano*, **2014**, *8*, p. 2018-32.

[13] O. Provot *et al.*, Discovery and hit to lead optimization of novel combretastatin A-4 analogues: dependence of C-linker length and hybridization, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **2013**, *13*, p. 1614-35.

[14] A. Hamze, M. Alami, O. Provot, Developments of isoCombretastatin A-4 derivatives as highly cytotoxic agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **2020**, *190*, 112110.

[15] T. Naret *et al.*, Metal-catalyzed synthesis of 1,1-diarylethylene scaffolds, *Asian J. Org. Chem.*, **2017**, *6*, p. 1509-18.

[16] M.A. Soussi *et al.*, IsoCombretastatin A-4 derivatives: potent cytotoxic agents with antitubulin activity, *ChemMedChem*, **2015**, *10*, p. 1392-1402.

[17] I. Khelifi *et al.*, Design, synthesis and anticancer properties of IsoCombretastatin A-4 analogues as potent tubulin assembly inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, *127*, p. 1025-34.

[18] T. Naret *et al.*, 1,1-Diheterocyclic ethylenes derived from quinaldine and carbazole as new tubulin-polymerization inhibitors: synthesis, metabolism, and biological evaluation, *J. Med. Chem.*, **2019**, *62*, p. 1902-16.

[19] S. Pecnard *et al.*, Anticancer properties of indole derivatives as IsoCombretastatin A-4 analogues, *Eur. J. Med. Chem.*, **2021**, *223*, 113656.

[20] I. Khelifi *et al.*, Synthesis and anticancer properties of oxazepines related to azaisoquinoline and IsoCombretastatin A-4 analogues, *ChemMedChem*, **2020**, *15*, p. 1571-78.

[21] D. Lamaa *et al.*, Design and synthesis of tubulin and histone deacetylase inhibitor based on isoCombretastatin A-4, *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*, p. 6574-91.

[22] C. Hauguel *et al.*, Design, synthesis and biological evaluation of quinoline-2-carbonitrile-based hydroxamic acids as dual tubulin polymerization and histone deacetylase inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.*, **2022**, *240*, 114573.

[23] M. Alami *et al.*, Fr. Patent N° 145314, **2014** ; WO 2015/155262.

[24] M. Alami *et al.*, Fr. Patent N° 1650043, **2016** ; WO 2017/118822.

[25] M. Alami *et al.*, Fr. Patent N° 1853709, **2018** ; WO2019/207257.

[26] <https://satt-paris-saclay.fr/vitrine-technologique/dacmma>

[27] S. Apcher, M. Alami *et al.*, Compound, composition and uses thereof for treating cancer, Eur. Patent N° 17306456.9, **2017** ; WO/2018/189210. M. Alami *et al.*, Composés cytotoxiques inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline, Fr. Patent N° 1453142, **2014** ; étendu à l'international, **2015**, WO/2015/155262. M. Alami *et al.*, Conjugué anticorps-médicament comprenant des dérivés de quinoléine, Fr. Patent N° 1858366, **2018** ; WO/2020/058290. S. Apcher, M. Alami *et al.*, Madrasin-derivatives compounds, composition and uses thereof for treating cancer, Eur. Patent N° 18306499, **2018** ; WO/2020/099650.

### Mouad ALAMI,

Directeur de recherche au CNRS, directeur de BioCIS (UMR CNRS 8076), Faculté de pharmacie, Université Paris-Saclay.

\* [mouad.alami@universite-paris-saclay.fr](mailto:mouad.alami@universite-paris-saclay.fr)