

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE
(ONCOLOGIE)

PAR
CAROLINE DESCÔTEAUX

DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX COMPOSÉS ANTICANCÉREUX
POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS FÉMININS

MAI 2013

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (PH.D.)
(ONCOLOGIE)

Programme offert par l'Université du Québec à Trois-Rivières

DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX COMPOSÉS ANTICANCÉREUX
POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS FÉMININS

PAR

CAROLINE DESCÔTEAUX

Gervais Bérubé

Directeur de recherche

Université du Québec à Trois-Rivières

Sylvain Robert

Président du jury

Université du Québec à Trois-Rivières

Éric Asselin

Codirecteur de recherche

Université du Québec à Trois-Rivières

René C.-Gaudreault

Évaluateur externe

Université Laval

Bertrand-Jacques, Jean-Claude

Évaluateur externe

Université McGill

AVANT-PROPOS

Le cancer est un des fléaux les plus importants de notre société. Cette maladie touche beaucoup de gens, de près ou de loin. À un moment ou un autre de son existence, chacun risque d'affronter le cancer ou encore, soutenir un proche affecté par cette maladie.

L'équipe du Dr Gervais Bérubé travaille depuis quelques années sur le développement d'un nouveau médicament pour vaincre certaines formes de cancer. Faire partie de cette équipe et contribuer à un projet d'une telle envergure représente pour moi une opportunité exceptionnelle me permettant d'aider la Société à aller de l'avant. Dans le cadre de ce doctorat, j'ai participé à la conception d'un agent chimiothérapeutique innovateur synthétisé dans le but d'améliorer la qualité de vie des patientes.

Cette thèse de doctorat intitulée « Développement de nouveaux composés anticancéreux pour le traitement des cancers féminins » est présentée à l'Université du Québec à Trois-Rivières pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences (Ph. D.).

Ce travail a été réalisé sous la direction du Dr Gervais Bérubé ainsi que sous la codirection du Dr Éric Asselin de l'UQTR et a donné lieu à quatre publications scientifiques. Celles-ci constituent le corps de ce document, rédigé sous la forme d'insertion de ces articles intitulés :

- Premier article : « Synthesis of D- and L-tyrosine-chlorambucil analogs active against breast cancer cell lines »;
- Deuxième article : « SAR study of tyrosine-chlorambucil hybrid regioisomers; synthesis and biological evaluation against breast cancer cell lines »;
- Troisième article : « Design of novel tyrosine-nitrogen mustard hybrid molecules active against uterine, ovarian and breast cancer cell lines »;
- Quatrième article : « Exploring the synthesis of L-tyrosine-platinum(II) molecules as potential anticancer agents ».

REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse ont été menés grâce au soutien et aux encouragements de nombreuses personnes. Je tiens à remercier celles-ci à qui je dois, en grande partie, la réalisation de ce doctorat.

Le Dr Gervais Bérubé, mon directeur de recherche, est une personne à qui je dois énormément pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Il m'a pris sous son aile, m'a beaucoup appris et m'a permis de développer une autonomie en recherche. Mille mercis de m'avoir fait confiance pour la rédaction d'articles scientifiques et de m'avoir accordé l'opportunité de participer à de nombreux congrès. Merci de m'avoir donné une place de choix dans votre équipe.

Le Dr Éric Asselin, mon codirecteur, a aussi été une ressource très estimée. Merci d'avoir pris le temps de répondre à mes questions en biologie cellulaire et de m'avoir permis d'explorer le côté biologique de mon projet.

Je voudrais remercier également tous les collaborateurs ayant participé à la réalisation des manuscrits et à la présentation de mes recherches. Merci aux techniciens et assistants de recherche qui ont contribué, de par leur aide technique et leurs nombreux conseils, à la réalisation de mes travaux.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à ma famille; mes parents, Pauline et Gilbert, et mes sœurs, Mélissa et Sophie. Je ne vous remercierai jamais assez pour tous vos bons mots, pour avoir cru en moi, du début à la fin. Merci de m'avoir donné le courage d'aller jusqu'au bout, merci pour votre support inestimable.

Finalement, je remercie le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) pour le support financier.

RÉSUMÉ

Actuellement, un des moyens les plus efficaces pour tenter de vaincre le cancer est d'avoir recours à la chimiothérapie. Malgré l'efficacité des agents anticancéreux existants, l'administration de ces derniers engendre des effets secondaires importants chez les patients, diminuant ainsi grandement leur qualité de vie. Depuis quelques années déjà, des équipes de chercheurs se sont penchées sur le développement d'une nouvelle technique permettant d'amener un médicament connu à un endroit spécifique dans le corps; il s'agit du ciblage thérapeutique. Via cette approche, il serait possible de concentrer l'action du composé anticancéreux au niveau de l'organe touché par le cancer principalement, laissant ainsi les cellules saines intactes. Tout récemment, différents types de composés hybrides cytotoxiques ont été conçus pour le traitement des cancers féminins (sein, utérus et ovaires).

Dans le cadre de cette étude, des agents chimiothérapeutiques connus, le chlorambucil et le cisplatine, ont été liés à la tyrosine, un acide aminé essentiel. Considérant que cette dernière présente certaines analogies avec l'hormone sexuelle féminine, l'estradiol, la tyrosine pourrait imiter l'hormone naturelle et lier le récepteur estrogénique, tout en limitant la prolifération cellulaire. Ainsi, des molécules hybrides cytotoxiques pourraient être développées et éventuellement utilisées pour le traitement des cancers féminins.

Dans un premier temps, la D- et la L-tyrosine ont été modifiées et liées au chlorambucil. Les résultats biologiques *in vitro* ont démontré que les molécules à base de l'acide aminé naturel, L-tyrosine, étaient actives sur les adénocarcinomes du sein. Par la suite, dans le but de favoriser l'interaction de la portion ligante avec la protéine cible, le récepteur estrogénique alpha, les isomères *ortho* et *méta* de la L-tyrosine ont été utilisés pour lier le chlorambucil. Les molécules à base de L-*méta*-tyrosine se sont avérées les plus actives. Également, une étude de modélisation moléculaire a permis de constater que l'isomère L-*méta*-tyrosine adoptait une conformation semblable à celle de l'estradiol dans le récepteur estrogénique alpha, contrairement aux deux autres isomères, *ortho* et *para*. Cependant, cette étude a aussi permis de conclure que l'acide aminé, agissant comme ligand, n'occupait pas tout l'espace disponible dans la cavité de la protéine. Suite à cela, le squelette de la L-tyrosine a été modifié et élargi de manière à permettre, en raison de la proximité ligand-récepteur, de nouvelles interactions. Ainsi, des molécules L-tyrosine-chlorambucil au squelette extensionné ont été développées. Finalement, dans le but d'appliquer le concept de ciblage thérapeutique à un autre médicament connu, la L-tyrosine a également été liée au cisplatine. Plusieurs voies de synthèse ont été explorées afin de concevoir des molécules L-*para*-tyrosine-Pt(II). Celles-ci se sont malheureusement avérées inactives sur les cellules cancéreuses du sein. Cette thèse présente la conception, le développement et l'analyse biologique de ces nouveaux composés anticancéreux à base de tyrosine, un acide aminé.

Mots clés : cancers féminins, tyrosine, chlorambucil, cisplatine

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	iii
REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ	v
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Épidémiologie du cancer	1
1.2 Histopathologie du cancer	3
1.2.1 Cellule normale et cellule cancéreuse	3
1.2.2 Cancérogénèse	4
1.3 Cancer du sein	5
1.4 Traitements	7
1.4.1 Chirurgie.....	7
1.4.2 Radiothérapie.....	8
1.4.3 Hormonothérapie.....	8
1.4.4 Chimiothérapie	9
1.5 Agents alkylants	10
1.5.1 Chlorambucil.....	11
1.5.2 Cisplatine.....	12
1.6 Effets secondaires	14
1.7 Ciblage thérapeutique	16
1.8 Les estrogènes.....	17
1.8.1 Synthèse des estrogènes	18
1.8.2 Effets physiologiques des estrogènes	19
1.8.3 Estradiol et cancer du sein.....	20
1.9 Le récepteur estrogénique.....	21
1.9.1 Structure	21
1.9.2 Isoformes alpha et bêta du récepteur aux estrogènes	22

1.10	Estradiol et récepteur aux estrogènes : mode d'action	25
1.11	Activité agoniste et antagoniste	27
1.12	Ligands des récepteurs aux estrogènes	28
1.13	Les SERMs : ligands du récepteur estrogénique	30
1.13.1	Les classes de SERMs	30
1.14	Propriétés structurales des ligands	32
1.15	Études antérieures	34
1.15.1	Encapsulation de médicaments	34
1.15.2	Molécules cytotoxiques conjuguées	34
1.15.3	Ciblage des récepteurs nucléaires	35
1.15.4	Molécules hybrides estradiol-cytotoxiques	36
1.15.5	Molécules estradiol-Pt(II) : évaluation biologique	36
1.15.6	Molécules hybrides antiestrogéniques cytotoxiques	37
1.16	Les acides aminés	39
1.16.1	La tyrosine	39
1.17	Présentation du projet de recherche	41
1.17.1	Hypothèses de recherche	42
1.17.2	Objectifs de recherche	43
CHAPITRE II		
SYNTHÈSE D'ANALOGUES D- ET L-TYROSINE-CHLORAMBUCIL		
ACTIFS SUR LES LIGNÉES CELLULAIRES CANCÉREUSES DU SEIN		
2.1	Contribution des auteurs	47
2.2	Résumé	47
2.3	Premier article scientifique	49
	Abstract	50
	Acknowledgements	61
	References and notes	62
CHAPITRE III		
ÉTUDE RSA DE RÉGIOISOMÈRES HYBRIDES TYROSINE-		
CHLORAMBUCIL; SYNTHÈSE ET ÉVALUATION BIOLOGIQUE SUR		
LES CELLULES CANCÉREUSES DU SEIN		
3.1	Contribution des auteurs	66
3.2	Résumé	66

3.3	Deuxième article scientifique	68
	Abstract.....	69
	Introduction	70
	Materials and methods.....	74
	Chemistry	74
	Biology	87
	<i>In vitro</i> cytotoxic activity.....	87
	Molecular modelling	88
	Results and discussion	88
	Synthesis of tyrosine-chlorambucil hybrid regioisomers.....	88
	<i>In vitro</i> biological activity	90
	Docking	94
	Conclusion	96
	Acknowledgments	97
	References	98

CHAPITRE IV

DESIGN DE NOUVELLES MOLÉCULES HYBRIDES TYROSINE-MOUTARDE AZOTÉE ACTIVES SUR LES LIGNÉES CELLULAIRES CANCÉREUSES DE L'UTÉRUS, DE L'OVAIRE ET DU SEIN 101

4.1	Contribution des auteurs.....	101
4.2	Résumé	101
4.3	Troisième article scientifique	103
	Abstract.....	104
	Introduction	105
	Experimental.....	109
	Chemistry	109
	Preparation of the hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide-chlorambucil molecules with the linear methodology.....	110
	Preparation of the hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide-chlorambucil molecules with the convergent methodology.....	118
	Biology.....	123
	<i>In vitro</i> cytotoxic activity.....	123
	Results and discussion	124

Synthesis of <i>ortho</i> -, <i>meta</i> - and <i>para</i> -hydroxyphenyl-tyrosinamide-chlorambucil hybrid molecules	124
<i>In vitro</i> cytotoxic activity.....	126
Conclusion.....	131
Acknowledgments	131
References	132
CHAPITRE V	
EXPLORATION DE LA SYNTHÈSE DE MOLÉCULES L-TYROSINE-PLATINE(II) COMME AGENTS ANTICANCÉREUX POTENTIELS	135
5.1 Contribution des auteurs.....	135
5.2 Résumé	135
5.3 Quatrième article scientifique.....	136
Abstract.....	137
Introduction	138
Results and discussion	140
Synthesis of L-tyrosine methyl ester platinum(II) hybrids	140
<i>In vitro</i> cytotoxic activity	143
Conclusion	144
Experimental section	145
Chemistry	145
First synthetic method (Scheme 1)	146
Second synthetic method (Scheme 2).....	148
Third synthetic method (Scheme 3).....	152
Biology	154
<i>In vitro</i> cytotoxic activity.....	154
Acknowledgements	154
References	155
CHAPITRE VI	
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	157
CHAPITRE VII	
CONCLUSION.....	180
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	183
ANNEXE.....	196

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Répartition, en pourcentage, du nombre estimatif de nouveaux cas et de décès pour certains cancers, chez la femme au Canada en 2012. (Tirée et adaptée de Société canadienne du cancer, 2012.).....	2
1.2	Représentation du développement d'un cancer. (Tirée et adaptée de Béliveau et Gingras, 2005.)	4
1.3	Anatomie du sein. (Tirée et adaptée de Société canadienne du cancer, 2012.)	5
1.4	Déformation de l'ADN induite par des agents alkylants. (Tirée et adaptée de Patel et al., 2013.).....	10
1.5	Deux agents alkylants connus : le chlorambucil et le cisplatine.....	11
1.6	Mode d'action du chlorambucil. (Tirée et adaptée de Hernandez et Rathinavelu 2006.).....	12
1.7	Deux agents anticancéreux à base de platine(II) : le carboplatine et l'oxaliplatine	13
1.8	Mode d'action du cisplatine. (Tirée et adaptée de Kartalou et Essigmann, 2001.)	14
1.9	Les estrogènes naturels : estrone (E1), estradiol (E2) et estriol (E3).....	17
1.10	Biosynthèse des stéroïdes. (Tirée et adaptée de Thibault et Levasseur, 2001.)	19
1.11	Organisation structurale des récepteurs nucléaires	21
1.12	Représentation et analogie entre les récepteurs aux estrogènes alpha (hRE α) et bêta (hRE β) chez l'humain. (Tirée et adaptée de Ruff et al., 2000.)	23
1.13	Représentation schématique de la distribution des récepteurs estrogéniques, RE α et RE β chez l'humain. (Tirée et adaptée de Drummond et Fuller, 2010.)	24
1.14	Représentation du mécanisme d'action des estrogènes. (Tirée de Cremoux, 2011.)	26
1.15	Structure tridimensionnelle du domaine de liaison du ligand lié à un agoniste (estradiol) et à un antagoniste (tamoxifène et raloxifène). (Tirée et adaptée de Ruff et al., 2000.)	28

1.16	Structure de l'estradiol (E2) et représentation de l'estradiol dans le site actif du récepteur estrogénique. (Tirée et adaptée de Guo et al., 2002.)	29
1.17	Exemples de molécules estrogéniques et anti-estrogéniques.....	31
1.18	Exemples de quelques molécules hybrides cytotoxiques	38
1.19	Structure générale des acides aminés; représentation de Fischer des énantiomères D et L	39
1.20	Structure de la L-tyrosine.....	40
1.21	Bioynthèse des catécholamines à partir de la tyrosine.....	40
6.1	Spectre RMN ¹ H d'un mélange 1 : 2 des amides de Mosher L-tyrosine (<i>S, S</i>) et D-tyrosine (<i>R, S</i>) estérifiés	161
6.2	Affinité de l'estradiol (E2), du chlorambucil (CLL) et de la molécule hybride L- <i>para</i> -tyrosine-chlorambucil hydroxyméthyle avec un espaceur contenant cinq atomes de carbone (L- <i>p</i> -tyr-E, m = 5) pour le RE α	164
6.3	Estradiol et dérivés L- <i>ortho</i> , L- <i>mé</i> ta et L- <i>para-N</i> -acétyltyrosine hydroxyméthyle dans le RE α	169
6.4	Estradiol et dérivés <i>ortho</i> , <i>mé</i> ta et <i>para</i> -hydroxyphényl-L- <i>para-N</i> -acétyltyrosine dans le RE α	175
6.5	Molécules L-tyrosinamide-Pt(II)	178

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Å	Ångström
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF-1	Fonction activatrice 1
AF-2	Fonction activatrice 2
AMP _c	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
Arg394	Arginine 394
CLL	Chlorambucil
Ctr1	Transporteur du cuivre(I)
DBD	Domaine de liaison de l'ADN (« DNA binding domain »)
DES	Diéthylstilbestrol
E1	Estrone
E2	Estradiol
E3	Estriol
ERE	Éléments de réponse aux estrogènes
FSH	Hormone folliculostimulante lutéinisante
5-FU	5-Fluorouracile
Glu353	Acide glutamique 353
GMP _c	Guanosine monophosphate cyclique
GnRH	Gonadolibérine
GPR30	Récepteur couplé à la protéine G30
GST P11	Glutathion S-transférase
HER-2	Récepteur du facteur de croissance épidermique 2
His524	Histidine 524
hRE α	Récepteur alpha des estrogènes retrouvé chez l'humain
hRE β	Récepteur bêta des estrogènes retrouvé chez l'humain
Hsp90	Protéine de choc thermique 90
IC ₅₀	Concentration inhibant la croissance cellulaire de 50 %

PI3K-AKT	Protéine kinase phosphoinositide 3
kDa	Kilodalton
LDB	Domaine de liaison du ligand (« Ligand binding domain »)
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphénylalanine
LH	Hormone lutéique
MAPK	Protéine kinase activée par les agents mitogènes
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazoline
RE	Récepteur estrogénique
RE α	Récepteur des estrogènes alpha
RE β	Récepteur des estrogènes bêta
RE γ	Récepteur des estrogènes gamma
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAR	Relation structure-activité
SERM	Modulateurs sélectifs des récepteurs des estrogènes
SHBG	Globuline de liaison aux hormones sexuelles
SRC-1	Coactivateur-1 du récepteur stéroïdien

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Épidémiologie du cancer

En 2012, le cancer constitue l'une des principales préoccupations des Canadiens et des Canadiennes en matière de santé. Cette pathologie, appelée par plusieurs « le mal du siècle », existe en réalité depuis des millénaires. Auparavant, le cancer était plutôt méconnu. Aujourd'hui, la population est mieux informée des causes, du développement et des conséquences de cette maladie dévastatrice, ce qui explique le sentiment d'inquiétude vécu par plusieurs.

En effet, malgré le fait que les effets néfastes du cancer sont connus depuis très longtemps, et en dépit des nombreux efforts déployés pour vaincre cette maladie, celle-ci est encore et toujours très présente. D'après les données rapportées par Statistique Canada, il s'agit actuellement de la principale cause de décès au pays (environ 30 %), suivie de près par les maladies du cœur (environ 20 %) (1). Au Canada, les autorités estiment 186 400 nouveaux cas de cancer et 75 700 décès attribuables à cette maladie pour l'année 2012 (2).

Le cancer touche actuellement près d'une femme sur trois. Comme l'indique la Figure 1.1, le cancer du sein se classe au premier rang parmi les cancers féminins nouvellement diagnostiqués. Il représente 26 % des nouveaux cas de cancer enregistrés en 2012. Toujours chez la gent féminine, il se classe au deuxième rang sur le plan de la mortalité (14 %), précédé par le cancer du poumon (26 %) (2).

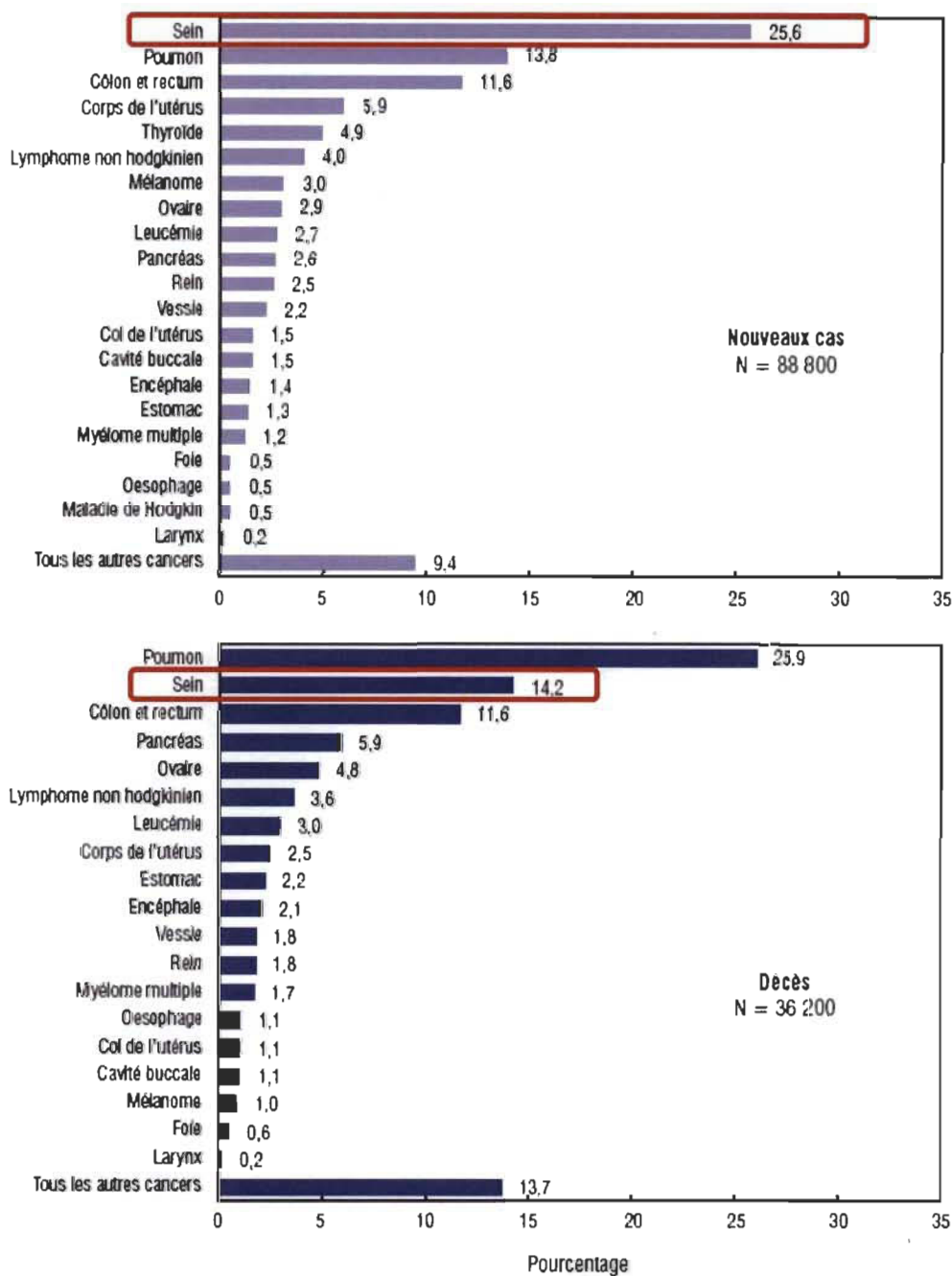


Figure 1.1 Répartition, en pourcentage, du nombre estimatif de nouveaux cas et de décès pour certains cancers, chez la femme au Canada en 2012. (Tirée et adaptée de Société canadienne du cancer, 2012.)

Les cancers de l'ovaire, de l'utérus et du col de l'utérus surviennent aussi fréquemment chez la femme. Ensemble, mis à part le cancer du sein, ces trois types de cancer représentent 10 % des nouveaux de cancer diagnostiqués de cancer et 8 % des décès attribuables aux cancers en 2012.

1.2 Histopathologie du cancer

1.2.1 *Cellule normale et cellule cancéreuse*

Le corps humain est composé d'environ 60 000 milliards de cellules (3). Ces unités structurales ont un cycle de vie prédéterminé. La cellule normale apparaît, se multiplie et s'éteint de manière programmée. Dépendamment des besoins de son environnement, cette dernière peut se renouveler pendant quelques générations, et les divisions cellulaires ne se déclenchent qu'en fonction des besoins de l'organisme, dans le but de réparer les tissus endommagés (4). Ainsi, à chaque instant, le nombre de cellules qui naissent compense le nombre de cellules qui meurent. Ce renouvellement cellulaire est assuré par des mécanismes de régulation qui veillent à ce que chacune des cellules manquantes soit remplacée par une nouvelle cellule ayant la même fonction et la même position dans le corps (3). Ainsi, une cellule normale est constamment soumise à des molécules (facteurs de croissance, inhibiteurs, cytokines, chimiokines) qui dictent sa transformation. Inversement, la cellule normale sécrète à son tour des molécules qui influencent le devenir des cellules voisines.

Compte tenu du grand nombre de cellules qui se divisent chaque jour, l'apparition de cellules anormales peut survenir soit spontanément ou suite à une transformation induite par un agent cancérogène (5). Selon diverses études, de multiples facteurs peuvent induire le développement des cellules anormales chez l'homme; le tabagisme, l'alimentation, l'hérédité, les infections, les expositions professionnelles, l'alcool, l'obésité, l'exposition aux rayons UV, les drogues et la pollution en font partie (6,7). Ces éléments de stress agissent sur les cellules et représentent alors des causes possibles d'un cancer (Figure 1.2). Effectivement, face à ces perturbations, certains gènes peuvent être déréglés et une cellule peut subir des altérations ou des mutations quelconques. Normalement, une telle cellule, devenue fragile et peu viable, est naturellement reconnue et détruite par le système immunitaire (5). Cependant dans certains cas, des cellules anormales survivent en raison de leur agressivité. Ces dernières, qualifiées de cancéreuses, se multiplient de façon exagérée et non contrôlée, causant l'apparition d'une tumeur. Le point de départ de tout cancer est donc la cellule qui a changé et dont

la division est devenue incontrôlable parce qu'elle échappe au contrôle de l'organisme. Ainsi, l'immortalité, l'autonomisation de la division cellulaire et la capacité d'infiltration sont les principales caractéristiques d'une cellule cancéreuse (3).

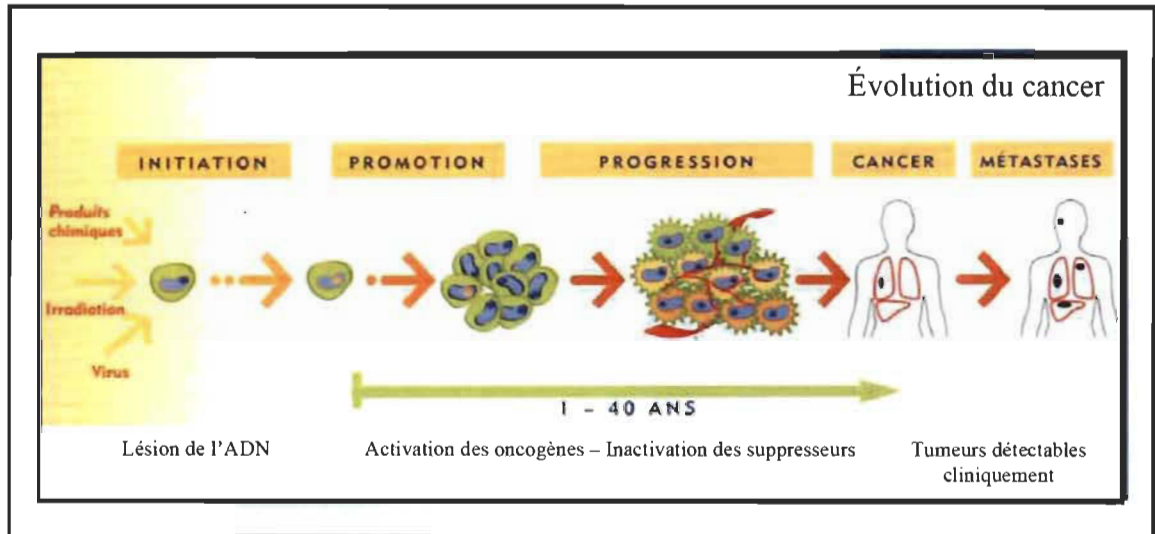


Figure 1.2 Représentation du développement d'un cancer. (Tirée et adaptée de Béliveau et Gingras, 2005.)

1.2.2 Cancérogénèse

Une tumeur primaire, appelée aussi tumeur primitive, peut se développer au niveau de différents organes (sein, foie, poumon, peau, testicule, etc.). Les amas de cellules cancéreuses peuvent alors proliférer en allant chercher des éléments nutritifs dans leur environnement immédiat via la formation de nouveaux vaisseaux sanguins; cela constitue l'angiogénèse tumorale (3,8). Les cellules malignes peuvent également se détacher de la tumeur d'origine et migrer, par voie sanguine ou par voie lymphatique, vers d'autres régions du corps, formant ainsi des métastases. Parfois, le cancer peut être détecté avant même la formation de métastases. Dans de tels cas, il est important que le traitement puisse être appliqué le plus rapidement possible, et ce afin de limiter la progression tumorale.

1.3 Cancer du sein

Le cancer du sein se forme dans les cellules de la glande mammaire. Dans la majorité des cas, il se manifeste d'abord par une bosse indolore dans le sein ou l'aisselle (2). On qualifie de cancer du sein tout développement d'amas de cellules cancéreuses ayant lieu au niveau du tissu mammaire. Le tissu mammaire comprend le sein, mais également la partie du corps comprise entre la clavicule, l'aisselle et la lame du sternum, au milieu de la poitrine (5,9). Chaque sein est constitué de glandes mammaires, de canaux galactophores (petits conduits) et de tissu adipeux (Figure 1.3). Les glandes mammaires, groupées en lobules, produisent le lait, qui circule depuis les lobules jusqu'au mamelon par un réseau de canaux. Le mamelon se trouve au centre d'une région cutanée plus foncée, appelée aréole. Le tissu adipeux occupe l'espace entre les lobules et les canaux, et assure la protection de ces derniers.

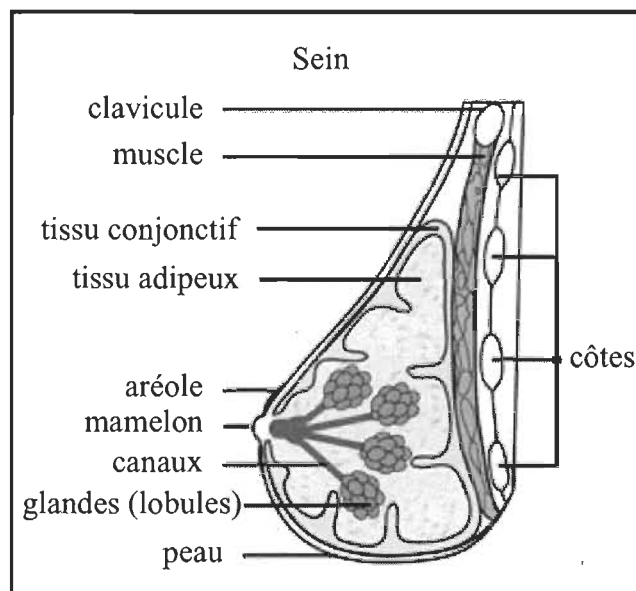


Figure 1.3 Anatomie du sein. (Tirée et adaptée de Société canadienne du cancer, 2012.)

Tout au long de la vie, le sein de la femme est sujet à des modifications structurales et fonctionnelles considérables (10). Chez les femmes plus jeunes, le tissu mammaire est principalement constitué de glandes et de canaux galactophores alors que chez les femmes plus âgées, le tissu adipeux prédomine (2,9). Les seins abritent aussi des

vaisseaux et des ganglions faisant partie du système lymphatique, dont le rôle est de combattre les infections. Les vaisseaux lymphatiques transportent le liquide appelé lymphé jusqu'aux ganglions lymphatiques, lesquels sont regroupés sous le bras, près de la clavicule et dans la poitrine, derrière le sternum. Les ganglions lymphatiques emprisonnent les bactéries, les cellules cancéreuses ainsi que les autres substances nocives.

La plupart des tumeurs mammaires malignes se développent dans les canaux galactophores (il s'agit alors d'un carcinome canalaire) ou dans les lobules (carcinome lobulaire) (10). Il existe différents types de cancer du sein. Ces derniers se divisent en deux grandes catégories; le cancer non invasif (*in situ*) et le cancer invasif (infiltrant). Le cancer du sein non invasif est un cancer qui demeure situé au niveau des canaux galactophores ou des lobules du sein (5). Le carcinome canalaire *in situ* est le type de cancer du sein le plus fréquent. Dans ce cas, le cancer demeure localisé et aucune propagation n'est observée à l'extérieur des parois des canaux et, par conséquent, le cancer ne peut pas s'étendre aux ganglions lymphatiques ni aux autres organes. Chez la plupart des femmes atteintes de ce type de cancer, le traitement est une réussite. Des cellules cancéreuses peuvent également se développer au niveau des lobules et donner lieu au développement d'un carcinome lobulaire *in situ*. Le carcinome prend naissance dans les glandes qui sécrètent le lait (lobules), mais ne se propage pas à l'extérieur des parois des lobules. Ce cancer non invasif donne toutefois lieu à une augmentation du risque de présenter un cancer du sein infiltrant. En ce qui a trait aux cancers de type invasif, le carcinome canalaire infiltrant est le cancer du sein le plus courant. Il prend naissance dans les canaux où passe le lait, traverse la paroi de ceux-ci et envahit le tissu mammaire. À ce point, il peut s'étendre (se métastaser) à d'autres parties du corps. Les autres types de cancer du sein infiltrant incluent le carcinome lobulaire infiltrant, le carcinome mucineux infiltrant, le carcinome tubulaire, le carcinome médullaire et le carcinome micropapillaire infiltrant. Il existe aussi d'autres types de cancer du sein, comme le cancer inflammatoire du sein et la maladie de Paget, bien que ceux-ci touchent une plus petite proportion de la population (2,10). Le cancer inflammatoire du sein se caractérise par une rougeur, un gonflement des seins, une texture de peau similaire à une

peau d'orange, un changement dans l'apparence du mamelon et de la douleur au niveau du sein (5). Le sein peut devenir plus dur, plus sensible et il peut y avoir de la démangeaison. Le cancer du sein inflammatoire est souvent difficile à diagnostiquer en raison de l'absence de masse. Ce cancer présente un risque plus élevé de se propager et peut être plus difficile à traiter que le carcinome canalaire ou lobulaire infiltrant. La maladie de Paget, quant à elle, est caractérisée par une éruption cutanée au niveau du mamelon (5). Des rougeurs, des écoulements et des démangeaisons peuvent alors survenir. Ce type de cancer est généralement traité par chirurgie. Souvent, la maladie de Paget est associée à d'autres types de cancer du sein, notamment un carcinome canalaire invasif. D'autres types de traitements peuvent alors s'avérer nécessaires.

1.4 Traitements

Plusieurs traitements existent pour guérir le cancer. Les plus communs sont la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie. Le choix de l'application de l'une ou l'autre de ces techniques résulte de la concertation de différents spécialistes et dépend étroitement du type de cancer et de son stade de progression.

1.4.1 Chirurgie

La chirurgie est généralement le premier traitement auquel les oncologues ont recours lorsque la tumeur est localisée à un endroit précis du corps (4). Cette opération chirurgicale consiste à enlever la quasi-totalité des cellules cancéreuses. Pour améliorer l'efficacité de la chirurgie et s'assurer que la tumeur soit entièrement éliminée, l'intervention est souvent associée à un autre traitement, comme la radiothérapie ou la chimiothérapie. Un des inconvénients de la chirurgie est la douleur. De plus, cette technique est moins appropriée lorsque le cancer devient invasif. En effet, le procédé chirurgical localisé ne permet pas la suppression des cellules cancéreuses qui auraient accédé à d'autres organes sous la forme de métastases.

1.4.2 Radiothérapie

La radiothérapie est un autre mode de traitement fréquent du cancer; elle concerne pratiquement près d'un patient sur deux (4). Cette technique consiste à exposer les cellules cancéreuses d'une tumeur à des radiations tout en préservant, autant que possible, les tissus sains et les organes avoisinants. Les rayons ionisants utilisés sont principalement des rayons X, des électrons produits par des accélérateurs linéaires ou, dans une moindre mesure, des rayons gamma générés par le cobalt. La radiothérapie agit en ionisant les acides nucléiques (ADN et ARN) des cellules. À de fortes concentrations, les radiations fragilisent le contenu des cellules traitées et entraînent une altération des chromosomes de façon à bloquer le mécanisme de multiplication des cellules irradiées et à provoquer leur destruction. La radiothérapie agit localement sur la région visée; son action se limite à la tumeur et à la région avoisinante de celle-ci. Cette technique atteint inévitablement un certain nombre de cellules saines, ce qui peut entraîner, entre autres, des sensations de brûlure (4).

1.4.3 Hormonothérapie

Le développement de certains types de tumeurs est stimulé par des hormones. Ces cancers sont alors qualifiés d'hormono-dépendants. L'hormonothérapie est un traitement qui ajoute, bloque ou enlève des hormones afin de ralentir ou de faire cesser la croissance de cellules cancéreuses hormono-dépendantes (11). Elle permet ainsi d'empêcher le développement de ces tumeurs. Les principales hormones responsables de la croissance tumorale sont les hormones de croissance, les hormones sexuelles, les hormones thyroïdiennes et d'autres molécules endogènes. L'hormonothérapie consiste à enlever la glande sécrétrice d'hormones, à l'irradier ou encore à administrer des hormones ou autres médicaments agissant sur l'activité hormonale. Les cancers du sein, de la prostate et de l'endomètre sont les principaux cancers concernés par ce type de traitement. Les hormones sont des molécules qui jouent des rôles importants dans l'homéostasie d'un organisme. Une suppression de ces dernières, provoquée par l'anti-hormonothérapie, engendre plusieurs effets secondaires indésirables : bouffées de

chaleur, pertes vaginales, prise de poids, thromboses veineuses, douleurs articulaires, douleurs musculaires, ostéoporose et autres.

1.4.4 Chimiothérapie

La chimiothérapie est l'un des traitements anticancéreux les plus fréquemment utilisés de nos jours. Ce mode de traitement utilise des substances chimiques, qualifiées de cytotoxiques, pour tuer les cellules cancéreuses ou bloquer leur multiplication (12). Les médicaments utilisés en chimiothérapie sont appelés des agents antinéoplasiques. Parmi ceux-ci figurent les alkylants, les antibiotiques, les antimétabolites et les antimitotiques. Les agents alkylants provoquent une lésion biochimique dans l'ADN du noyau et altèrent ainsi la cellule cancéreuse. Les antibiotiques entravent également la multiplication cellulaire. Les antimétabolites, quant à eux, trompent la cellule en imitant des substances indispensables à la division et à la survie des cellules. Et finalement, les antimitotiques bloquent notamment la division de la cellule-mère en deux cellules-filles. Dans l'ensemble, ces composés antinéoplasiques sont administrés par voie orale ou intraveineuse. Une fois dans le corps, ceux-ci se propagent dans l'ensemble de l'organisme pour altérer les cellules les plus sensibles et à prolifération rapide telles les cellules cancéreuses.

L'objectif de la chimiothérapie consiste principalement à inhiber la croissance tumorale à l'aide de médicaments capables d'interférer dans le processus de synthèse protéique ou de bloquer la division cellulaire (12). Cette technique de destruction de la cellule fut trouvée accidentellement, environ cinquante ans après la découverte de la radiothérapie, soit pendant la Seconde Guerre mondiale (3). Sur un bateau transportant des gaz asphyxiants, des fuites survinrent et une importante baisse du nombre de globules blancs sanguins fut observée chez les personnes à bord. Suite à cet incident, ces produits, qui étaient en fait des dérivés des moutardes à l'azote, furent utilisés pour le traitement des cancers des tissus hématopoïétiques : leucémies et hématosarcomes. Dans les années qui ont suivi, les recherches se sont succédées et la chimiothérapie moderne a pris son essor avec les premières applications cliniques. D'hier à aujourd'hui, l'enrichissement

progressif de l'arsenal chimiothérapeutique a permis de découvrir et développer plus d'une quarantaine de médicaments actifs contre le cancer.

1.5 Agents alkylants

Les divers composés cytotoxiques utilisés en clinique exécutent leur action anticancéreuse selon des voies distinctes et ils agissent sur des cibles moléculaires différentes (11). La principale cible des agents anticancéreux connus est l'ADN, source de l'information génétique de la cellule. Les agents alkylants induisent une déformation de la double hélice de l'ADN, empêchant ainsi la réplication de celui-ci (13,14) (Figure 1.4).

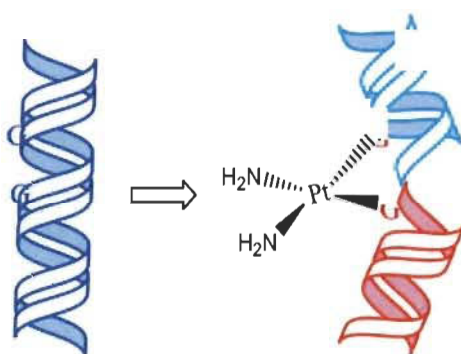


Figure 1.4 Déformation de l'ADN induite par des agents alkylants. (Tirée et adaptée de Patel et al., 2013.)

On peut distinguer des classes de médicaments agissant directement sur l'ADN (alkylants, intercalants) et d'autres indirectement (antimétabolites, inhibiteurs de la transcription et de la réplication) (4,11). Les composés étudiés dans le cadre de ce travail sont des dérivés d'agents alkylants connus, soit le chlorambucil et le cisplatine (Figure 1.5).

synthèse protéique, inhiber l'activité enzymatique ou encore il peut perturber les processus de signalisation cellulaire. Bien que le chlorambucil puisse produire des dommages en réagissant avec une variété de composantes biologiques présentes sur son passage, il fut démontré que la formation de liens interbrins avec les bases azotées de l'ADN était la principale explication de son activité antitumorale (19). Le composé actif forme principalement des liaisons covalentes avec l'atome d'azote en position 7 de la guanine (N7) et avec l'atome d'azote en position 3 de l'adénine (N3). Finalement, suite à l'inactivation ou à la dégradation de l'ADN, la cellule entre en apoptose (20).

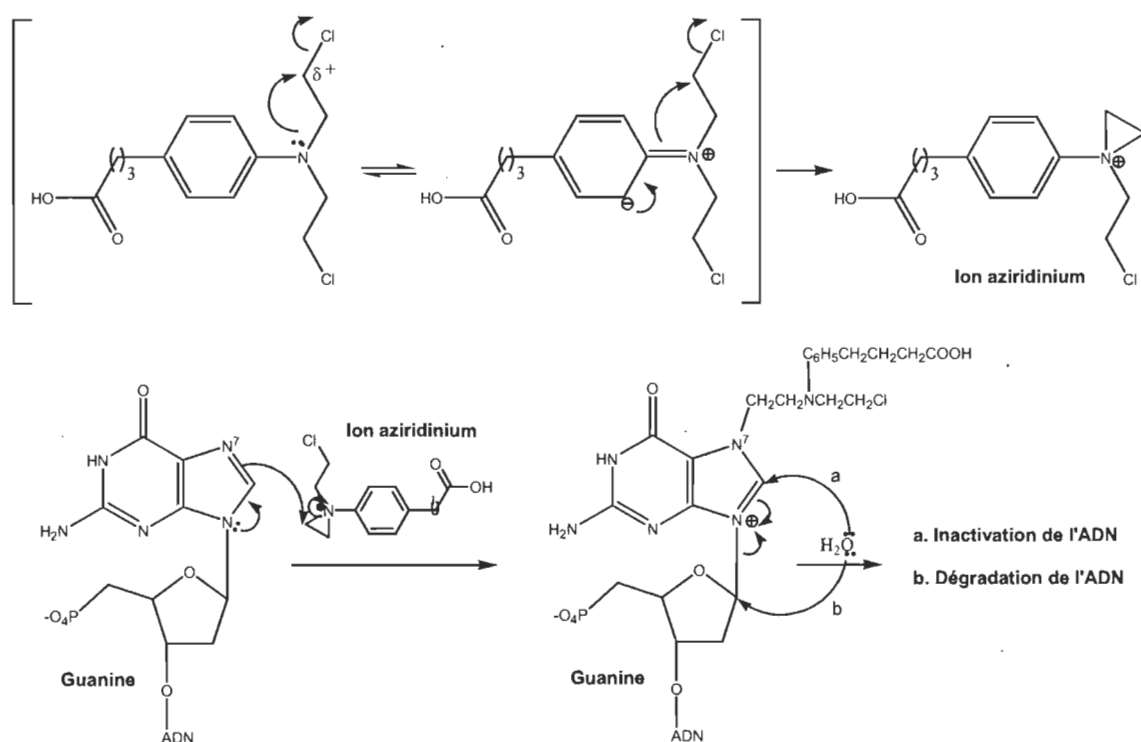


Figure 1.6 Mode d'action du chlorambucil. (Tirée et adaptée de Hernandez et Rathinavelu 2006.)

1.5.2 Cisplatine

Les propriétés anticancéreuses du cisplatine ont été découvertes en 1964, alors que Rosenberg et son équipe étudiaient l'effet du champ électrique sur la croissance bactérienne (21). Ce composé, comme le carboplatine et l'oxaliplatine (Figure 1.7), est un agent anticancéreux à base de platine(II). Les complexes métalliques formés de cet

élément sont maintenant utilisés dans près de la moitié des thérapies tumorales à travers le monde. Le cisplatine est un composé alkylant bifonctionnel. Il est principalement indiqué pour traiter les cancers des testicules, de l'ovaire, de la vessie, du poumon et de la tête et du cou (22,23). Le cisplatine est administré par voie intraveineuse à raison de 50 à 100 mg/m²/3 semaines ou encore selon une posologie cyclique (12,24).

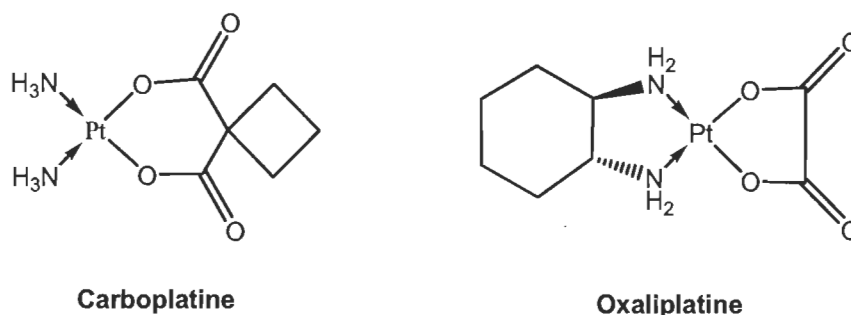


Figure 1.7 Deux agents anticancéreux à base de platine(II) : le carboplatine et l'oxaliplatin.

Plusieurs études menées au cours des dernières années ont permis d'élucider le mécanisme d'action du cisplatine (22,25-27). Celui-ci est illustré à la Figure 1.8. Une fois administré, le composé est véhiculé dans le sang où la concentration en ions chlorures est très élevée (environ 100 mM). À ce moment, le temps de demi-vie du platine lié aux protéines plasmatiques est d'environ 30 minutes. Arrivé à proximité de la cellule, le cisplatine traverse la membrane cellulaire. Bien que plusieurs s'entendent pour dire que le cisplatine pénètre la cellule par un mode de diffusion passive, certains portent à croire qu'un mode de transport actif pourrait être impliqué dans le passage intracellulaire. Les unités de phosphatidylsérines de la membrane cellulaire de même que la protéine de transport Ctr1 (transporteur actif du Cu(I)) figurent entre autres parmi les facteurs potentiels pouvant jouer un rôle dans le transport membranaire du cisplatine (22). Une fois à l'intérieur de la cellule, les ligands chlorures du complexe sont rapidement remplacés par des molécules d'eau. Il est à noter que ce processus d'hydratation est favorisé par la très faible concentration en ions chlorures au sein de la cellule (environ 4 mM) (26). L'espèce cationique résultante constitue la forme active du cisplatine. Les ligands aquo sont ensuite rapidement remplacés par des sites nucléophiles et le platine se lie alors avec des macromolécules biologiques du milieu. Le cisplatine est

inactivé dans le sang et les cellules par une interaction covalente avec les groupements sulphydriques (S-H) du glutathion et des métallothionéines (25). Sa liaison aux protéines tissulaires, aux cellules sanguines et aux protéines plasmatiques l'inactive également. Quoique plusieurs composantes cellulaires puissent interagir avec le cisplatine, l'ADN demeure la principale cible de ce composé (28). Les liaisons covalentes nouvellement formées se font principalement sur des bases guanines adjacentes, et plus précisément sur l'atome d'azote en position 7 (N7) (27). Des adduits intracaténares (majoritairement) et intercaténares causent des perturbations non négligeables au sein de la machinerie cellulaire et de ce fait, la mort programmée de la cellule survient.

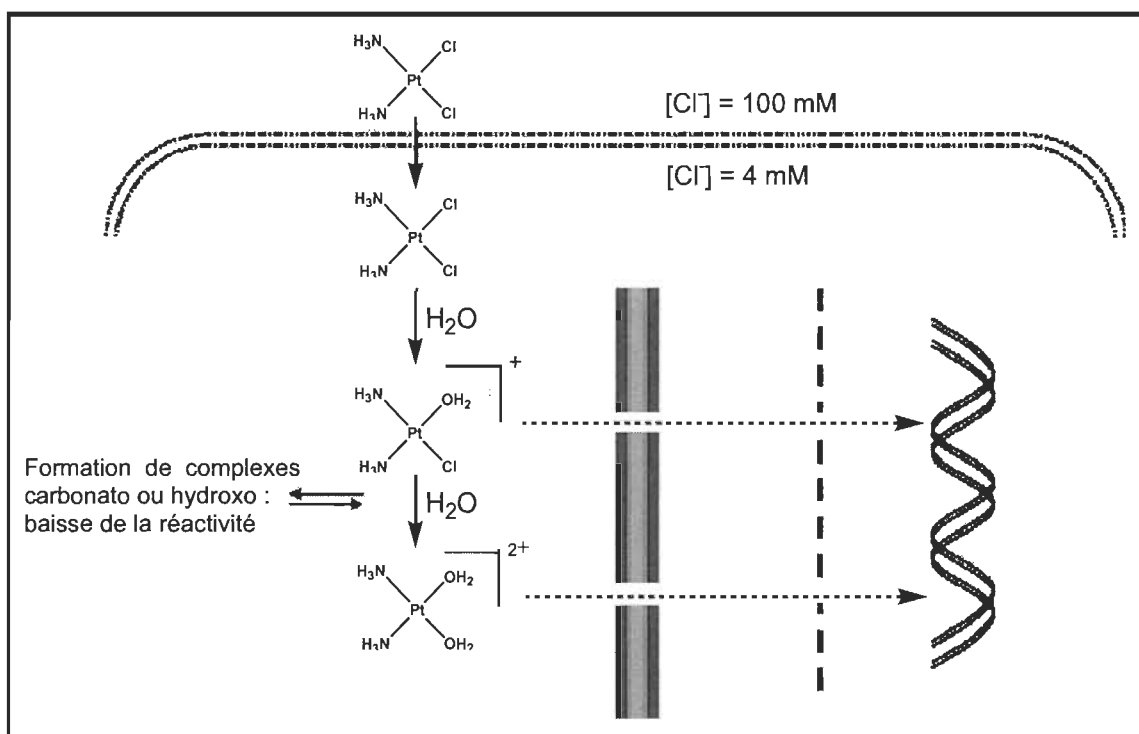


Figure 1.8 Mode d'action du cisplatine. (Tirée et adaptée de Kartalou et Essigmann, 2001.)

1.6 Effets secondaires

Malgré l'activité cytotoxique du chlorambucil et du cisplatine, l'utilisation de tels produits présente des inconvénients non négligeables. Ces composés ont la propriété d'agir sur les cellules à prolifération rapide, caractéristique importante des cellules

cancéreuses. En effet, celles-ci prennent moins de temps que les cellules normales pour achever un cycle cellulaire. Ceci s'explique par un dérèglement du fonctionnement de la cellule. Les agents chimiothérapeutiques touchent essentiellement les cellules en division (forte activité mitotique), et les cellules cancéreuses ont la propriété de se diviser plus souvent que les cellules normales. Seulement, leur action ne se limite pas aux cellules anormales. Des cellules saines du corps peuvent aussi être affectées au moment de leur propre prolifération, provoquant ainsi des effets secondaires indésirables chez les patients recevant le médicament. Entre autres, les cellules dont le cycle de vie est plus rapide seront par le fait même les plus touchées. Les principaux effets secondaires observés suite à l'administration du chlorambucil sont des nausées, une myélotoxicité, une neurotoxicité, l'aménorrhée ou l'azoospermie (12,29). Le cisplatine, quant à lui, peut engendrer des nausées et des vomissements, une toxicité rénale, nerveuse, hématologique et auditive (12,28).

Également, comme pour la majorité des traitements dont il est question en chimiothérapie, une administration répétée occasionne généralement une résistance face aux médicaments donnés. Un enzyme présente au niveau des tissus cancéreux, la glutathion S-transférase (GST P11), est connue pour inhiber l'action du chlorambucil sur les cellules cancéreuses. Cela se produit via une attaque nucléophile du groupement thiol sur l'ion aziridinium. Quant au cisplatine, il est désactivé par les résidus soufrés (glutathion, métallothionéine) qu'il peut rencontrer (20,30). Ainsi, pour obtenir l'effet escompté, les doses doivent souvent être augmentées ou rapprochées, ce qui a pour principal effet d'augmenter les effets secondaires déjà existants.

De plus, le fait de traiter des tumeurs solides, telles les tumeurs du sein, constitue une difficulté supplémentaire (31). Celles-ci, en raison de leur vascularisation très hétérogène, s'habituent à vivre en condition d'hypoxie (manque d'oxygène). De cette façon, leur sensibilité à l'apoptose (mort cellulaire programmée) diminue grandement et les cellules tumorales acquièrent une certaine chimiorésistance. La pénétration des molécules anticancéreuses dans un tel microenvironnement devient plus difficile. De ce

fait, souvent, le traitement des tumeurs solides nécessite d'avoir recours à des doses de médicaments plus importantes, ce qui augmente par le fait même la toxicité systémique.

1.7 Ciblage thérapeutique

Le principal inconvénient lié à la chimiothérapie est le manque de sélectivité envers les cellules tumorales (32). Ceci s'explique par le fait que les médicaments utilisés présentement en clinique n'agissent pas uniquement sur les cellules cancéreuses; les cellules saines sont affectées au même titre que ces dernières. L'agent anticancéreux idéal devrait posséder une toxicité exclusive pour la cellule cancéreuse, laissant indemnes les autres cellules de l'organisme, ou du moins leur capacité à récupérer des aptitudes fonctionnelles et reproductives normales (12).

Une solution possible à ce manque de sélectivité pourrait être d'avoir recours au ciblage thérapeutique. La distribution sélective d'un principe actif représente une approche unique pouvant éliminer, ou du moins, diminuer grandement les effets secondaires associés à la chimiothérapie (33). Pour qu'une cellule soit sensible à un composé, celle-ci doit pouvoir se démarquer des cellules saines et présenter des caractéristiques biochimiques lui étant propres (34). Le ciblage thérapeutique consiste à tirer profit de cette différenciation physiologique pour concentrer l'action d'un médicament à un endroit spécifique dans le corps. De nombreuses équipes de chercheurs se sont penchées sur le sujet.

Pour transporter un composé d'intérêt pharmacologique à un organe précis, là où est la tumeur, un système de livraison du médicament doit être conçu. Un tel procédé consiste à lier un agent cytotoxique à un ligand, celui-ci étant destiné à interagir avec un organe, un type de cellule, une membrane ou un organite intracellulaire exprimé par le tissu cancéreux (35). De cette façon, le ligand pourrait agir comme molécule vectrice et transporter le composé d'intérêt à un endroit dans le corps, là où ce dernier pourrait exercer son action cytotoxique.

1.8 Les estrogènes

Tel que mentionné précédemment, le cancer occupe une place importante dans les causes de mortalité chez les femmes. Bien que celles-ci puissent être atteintes par un certain nombre d'autres cancers, ceux qui affectent leurs organes reproducteurs, comme le sein, l'utérus et les ovaires, les concernent plus spécifiquement. Une caractéristique commune à ces organes est qu'ils sont majoritairement régulés par les estrogènes, une classe d'hormones stéroïdiennes appelées hormones sexuelles féminines.

Trois estrogènes endogènes sont retrouvés chez l'humain : l'estrone (E1), l'estradiol (E2) et l'estriol (E3) (36). Ces trois hormones sont illustrées à la Figure 1.9. Elles se distinguent de par leur squelette cyclo-pentano-perhydro-phénanthrène, une structure carbonée plane, polycyclique, dans laquelle sont juxtaposés trois cycles à six et un cycle à cinq, identifiés A, B, C et D. L'estradiol, aussi appelé 17- β -estradiol, est l'estrogène le plus actif du groupe. Il s'agit d'une petite molécule au caractère lipophile dont le transport dans le sang est assuré par des protéines, telles des globulines et des albumines.

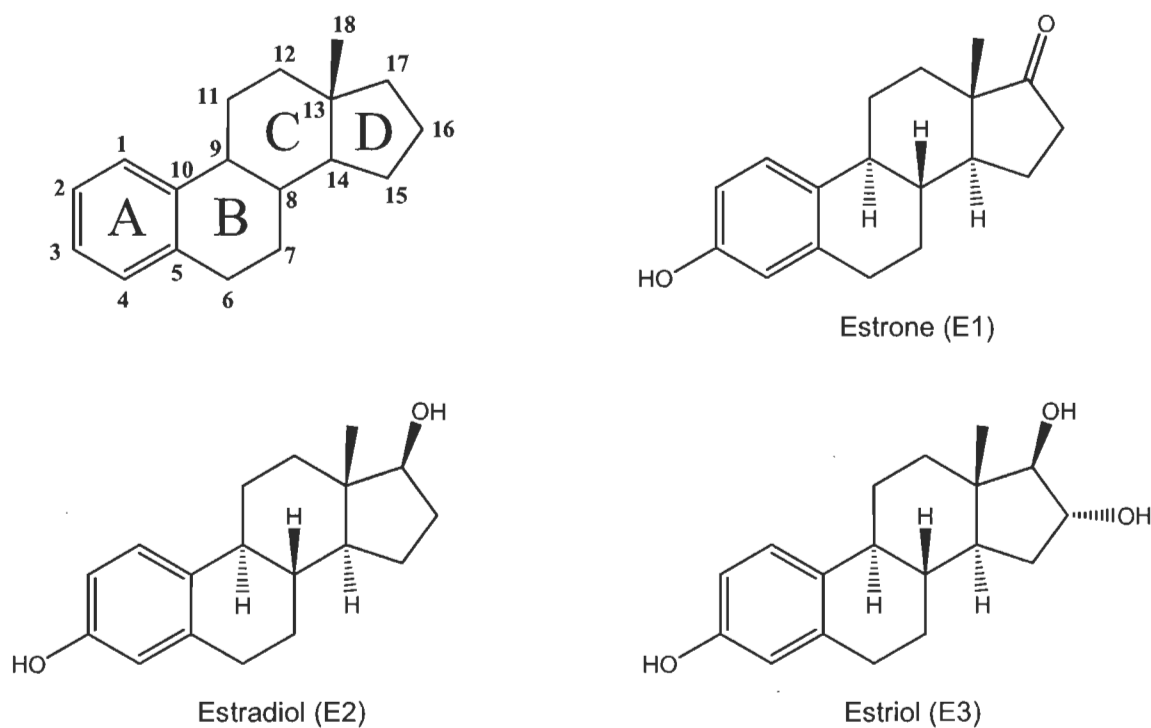


Figure 1.9 Les estrogènes naturels : estrone (E1), estradiol (E2) et estriol (E3).

1.8.1 Synthèse des œstrogènes

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes synthétisées principalement au niveau des ovaires, des glandes surrénales et, dans une moindre mesure, dans les tissus périphériques.

L'œstradiol est sécrété suite à l'action d'hormones sur différentes régions du cerveau (37). En fonction du taux d'œstrogènes présent dans le corps, l'hypothalamus libère la gonadolibérine (GnRH). Ce signal hormonal déclenche la synthèse de l'hormone lutéique (LH) et de l'hormone folliculostimulante lutéinisante (FSH) dont la fonction principale est la régulation des gonades (ovaires chez la femme). Ces hormones sont libérées au niveau de l'hypophyse et agissent en synergie sur la stéroïdogénèse ovarienne. La LH agit sur les cellules de la thèque interne du follicule ovarien (phase folliculaire) et sur les cellules de la granulosa (phase lutéinique) pour initier la synthèse des stéroïdes. La FSH, quant à elle, agit sur les cellules de la granulosa du follicule ovarien en augmentant l'activité de l'aromatase qui convertit les androgènes en œstrogènes.

Chez les femmes non ménopausées, l'œstradiol est synthétisé à partir du cholestérol des lipoprotéines retrouvées dans la thèque interne et la granulosa du follicule ovarien (38). Il peut également être synthétisé à partir du cholestérol libéré par les glandes surrénales ou retrouvé au niveau des organes périphériques. C'est ce qui se produit essentiellement chez les femmes ménopausées.

La stéroïdogénèse (Figure 1.10) est un processus qui décrit la synthèse des hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol, le précurseur principal (39). Les étapes successives de cette synthèse des stéroïdes font intervenir plusieurs enzymes. Le cholestérol, issu des lipides de l'organisme, est d'abord transformé en prégnénolone via un processus de double oxydation. Ensuite la prégnénolone est soit métabolisée en 17α -hydroxyprégnénolone ou en progestérone qui, toutes deux, suite à l'action d'enzymes, conduisent à la formation de l'androstènedione. Cette hormone stéroïdienne est ensuite transformée soit en testostérone, soit en estrone. Ces deux métabolites

peuvent à leur tour être métabolisés en estradiol, soit suite à l'aromatase de la testostérone ou à l'oxydation de l'estrone.

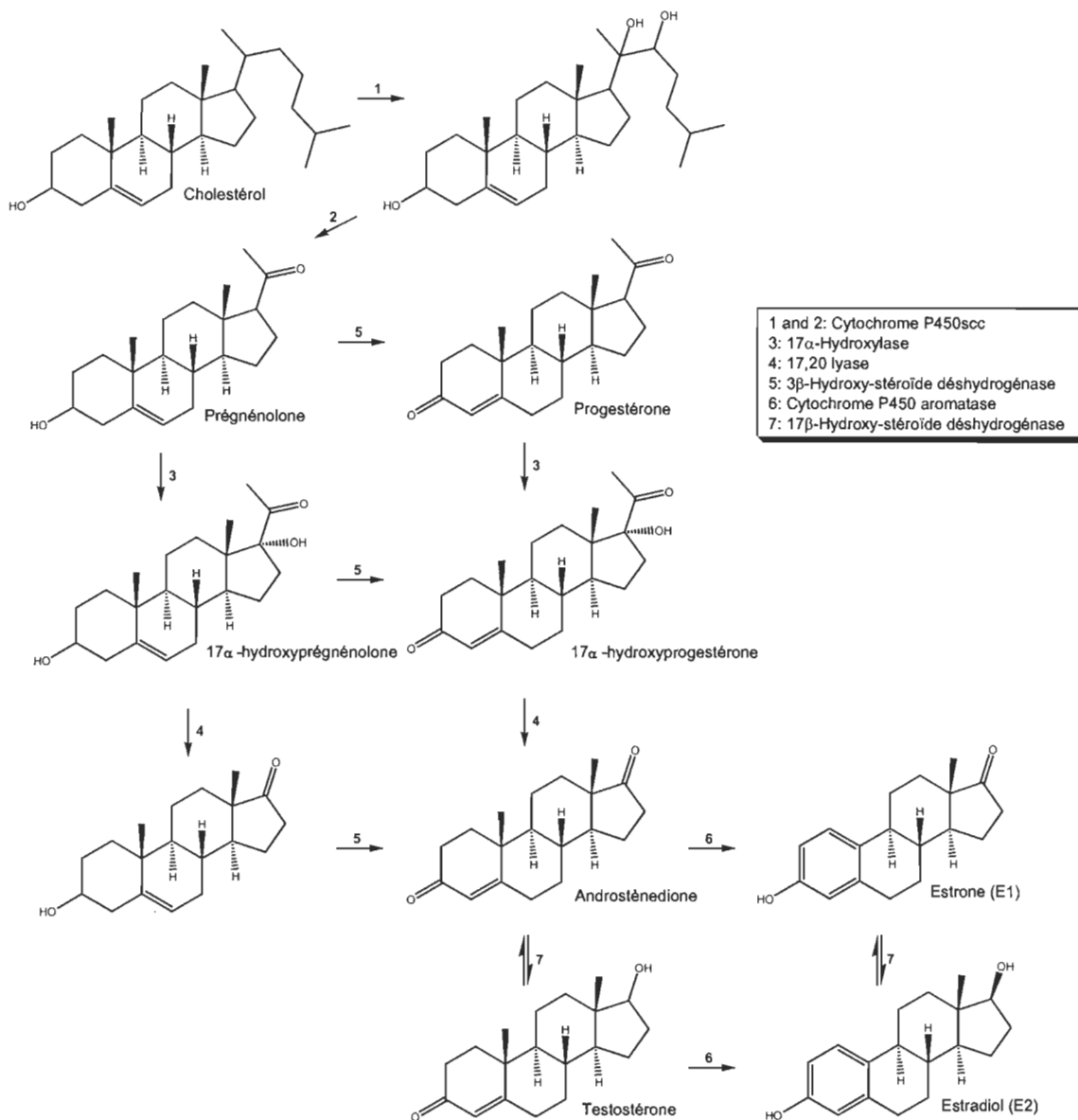


Figure 1.10 Biosynthèse des stéroïdes. (Tirée et adaptée de Thibault et Levasseur, 2001.)

1.8.2 Effets physiologiques des estrogènes

Les stéroïdes exercent une action hormonale variée et très importante au sein de l'organisme (40). Chez la femme, ils interviennent dans la reproduction et le contrôle du

cycle menstruel. De manière plus spécifique, au niveau des ovaires, l'estradiol permet la prolifération des cellules de la granulosa et participe à la formation du follicule. Cette hormone agit aussi sur l'utérus. Elle sollicite la croissance de la muqueuse de l'endomètre, elle participe au processus de contraction utérine lors de l'accouchement et elle provoque la sécrétion d'un liquide favorable à la progression des spermatozoïdes. Au niveau du sein, le rôle principal de l'estradiol est de permettre la croissance des canaux galactophores et des lobules nécessaires pour l'allaitement. Les hormones sexuelles féminines assurent également l'apparition des caractères sexuels secondaires, tels l'élargissement du bassin, la croissance des seins et le développement de la pilosité.

Les estrogènes ont aussi une influence sur le métabolisme des lipides et du calcium autant chez la femme que chez l'homme (41,42). Ils sont impliqués dans le développement et la protection du système nerveux central et du système cardio-vasculaire, de même que dans l'homéostasie et la maturation du squelette osseux (43-46). Ils ont également des effets sur la distribution du tissu adipeux (47,48).

1.8.3 Estradiol et cancer du sein

La majorité des cancers féminins sont qualifiés d'hormono-dépendants, c'est-à-dire que leur développement est stimulé par la présence de l'hormone sexuelle féminine, l'estradiol. Plus particulièrement, les deux tiers des cancers du sein sont sensibles à cette action hormonale. Dans de telles situations, les hormones jouent un rôle similaire aux facteurs de croissance sur la prolifération des cellules mammaires (49). En effet, des études récentes ont démontré que ce sont principalement les fortes concentrations d'estrogènes qui favorisent l'apparition du cancer du sein (50-52).

L'activité de la 17β -hydroxystéroïde déshydrogénase joue aussi un rôle important dans le développement d'un cancer. Cet enzyme participe à la formation de l'estradiol (53). Il catalyse la conversion de l'androstènedione en testostérone et de l'estrone en estradiol. Des chercheurs ont rapporté des activités plus élevées de 17β -hydroxystéroïde

déshydrogénase associées à une plus grande production d'estradiol dans les tumeurs mammaires comparativement aux tissus sains (53-54).

1.9 Le récepteur estrogénique

Les récepteurs des hormones sont des protéines exprimées dans certaines cellules. Les hormones en circulation vont s'y fixer, ce qui déclenche toute une cascade de signalisation. Une caractéristique importante des cancers féminins est que bien souvent, les organes atteints expriment le récepteur aux estrogènes, une entité avec laquelle l'estradiol interagit (55). En effet, la majorité des cancers féminins surexpriment ce récepteur, soit 60-70 % des cancers du sein, 70-73 % des cancers de l'utérus et 60 % des cancers de l'ovaire (56-58). Donc, en lien avec le ciblage thérapeutique, cette protéine constitue un outil intéressant, une cible attrayante pour traiter les cancers chez la femme.

1.9.1 Structure

Le récepteur estrogénique appartient à la grande famille des récepteurs nucléaires, un groupe formé de facteurs de transcription ligand-inductibles, qui sont activés par de petites molécules lipophiles, les estrogènes (59). Les membres de ce groupe de protéines sont caractérisés par une organisation structurale très conservée. Les récepteurs nucléaires sont constitués de cinq régions (A/B-F) avec chacune différentes séquences de bases azotées (60) (Figure 1.11).

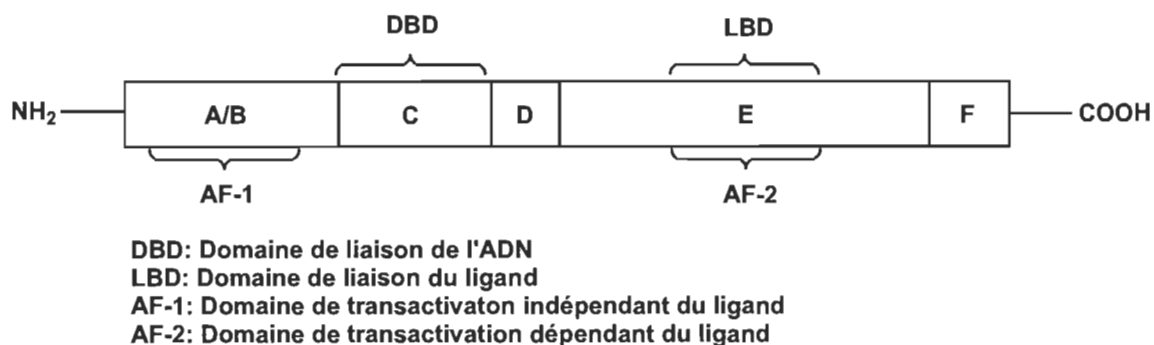


Figure 1.11 Organisation structurale des récepteurs nucléaires.

Le domaine A/B forme la région N-terminale de la protéine. Cette partie du récepteur contient la sous-division AF-1 qui induit un changement de conformation de manière hormono-indépendante. Son rôle est de recruter et de stabiliser les cofacteurs de transcription et de participer à l'activation et à l'expression des gènes cibles de l'estradiol (61). Le domaine A/B varie beaucoup selon les espèces.

La région C, le domaine de liaison de l'ADN (DBD), contient une structure particulière composée de deux doigts de zinc (62). Ces derniers sont impliqués dans la dimérisation et dans la fixation du récepteur à l'ADN en se liant aux éléments de réponse aux estrogènes (ERE) sur le chromosome (28).

Le domaine D sert de liaison entre le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et le domaine de liaison du ligand (LBD) (63). Cette section permet au récepteur d'adopter différentes conformations facilitant ainsi la translocation nucléaire. Le domaine D est très peu conservé entre les espèces.

La région E, le domaine de liaison du ligand (LBD), joue un rôle important dans la fixation de ce dernier. Cette portion de la protéine contient le site AF-2, impliqué dans la transactivation du récepteur, laquelle est dépendante de l'hormone (63). Le domaine E présente une organisation bien particulière. Il est structuré en douze hélices alpha (H1 à H12) riches en acides aminés hydrophobes et en deux feuillets bêta.

La région C-terminale de la protéine est constituée du domaine F. Cette section, adjacente au domaine E, pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance de la liaison spécifique à un ligand agoniste ou antagoniste (64). Cette propriété du domaine F est toutefois moins bien connue.

1.9.2 Isoformes alpha et bêta du récepteur aux estrogènes

Il existe trois isoformes de récepteurs aux estrogènes : RE α , RE β et RE γ . Les isoformes α et β sont retrouvés chez toutes les espèces alors que l'isoforme γ n'a été identifié que

chez certaines espèces de poissons (65). Les récepteurs α et β des estrogènes retrouvés chez l'homme sont identifiés hRE α et hRE β . Ces protéines intracellulaires ont des masses moléculaires apparentes de 66 kDa (hRE α) et 59 kDa (hRE β). Elles contiennent respectivement 595 et 530 acides aminés, et une homologie de 47 % subsiste entre ces deux entités (66,67) (Figure 1.12).

En effet, bien que les gènes codant pour le hRE α et pour le hRE β soient localisés sur des chromosomes différents (6q 24-27 pour hRE α et 14q 22-24 pour hRE β), les deux récepteurs ont une très forte similitude au niveau du domaine de liaison de l'ADN (97 %). Ceci suggère que les deux récepteurs se lient aux mêmes éléments de réponses des estrogènes (ERE) (67). Par contre, comparativement au domaine de liaison de l'ADN (DBD), l'homologie d'identité du domaine de liaison des ligands (LBD) est de seulement 59 %.

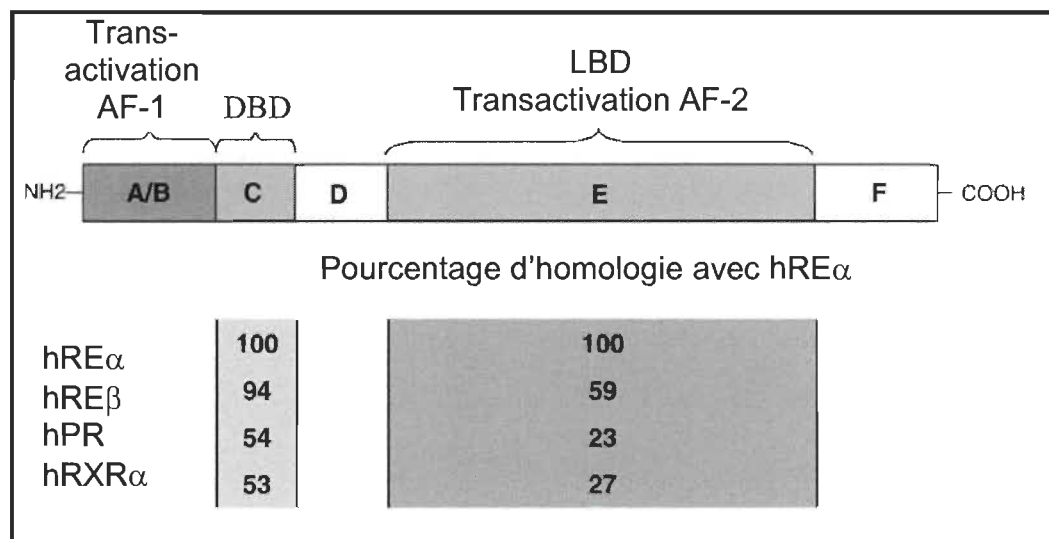


Figure 1.12 Représentation et analogie entre les récepteurs aux estrogènes alpha (hRE α) et bêta (hRE β) chez l'humain. (Tirée et adaptée de Ruff et al., 2000.)

Une autre caractéristique différenciant hRE α et hRE β est l'espace occupé par le domaine de liaison du ligand. La cavité de liaison du ligand du récepteur estrogénique alpha occupe un plus grand volume (hRE α ; 450 Å³) comparativement à son analogue bêta (hRE β ; 390 Å³) (60).

Les deux récepteurs hRE α et hRE β diffèrent également quant à leurs emplacements et à leurs concentrations dans l'organisme (68). Chez l'humain, le RE α fut principalement détecté au niveau de l'ovaire, l'utérus, l'hypophyse, les testicules, l'épididyme, le rein, la glande mammaire ainsi que dans plusieurs régions du cerveau. Le RE β , quant à lui, se retrouve principalement au niveau de la prostate, du poumon, de la rate, et comme pour son analogue le RE α , dans l'ovaire, l'utérus et plusieurs régions du cerveau (Figure 1.13).

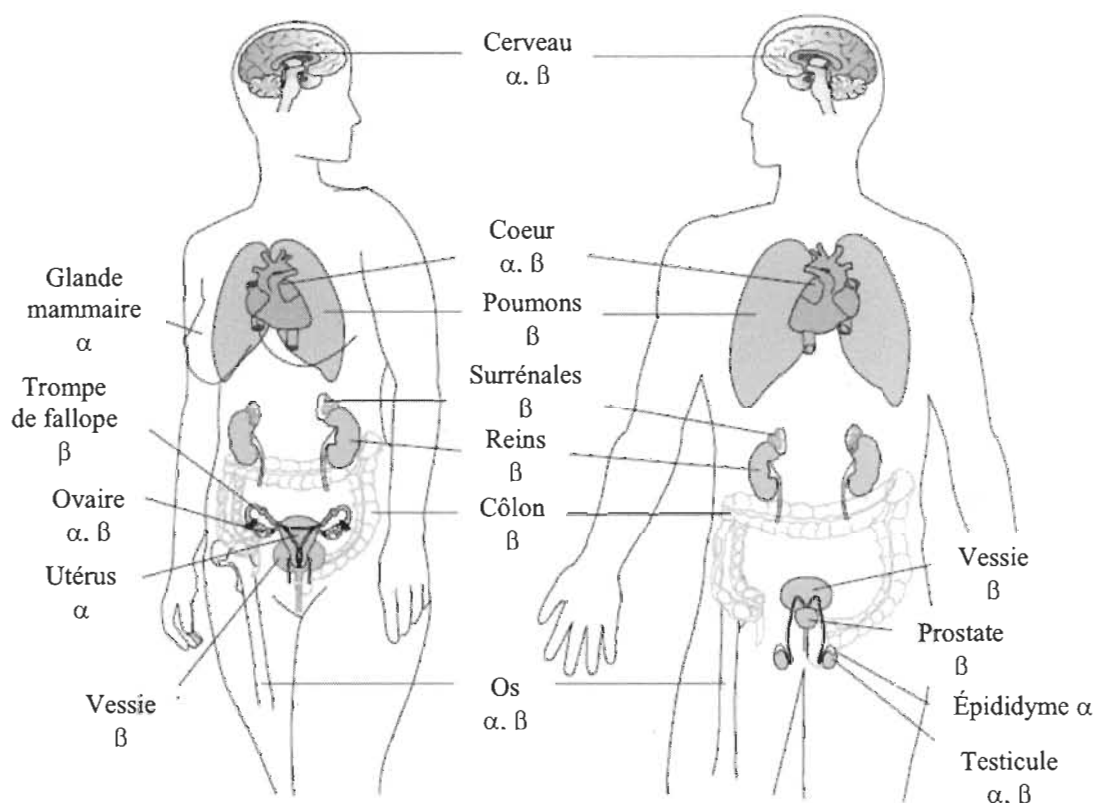


Figure 1.13 Représentation schématique de la distribution des récepteurs estrogéniques, RE α et RE β chez l'humain. (Tirée et adaptée de Drummond et Fuller, 2010.)

Aussi, hRE α et hRE β se différencient quant aux réponses qu'ils induisent suite à leur stimulation. Autrement dit, les signaux envoyés varient selon que les ligands se fixent aux récepteurs hRE α ou hRE β . De manière générale, fixés aux récepteurs hRE β , les estrogènes semblent inhiber la transcription des gènes, alors qu'il y a activation de la transcription lorsque les estrogènes se lient aux hRE α (69). Le hRE α influence la

prolifération des cellules cancéreuses et l'isotype β possède un rôle antiprolifératif en agissant comme un régulateur négatif de hRE α . Des études ont démontré que lorsque hRE β forme un hétérodimère avec hRE α , l'activité transcriptionnelle de ce dernier est diminuée (69,70).

1.10 Estradiol et récepteur aux estrogènes : mode d'action

L'hormone sexuelle féminine, l'estradiol, circule dans le sang en formant un complexe avec des protéines, entre autres avec la globuline de liaison des hormones sexuelles (SHBG) (67). Cet amalgame diffuse librement au travers des membranes cytoplasmiques et nucléaires. Une fois dans le cytoplasme ou le noyau de la cellule, l'hormone stéroïdienne se dissocie des protéines de liaison et rencontre le récepteur des estrogènes. En l'absence d'hormone, le récepteur des estrogènes demeure sous la forme d'un complexe oligomérique inactif, lié à un certain nombre de protéines incluant des protéines chaperonnes (hsp90). Celles-ci ont pour rôle de maintenir le récepteur dans une conformation propice à la liaison aux estrogènes. Lorsque l'estradiol se lie au récepteur estrogénique, les protéines chaperonnes s'en détachent, lui permettant ainsi de former un dimère (71) (Figure 1.14). Après sa dimérisation, le dimère peut assurer sa fonction de régulateur transcriptionnel, soit en se liant à l'ADN sur des ERE (éléments de réponses aux estrogènes), soit en modulant l'activité d'autres facteurs transcriptionnels. Ainsi, le complexe RE-E2 dimérisé et lié à l'ADN entre en contact direct avec le complexe général de transcription (ARN-polymérase et facteurs transcriptionnels), ou encore il agit indirectement via une interaction avec des protéines intermédiaires appelées cofacteurs. L'activité transcriptionnelle de la région AF2 est alors favorisée (co-activateurs) ou inhibée (co-inhibiteurs). Il est à noter que le mode d'action du récepteur est sensiblement le même pour les isoformes alpha et bêta.

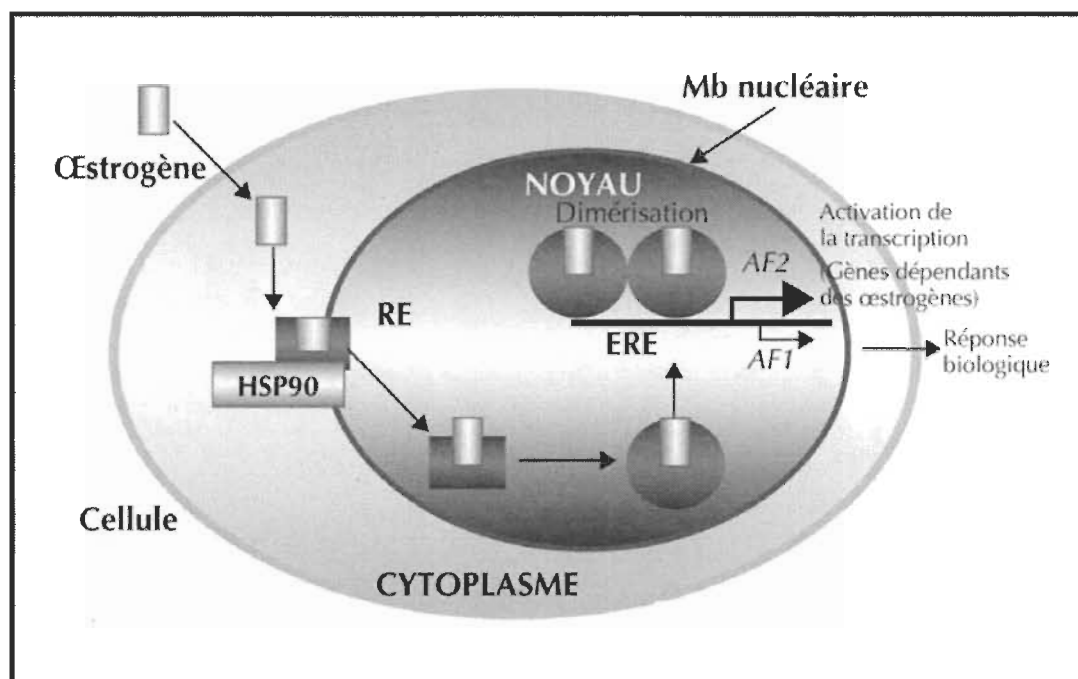


Figure 1.14 Représentation du mécanisme d'action des œstrogènes. (Tirée de Cremoux, 2011.)

Au-delà de la voie de signalisation classique passant par l'activité nucléaire du récepteur, les œstrogènes provoquent également des effets moins classiques par l'intermédiaire de certaines voies de signalisation membranaires. Les effets rapides observés avec les œstrogènes s'expliquent par l'existence de récepteurs membranaires. La liaison des œstrogènes à ces récepteurs déclenche des systèmes de signalisation cellulaire particuliers ayant lieu dans le cytoplasme de la cellule (38). Ceux-ci sont responsables de la production de seconds messagers intracellulaires (Ca^{2+} , AMPc , GMPc), lesquels occasionnent des conséquences biologiques sur de nombreux tissus en particulier au niveau du tissu nerveux, des cellules cancéreuses du sein, de l'endothélium vasculaire, du tissu osseux et de l'ovaire. Bien que la voie non génomique ne constitue pas le mode d'action classique des œstrogènes, le récepteur membranaire des œstrogènes et les voies de signalisation qui en découlent représentent des cibles thérapeutiques intéressantes qui font l'objet de plusieurs études.

1.11 Activité agoniste et antagoniste

L'interaction ligand-récepteur peut soit activer, soit inhiber l'activité de la protéine en question. Dépendamment de la nature du ligand agissant comme agoniste ou antagoniste, la réponse sera différente. Une activité agoniste signifie que l'interaction du ligand avec le récepteur induit une transcription hormono-dépendante, se traduisant par une augmentation de la prolifération cellulaire. À l'opposé, certains composés peuvent lier cette même protéine et engendrer une activité antagoniste en bloquant l'action des estrogènes. Cette différence liée au processus de transcription des ligands s'explique principalement par la structure tridimensionnelle du récepteur. Les nombreuses études cristallographiques menées jusqu'à présent ont permis de mieux comprendre le mode de liaison du ligand dans ce dernier (72,73).

Le domaine de liaison du ligand, partie intégrante de la région AF2 de la protéine, forme une cavité dans laquelle se loge l'estradiol ou tout autre composé ayant une affinité pour le récepteur aux estrogènes. Une fois dans le récepteur, les ligands peuvent induire des changements de conformation importants de la protéine.

Ainsi, la fixation d'un agoniste entraîne un basculement de l'hélice H12 (60,74) (Figure 1.15). Ce réarrangement s'accompagne d'une compaction générale du domaine de liaison du ligand, entraînant la stabilisation du dimère, une dissociation des co-répresseurs et la création de nouvelles surfaces d'interaction pour des co-activateurs. Comme le démontre la Figure 1.15, en se refermant, l'hélice H12 (en vert) rend accessibles des sites de liaison pour différents co-activateurs (RIP140, SRC1, etc.). Le récepteur activé peut alors se lier sur les ERE (éléments de réponse aux estrogènes) et déclencher la transcription de gènes spécifiques.

D'une manière similaire, l'activité antagoniste d'une molécule s'explique aussi par le positionnement de cette hélice H12. La fixation d'un antagoniste a pour effet de déplacer l'hélice H12 (en bleu) dans une position masquant les sites d'interaction des co-activateurs.

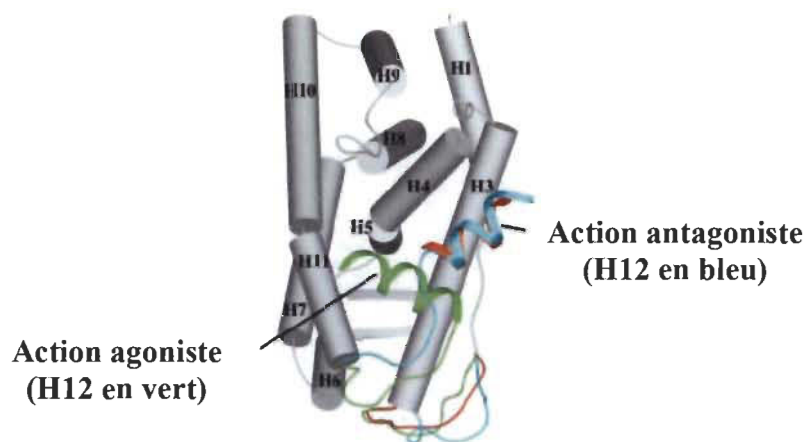


Figure 1.15 Structure tridimensionnelle du domaine de liaison du ligand lié à un agoniste (estradiol) et à un antagoniste (tamoxifène et raloxifène). (Tirée et adaptée de Ruff et al., 2000.)

L'emplacement de l'hélice H12 est donc à l'origine des effets agonistes ou antagonistes des estrogènes (75). De ce fait, l'activité d'une molécule (agoniste) n'est pas corrélée avec son affinité pour le récepteur aux estrogènes. Il semblerait plutôt qu'elle dépende de la faculté qu'a le produit en question de placer l'hélice H12 dans la même configuration que le fait l'estradiol (76).

1.12 Ligands des récepteurs aux estrogènes

Indépendamment du caractère agoniste ou antagoniste d'un ligand, celui-ci doit d'abord lier le récepteur aux estrogènes afin d'exercer son effet. Pour qu'il y ait une affinité, un composé doit présenter un certain nombre de caractéristiques chimiques et structurales lui permettant d'interagir avec la protéine en question. Autrement dit, une molécule ayant une géométrie complémentaire avec le récepteur visé pourrait, vraisemblablement, agir en tant que ligand à cet effet.

Les relations structure-activité (SAR) ont été étudiées avec plusieurs molécules stéroïdiennes et non-stéroïdiennes dans le but de comprendre et d'expliquer les possibilités d'interaction d'un ligand avec le récepteur aux estrogènes (75). Les caractéristiques structurales propres à l'estradiol, l'hormone sexuelle féminine, de même

que l'emplacement de celle-ci dans la cavité hautement hydrophobe du récepteur furent analysées (60).

L'estradiol est caractérisé par l'aromaticité du cycle A de son noyau stéroïde de même que par la présence de groupements alcools aux deux extrémités (positions 3 et 17) de sa structure. La représentation cristallographique de l'hormone naturelle dans le RE α a permis de mieux comprendre le positionnement du ligand (60). Aux extrémités de la cavité se situent des régions polaires qui servent d'ancrage aux fonctions alcools du stéroïde. Le groupement hydroxyle phénolique appartenant au noyau A est lié aux acides aminés Glu353 (histone 3) et Arg394 (histone 5). À l'autre extrémité de la structure, le groupe hydroxyle appartenant au noyau D du stéroïde est retenu par le résidu His524 (histone 11) (Figure 1.16). Toutes ces interactions participant à la liaison de l'hormone dans le récepteur sont principalement des liaisons hydrogène, bien que des liaisons de Van der Waals (forces intermoléculaires de faible intensité) soient aussi présentes. Il est à noter que la capacité de liaison du ligand provient principalement de l'anneau A et des liens hydrogène qu'il forme avec la cavité du ligand (78).

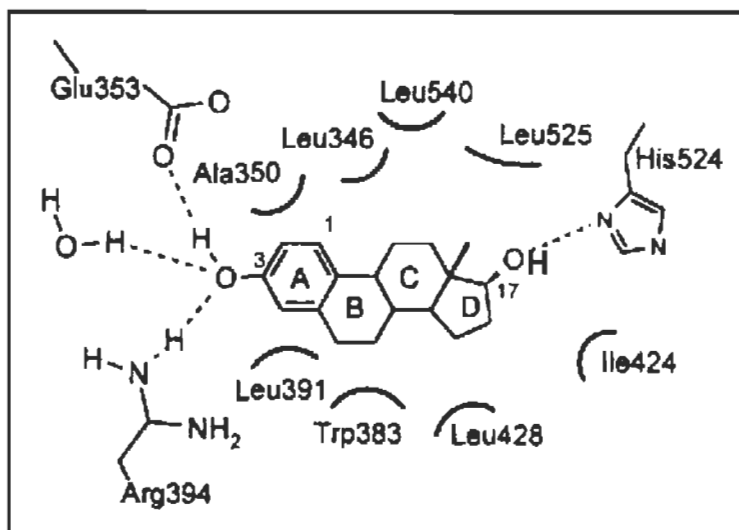


Figure 1.16 Structure de l'estradiol (E2) et représentation de l'estradiol dans le site actif du récepteur estrogénique. (Tirée et adaptée de Guo et al., 2002.)

1.13 Les SERMs : ligands du récepteur estrogénique

L'estradiol (E2) est considéré comme étant le ligand endogène le plus puissant du RE α . Cette molécule lie le récepteur avec un taux d'efficacité de 100 % (79).

Mise à part l'hormone naturelle, plusieurs autres molécules peuvent également créer des interactions avec cette même protéine. Contrairement aux autres récepteurs nucléaires, le récepteur des estrogènes se distingue de par la variété de ligands pouvant s'y lier (80). Au cours des dernières décennies, une vaste gamme de molécules, naturelles et synthétiques, ont démontré qu'elles pouvaient interagir de manière sélective avec les récepteurs des estrogènes (RE α et RE β) et en moduler la réponse. Ces molécules sont appelées des modulateurs sélectifs des récepteurs des estrogènes ou en anglais SERMs «selective estrogen receptor modulators». Elles exercent un effet agoniste ou antagoniste en fonction du tissu où elles agissent. Autrement dit, ces ligands ont la capacité de bloquer l'action des estrogènes dans certains tissus alors qu'ils imitent leur action ailleurs dans le corps.

1.13.1 Les classes de SERMs

Les SERMs sont divisés en trois catégories : les agonistes purs, les agonistes/antagonistes mixtes et les antagonistes purs (80). La Figure 1.17 présente les SERMs les plus connus.

Les composés agissant comme l'estradiol et exerçant une activité agoniste dans l'ensemble des types cellulaires exprimant le RE α sont identifiés comme des « agonistes purs ». D'autres SERMs sont à la fois agonistes et antagonistes, selon l'organe sur lequel ils agissent. Il s'agit des « agonistes/antagonistes mixtes ». Les antagonistes purs, quant à eux, sont capables d'inhiber toute activité transcriptionnelle du récepteur, et ce dans l'ensemble des tissus.

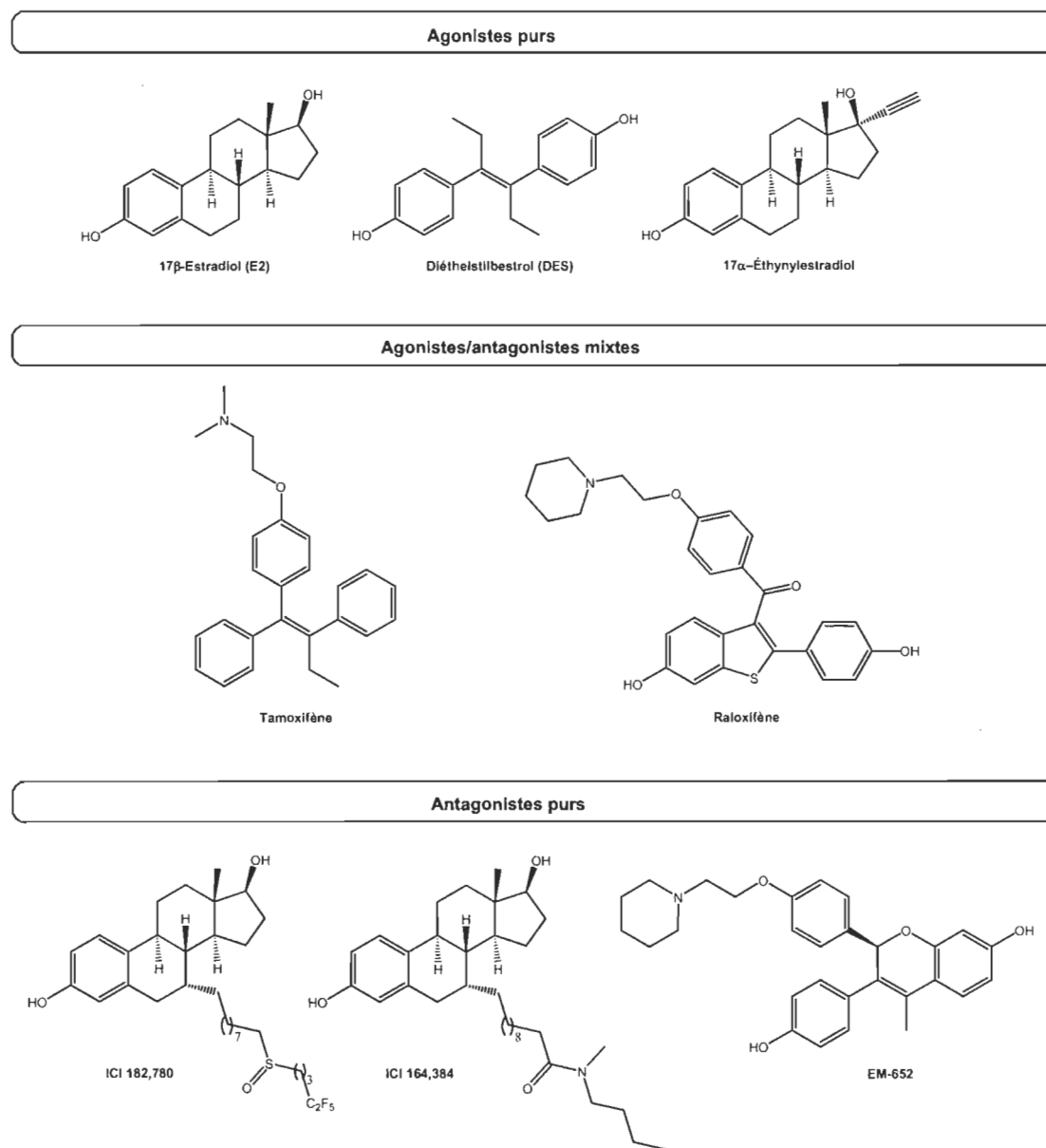


Figure 1.17 Exemples de molécules estrogéniques et anti-estrogéniques.

Parmi les SERMs illustrés, figurent entre autres le diéthylstilbestrol (DES) et le 17 α -éthynylestradiol, des composés au pouvoir estrogénique très puissant. Dans le passé, le DES était utilisé pour prévenir les accouchements prématurés (81). Il fut retiré du marché en raison d'anomalies génitales (cancer du col de l'utérus et de la prostate vers 18 ans selon le sexe) retrouvées chez les enfants des mères ayant reçu le médicament. Le 17 α -éthynylestradiol, quant à lui, est l'estrogène actif par voie orale le plus utilisé au monde. Ce principe actif fait partie de la formulation moderne de la majorité des pilules contraceptives (82).

Le tamoxifène et le raloxifène ont des propriétés à la fois agonistes et antagonistes selon la nature des tissus sur lesquels ils agissent (83). Le tamoxifène est reconnu pour inhiber la croissance des cellules mammaires. Il est utilisé pour le traitement du cancer du sein. Ce même composé exerce toutefois un effet inverse au niveau de l'endomètre. Ces effets spécifiques dépendent entre autres de la forte concentration des coactivateurs nucléaires (SRC-1) observée au niveau du tissu utérin comparativement au tissu mammaire où la présence y est plus faible. Une molécule analogue, le raloxifène, présente des effets estrogéno-mimétiques sur l'os, le métabolisme lipidique et la coagulation, mais il est sans effet estrogénique sur le sein et le tissu endométrial. Le raloxifène est indiqué pour le traitement de l'ostéoporose, cependant, le risque de complications thromboemboliques est possible.

Le criblage d'un grand nombre de ligands synthétiques a également permis de découvrir des antagonistes à haute affinité pour le $RE\alpha$, dont certaines ont une application médicale intéressante. Le ICI 182 780 (aussi appelé fulvestrant) est un nouvel anti-estrogène approuvé pour le traitement adjuvant des cancers du sein chez la femme ménopausée (84). Il s'agit d'un dérivé au squelette stéroïdien, ayant une activité antagoniste pure. Des composés semblables, le ICI 164 384 et le EM-652, appartiennent aussi à cette classe de SERMs (85).

1.14 Propriétés structurales des ligands

Comme il fut mentionné précédemment, les SERMs sont des composés qui ont une affinité pour le récepteur des estrogènes. Pour qu'interaction il y ait, ces composés, bien que différents de l'estradiol, doivent avoir un squelette similaire à ce dernier, ou du moins en partie.

Récemment, des outils informatiques de modélisation moléculaire ont permis de développer des modèles permettant d'identifier, en trois dimensions, les propriétés stériques et électrostatiques des ligands potentiels du $RE\alpha$ (72,73,77). Ces études ont permis de suggérer un modèle de molécule pouvant lier la protéine ciblée. Pour qu'une

molécule puisse agir comme un ligand estrogénique, il fut établi que le composé doit rencontrer certains critères.

D'abord, le groupement $-OH$ phénolique en position 3 du noyau stéroïde étant majoritairement responsable de la liaison de l'estradiol dans le récepteur (plus que la fonction alcool en position 17), le fait qu'une molécule dispose d'un tel phénol dans sa structure ne pourrait qu'en faire un meilleur ligand.

De même, l'estradiol possède un deuxième groupement hydroxyle (en position 17) aussi impliqué, bien que dans une moindre mesure, dans des ponts hydrogène avec l'acide aminé His524 du récepteur. La distance entre les deux fonctions alcools du stéroïde (3-OH et 17-OH) est de 10,9 Å (73). Ainsi, un composé possédant un deuxième groupement donneur d'hydrogène, imitant le $17\beta-OH$ de l'estradiol, lequel serait placé à une distance approximative de 10-11 Å du phénol, pourrait vraisemblablement se positionner dans une conformation semblable à l'hormone dans la protéine.

Également, mises à part les deux extrémités polaires du stéroïde naturel, le reste de la structure est hautement hydrophobe, ce qui convient parfaitement à l'environnement du récepteur. De ce fait, un composé avec un caractère hydrophobe important pourrait mieux s'adapter à un tel milieu.

Finalement, la structure polycyclique rigide de l'estradiol contribue sans aucun doute à assurer la planéarité de la molécule, ce qui permet une meilleure insertion dans la cavité du récepteur. Un composé ayant un squelette cyclique, du moins en partie, pourrait ainsi représenter un meilleur ligand.

Enfin, la conception d'un ligand au récepteur des estrogènes nécessite de considérer l'ensemble de ces caractéristiques structurales. Normalement, un composé qui rencontrerait la majorité de ces critères, donc qui imiterait le plus possible l'estradiol, l'hormone naturelle, pourrait démontrer une affinité considérable pour le $RE\alpha$.

1.15 Études antérieures

Depuis quelques années, plusieurs recherches ont été réalisées dans le but de concevoir des médicaments anticancéreux moins dommageables pour les tissus sains. Certains de ces nouveaux composés sont d'ailleurs présentement sur le marché. À titre d'exemple, la capécitabine et le trastuzumab sont utilisés pour traiter certains cancers du sein.

1.15.1 Encapsulation de médicaments

Parmi les méthodes étudiées pour diminuer la toxicité systémique associée à l'administration d'un médicament, figure entre autres l'encapsulation du principe actif dans des liposomes, des microsphères ou plus récemment, des nanoparticules (35). Ces particules, généralement sphériques, sont constituées soit d'une bicouche lipidique, d'un matériau biodégradable ou d'un polymère. Ces capsules synthétiques servent d'enveloppe pour contenir différentes substances médicamenteuses dans un milieu aqueux, et limiter la diffusion de celles-ci ailleurs dans le corps. Certains des systèmes élaborés permettent même de libérer la drogue à distance une fois les capsules localisées dans l'environnement immédiat de la tumeur. Une des applications de l'encapsulation est le transport de la doxorubicine dans des liposomes (86). Cette technique est actuellement mise à profit sur le marché américain et européen, notamment pour les traitements des cancers de l'ovaire et du sein. Elle permet d'obtenir une diminution significative de la toxicité cardiaque comparativement à la forme classique du médicament administré en solution.

1.15.2 Molécules cytotoxiques conjuguées

Plusieurs autres approches ont aussi été développées pour concevoir un système de livraison, lequel permettrait d'amener un médicament à un endroit spécifique dans l'organisme. Ceci peut être réalisé en ayant recours au ciblage thérapeutique, technique décrite précédemment. Ce procédé consiste à utiliser un vecteur pour diriger un médicament contre une tumeur (87). À cette fin, la synthèse de molécules cytotoxiques conjuguées à divers types de ligands a fait l'objet de plusieurs recherches.

L'équipe de Beck, en 1976, fut l'une des premières à lier une molécule biologique (un peptide) à un composé pharmacologique connu et à publier ses travaux sur le design de molécules platine(II) peptidiques spécifiques pour les cellules cancéreuses (88). Les cellules tumorales se différenciant des cellules normales de par leur caractère néoplasique, elles permettent à de grosses molécules, tels des oligopeptides, de pénétrer le corps cellulaire par pinocytose. La pinocytose est un mécanisme via lequel la membrane cellulaire se replie afin d'englober et d'absorber du milieu extracellulaire contenant des molécules dissoutes. Le groupe de Beck s'est alors basé sur cette différenciation cellulaire pour concevoir des molécules hybrides dipeptides-Pt(II). Ce type de molécule unique s'est avéré présenter une activité anticancéreuse intéressante.

Pendant les années qui ont suivi, la tendance était au développement de composés hybrides. D'autres stratégies de ciblage thérapeutique ont été développées. Parmi celles-ci, des pro-médicaments, non toxiques, furent conçus pour être transformés par des enzymes spécifiques présents dans les tissus atteints. Ainsi, cette activité enzymatique permettait d'obtenir des composés anti-tumoraux actifs. À titre d'exemple, le 5-fluorouracile (5-FU) est un médicament activé par la thymidine phosphorylase (89). L'expression de cet enzyme chez les cellules cancéreuses du côlon suivie de l'administration du 5-FU a démontré un effet cytotoxique accru à cet endroit spécifique du corps. La capecitabine est aussi un promédicament qui une fois administré, est converti en 5-FU. Ce dernier est utilisé pour traiter le cancer du sein.

1.15.3 Ciblage des récepteurs nucléaires

Dans le même ordre d'idée, des récepteurs cellulaires furent également utilisés comme cible pour concentrer l'action d'une substance médicamenteuse au niveau de certaines cellules. Par exemple, le récepteur de l'acide folique est souvent surexprimé chez les cellules cancéreuses comparativement aux cellules saines (90,91). Cette caractéristique importante a encouragé certains chercheurs à développer une série de molécules à base de dérivés d'acide folique (92). Ainsi, une variété de macromolécules et de composés

cytotoxiques connus furent conjugués au ligand folate afin de faciliter leur rétention à l'intérieur des cellules cancéreuses.

1.15.4 Molécules hybrides estradiol-cytotoxiques

Toujours dans le but d'augmenter la spécificité d'un médicament, une variété de molécules a été conçue pour viser un autre récepteur, soit le récepteur des estrogènes (RE α) (93-97). Dans ces cas précis, le but est de traiter les cancers féminins. Ainsi, une variété de composés cytotoxiques fut conjuguée à l'estradiol, l'hormone sexuelle féminine, pour concentrer ces substances médicamenteuses au niveau des cellules surexprimant ce récepteur. La conjugaison de l'estradiol avec diverse molécules anticancéreuses telles la geldanamycine (inhibiteur de la protéine Hsp90), l'ellipticine (agent intercalant et inhibiteur de la topoisomérase II), l'adénosine (inhibiteur de l'enzyme 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase), le cisplatine (agent bialkylant) et le chlorambucil (agent alkylant), a permis de former des conjugués très actifs *in vitro*, particulièrement sur les cellules cancéreuses du sein (Figure 1.18).

1.15.5 Molécules estradiol-Pt(II) : évaluation biologique

Afin d'élucider et de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces molécules estrogéniques cytotoxiques, l'équipe des Drs Bérubé et Asselin a procédé à une évaluation biologique plus approfondie sur une série de conjugués analogues du cisplatine (94). Tout d'abord, une étude de l'affinité de ces composés a permis de constater que la portion estrogénique se liait effectivement au récepteur (RE α), tout comme l'hormone naturelle. Ceci confirme que l'estradiol maintient son rôle de ligand, même suite à sa conjugaison avec une autre entité. Également, des essais biologiques menés *in vitro* ont permis de démontrer que le conjugué nouvellement synthétisé présentait une activité anti-tumorale améliorée comparativement au cisplatine administré seul, et ce sur les cellules cancéreuses du sein hormono-dépendantes (MCF-7) (94). L'efficacité de ce nouveau type de composé fut aussi prouvée *in vivo*. Des modèles de xénogreffes de tissus cancéreux obtenus sur des souris immunodéficientes ont été

utilisés avec des tumeurs hormono-dépendante (MCF-7) et hormono-indépendante (MDA-MB-468) (98). À des concentrations équivalentes, le composé hybride estradiol-Pt(II) était plus puissant et plus sélectif que son précurseur, le cisplatine. Un autre point intéressant découlant de cette étude est l'absence de toxicité systémique observée suite à l'administration (sur période de 21 jours) du composé chez les animaux (98).

Bien que ce type de molécule estradiol-Pt(II) présentait une activité anticancéreuse fort intéressante, d'autres observations ont également permis de constater que la liaison de celle-ci avec le récepteur induisait une activité transcriptionnelle (activation des gènes) non négligeable (98). Le vecteur estrogénique pouvait non seulement concentrer la portion cytotoxique chez les cellules surexprimant le récepteur en question, mais il favorisait aussi la prolifération cellulaire au niveau de l'organe visé. Le but de la chimiothérapie étant d'éliminer les cellules cancéreuses, la multiplication de celles-ci n'est donc pas souhaitable.

1.15.6 Molécules hybrides antiestrogéniques cytotoxiques

Plus récemment, afin d'éviter la prolifération des cellules hormono-dépendantes, des molécules hybrides cytotoxiques au squelette non-stéroïdien ont été synthétisées. Des ligands antagonistes du RE α furent conjugués à des composés cytotoxiques connus. À titre d'exemple, la doxorubicine, un agent intercalant, fut combinée au 4-hydroxytamoxifène, un composé aux propriétés antiestrogéniques (99,100) (Figure 1.18). Ce type de molécule s'est avéré actif et sélectif pour les cellules cancéreuses du sein hormono-dépendantes.

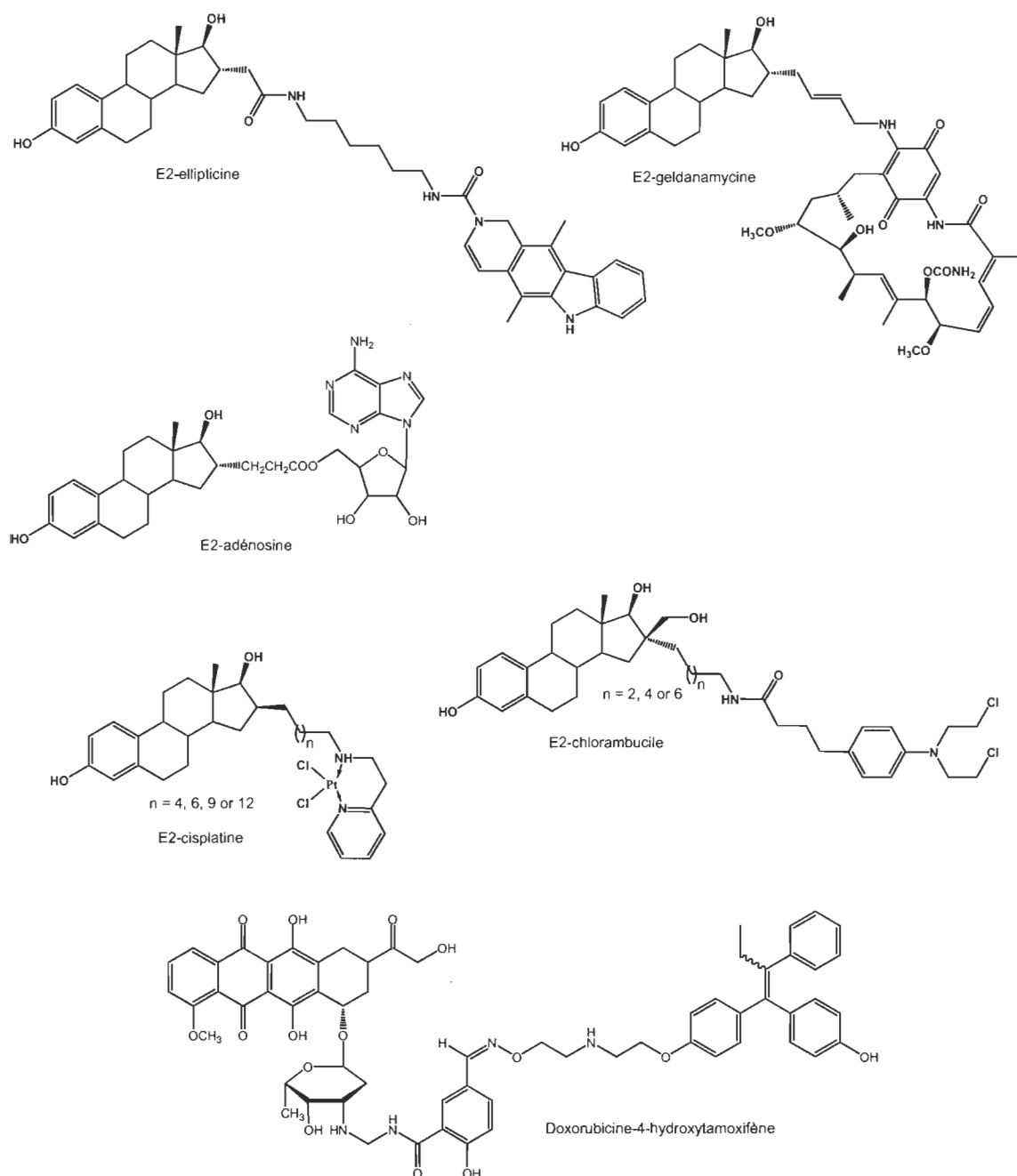


Figure 1.18 Exemples de quelques molécules hybrides cytotoxiques.

Ensemble, ces études ont permis de prouver qu'il est possible de limiter la toxicité associée à un traitement chimiothérapeutique, et ce en acheminant un composé d'intérêt au niveau d'un organe précis. Le fait de cibler une protéine, tel un récepteur spécifique aux cellules cancéreuses, constitue une avenue intéressante.

1.16 Les acides aminés

Les produits naturels connaissent un intérêt accru depuis quelques années. Au cours des dernières décennies, une variété de molécules hybrides fut synthétisée à partir de différents acides aminés (101,102). Les acides aminés sont des entités qui, liées entre elles par des liaisons covalentes, forment les macromolécules biologiques que sont les protéines (103).

Ces molécules naturelles ont une structure particulière, caractérisée par un carbone en alpha ($C\alpha$) porteur de quatre groupements : un d'hydrogène, une fonction aminée ($-NH_2$), une fonction acide carboxylique ($-COOH$) et une chaîne latérale R propre à chaque acide aminé (Figure 1.19) (103). À l'exception de la glycine, pour laquelle $R = H$, les acides aminés existent tous sous la forme de deux énantiomères optiquement actifs, traditionnellement appelés D et L, selon que le groupe amine ($-NH_2$) se trouve respectivement à droite (D) ou à gauche (L) dans la projection de Fischer. Il est à noter que les acides aminés L représentent la quasi-totalité des acides aminés retrouvés dans les protéines naturelles.

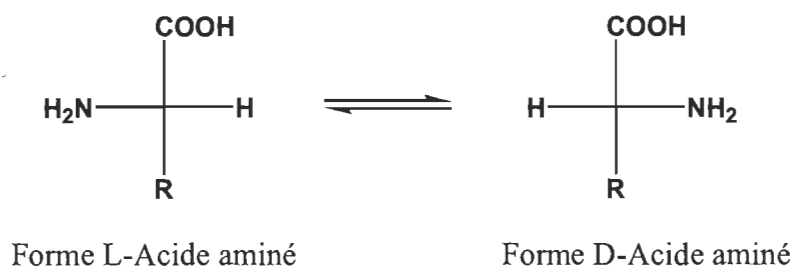


Figure 1.19 Structure générale des acides aminés; représentation de Fischer des énantiomères D et L.

1.16.1 La tyrosine

Il existe une vingtaine d'acides aminés différents présents dans les protéines. Parmi ceux-ci figure la tyrosine, un acide aminé aromatique polaire, très peu soluble dans l'eau (104). La L-tyrosine (Figure 1.20) est une molécule essentielle au bon fonctionnement du corps. Dans l'organisme, cet acide aminé est synthétisé à partir de la phénylalanine

(105). La L-tyrosine peut aussi être fournie par l'alimentation. On la retrouve dans une variété d'aliments, entre autres dans les amandes, les avocats, les bananes, les produits laitiers, les fèves lima, les graines de citrouille et les graines de sésame (106).

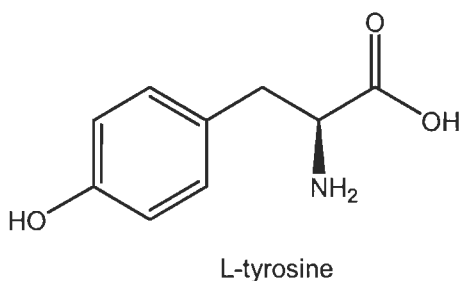


Figure 1.20 Structure de la L-tyrosine.

Le rôle principal de la tyrosine réside dans la synthèse des neurotransmetteurs membres de la famille des catécholamines, soit l'adrénaline (épinéphrine), la noradrénaline (norépinéphrine), la dopamine et la L-DOPA (Figure 1.21) (107). Cet acide aminé est aussi précurseur de la mélanine et des hormones thyroïdiennes.

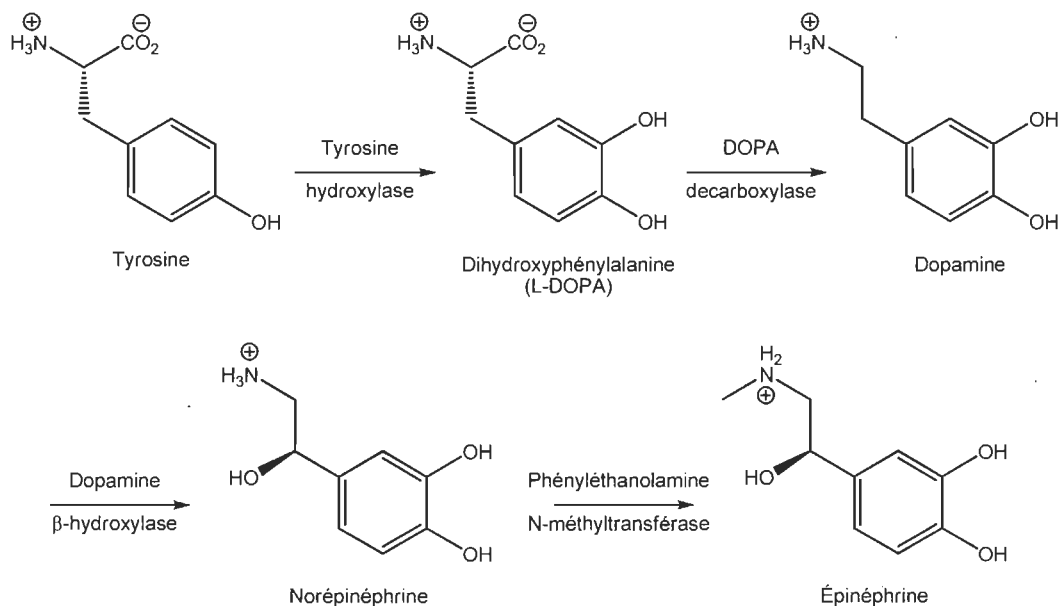


Figure 1.21 Bioynthèse des catécholamines à partir de la tyrosine.

La tyrosine est utilisée pour diverses applications thérapeutiques, notamment pour le traitement des états de choc, des dépressions, de la maladie de Parkinson et du trouble du

déficit de l'attention avec hyperactivité (108). Ce composé ayant la propriété de traverser la barrière hématoencéphalique, il peut être administré chez des malades souffrant de troubles neurologiques et ainsi devenir une source importante de neurotransmetteurs.

Les acides aminés étant des composantes naturelles bien tolérées par le corps et essentielles pour la synthèse des protéines et la croissance cellulaire, ceux-ci pourraient être fort utiles pour le développement de nouveaux médicaments (109). Également, le fait que l'utilisation de telles molécules peut favoriser l'absorption des substances médicamenteuses est bien connu (110). Ainsi, une stratégie possible pour augmenter le transport membranaire des composés d'intérêt biologique à travers la membrane cellulaire serait de conjuguer ces derniers avec des acides aminés. Des travaux ont d'ailleurs été menés en ce sens en combinant un dérivé de l'ellipticine, un agent anticancéreux, à des acides aminés aliphatiques (glycine, alanine, valine, leucine) produisant de cette façon des molécules plus lipophiles (111). Dans tous les cas, la conjugaison avec un acide aminé a permis d'augmenter la liposolubilité des composés.

1.17 Présentation du projet de recherche

Le fait de lier un agent cytotoxique connu à un ligand interagissant avec un récepteur quelconque pourrait permettre de concentrer l'action dudit médicament à un endroit spécifique dans le corps et de limiter ainsi la toxicité systémique. Comme il fut mentionné précédemment, ce concept innovateur peut être appliqué au traitement du cancer du sein. En effet, la majorité des cellules cancéreuses du sein surexpriment le RE comparativement aux cellules mammaires saines, ce qui constitue une cible intéressante pour diriger un médicament au niveau de l'organe en question (63). Également, le RE α est présent au niveau des glandes mammaires, tandis que la forme bêta y est beaucoup moins abondante (112). Compte tenu de ces faits, le RE α représente un outil intéressant pour traiter du cancer du sein.

Plusieurs travaux ont montré une certaine activité avec des composés hybrides cytotoxiques sur les cellules cancéreuses du sein. De manière plus spécifique, des études menées dans les laboratoires des professeurs Bérubé et Asselin de l'UQTR ont permis de découvrir un nouveau dérivé estradiol-Pt(II) et d'illustrer l'efficacité *in vitro* et *in vivo* de ce type de molécule (94,98). Cependant, bien que l'affinité pour le RE α et l'activité cytotoxique de ce composé aient été démontrées, celles-ci s'accompagnent toutefois d'une stimulation de la prolifération cellulaire. Donc, malgré le fait que des ligands au squelette estrogénique pourraient favoriser l'interaction avec le récepteur, l'action proliférative de telles molécules pourrait également nuire à l'action anticancéreuse recherchée, ce qui représente une difficulté non négligeable.

1.17.1 Hypothèses de recherche

Le domaine de liaison du ligand communément appelé en anglais « ligand binding domain (LBD) » du RE α étant une cavité très flexible, certains chercheurs admettent que des entités aux structures variées pourraient s'y loger. En ce sens, nous estimons qu'une molécule différente de l'estradiol présentant des similitudes structurales avec cette dernière, pourrait interagir avec le récepteur sans toutefois engendrer la transcription de certains gènes. Ce nouveau ligand pourrait à la fois lier le récepteur avec une affinité semblable à l'estradiol et agir comme un anti-estrogène en bloquant le site de liaison de l'hormone.

De ce fait, il serait possible de conjuguer cette molécule anti-estrogénique à un composé anticancéreux connu. Le ligand pourrait alors agir comme vecteur et transporter le médicament aux cellules cancéreuses exprimant le RE α . À ce stade, l'agent anticancéreux pourrait agir en éliminant les cellules atteintes, sans provoquer leur prolifération.

Dans le cadre de ce projet de recherche, le choix du ligand repose entre autre sur la tendance grandissante d'avoir recours aux produits naturels. Plus particulièrement, l'utilisation des acides aminés représente un avantage car il permet de tirer profit de ces

produits naturels bien tolérés par le corps. Parmi les acides aminés existants, la L-tyrosine fut sélectionnée. Cet acide aminé possède une structure mimant, du moins en partie, à celle de l'estradiol, le ligand naturel (73). La partie phénolique de la L-tyrosine pourrait imiter le noyau A du squelette stéroïdien et la fonction acide carboxylique pourrait être chimiquement transformée de manière à imiter l'alcool en position 17 du stéroïde. Ainsi, la tyrosine modifiée pourrait adopter une conformation similaire à celle de l'estradiol dans la protéine. Il est probable alors que les groupements fonctionnels au caractère nucléophile de ce ligand potentiel puissent lier de manière covalente les mêmes résidus que l'hormone naturelle dans le récepteur et que la tyrosine puisse alors adopter une conformation comparable à cette dernière.

Bref, en liant des composés anticancéreux tel le chlorambucil et le cisplatine à la L-tyrosine modifiée, des molécules hybrides cytotoxiques spécifiques pour les cellules cancéreuses du sein pourraient être conçues. La portion ligand pourrait, une fois dans l'organisme, favoriser le transport des composés anticancéreux au niveau des cellules mammaires atteintes par le cancer. Nous espérons ainsi augmenter la spécificité de ces médicaments pour en diminuer éventuellement les effets secondaires.

1.17.2 Objectifs de recherche

Le but principal des travaux entrepris dans le cadre de ce doctorat était de modifier la tyrosine commercialement disponible et de créer des molécules à base de chlorambucil et de cisplatine. Plus spécifiquement, les objectifs portaient sur la conception, la synthèse et l'évaluation biologique *in vitro* de ces molécules. Dans certains cas, une étude de modélisation moléculaire fut élaborée afin de prévoir, de manière théorique, le mode de liaison de ces composés dans le RE α .

Chapitre II

Le deuxième chapitre de ce document présente le développement de molécules à base des formes naturelles (L-tyrosine) et non naturelles (D-tyrosine) de la tyrosine couplées au chlorambucil. L'objectif de cet article intitulé « Synthèse d'analogues D- et

L-tyrosine-chlorambucil actifs contre les lignées cellulaires cancéreuses du sein » était premièrement d'évaluer la possibilité de concevoir ce genre de molécules.

Le chlorambucil fut lié soit directement à la fonction aminée de la tyrosine ou via un espaceur. Dans ce cas échéant, un acide aminé linéaire doté de cinq ou dix atomes de carbone (-CH₂-) fut utilisé. Deux méthodes de synthèse ont été utilisées pour la fabrication de ces molécules : une voie directe et une voie convergente.

Dans le but de vérifier si les composés conservaient leur activité optique pendant les diverses étapes de synthèse, les précurseurs L- et D-tyrosine ester ont été transformés en amides de Mosher. Une analyse par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN ¹H) permettait de distinguer clairement les deux isomères et de comparer les résultats avec les molécules tyrosine-chlorambucil nouvellement conçues.

Par la suite, l'activité antiproliférative des composés fut étudiée *in vitro* sur les cellules cancéreuses du sein hormono-dépendantes (MCF-7) et hormono-indépendantes (MDA-MB-231). L'objectif principal était ici de mettre en évidence l'importance du ligand tyrosine en comparant l'effet antiprolifératif de ces molécules hybrides avec celui du chlorambucil. Cette étude visait également à étudier comment la nature du ligand (naturel et non naturel) pouvait influencer l'action anticancéreuse des molécules à base de la L-tyrosine et de la D-tyrosine. Subséquemment, afin de s'assurer de la sélectivité des composés pour les cellules hormono-dépendantes, quelques molécules furent retenues pour une étude biologique plus approfondie avec les lignées cancéreuses du sein hormono-indépendantes, MDA-MB-436 et MDA-MB-468.

Chapitre III

Ce troisième chapitre porte sur les relations structure-activité des isomères *ortho*, *méta* et *para* de la L-tyrosine couplés au chlorambucil. Le but de cet article intitulé « Étude de la relation structure-activité des régioisomères hybrides tyrosine-chlorambucil; synthèse et évaluation biologique sur les lignées cellulaires cancéreuses du sein » était d'évaluer

comment la position du phénol pouvait favoriser l'interaction du ligand dans le récepteur aux estrogènes.

En ayant recours à la synthèse convergente décrite dans l'article précédent, le chlorambucil fut lié aux différents régioisomères de la L-tyrosine (*ortho*, *méta* et *para*) soit directement ou via un espaceur (5 ou 10 atomes de carbone). Afin d'étudier et de comparer l'activité cytotoxique des isomères nouvellement synthétisés, l'ensemble de ces molécules fut testé sur les cellules cancéreuses du sein hormono-dépendantes (MCF-7) et hormono-indépendantes (MDA-MB-231).

Un des objectifs spécifiques de cette étude était également de comprendre le mode de liaison des différents ligands dans le récepteur. Pour ce faire, la technique de docking par modélisation moléculaire fut appliquée à des analogues des différents régioisomères. Le but était alors d'évaluer si un des isomères de la tyrosine (*ortho*, *méta* ou *para*) pouvait adopter un positionnement semblable à celui de l'estradiol dans la protéine visée, et ce, en regardant plus spécifiquement la portion phénol des molécules.

Chapitre IV

L'étude de modélisation moléculaire réalisée et présentée dans le chapitre III a permis de constater que les molécules tyrosine-chlorambucil n'occupaient pas autant d'espace que l'hormone naturelle dans la pochette de liaison du récepteur. Ainsi, l'article intitulé « Design de nouvelles molécules hybrides tyrosine-moutarde azotée actives sur les lignées cellulaires cancéreuses de l'utérus, de l'ovaire et du sein » présente la conception de nouvelles molécules à base de L-tyrosine couplées au chlorambucil avec un squelette élargi.

Les isomères *ortho*-, *méta*- et *para*-aminophénol furent utilisés et assemblés au groupement acide de la tyrosine, conférant ainsi à la molécule finale un noyau aromatique additionnel imitant possiblement le noyau D du stéroïde. Encore une fois, le chlorambucil fut lié soit directement ou séparé par un espaceur (5 ou 10 atomes de carbone) via la synthèse convergente appliquée dans le cadre des travaux précédents.

Dans le but d'étudier l'effet cytotoxique de ces composés plus volumineux, ces molécules L-tyrosine-chlorambucil au squelette élargi furent testées sur les cellules cancéreuses du sein hormono-dépendantes (MCF-7) et hormono-indépendantes (MDA-MB-231). L'activité de ces dernières fut comparée à celle du chlorambucil. Ensuite, une étude biologique plus exhaustive fut réalisée avec une série de molécules (espaceur, 5 atomes de carbone). L'objectif était alors d'étudier l'action cytotoxique de ces composés sur d'autres cellules cancéreuses féminines, soit sur des lignées du sein, de l'ovaire et de l'utérus, hormono-dépendantes (sein : ZR-75-1; ovaire : OVCAR-3; utérus : Ishikawa) et hormono-indépendantes (sein : MDA-MB-468 et MDA-MB-436; ovaire : A2780; utérus : HEC-1A).

Chapitre V

Jusqu'ici, le composé cytotoxique couplé à la portion tyrosine fut le chlorambucil. L'objectif du chapitre V, dont l'article présenté s'intitule « Explorer la synthèse de molécules L-tyrosine-platine(II) en tant qu'agents anticancéreux potentiels » était d'appliquer le concept du ciblage thérapeutique pour des molécules tyrosine dérivées du cisplatine. Le but ultime de cette étude consistait à étudier la faisabilité de telles molécules, et ce en appliquant diverses méthodes de synthèse chimique.

Cet article présente trois différentes méthodes de synthèse élaborées pour fabriquer ces nouvelles molécules L-tyrosine-Pt(II). Afin d'étudier l'effet cytotoxique de ces composés, des tests biologiques préliminaires *in vitro* ont été effectués sur les lignées cancéreuses du sein hormono-dépendantes (MCF-7) et hormono-indépendantes (MDA-MB-231). Faute d'activité, des essais supplémentaires ont été réalisés avec les précurseurs de ces molécules L-tyrosine-Pt(II), et ce dans le but de comparer l'action du dérivé Pt(II) à celle du cisplatine.

CHAPITRE II

SYNTHÈSE D'ANALOGUES D- ET L-TYROSINE-CHLORAMBUCIL ACTIFS SUR LES LIGNÉES CELLULAIRES CANCÉREUSES DU SEIN

Caroline Descôteaux, Valérie Leblanc, Kevin Brasseur, Atul Gupta, Éric Asselin,
Gervais Bérubé*

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. La référence de cet article est la suivante : *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2010) 20 : 7388-7392.
DOI 10.1016/j.bmcl.2010.10.039

2.1 Contribution des auteurs

La majeure partie des travaux présentés fut réalisée par Caroline Descôteaux, sous la supervision des Drs Bérubé et Asselin. La synthèse de l'ensemble des molécules de même que les travaux préliminaires de modélisation moléculaire ont été effectués par celle-ci. L'évaluation biologique fut également réalisée par Caroline Descôteaux et Kevin Brasseur, avec le soutien de Valérie Leblanc. Première auteure de cette publication, Caroline Descôteaux a rédigé, soumis, corrigé le manuscrit et répondu aux interrogations et suggestions des examinateurs avec l'appui et les conseils d'Atul Gupta et du Dr Bérubé.

2.2 Résumé

Une série d'analogues D- et L-tyrosine-chlorambucil a été synthétisée comme agents anticancéreux pour le traitement du cancer du sein. Suite à des modifications de la D- et de la L-tyrosine, les nouveaux composés ont été synthétisés avec de bons rendements.

L'évaluation biologique anticancéreuse des composés nouvellement synthétisés fut réalisée sur différentes lignées cellulaires cancéreuses du sein, hormono-dépendantes et hormono-indépendantes (RE+ et RE-). Les nouveaux analogues présentaient une activité anticancéreuse significative lorsque comparée au chlorambucil. Une étude de la relation structure-activité a permis de démontrer l'influence de la longueur de l'espaceur ainsi que l'influence de la stéréochimie de l'entité tyrosine. Un fait intéressant, les dérivés D- et L-tyrosinol-chlorambucil porteurs d'un espaceur constitué de 10 atomes de carbone sont plus sélectives pour les cellules cancéreuses du sein hormono-dépendantes MCF-7 (RE+).

2.3 Premier article scientifique

Synthesis of D- and L-tyrosine-chlorambucil analogs active against breast cancer cell lines

Caroline Descôteaux, Valérie Leblanc, Kevin Brasseur, Atul Gupta, Éric Asselin,
Gervais Bérubé*

*Groupe de Recherche en Oncologie et Endocrinologie Moléculaires,
Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500,
Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7*

* Corresponding author:

1-819-376-5011 extension 3353

1-819-376-5084

Gervais.Berube@uqtr.ca

Abstract

A series of D- and L-tyrosine-chlorambucil analogs was synthesized as anticancer drugs for chemotherapy of breast cancer. The novel compounds were synthesized in good yields through efficient modifications of D- and L-tyrosine. The newly synthesized compounds were evaluated for their anticancer efficacy in different hormone-dependent and hormone-independent (ER+ and ER-) breast cancer cell lines. The novel analogs showed significant in vitro anticancer activity when compared to chlorambucil. Structure-activity relationship (SAR) reveals both, the influence of the length of the spacer chain and the stereochemistry of the tyrosine moiety. Interestingly, the D- and L-tyrosinol-chlorambucil derivatives with 10 carbon atoms spacer are selective towards MCF-7 (ER+) breast cancer cell line.

Over the years much research has been done on breast cancer. It has been established that tumours may differ according to the protein they express.¹ Breast cancer is no more considered as a single homogeneous disease and treatment may differ from a patient to another. An extensive field of investigation is now to target drugs to specific molecules within the tumours and this is done by using molecular-targeted cancer therapy.

The estrogen receptor alpha ($ER\alpha$) has already been used as a target to deliver a cytotoxic moiety to breast cancer cells.^{2,3,4} $ER\alpha$ is a cytosolic protein which become overexpressed in several cancerous cell types. Estradiol (E_2) (**1**), the female sex hormone, binds to its receptor and then activates transcription factors and triggers proliferation (Fig. 1). Recently, our group has synthesized several E_2 -linked-drugs in order to carry an anticancer agent, known for its efficacy, to cells expressing the $ER\alpha$.^{5,6,7} These molecules have shown promising in vitro biological activity and in vivo studies of one of these revealed selectivity for hormone-dependent breast cancer.⁸

Also, non-steroidal cytotoxic hybrid molecules have already been synthesized in attempt to target the $ER\alpha$.⁴ The aim of such design was to destroy cancerous cells without activating the $ER\alpha$. Conjugates comprising a chemotherapeutic agent and an amino acid (or a derivative thereof) have also shown promising in vivo results.⁹ Furthermore, chlorambucil conjugates with lipidic amino acids were developed as anticancer agent.¹⁰ This particular system was used as a tool to improve the delivery and cytotoxicity of the parent drug.

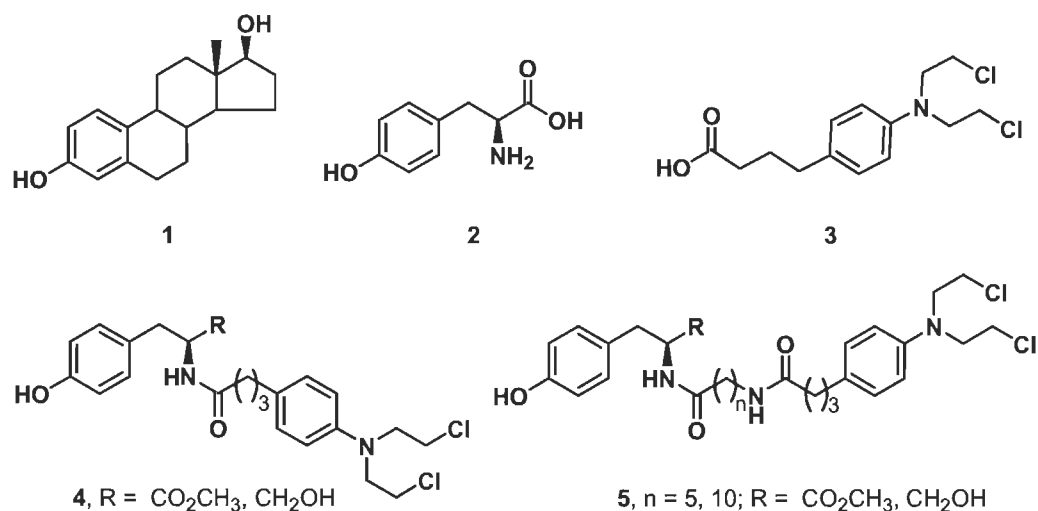


Figure 1. Structures of estradiol (1), L-tyrosine (2), chlorambucil (3) and tyrosine derivatives 4 and 5.

Natural amino acids have been widely used in production of pharmaceuticals and food.¹¹ L-tyrosine (2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)-propanoic acid) (2) is a natural amino acid, which plays a crucial role in human development (Fig. 1). It is the precursor for the synthesis of thyroid hormones and some neurotransmitters such as dopamine and noradrenaline.¹² Recently, it has been discovered that L-tyrosine and some of its metal complex derivatives show antibacterial activity against *Bacillus subtilis*, *Serratia*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*.¹³ It also acts as an antifungal agent.

Chlorambucil (CHL) (3) is a bis-alkylating agent which belongs to the nitrogen mustard family (Fig. 1). It is mainly used to treat chronic lymphocytic leukemia and malignant lymphomas.¹⁴ It is also useful for the treatment of solid tumors such as advanced ovarian and breast carcinomas.¹⁵ Like other type of anticancer treatment, administration of CHL causes non negligible toxic side effects including bone marrow suppression, anaemia and reduced immune system function.^{16,17}

In our search for anticancer agents with better therapeutic index and selectivity towards breast cancer, we have designed and synthesized a new class of tyrosine-linked nitrogen mustard hybrids (4, 5) (Fig. 1). Many unusual molecular structures can bind to the ER α .¹⁸ Thus, we hypothesized that tyrosine could be used as a building block to target

the estrogen receptor as its structure could mimic, albeit slightly, the steroid backbone of 17β -estradiol (**1**) (Fig. 2). Thus, the phenolic group of tyrosine is used as a potential bioisosteric function imitating the phenol group of estradiol. Moreover, molecular modeling displays the possible interactions of the novel hybrids with the estrogen receptor alpha (ongoing study). This encouraged us to perform this exploratory work. Besides, the cytotoxic activity of chlorambucil and the known antibacterial activity of tyrosine could together 1) generate powerful compounds interacting with the ER α , 2) being more specific to female cancer cells, and 3) more potent than each of the independent components.

For this purpose, tyrosine was used as the starting material to which chlorambucil was added directly (**4**) or via a spacer (**5**) to construct several tyrosine-chlorambucil hybrids. Chlorambucil was linked to the tyrosine framework at the α -amine function. This position seems suitable as it should not affect functional groups possibly involved in the receptor recognition. The final compounds are either tyrosine methyl ester or tyrosinol analogs. In each case, both, natural (L-tyrosine) and non-natural (D-tyrosine) amino acids were used.

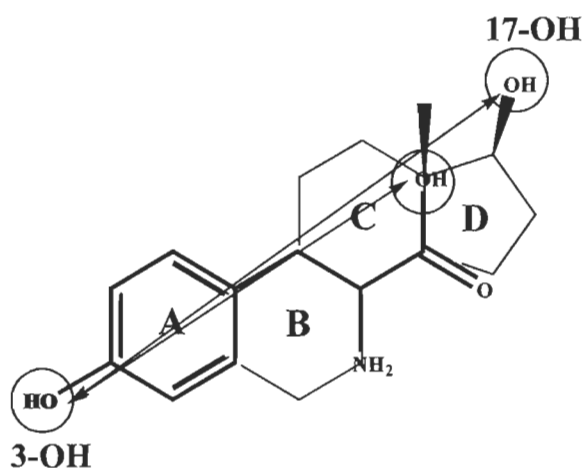
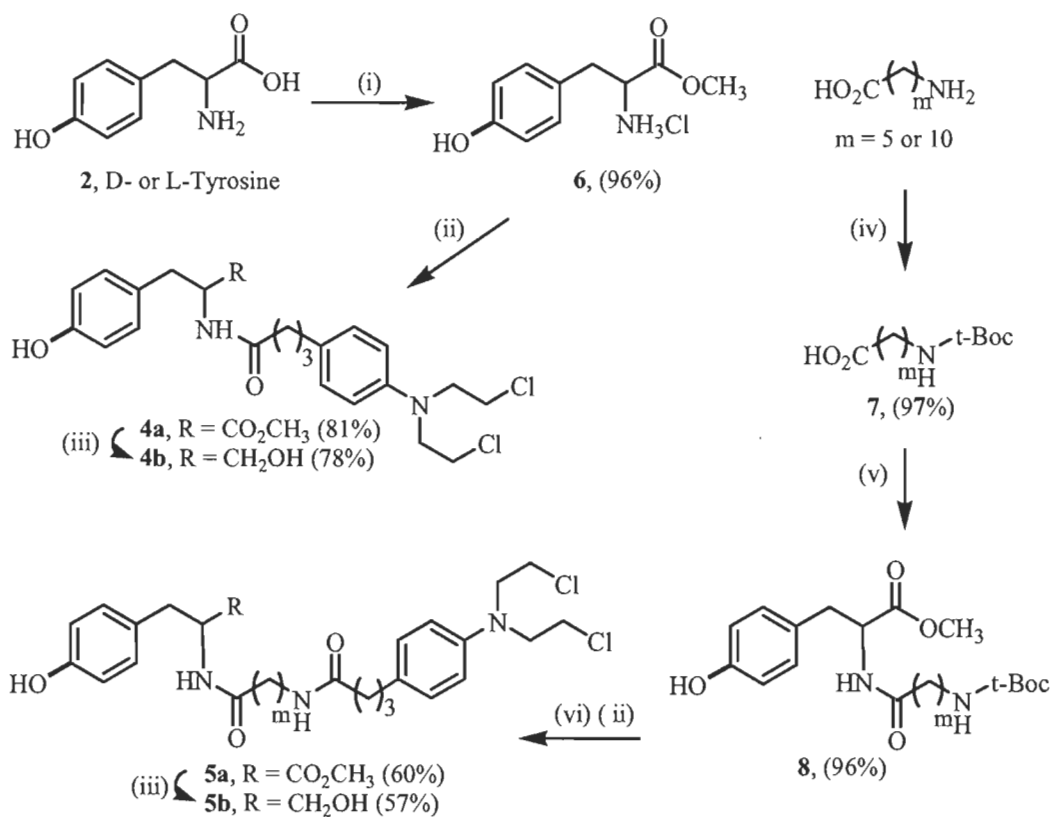


Figure 2. Superimposition of 17β -estradiol (**1**) and tyrosine (**2**).

This study presents the design, synthesis and biological activities of these new tyrosine-chlorambucil conjugates (**4**, **5**). The hybrids were made using two distinct

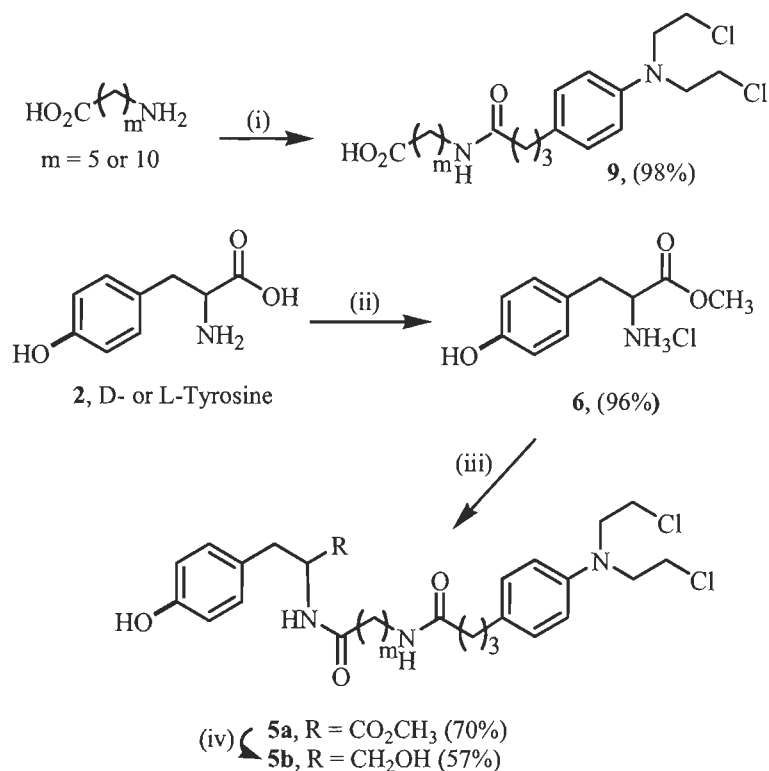
synthetic methodologies (linear and convergent synthesis) which will be described and compared in terms of their efficiency.

With the linear synthesis (**Scheme 1**), tyrosine was initially transformed into the corresponding methyl ester hydrochloride salt (**6**) with thionyl chloride in methyl alcohol (MeOH) at reflux in 96% yield. Condensation of compound **6** with chlorambucil in presence of 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and triethylamine (Et₃N) in *N,N*-dimethylformamide (DMF) at room temperature (22°C) yielded compound **4a** in 81% yield. Borohydride reduction of compound **4a** with excess of lithium borohydride (LiBH₄) in dry diethyl ether (Et₂O) at room temperature (22°C) gave the desired tyrosinol compounds **4b** in 78% yield. Chlorambucil was also linked via a 5 or a 10 carbon atoms spacer. The amino acid spacer was first protected using 2-(*t*-butoxycarbonyloxyimino)-2-phenylacetonitrile (BOC-ON) in 1,4-dioxane, water and Et₃N at room temperature (22°C) yielding *N*-BOC-amino acid (**7**) in 97% yield. Then, the corresponding *N*-Boc protected amino acid-alkyl chain (**7**) was linked to tyrosine methyl ester (**6**) via an amide function. Activation and condensation were performed using DCC and HOBt in DMF linking **7** to **6** to give compound **8** in 96% yield. Deprotection was achieved with treatment of the 'Boc-compound (**8**) with trifluoroacetic acid in dichloromethane (DCM). The resulting oil was then coupled to chlorambucil (**3**) using DCC and HOBt in DMF. The tyrosine methyl ester chlorambucil derivatives **5a** were obtained in 60% yield. The pure compounds were then reduced in the presence of LiBH₄ in Et₂O and provide the corresponding tyrosinol derivatives **5b** in 57% yield.



Scheme 1. Reagent and conditions (i) SOCl₂, MeOH, reflux, 3.5h; (ii) Chlorambucil, HOBT, DCC, Et₃N, dry DMF, 22°C; (iii) LiBH₄ excess, dry Et₂O, 22°C; (iv) BOC-ON, 1,4-dioxane, water, Et₃N, 22°C; (v) 6, HOBT, DCC, Et₃N, dry DMF, 22°C; (vi) excess TFA, DCM, 22°C, 10 min.

With the convergent synthesis (**Scheme 2**), chlorambucil was first linked to the amino acid-spacer. The acid function of the chlorambucil was activated with isobutylchloroformate (ClCO₂^tBu) and then coupled to the amino acid function using hexamethyldisilazane (HMDS), trimethylsilyl chloride (TMSCl), and a catalytic amount of sulfuric acid.¹⁹ The resulting amide (**9**) was isolated in 98% yield. The amino acid-CHL derivative (**9**) was then coupled, in presence of DCC and HOBT, to the tyrosine methyl ester, obtained as described above with the linear synthesis. The tyrosine methyl ester CHL analogs (**5a**) were obtained in 70% yield. The final chemical step, reduction with LiBH₄ in Et₂O, provides the desired tyrosinol derivatives in 57% yield. All the new compounds were fully characterized by their respective IR, ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopy and by HRMS.²⁰

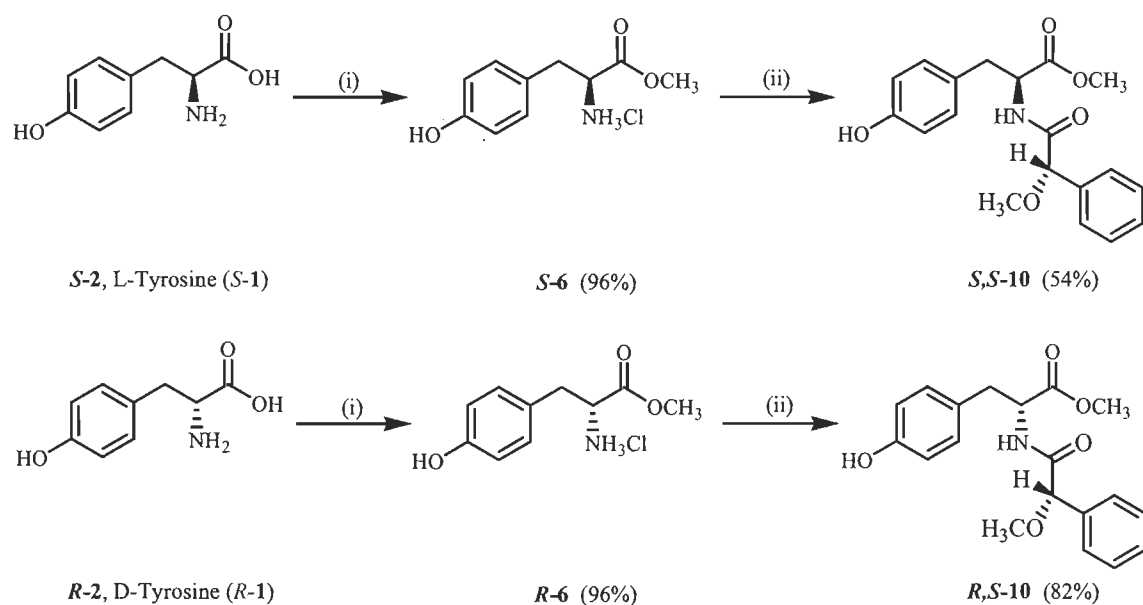


Scheme 2. Reagent and conditions (i) 1. HMDS, H₂SO₄ cat., DCM, Et₃N, TMSCl; 2. CHL, HOBt, DCC, Et₃N, DMF; (ii) SOCl₂, MeOH, reflux, 3.5h; (iii) Chlorambucil-NH(CH₂)_mCO₂H, m = 5 or 10, HOBt, DCC, Et₃N, dry DMF, 22°C; (iv) LiBH₄ excess, dry Et₂O, 22°C.

Briefly, compounds **5a** and **5b** were synthesized using two different approaches of synthesis. With the linear path (**Scheme 1**), D- or L-tyrosine were transformed into **5a** and **5b** through 4 and 5 chemical steps respectively. By the convergent path (**Scheme 2**), chlorambucil was first linked to the spacer and then, the resulting moiety was conjugated to the tyrosine methyl ester hydrochloride. The same derivatives (**5a** and **5b**) were obtained in 2 and 3 chemical steps. The convergent path is the most effective with fewer chemical steps and better global yields. Compounds **5a** and **5b** were obtained in 54% and 31% respectively with the linear path and in 67% and 38% with the convergent path.

In order to verify if some epimerization occurred during the formation of the S- and R-tyrosine methyl ester hydrochlorides (*S*-**6** and *R*-**6**), the corresponding Mosher's amides were synthesized (**Scheme 3**). Thus, independent treatment of *S*-**6** and *R*-**6** with commercially available *S*-(+)- α -methoxyphenyl acetic acid, HOBt, DCC, Et₃N in DMF

gave the corresponding amides *S,S*-10 and *R,S*-10 with good yields. Proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectroscopic analysis of the two diastereoisomers showed no trace of epimerization in the final products. Further confirmation of this was done by the preparation of a 1:2 mixture of *S,S*-10 and *R,S*-10 molecules which shows by ^1H NMR many distinct signals assigned to each specific diastereoisomers. For example, the methyl ester and methyl ether signals are more deshielded with the *S,S*-10 derivative compared to the *R,S*-10 derivative. This confirms that no epimerization occurred during the first step of the synthesis of the tyrosine-chlorambucil analogs described above.



Scheme 3. Reagent and conditions (i) SOCl_2 , MeOH, reflux, 3.5h; (ii) *S*-(+)- α -methoxyphenyl acetic acid, HOBt, DCC, Et_3N , dry DMF, 22°C .

The newly synthesized compounds (Table 1) were evaluated for their *in vitro* cytotoxic activity using estrogen receptor positive (MCF-7) and negative (MDA-MB-231) breast cancer cell lines. Chlorambucil (**3**) was used as a positive control. MTT assays²¹ showed that the newly synthesized tyrosine-chlorambucil hybrids of type **4** and **5** (Table 2) possess moderate to significant cytotoxic activity. Some selected compounds (**3**, L-4 and L-5) were tested on additional ER- (MDA-MB-436, MDA-MB-468) breast cancer cell lines to further assess selectivity on ER+ MCF-7 cancer cells (Table 3).

All compounds were first tested on hormone-dependent (MCF-7) and hormone-independent (MDA-MB-231) cancer cell lines. Generally, biological activity results of all compounds tested revealed a greater cytotoxic activity, compared to chlorambucil (**3**; $IC_{50} > 130 \mu\text{M}$ for all cell lines) itself. The L-tyrosine-chlorambucil analogs are generally more active than the D- analogs (Table 2). Compound **D-5b** is 8 times more active than the parent drug on MCF-7 cells. Its enantiomer, compound **L-5b**, is also very active, nearly 7 times more active than chlorambucil (**3**). Interestingly, these two compounds contain a 10 carbon atoms spacer in their structure. They are also both tyrosinol analogs, while their methyl ester derivatives are much less active on the same hormone-dependent cancer cell line.

The observed biological activity of these two hybrids (**D-5b** and **L-5b**) could be explained by an increase in solubility due to the hydroxymethyl (CH_2OH) function, which can create hydrogen bond with water and biological residues. Even if a longer alkyl chain should create a diminution in solubility, the CH_2OH residue could help to counteract this effect. Furthermore, other derivatives bearing a CH_2OH residue were synthesized and it was found to be beneficial for biological activity.⁷ Of note, the best cytotoxic activity was obtained with the longer alkyl chain spacer which could enhance cellular penetration. In earlier studies, it was observed that, on several non-steroidal estrogen cytotoxic molecules, the length of the side chain bearing the cytotoxic portion should be about 11 carbon atoms long for optimal biological activity.²²

Table 1
Compound numbers and descriptors

	Compound #	Chain length (n (or m))	R
CHL	3	-----	-----
D or L Tyrosine	4a	-----	CO ₂ CH ₃
	4b	-----	CH ₂ OH
	5a	5	CO ₂ CH ₃
	5b	5	CH ₂ OH
	5a	10	CO ₂ CH ₃
	5b	10	CH ₂ OH

Table 2

Inhibitory concentration of chlorambucil (**3**) and compounds **4** and **5** on both ER⁺ and ER⁻ breast cancer cell lines

Compound	MCF-7 (ER ⁺) IC ₅₀ ^a (μM)	MDA-MB-231 (ER ⁻) IC ₅₀ ^a (μM)
3	130.36 ± 2.92	136.85 ± 6.79
L-4a	31.92 ± 0.89	37.83 ± 1.52
L-4b	34.11 ± 2.04	39.57 ± 2.40
L-5a , n = 5	25.43 ± 2.06	36.81 ± 3.97
L-5b , n = 5	62.16 ± 5.50	55.09 ± 5.33
L-5a , n = 10	67.90 ± 8.68	NR
L-5b , n = 10	19.39 ± 2.66	NR
D-4a	50.01 ± 5.51	47.23 ± 5.81
D-4b	31.41 ± 3.22	29.78 ± 3.86
D-5a , n = 5	152.37 ± 11.28	---
D-5b , n = 5	66.98 ± 3.28	---
D-5a , n = 10	NR	NR
D-5b , n = 10	16.27 ± 2.00	NR

In order to further confirm the observed selectivity of the molecules bearing a 10 carbon atoms spacer for hormone-dependent cancer cells, the complete L-tyrosine-chlorambucil (**L-4** and **L-5**) series was selected for additional biological assays on two ER⁻ cancer cell lines (MDA-MB-436 and MDA-MB-468). The results showed that compounds **L-5a** and **L-5b**, with n = 10, are active against hormone-dependent cancer cells whereas they do not reach IC₅₀ with all hormone-independent cancer cells tested. In light of these results, we can confirm that tyrosine-chlorambucil derivatives bearing a 10 carbon atom spacers are specific to hormone-dependent MCF-7 cancer cells.

Table 3
Inhibitory concentration of chlorambucil (**3**) and compounds L-4
and L-5 on ER⁻ breast cancer cell lines

Compound	MDA-MB-468 (ER ⁻) IC ₅₀ ^a (μM)	MDA-MB-436 (ER ⁻) IC ₅₀ ^a (μM)
3	131.83 ± 7.87	146.88 ± 10.69
L-4a	15.42 ± 1.21	62.51 ± 2.49
L-4b	24.38 ± 1.65	55.08 ± 2.90
L-5a, n = 5	14.96 ± 1.10	59.04 ± 3.31
L-5b, n = 5	28.92 ± 0.71	77.28 ± 7.07
L-5a, n = 10	NR	NR
L-5b, n = 10	NR	NR

In conclusion, tyrosine-based chlorambucil hybrids have been synthesized in good yields starting from D- and L-tyrosine through two different methodologies. The convergent synthesis was more effective compared to the linear synthesis. The former was performed with fewer chemical steps and with about 24% increased in overall yield. Most of the tyrosine-chlorambucil analogs are more cytotoxic than chlorambucil itself. Compounds D-**5b** and L-**5b**, bearing a 10 carbon atoms spacer between the chlorambucil and the tyrosinol moiety, were the most active compounds and were selective toward hormone-dependent breast cancer cells (MCF-7). Further evaluation of these compounds is in progress in our laboratory.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies du Québec (FQRNT) for valuable financial support. The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) student fellowship to C. Descôteaux is gratefully acknowledged. We also wish to thank É. Froehlich B.Sc. students who participated to the synthesis of these molecules.

References and notes

1. Esteva, F. J.; Hortobagyi, G. N. *Sci. Am.* **2008**, 298, 58.
2. Ott, I.; Gust, R. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2007**, 7, 95.
3. Gust, R.; Beck, W.; Jaouen, G.; Schöenberger, H. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253, 2742.
4. Gust, R.; Beck, W.; Jaouen, G.; Schöenberger, H. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253, 2760.
5. Descôteaux, C.; Leblanc, V.; Bélanger, G.; Parent, S.; Asselin, É.; Bérubé, G. *Steroids* **2008**, 73, 1077.
6. Gagnon, V.; St-Germain, M. E.; Descôteaux, C.; Provencher-Mandeville, J.; Parent, S.; Mandal, S. K.; Asselin, É.; Bérubé, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 5919.
7. Gupta, A.; Saha, P.; Descôteaux, C.; Leblanc, V.; Asselin, É.; Bérubé, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 1614.
8. Van Themsche, C.; Parent, S.; Leblanc, V.; Descôteaux, C.; Simard, A. M.; Bérubé, G.; Asselin, É. *Endocr. Relat. Cancer* **2009**, 16, 1185.
9. Gengrinovitch, S.; Izakovich, E. WO patent 2005072061 A2, 2005.
10. Wood, I. P.; Toth, I.; Holley, J. L.; Gibbons, W. A. *Peptides* **1993**, 22, 330.
11. Zhang, L.; Song, M.; Tian, Q.; Min, S. *Sep. Pur. Tech.* **2007**, 55, 388.
12. Refat, M. S.; El-Korashy, S. A.; Ahmed, A. S. *J. Mol. Struct.* **2008**, 881, 28.
13. Wojciechowska, A.; Daszkiewicz, M.; Bienko, A. *Polyhedron* **2009**, 28, 1481.
14. Delgado, J. N.; Remers, W. A. Antineoplastic agents, In Wilson and Gisvold's Textbook of organic Medicinal and pharmaceutical chemistry, 9th Ed.; New York: Lippincott, 1989.

15. Sienkiewicz, P.; Bielawski, K.; Bielawska, A.; Palka, J. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, 492, 95.
16. Dorr, R.; W.L., F. *Cancer Chemotherapy Handbook*; New York: Elsevier Science, 1982.
17. Annette, N.; Stephen, J. P.; Geoffrey, P. S. *Leuk. Lymph.* **2004**, 45, 271.
18. Hsieh, R. W.; Rajan, S. S.; Sharma, S. K.; Guo, Y.; DeSombre, E. R.; Mrksich, M.; Greene, G. L. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 17909.
19. Lau, A.; Bérubé, G.; Ford, C. H. *J. Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 1299.
20. Spectral data for *N*-chlorambucil-L-tyrosine methyl ester (**L-4a**): IR (KBr, ν_{\max} , cm^{-1}) 3100-3450 (O-H and N-H), 1741 (C=O, COOCH₃), 1650 (C=O, NHCO), 1517 and 1221 (C-N-H). ¹H NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm) 8.27 (1H, s, OH), 7.25 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, CHNHCO), 7.05 and 7.03 (4H, 2d, *J* = 8.6 Hz and *J* = 9.0 Hz, 3-CH tyr and 3-CH CHL), 6.75 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, 2-CH tyr), 6.70 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, 2-CH CHL), 4.63 (1H, m, CHNH), 3.74 (8H, dt, *J* = 3.5 Hz and *J* = 1.8 Hz, CH₂Cl and NCH₂), 3.65 (3H, s, OCH₃), 2.82-3.08 (2H, m, CH₂CHNH), 2.46 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.18 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, NHCOCH₂), 1.76-1.87 (2H, m, CH₂CH₂CH₂). ¹³C NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm) 172.43 (NHCOCH₂), 172.38 (COOCH₃), 156.5 (1-C tyr), 144.8 (1-C CHL), 131.0 (4-C CHL), 130.4 (2C, 3-C tyr), 129.7 (2C, 3-C CHL), 127.9 (4-C tyr), 115.4 (2C, 2-C tyr), 112.4 (2C, 2-C CHL), 54.0 (CHNH), 53.3 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 51.5 (OCH₃), 41.0 (2x C, 2x NCH₂CH₂Cl), 36.9 (CH₂CHNH), 35.0 (CH₂CH₂Ph), 34.0 (NHCOCH₂), 27.7 (CH₂CH₂CH₂). ESI+ HRMS [M + H]⁺ calculated for C₂₄H₃₁Cl₂N₂O₄ = 481.1655; found = 481.1650.
- Spectral data for *N*-chlorambucil-L-tyrosinol (**L-4b**): IR (NaCl, ν_{\max} , cm^{-1}) 3100-3400 (O-H and N-H), 1646 (C=O, NHCO), 1516 and 1250 (C-N-H). ¹H NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm) 8.16 (1H, s, OH), 7.08 and 7.04 (4H, 2d, *J* = 9.0 Hz and *J* = 9.0 Hz, 3-CH tyr and 3-CH CHL), 6.87 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, CHNHCO), 6.75 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, 2-CH tyr), 6.70 (2H, d, *J* = 7.4 Hz, 2-CH CHL), 4.08 (1H, m, CHNH), 3.74 (8H, dt, *J* = 1.8 Hz and *J* = 3.5 Hz, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.51 (2H, t, *J* = 5.3 Hz, CH₂OH), 2.62-2.88 (2H, m, CH₂CHNH), 2.46 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.14 (2H, d, *J* = 7.4 Hz, NHCOCH₂), 1.76-1.87 (2H, m, CH₂CH₂CH₂). ¹³C NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm) 172.4 (NHCOCH₂), 156.0 (1-C tyr), 144.8 (1-C CHL), 131.0 (4-C CHL), 130.4 (2C, 3-C tyr), 129.9 (4-C tyr), 129.7 (2C, 3-C CHL), 115.2 (2C, 2-C tyr), 112.4 (2C, 2-C CHL), 63.5 (CH₂OH), 53.3 (3C, CHNH and 2x NCH₂CH₂Cl), 41.0 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 36.2 (CH₂CHNH), 35.5 (CH₂CH₂Ph), 34.1 (NHCOCH₂), 27.8 (CH₂CH₂CH₂). ESI+ HRMS [M + H]⁺ calculated for C₂₃H₃₁Cl₂N₂O₃ = 453.1706; found = 453.1703.
- Spectral data for *N*-((6-*N*-chlorambucilamino)hexanoyl)-L-tyrosine methyl ester (**L-5a**, *n* = 5): IR (NaCl, ν_{\max} , cm^{-1}) 3150-3500 (O-H and 2x N-H), 1745 (C=O,

COOCH₃), 1646 (2 x C=O, 2x NHCO), 1523 and 1253 (C-N-H). ¹H NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm) 8.48 (1H, br s, OH), 7.27 (1H, d, J = 8.2 Hz, CHNHCO), 7.16 (1H, br t, J = 5.9 Hz, CH₂NHCO), 7.07 and 7.04 (4H, 2d, J = 8.6 Hz and J = 8.6 Hz, 3-CH tyr and 3-CH CHL), 6.75 (2H, d, J = 8.6 Hz, 2-CH tyr), 6.71 (2H, d, J = 9.0 Hz, 2-CH CHL), 4.65 (1H, m, CHNH), 3.74 (8H, m, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.65 (3H, s, OCH₃), 2.85-3.17 (4H, #m, CH₂CHNH and CH₂NHCO), 2.52 (2H, t, J = 7.6 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.16 (4H, m apparent, CH₂NHCOCH₂ and CHNHCOCH₂), 1.82-1.89 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.19-1.54 (6H, #m, 3x CH₂). ¹³C NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm) 172.5 (CONH), 172.4 (CONH), 172.1 (COOCH₃), 156.5 (1-C tyr), 144.9 (1-C CHL), 130.9 (4-C CHL), 130.4 (2C, 3-C tyr), 129.7 (2C, 3-C CHL), 128.0 (4-C tyr), 115.4 (2C, 3-C tyr), 112.4 (2C, 3-C CHL), 53.8 (CHNH), 53.3 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 51.5 (OCH₃), 41.0 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 39.0, 36.9, 35.7, 35.5, 34.2, 27.9, 26.4, 25.4, (1C hidden). ESI+ HRMS [M + H]⁺ calculated for C₃₀H₄₂Cl₂N₃O₅ = 594.2496; found = 594.2490.

Spectral data for *N*-((6-*N*-chlorambucilamino)hexanoyl)-L-tyrosinol (L-5b, n = 5): IR (NaCl, ν_{max}, cm⁻¹) 3100-3400 (2x O-H and 2x N-H), 1639 (2x C=O, 2x NHCO), 1523 and 1246 (C-N-H). ¹H NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm) 8.33 (1H, s, OH), 7.12 (1H, br t, hidden, CH₂NHCO), 7.07 and 7.06 (4H, 2d, J = 8.6 Hz and J = 8.2 Hz, 3-CH tyr and 3-CH CHL), 6.87 (1H, d, J = 8.2 Hz, CHNHCO), 6.74 (2H, d, J = 8.2 Hz, 2-CH tyr), 6.71 (2H, d, J = 9.0 Hz, 2-CH CHL), 4.06 (1H, m, CHNH), 3.74 (8H, m, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.51 (2H, d, J = 5.1 Hz, CH₂OH), 3.14 (2H, m, CH₂NHCO), 2.88 (1H, s, CH₂OH), 2.58-2.87 (2H, m, CH₂CHNH), 2.52 (2H, t, J = 7.6 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.17 (2H, t, J = 7.4 Hz, CH₂NHCOCH₂), 2.10 (2H, t, J = 6.3 Hz, CHNHCOCH₂), 1.78-1.93 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.38-1.55 (4H, m, CH₂CH₂NHCO and CHNHCOCH₂CH₂), 1.22 (2H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂). ¹³C NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm) 172.54 (CONH), 172.48 (CONH), 156.1 (1-C tyr), 144.9 (1-C CHL), 130.9 (4-C CHL), 130.4 (2C, 3-C tyr), 129.9 (4-C tyr), 129.7 (2C, 3-C CHL), 115.3 (2C, 2-C tyr), 112.4 (2C, 2-C CHL), 63.8 (CH₂OH), 53.3 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 53.2 (CHNH), 41.0 (2x C, 2x NCH₂CH₂Cl), 39.0 (CH₂NHCO), 36.2 (CH₂CHNH), 36.1 (CHNHCOCH₂), 35.6 (CH₂CH₂Ph), 34.3 (CH₂NHCOCH₂), 27.9 (COCH₂CH₂CH₂Ph), 26.4 (CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 25.6 (NHCOCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), (1x CH₂ hidden). ESI+ HRMS [M + H]⁺ calculated for C₂₉H₄₂Cl₂N₃O₄ = 566.2547; found = 566.2541.

Spectral data for *N*-((11-*N*-chlorambucilamino)undecanoyl)-L-tyrosine methyl ester. (L-5a, n = 10): IR (NaCl, ν_{max}, cm⁻¹) 3250-3450 (O-H and 2x N-H), 1745 (C=O, COOCH₃), 1656 and 1614 (2x C=O, 2x NHCO), 1516 and 1216 (C-N-H). ¹H NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm) 8.49 (1H, s, OH), 7.23 (1H, d, J = 7.8 Hz, CHNHCO), 7.12 (1H, br t apparent, partly hidden, CH₂NHCO), 7.06 and 7.03 (4H, 2d, J = 8.6 Hz and J = 8.2 Hz, 3-CH tyr and 3-CH CHL), 6.75 (2H, d, J = 8.2 Hz, 2-CH tyr), 6.71 (2H, d, J = 8.6 Hz, 2-CH CHL), 4.65 (1H, m, CHNH), 3.74 (8H, m, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.65 (3H, s, OCH₃), 3.19 (2H, q, J = 6.3 Hz, CH₂NHCO), 2.81-3.07 (2H, m, CH₂CHNH), 2.52 (2H, t, J = 7.6 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.16 (4H, 2d overlapped, J = 7.4 Hz, CH₂NHCOCH₂ and CHNHCOCH₂), 1.78-1.93 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.26-1.52 (16H, #m and s, 8x CH₂). ¹³C NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm) 172.5 (2C, 2x CONH), 172.4 (COOCH₃), 156.6 (1-C tyr), 144.9 (1-C CHL), 130.9 (4-C CHL), 130.4 (2C, 3-C tyr), 129.7

(2C, 3-C CHL), 127.8 (4-C tyr), 115.4 (2C, 3-C tyr), 112.4 (2C, 3-C CHL), 53.9 (CHNH), 53.3 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 51.5 (OCH₃), 41.0 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 39.0, 36.9, 35.7, 35.6, 34.3, 27.9, 26.4, 25.4, (6C hidden). ESI+ HRMS [M + H]⁺ calculated for C₃₅H₅₂Cl₂N₃O₅ = 664.3279; found = 664.3273.

Spectral data for *N*-((11-*N*-chlorambucilamino)undecanoyl)-L-tyrosinol (**L-5b**, n = 10): IR (KBr, ν_{\max} , cm⁻¹) 3200-3500 (2x O-H and 2x N-H), 1649 (2x C=O, NHCO), 1540 and 1212 (C-N-H). ¹H NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm) 8.28 (1H, s, OH), 7.15 (1H, br t apparent, partly hidden, CH₂NHCO), 7.07 (4H, d, J = 8.6 Hz, 3-CH tyr and 3-CH CHL), 6.85 (1H, d, J = 8.2 Hz, CHNHCO), 6.74 (2H, d, J = 8.2 Hz, 2-CH tyr), 6.71 (2H, d, J = 8.6 Hz, 2-CH CHL), 4.10 (1H, m, CHNH), 3.75 (8H, m, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.50 (2H, t, J = 4.9 Hz, CH₂OH), 3.18 (2H, m, CH₂NHCO), 2.81 (1H, s, CH₂OH), 2.64-2.84 (2H, m, CH₂CHNH), 2.51 (2H, t, J = 7.6 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.16 (2H, t, J = 7.4 Hz, CH₂NHCOCH₂), 2.10 (2H, t, J = 7.4 Hz, CHNHCOCH₂), 1.81-1.92 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.25-1.54 (16H, #m and s, 8x CH₂). ¹³C NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm) 172.5 (CONH), 172.3 (CONH), 156.1 (1-C tyr), 144.9 (1-C CHL), 131.0 (4-C CHL), 130.4 (2C, 3-C tyr), 129.8 (4-C tyr), 129.7 (2C, 3-C CHL), 115.2 (2C, 2-C tyr), 112.4 (2C, 2-C CHL), 63.7 (CH₂OH), 53.3 (3C, 2x NCH₂CH₂Cl and CHNH), 41.0 (2x C, 2x NCH₂CH₂Cl), 38.9, 36.2, 35.6, 34.2, 26.8, 25.8, (8x CH₂ hidden). ESI+ HRMS [M + H]⁺ calculated for C₃₄H₅₂Cl₂N₃O₄ = 636.3329; found = 636.3327.

21. Carmichael, J.; DeGraff, W. G.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Mitchell, J. B. *Cancer Res.* **1987**, 47, 936.
22. He, Y.; Groleau, S.; Gaudreault, R. C.; Caron, M.; Thérien, H. -M.; Bérubé, G. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 5, 2217.

CHAPITRE III

ÉTUDE RSA DE RÉGIOISOMÈRES HYBRIDES TYROSINE-CHLORAMBUCIL; SYNTHÈSE ET ÉVALUATION BIOLOGIQUE SUR LES CELLULES CANCÉREUSES DU SEIN

Caroline Descôteaux, Kevin Brasseur, Valérie Leblanc, Sophie Parent, Éric Asselin,
Gervais Bérubé*

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue *Amino Acids*. La référence de cet article est la suivante : *Amino Acids* (2012) 43 : 923-935.
DOI 10.1007/s00726-011-1152-3.

3.1 Contribution des auteurs

La majeure partie des travaux présentés fut réalisée par Caroline Descôteaux, sous la supervision des Drs Bérubé et Asselin. La synthèse chimique de l'ensemble des molécules de même que les travaux de modélisation moléculaire ont été effectués par celle-ci. L'évaluation biologique fut également réalisée par Caroline Descôteaux et Kevin Brasseur, avec le soutien de Valérie Leblanc. Des essais préliminaires d'affinité pour le RE α ont été effectués par Sophie Parent. Première auteure de cette publication, Caroline Descôteaux a rédigé, soumis, corrigé le manuscrit et répondu aux interrogations et suggestions des examinateurs sous la supervision du Dr Bérubé.

3.2 Résumé

Des acides aminés furent transformés et couplés au chlorambucil, un agent chimiothérapeutique connu, dans le but de créer de nouveaux médicaments anticancéreux sélectifs pour les cellules cancéreuses du sein. Parmi les acides aminés disponibles, la tyrosine fut choisie pour agir comme un ligand estrogénique. L'hypothèse

étant que la tyrosine, présentant quelques similitudes structurales avec l'estradiol, pourrait mimer l'hormone naturelle et, subséquemment, lier le récepteur aux estrogènes. Dans le cadre de cette étude exploratoire, plusieurs composés hybrides à base de tyrosine ont été conçus. Ainsi, des analogues *ortho*-, *méta*- et *para*-tyrosine-chlorambucil ont été synthétisés dans le but de générer de nouveaux composés anticancéreux présentant des diversités structurales, plus spécialement au niveau du groupement phénol. Ces nouveaux analogues furent produits avec de bons rendements selon une voie de synthèse efficace. Tous les hybrides tyrosine-chlorambucil étaient plus efficaces que le composé d'origine, le chlorambucil. Une évaluation biologique *in vitro* sur des lignées cellulaires cancéreuses du sein hormono-dépendantes et hormono-indépendantes (RE⁺ et RE⁻) a révélé une activité cytotoxique supérieure pour les composés où la fonction phénolique était positionnée en *méta*. Des calculs de modélisation moléculaire ont été réalisés avec les régioisomères phénoliques L-*ortho*-, L-*méta*- et L-*para*-tyrosine. La synthèse de tous les régioisomères tyrosine-chlorambucil de même que leur activité biologique sont présentées dans ce papier. Les orientations possibles de ces composés à l'intérieur de la protéine cible (RE α) sont discutées en relation avec leur activité biologique.

3.3 Deuxième article scientifique

SAR study of tyrosine-chlorambucil hybrid regioisomers; synthesis and biological evaluation against breast cancer cell lines

Caroline Descôteaux, Kevin Brasseur, Valérie Leblanc, Sophie Parent, Éric Asselin,
Gervais Bérubé*

*Groupe de Recherche en Oncologie et Endocrinologie Moléculaires,
Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500,
Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7*

* Corresponding author:

1-819-376-5011 extension 3353

1-819-376-5084

Gervais.Berube@uqtr.ca

Abstract

Amino acids were transformed and coupled to chlorambucil, a well-known chemotherapeutic agent, in an attempt to create new anticancer drugs with selectivity for breast cancer cells. Among the amino acids available, tyrosine was selected to act as an estrogenic ligand. It is hypothesized that tyrosine, which shows some structural similitude with estradiol, could possibly mimic the natural hormone and, subsequently, bind to the estrogen receptor. In this exploratory study, several tyrosine-drug conjugates have been designed. Thus, *ortho*-, *meta*- and *para*-tyrosine-chlorambucil analogs were synthesized in order to generate new anticancer drugs with structural diversity, more specifically in regards to the phenol group location. These new analogs were produced in good yield following efficient synthetic methodology. All the tyrosine-chlorambucil hybrids were more effective than the parent drug, chlorambucil. *In vitro* biological evaluation on estrogen receptor positive and estrogen receptor negative (ER⁺ and ER⁻) breast cancer cell lines revealed an enhanced cytotoxic activity for compounds with the phenol function located at position *meta*. Molecular docking calculations were performed for the pure L-*ortho*, L-*meta*- and L-*para*-tyrosine phenolic regioisomers. The synthesis of all tyrosine-chlorambucil hybrid regioisomers and their biological activity are reported herein. Possible orientations within the targeted protein (estrogen receptor alpha (ER α)) are discussed in relation to the biological activity.

Key words: *Ortho*-, *Meta*-, *Para*-, Tyrosine-chlorambucil hybrid, Breast cancer

Introduction

Cancer is a devastating disease which continues to grow in size worldwide. In recent years, much effort has been invested in developing new treatment for cancer. Usually, the most effective treatments are nonspecific to cancer site and produce undesirable side effects (Magrath 1994; Palmer and Wallace 2010). Hence, in order to overcome this lack of specificity, drug targeting is still a current and important research subject.

The estrogen receptor alpha ($ER\alpha$) is a nuclear protein which is present in breast cancer cells and becomes overexpressed in cancerous cells (Shanle and Xu 2010). Some research groups have already looked at the possibility of targeting this protein with known cytotoxic compounds (Gust et al. 2009). It has been discovered that the toxic moiety can concentrate only to female organs and thereby kill cancerous cells. Recently, the anticancer property of chlorambucil (CLL) (1) has been exploited by linking it to estradiol (2), the sex female hormone (Gupta et al. 2010) (Fig. 1). The new estradiol-chlorambucil hybrids (3) were made to target cells expressing the $ER\alpha$. It is important to indicate that an estrogenic drug could, not only target the cells, but also induce some transcriptional activity as it was observed for other type of estrogen-cytotoxic derivatives (Van Themsche et al. 2009). Hence, non-steroidal drugs with structural similarities with the natural ligand could possibly avoid such estrogenic activity.

Natural products such as monoclonal antibodies, enzymes, proteins, peptides and amino acids have already been transformed and used to improve anticancer treatment (Sachdeva 1998). Drug delivery systems were conceived and developed based on these natural entities, making the new compounds well tolerated by the human body.

Amino acid-drug conjugates have also been designed. Several amino acids (proline, asparagine and glutamine) were linked to nitrogen mustard analogs (Chrzanowski et al. 2003; Gengrinnovitch and Izakovich 2005). These amino-acid drug conjugates were then used as prodrugs to treat cancer cells. Furthermore, the development of amino acid-antioxidant conjugates and amino acid-anti-angiogenic conjugates were also recently reported in the literature (Ortial et al. 2006; Durand et al. 2009; Contino-Pépin

et al. 2009). Hence, amino-acid derivatives are a promising avenue which must be further exploited in the search for new drug candidates.

Lately, we have reported the synthesis of D- and L-tyrosine-chlorambucil molecules (**4**) (Descoteaux et al. 2010). L-tyrosine (**5**) was selected as ligand to reach the ER α as its structure shows likeness with the steroid backbone. These new tyrosine analogs showed potent activity against hormone-dependent breast cancer cells. Molecular modeling study predicted possible interactions with the ER α . However, despite the theoretical binding predictions and despite the interesting cytotoxicity observed, these molecules had very little *in vitro* affinity for the ER α when tested experimentally.

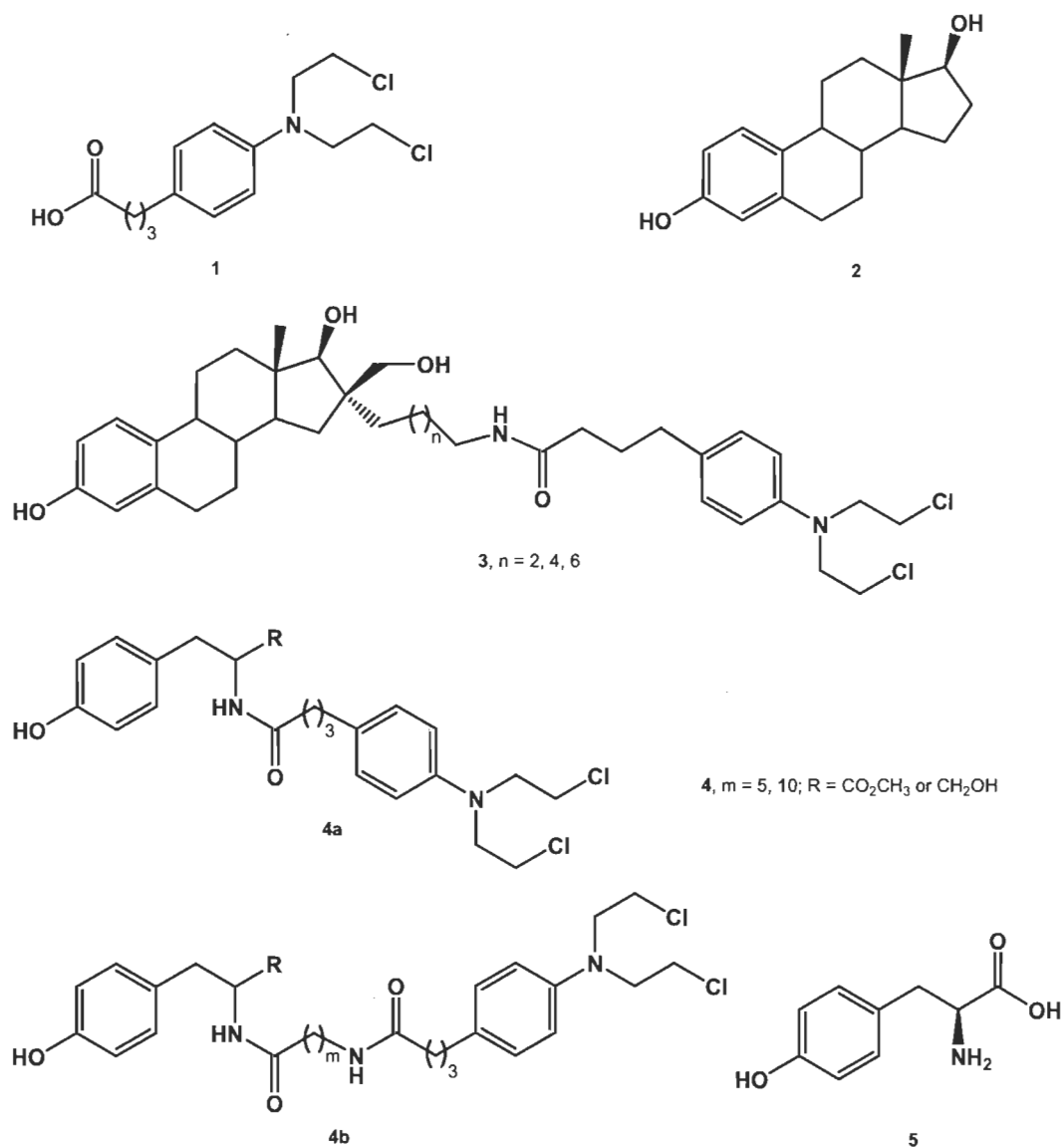


Figure 1. Chemical structures of chlorambucil (**1**), 17β-estradiol (**2**), 17β-estradiol-chlorambucil hybrids (**3**), tyrosine-chlorambucil hybrids (**4a**, **4b**) and L-tyrosine (**5**)

The study of interactions between the ER α and its potential ligands is a time consuming and difficult task. Structure activity relationship (SAR) studies have revealed that various compounds with diverse and unrelated structures can bind to the ER α (Demyttenaere-Kovatcheva et al. 2005). This can be explained by the motility and plasticity of the ER α ligand-binding cavity. Nevertheless, other studies have found some structural requirements for specific binding to the ER α (Muthyala et al. 2003). First of all, a phenol group, acting like the A-ring of estradiol, must be a part of the ligand. In

addition, a second hydroxyl group or a phenol function must be placed approximately 11 Å from the A-ring phenol. These two polar entities act as contact points within the ER α binding cavity via hydrogen bonding network.

Keeping in mind the importance of the phenol group, and being aware that subtle structure discrepancies can change the binding affinity to the ER α , we looked into the possibility of varying the position of the –OH group on the phenol portion of the tyrosine-chlorambucil hybrids. The aim of this study was to investigate how the phenol location could affect the cytotoxic activity of these molecules as well as their binding affinity.

In an attempt to study this, several tyrosine-based scaffold, DL-*ortho*- (DL-*o*-), L-*meta*- (L-*m*-) and L-*para*- (L-*p*-) tyrosine, were used as starting materials. It is noteworthy that the pure L-*o*-tyrosine was not commercially available. However, the mixture of isomers is adequate for this investigation which was mainly aimed at studying the influence of the phenol location on the cytotoxic activity of the tyrosine-chlorambucil hybrids. The chlorambucil moiety was either directly linked to the amino acid ligand or via an alkyl amide spacer. All of the new DL-*o*- (**6**, **7**), L-*m*- (**8**, **9**) and L-*p*-tyrosine-chlorambucil (**10**, **11**) (Fig. 2) hybrid molecules synthesized were evaluated for their *in vitro* cytotoxic activity on breast cancer cell lines (MCF-7, ER⁺ and MDA-MB-231, ER⁻). This manuscript gives a detailed description of the synthesis and cytotoxic activities of these novel tyrosine-chlorambucil hybrids. Finally, following molecular docking calculations, the orientation of L-*o*- (**12**, *ortho*-), L-*m*- (**12**, *meta*-) and L-*p*- (**12**, *para*-) tyrosine derivatives into the targeted protein, the ER α , was also investigated and the results are reported herein.

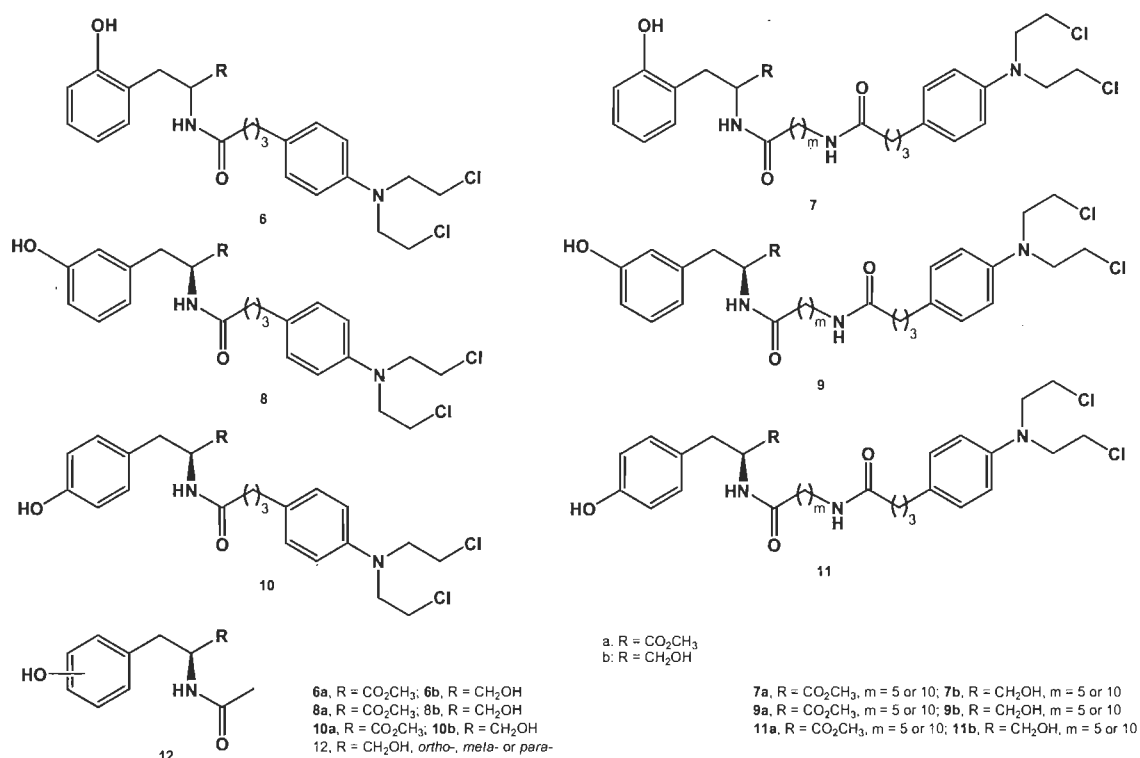


Figure 2. DL-*o*- (6-7), L-*m*- (8-9), L-*p*-tyrosine-chlorambucil (10-11) hybrids and N-acetyl tyrosinols (12) regioisomers used as model for docking calculations

Materials and methods

Chemistry

All reactions were performed with ACS Fisher solvents. In some cases, solvent, as well as starting materials and reactants, were first purified and dried by standard means (Perrin and Armarego 1988). Anhydrous reactions required an inert atmosphere of dry nitrogen. DL-*o*-tyrosine was purchased from ABCR GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Germany, L-*m*-tyrosine was purchased from PepTech Corporation, Burlington, MA, USA and L-*p*-tyrosine was purchased from Laboratoire Mat, Quebec, Canada. Of note, the pure L-*o*-tyrosine was not commercially available. The 6-aminohexanoic acid and 11-aminoundecanoic acid were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada. All reactions were monitored by UV fluorescence or staining with iodine on Sigma T 6145 commercial TLC plates (polyester silica gel 60 Å, 0.25 mm). Purifications were done using flash column chromatography according to the method of

Still et al. (1978) on Silicycle UltraPure Flash Silica Gel, 40-63 μm mesh. Hexanes and acetone were distilled before their use as chromatography eluent.

The infrared spectra were taken on a Nicolet Impact 420 FT-IR and a Thermo Nicolet IS10 FT-IR with ATR. Sodium chloride, potassium bromide pellets or ATR diamond accessory were used for analysis. Mass spectral assays were obtained using a MS model 6210, Agilent technology instrument. The high resolution mass spectra (HRMS) were obtained by TOF (time of flight) using ESI (electrospray ionization) using the positive mode (ESI+) (analysis at Université du Québec à Montréal).

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Varian 200 MHz NMR apparatus. Samples were dissolved in deuterioacetone (acetone- d_6) or deuterodimethylsulfoxide (DMSO- d_6) for data acquisition using tetramethylsilane as internal standard (TMS, δ 0.0 ppm for ^1H -NMR and ^{13}C -NMR). Chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm), the coupling constants (J) are expressed in hertz (Hz). Multiplicities are described by the following abbreviations: s for singlet, d for doublet, dd for doublet of doublets, dt for doublet of triplets, t for triplet, q for quartet, m for multiplet, #m for several multiplets, br s for broad singlet, br d for broad doublet and br t for broad triplet.

General procedure for the preparation of the N-chlorambucil-aminoalkyl carboxylic acid (14, m = 5 or 10):

The amino acid (**13**) (6.57 mmol) was dissolved in dichloromethane. Hexamethyldisilazane (21.69 mmol) and concentrated sulfuric acid (catalytic) were added. The mixture was stirred and heated to reflux under nitrogen atmosphere until complete dissolution. The solution was kept to reflux for 0.5 h. After cooling down, benzene, triethylamine (4.91 mmol) and chlorotrimethylsilane (4.91 mmol) were added. The resulting mixture was stirred at room temperature for 12 h. In another flask, chlorambucil (**1**) (3.29 mmol) was dissolved in dichloromethane at 0°C. Triethylamine (3.62 mmol) and isobutylchloroformate (3.62 mol) were added and the mixture was kept

at 0°C for 1 h. Then, the chlorambucil solution was added to the activated amino acid solution and the mixture was stirred at room temperature for 4 h. Work-up was done by diluting with ethyl acetate and by washing the organic phase with chlorhydric acid 10% solution (2x) and with a saturated sodium chloride solution. The organic phase was dried with anhydrous magnesium sulfate, filtered and evaporated. The product was purified by flash chromatography (hexanes: acetone, 7: 3) to give the desired material in 98% yield.

Spectral data for *N*-(6-chlorambucilamino)-hexanoic acid (**14**, *m* = 5). IR (NaCl, ν_{\max} , cm^{-1}): 3300 (N-H), 3200-2600 (O-H), 1716 (C=O, COOH), 1622 (C=O, NHCOO), 1522 and 1255 (C-N-H). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 7.26 (1H, br s, NH), 7.06 (2H, d, J = 8.6 Hz, 3-CH CLL), 6.70 (2H, d, J = 8.6 Hz, 2-CH CLL), 3.73 (8H, m, 2x CH_2Cl and 2x NCH_2), 3.19 (2H, m, CH_2NHCO), 2.51 (2H, t, J = 7.4 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.27 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH_2COOH), 2.18 (2H, t, J = 7.4 Hz, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2$), 1.78-1.96 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 1.28-1.67 (6H, m, 3x CH_2). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 174.3 (COOH), 173.0 (CONH), 144.8 (1-C CLL), 130.9 (4-C CLL), 129.7 (2C, 3-C CLL), 112.5 (2C, 2-C CLL), 53.3 (2C, 2x $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 41.0 (2x C, 2x $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 39.1, 35.6, 34.3, 33.6, 29.4, 27.9, 26.5, 24.7. ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3$ = 417.1706; found = 417.1707.

Spectral data for *N*-(11-chlorambucilamino)-undecanoic acid (**14**, *m* = 10). IR (NaCl, ν_{\max} , cm^{-1}): 3300 (N-H), 3200-2600 (O-H), 1714 (C=O, COOH), 1618 (C=O, NHCOO), 1526 and 1250 (C-N-H). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 7.07 (2H, d, J = 8.6 Hz, 3-CH CLL), 7.03 (1H, br s, NH), 6.72 (2H, d, J = 9.0 Hz, 2-CH CLL), 3.75 (8H, m, 2x CH_2Cl and 2x NCH_2), 3.17 (2H, m, CH_2NHCO), 2.90 (1H, br s, COOH), 2.51 (2H, t, J = 7.4 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.27 (2H, t, J = 7.4 Hz, CH_2COOH), 2.14 (2H, t, J = 7.2 Hz, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2$), 1.80-1.92 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 1.41-1.62 (4H, m, 2x CH_2), 1.30 (12H, 6x CH_2). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 174.0 (COOH), 172.1 (CONH), 144.9 (1-C CLL), 131.0 (4-C CLL), 129.7 (2C, 3-C CLL), 112.5 (2C, 2-C CLL), 53.3 (2C, 2x $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 41.0 (2C, 2x $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 39.0, 35.5, 34.2, 33.6, 29.8, 29.5 (2C), 29.3 (3C), 27.9, 27.0, 25.0. ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3$ = 487.2489; found = 487.2485.

General procedure for the preparation of tyrosine-methyl ester hydrochloride regioisomers (16) (DL-o-tyr, L-m-tyr, L-p-tyr):

A solution of tyrosine **15** (DL-*o*-, L-*m*- or L-*p*-, 1.67 mmol) in anhydrous methanol was stirred at 0°C. Then, thionyl chloride (5.00 mmol) was slowly added to the solution. The mixture was heated to reflux for 12 h. Then, the solvent was evaporated and the resulting crude compound was recrystallized in diethyl ether. The final material was filtered, washed with cold ether and dried in a desiccator for one day. The crude hydrochloric acid salt, obtained in a 100% yield, was pure enough to be used as such in the next step.

Spectral data for DL-*o*-tyrosine methyl ester hydrochloride (**16**, DL-*o*-). IR (ATR, ν_{\max} , cm^{-1}): 3258 (N-H), 3076 (O-H), 1734 (C=O ester), 1246 (CO-O-C). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm): 8.74 (3H, br s, NH_3), 7.05 (1H, t, $J = 10.9$ Hz, 5-CH tyr), 7.03 (1H, dJ = 6.6 Hz, 3-CH tyr), 6.84 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, 6-CH tyr), 6.71 (1H, t, $J = 6.9$ Hz, 4-CH tyr), 4.08 (1H, t, $J = 6.7$ Hz, CHNH_3), 3.58 (3H, s, OCH_3), 3.02 (2H, d, $J = 6.7$ Hz, CH_2CH), 2.48 (1H, s, OH). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm): 170.0 (COOCH_3), 156.2 (1-C tyr), 131.5 (3-C tyr), 129.1 (2-C tyr), 121.2 (5-C tyr), 119.4 (4-C tyr), 115.4 (6-C tyr), 52.9 (CHNH_3), 52.4 (OCH_3), 32.0 (CH_2CH). ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_3 = 196.0968$; found = 196.0966.

Spectral data for L-*m*-tyrosine methyl ester hydrochloride (**16**, L-*m*-). IR (ATR, ν_{\max} , cm^{-1}): 3243 (N-H), 3194 (O-H), 1745 (C=O ester), 1231 (CO-O-C). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm): 9.53 (1H, br s, OH), 8.66 (3H, br s, NH_3), 7.08 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, 5-CH tyr), 6.69-6.59 (2H, m, 4-CH tyr and 6-CH tyr), 6.62 (1H, s, 2-CH tyr), 4.16 (1H, t, $J = 6.25$ Hz, CHNH_3), 3.65 (3H, s, OCH_3), 3.14-2.92 (2H, m, CH_2CH). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm): 170.0 (COOCH_3), 158.0 (1-C tyr), 136.2 (3-C tyr), 130.0 (5-C tyr), 120.3 (4-C tyr), 116.7 (2-C tyr), 114.8 (6-C tyr), 53.7 (CHNH_3), 53.0 (OCH_3), 36.3 (CH_2CH). ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_3 = 196.0968$; found = 196.0964.

Spectral data for L-*p*-tyrosine methyl ester hydrochloride (**16**, L-*p*-). IR (KBr, ν_{\max} , cm^{-1}): 3354 (N-H), 3078 (O-H), 1742 (C=O ester), 1224 (CO-O-C). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm): 9.46 (1H, br s, OH), 8.60 (3H, br s, NH_3), 7.01 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 3-CH tyr), 6.73 (2H, d, $J = 8.60$ Hz, 2-CH tyr), 4.16 (1H, m, CHNH_3), 3.67 (3H, s, OCH_3), 3.03 (2H, m, CH_2CH). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm): 170.1 (COOCH_3), 157.4 (1-C tyr), 131.0 (2C, 3-C tyr), 125.0 (4-C tyr), 116.1 (2C, 2-C tyr), 54.1 (CHNH_3), 53.2 (OCH_3), 35.7 (CH_2CH). ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_3 = 196.0968$; found = 196.0968.

General procedure for the preparation of N-chlorambucil-DL-o-, N-chlorambucil-L-m- and N-chlorambucil-L-p-tyrosine methyl ester (6a, 8a and 10a):

The appropriate tyrosine methyl ester **16** (0.32 mmol) was dissolved in dimethylformamide and triethylamine (0.32 mmol) was added. At the same time, a solution of chlorambucil (**1**) (0.49 mmol) in dimethylformamide was activated using dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (0.52 mmol) followed by *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt) (0.52 mmol). The tyrosine solution was then added to the activated acid chlorambucil solution. The mixture was stirred at room temperature under nitrogen at room temperature for 24 h. The solution was diluted with ethyl acetate and water, and then washed with water (4x). The organic phase was dried with sodium sulfate, filtered and evaporated. The product was further purified by flash chromatography (hexanes: acetone, 4: 1) to give a pure compound in 81% yield.

Spectral data for *N*-chlorambucil-DL-*o*-tyrosine methyl ester (**6a**). IR (ATR, ν_{\max} , cm^{-1}): 3150-3400 (O-H and N-H), 1745 (C=O, COOCH_3), 1652 (C=O, NHCO), 1524 (C-N-H). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 8.74 (1H, s, OH), 7.39 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, CHNHCO), 7.01-7.13 (2H, m, 3-CH and 5-CH tyr), 7.03 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 3-CH CLL), 6.67-6.88 (2H, m, 4-CH and 6-CH tyr), 6.69 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, CH CLL), 4.75 (1H, m, CHNH), 3.74 (8H, dt, $J = 4.7$ Hz and $J = 1.2$ Hz, CH_2Cl and NCH_2), 3.63 (3H, s, OCH_3), 2.92-3.20 (2H, m, CH_2CHNH), 2.46 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.17 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, NHCOCH_2), 1.76-1.87 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 ,

δ ppm): 172.48 (NHCOCH₂), 172.3 (COOCH₃), 155.4 (1-C tyr), 144.6 (1-C CLL), 131.1 (3-C tyr), 130.6 (C, 4-C CLL), 129.5 (2C, 3-C CLL), 128.0 (2-C tyr), 123.5 (5-C tyr), 119.5 (4-C tyr), 115.1 (C, 6-C tyr), 112.2 (2C, 2-C CLL), 53.0 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 52.8 (CHNH), 51.2 (OCH₃), 41.8 (2x C, 2x NCH₂CH₂Cl), 34.9 (CH₂CHNH), 33.7 (CH₂CH₂Ph), 32.4 (NHCOCH₂), 27.4 (CH₂CH₂CH₂). ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₂₄H₃₁Cl₂N₂O₄ = 481.1655; found = 481.1652.

Spectral data for *N*-chlorambucil-*L*-*m*-tyrosine methyl ester (**8a**). IR (ATR, ν_{\max} , cm⁻¹): 3100-3450 (O-H and N-H), 1748 (C=O, COOCH₃), 1643 (C=O, NHCO), 1519 (C-N-H). ¹H-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 8.31 (1H, s, OH), 7.28 (1H, d, J = 8.2 Hz, CHNHCO), 7.06 (1H, t, J = 8.4 Hz, 5-CH tyr), 7.03 (2H, d, J = 9.0 Hz, 3-CH CLL), 6.72 (1H, s, 2-CH tyr), 6.70 (4H, 3d, J = 9.0 Hz, 4-CH tyr, 6-CH tyr and 2-CH CLL), 4.72 (1H, m, CHNH), 3.74 (8H, dt, J = 4.7 Hz and J = 1.2 Hz, CH₂Cl and NCH₂), 3.66 (3H, s, OCH₃), 2.85-3.12 (2H, m, CH₂CHNH), 2.46 (2H, t, J = 7.7 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.18 (2H, t, J = 7.4 Hz, NHCOCH₂), 1.76-1.88 (2H, m, CH₂CH₂CH₂). ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 172.18 (NHCOCH₂), 172.10 (COOCH₃), 157.4 (1-C tyr), 144.6 (1-C CLL), 138.7 (3-C tyr), 130.6 (4-C CLL), 129.5 (2C, 3-C CLL), 129.3 (5-C tyr), 120.2 (4-C tyr), 116.0 (2-C tyr), 113.7 (6-C tyr), 112.2 (2C, 2-C CLL), 53.4 (CHNH), 53.0 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 51.3 (OCH₃), 40.8 (2x C, 2x NCH₂CH₂Cl), 37.3 (CH₂CHNH), 34.8 (CH₂CH₂Ph), 33.7 (NHCOCH₂), 27.4 (CH₂CH₂CH₂). ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₂₄H₃₁Cl₂N₂O₄ = 481.1655; found = 481.1650.

Spectral data for *N*-chlorambucil-*L*-*p*-tyrosine methyl ester (**10a**). The spectral data for this particular compound were reported elsewhere and are in accordance with the literature (Descoteaux et al. 2010).

General procedure for the preparation of N-chlorambucil-DL-o-, N-chlorambucil-L-m- and N-chlorambucil-L-p-tyrosinol (6b, 8b and 10b):

The *N*-chlorambucil-tyrosine methyl ester (**6a**, **8a** or **10a**) (0.15 mmol) was dissolved in diethyl ether and dichloromethane and was stirred under nitrogen atmosphere. The

resulting solution was cooled down with an ice and water bath, afterwards lithium borohydride (0.90 mmol) was added. The mixture was kept at 0°C for 3 h. Afterwards, sodium sulfate decahydrate (0.3 g) was added. Work-up was done by diluting with diethyl ether and the organic phase was washed with saturated ammonium chloride solution (2x) and with water (4x). The organic phase was dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated. The product was purified by flash chromatography (hexanes: acetone, 7: 3) to give a pure compound in 88% yield.

Spectral data for *N*-chlorambucil-DL-*o*-tyrosinol (**6b**). IR (ATR, ν_{\max} , cm^{-1}): 3100-3450 (O-H and N-H), 1638 (C=O, NHCO), 1517 and 1242 (C-N-H). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 9.03 (1H, s, OH), 7.35 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, CHNHCO), 7.02-7.11 (2H, m, 3-CH tyr and 5-CH tyr), 7.07 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 3-CH CLL), 6.71 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, 2-CH CLL), 6.69-6.85 (2H, m, 4-CH tyr and 6-CH tyr), 4.18 (1H, t, $J = 5.7$ Hz, CHNH), 3.74 (8H, dt, $J = 1.6$ Hz and $J = 5.1$ Hz, 2x CH_2Cl and 2x NCH_2), 3.58 (2H, dt, $J = 1.2$ Hz and $J = 5.5$ Hz, CH_2OH), 2.92 (1H, s, CH_2OH), 2.78-2.91 (2H, m, CH_2CHNH), 2.52 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.25 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, NHCOCH_2), 1.83-1.94 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 173.8 (NHCOCH_2), 156.0 (1-C tyr), 144.7 (1-C CLL), 130.9 (4-C CLL), 130.6 (3-C tyr), 129.5 (2C, 3-C CLL), 127.7 (5-C tyr), 124.6 (2-C tyr), 119.3 (4-C tyr), 115.8 (6-C tyr), 112.2 (2C, 2-C CLL), 62.3 (CH_2OH), 54.1 (CHNH), 53.0 (2C, 2x $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 40.7 (2C, 2x $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 35.1 (CH_2CHNH), 33.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 31.9 (NHCOCH_2), 27.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$). ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3 = 453.1706$; found = 453.1702.

Spectral data for *N*-chlorambucil-L-*m*-tyrosinol (**8b**). IR (ATR, ν_{\max} , cm^{-1}): 3100-3450 (O-H and N-H), 1619 (C=O, NHCO), 1526 and 1254 (C-N-H). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 8.34 (1H, s, OH), 7.08 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, 5-CH tyr), 7.03 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 3-CH CLL), 6.97-7.01 (1H, m, CHNHCO), 6.70 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 2-CH CLL), 6.64-6.79 (3H, #m, 2-CH tyr, 4-CH tyr and 6-CH tyr), 4.14 (1H, m, CHNH), 3.74 (8H, dt, $J = 1.2$ Hz and $J = 4.7$ Hz, 2x CH_2Cl and 2x NCH_2), 3.53 (2H, d, $J = 4.7$ Hz, CH_2OH), 2.67-2.91 (2H, m, CH_2CHNH), 2.46 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.16 (2H,

t, $J = 7.4$ Hz, NHCOCH_2), 1.77-1.88 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$). ^{13}C -NMR (Acetone- d_6 , δ ppm): 172.4 (NHCOCH_2), 157.4 (1-C tyr), 144.6 (1-C CLL), 140.6 (3-C tyr), 130.7 (4-C CLL), 129.5 (2C, 3-C CLL), 129.1 (5-C tyr), 120.3 (4-C tyr), 116.1 (2-C tyr), 113.1 (6-C tyr), 112.2 (2C, 2-C CLL), 63.2 (CH_2OH), 53.0 (2C, 2x $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 52.8 (CHNH), 40.8 (2C, 2x $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 36.8 (CH_2CHNH), 35.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 33.9 (NHCOCH_2), 27.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$). ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3$ = 453.1706; found = 453.1707.

Spectral data for *N*-chlorambucil-*L-p*-tyrosinol (**10b**). The spectral data for this particular compound were reported elsewhere and are in accordance with the literature (Descoteaux et al. 2010).

General procedure for the preparation of N-((N-chlorambucilamino)alkanoyl)-DL-o-, L-m- and L-p-tyrosine methyl ester (7a, 9a and 11a):

The appropriate tyrosine methyl ester hydrochloride **16** (0.41 mmol) was dissolved in dimethylformamide and triethylamine (0.41 mmol). The latter was added in order to neutralize the hydrochloride salt. At the same time, a solution of *N*-chlorambucil-aminoalkyl carboxylic acid **14** ($m = 5$ or 10) (0.62 mmol) in dimethylformamide was activated using DCC (0.66 mmol) followed by HOBT (0.66 mmol). The tyrosine solution was then added to the activated *N*-chlorambucil-aminoalkyl carboxylic acid solution. The mixture was stirred at room temperature for 24 h. The solution was diluted with ethyl acetate and water, and then washed with water (4x). The organic phase was dried with sodium sulfate, filtered and evaporated. The product was further purified by flash chromatography (hexanes: acetone, 7: 3) to give a pure compound in 71% yield.

Spectral data for *N-((6-N-chlorambucilamino)hexanoyl)-DL-o*-tyrosine methyl ester (**7a**, $m = 5$). IR (ATR, ν_{max} , cm^{-1}): 3100-3400 (O-H and 2x N-H), 1745 (C=O, COOCH_3), 1634 (2x C=O, 2x NHCO), 1520 and 1253 (C-N-H). ^1H -NMR (Acetone- d_6 , δ ppm): 9.04 (1H, s, OH), 7.36-7.20 (2H, 2d apparent, CHNHCO and CH_2NHCO), 7.06-7.10 (2H, m, 3-CH and 5-CH tyr), 7.08 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, 3-CH CLL), 6.75-6.92 (2H,

2d apparent, 4-CH and 6-CH tyr), 6.72 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, 2-CH CLL), 4.67 (1H, m, CHNH), 3.75 (8H, s, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.63 (3H, s, OCH₃), 3.17 (2H, br m, CH₂NHCO), 2.92-3.17 (2H, m, CH₂CHNH), 2.53 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, CH₂CH₂Ph), 2.15 (4H, m apparent, CH₂NHCOCH₂ and CHNHCOCH₂), 1.84-1.95 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.28-1.58 (6H, #m, 3x CH₂). ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 172.4 (CONH), 172.2 (2C, CONH and COOCH₃), 155.5 (1-C tyr), 144.7 (1-C CLL), 131.1 (3-C tyr), 130.7 (4-C CLL), 129.5 (2C, 3-C CLL), 128.0 (2-C tyr), 123.6 (5-C tyr), 119.5 (4-C tyr), 115.1 (6-C tyr), 112.2 (2C, 2-C CLL), 53.2 (CHNH), 53.0 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 51.2 (OCH₃), 40.7 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 38.6, 35.4, 35.3, 34.0, 32.2, 29.0, 27.7, 25.8, 24.9. ESI+ HRMS: $[M + H]^+$ calculated for C₃₀H₄₂Cl₂N₃O₅ = 594.2496; found = 594.2488.

Spectral data for *N*-((6-*N*-chlorambucilamino)hexanoyl)-*L*-*m*-tyrosine methyl ester (**9a**, $m = 5$). IR (ATR, ν_{\max} , cm⁻¹): 3150-3450 (O-H and 2x N-H), 1745 (C=O, COOCH₃), 1638 (2x C=O, 2x NHCO), 1517 and 1217 (C-N-H). ¹H-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 8.66 (1H, s, OH), 7.24 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, CHNHCO), 7.16 (1H, m, CH₂NHCO), 7.09 (1H, t apparent, $J = 8.2$ Hz, 5-CH tyr), 7.07 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 3-CH CLL), 6.71 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 2-CH CLL), 6.64-6.75 (3H, m apparent, 2-CH tyr, 4-CH tyr and 6-CH tyr), 4.71 (1H, m, CHNH), 3.75 (8H, dt, $J = 1.2$ Hz and $J = 5.1$ Hz, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.66 (3H, s, OCH₃), 3.17 (2H, m, CH₂NHCO), 2.84-3.10 (2H, m, CH₂CHNH), 2.52 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, CH₂CH₂Ph), 2.18 (4H, m apparent, CH₂NHCOCH₂ and CHNHCOCH₂), 1.82-1.94 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.20-1.59 (6H, #m, 3x CH₂). ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 172.5 (CONH), 172.1 (CONH), 172.0 (COOCH₃), 157.6 (1-C tyr), 144.6 (1-C CLL), 138.6 (3-C tyr), 130.6 (4-C CLL), 129.5 (2C, 3-C CLL), 129.2 (5-C tyr), 120.1 (4-C tyr), 116.3 (2-C tyr), 113.8 (6-C tyr), 112.2 (2C, 2-C CLL), 53.3 (CHNH), 53.0 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 51.3 (OCH₃), 40.7 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 38.7, 37.4, 35.4 (2C), 34.0, 27.7, 26.1, 25.1. ESI+ HRMS: $[M + H]^+$ calculated for C₃₀H₄₂Cl₂N₃O₅ = 594.2496; found = 594.2491.

Spectral data for *N*-((6-*N*-chlorambucilamino)hexanoyl)-*L*-*p*-tyrosine methyl ester (**11a**, *m* = 5). The spectral data for this particular compound were reported elsewhere and are in accordance with the literature (Descoteaux et al. 2010).

Spectral data for *N*-((11-*N*-chlorambucilamino)undecanoyl)-*DL*-*o*-tyrosine methyl ester (**7a**, *m* = 10). IR (ATR, ν_{\max} , cm^{-1}): 3200-3400 (O-H and 2x N-H), 1749 (C=O, COOCH₃), 1645 and 1602 (2x C=O and 2x NHCO), 1520 and 1213 (C-N-H). ¹H-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 8.83 (1H, br s, OH), 7.31 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, CHNHCO), 7.03-7.12 (3H, m, CH₂NHCO, 3-CH tyr and 5-CH tyr), 7.07 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, 3-CH CLL), 6.69-6.89 (2H, m, 4-CH tyr and 6-CH tyr), 6.71 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, 2-CH CLL), 4.69 (1H, m, CHNH), 3.74 (8H, dt, *J* = 1.6 Hz and *J* = 5.1 Hz, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.62 (3H, s, OCH₃), 3.19 (2H, q, *J* = 5.9 Hz, CH₂NHCO), 2.90-3.16 (2H, m, CH₂CHNH), 2.52 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.17 (4H, m, CH₂NHCOCH₂ and CHNHCOCH₂), 1.82-1.90 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.25-1.54 (16H, #m and s, 8x CH₂). ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 172.3 (2C, 2x CONH), 172.1 (COOCH₃), 155.4 (1-C tyr), 144.7 (1-C CLL), 131.1 (3-C tyr), 130.7 (4-C CLL), 129.4 (2C, 3-C CLL), 128.0 (2-C tyr), 123.6 (5-C tyr), 119.4 (4-C tyr), 115.1 (6-C tyr), 112.2 (2C, 3-C CLL), 53.0 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 52.8 (CHNH), 51.1 (OCH₃), 40.7 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 38.8, 35.5, 35.3, 34.0, 33.7, 32.4, 29.5, 29.2, 29.1, 29.0, 28.8, 27.7, 26.6. ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₃₅H₅₂Cl₂N₃O₅ = 664.3279; found = 664.3271.

Spectral data for *N*-((11-*N*-chlorambucilamino)undecanoyl)-*L*-*m*-tyrosine methyl ester (**9a**, *m* = 10). IR (ATR, ν_{\max} , cm^{-1}): 3150-3400 (O-H and 2x N-H), 1745 (C=O, COOCH₃), 1642 and 1613 (2x C=O and 2x NHCO), 1517 and 1253 (C-N-H). ¹H-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 8.44 (1H, br s, OH), 7.26 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, CHNHCO), 7.10 (1H, m, CH₂NHCO), 7.04-7.13 (1H, m, 5-CH tyr), 7.06 (2H, d, *J* = 8.2 Hz, 3-CH CLL), 6.71 (2H, d, *J* = 9.0 Hz, 2-CH tyr), 6.65-6.75 (3H, m, 2-CH tyr, 4-CH tyr and 6-CH tyr), 4.69 (1H, m, CHNH), 3.74 (8H, dt, *J* = 1.6 Hz and *J* = 5.1 Hz, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.65 (3H, s, OCH₃), 3.19 (2H, q, *J* = 5.9 Hz, CH₂NHCO), 2.83-3.10 (2H, m, CH₂CHNH), 2.51 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.16 (4H, 2t overlapped, *J* = 7.2 Hz, CH₂NHCOCH₂ and CHNHCOCH₂), 1.81-1.92 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.25-1.55

(16H, #m and s, 8x CH₂). ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 172.2 (CONH), 172.1 (2C, COOCH₃ and CONH), 157.5 (1-C tyr), 144.6 (1-C CLL), 138.6 (3-C tyr), 130.7 (4-C CLL), 129.5 (2C, 3-C CLL), 129.2 (5-C tyr), 120.1 (4-C tyr), 116.1 (2-C tyr), 113.6 (6-C tyr), 112.2 (2C, 3-C CLL), 53.4 (CHNH), 53.0 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 51.3 (OCH₃), 40.7 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 38.8, 37.4, 35.5, 35.3, 34.0, 29.6, 29.2, 29.1, 28.9, 27.7, 26.7, 25.4. ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₃₅H₅₂Cl₂N₃O₅ = 664.3279; found = 664.3270.

Spectral data for *N*-((11-*N*-chlorambucilamino)undecanoyl)-*L*-*p*-tyrosine methyl ester (**11a**, *m* = 10). The spectral data for this particular compound were reported elsewhere and are in accordance with the literature (Descoteaux et al. 2010).

General procedure for the preparation of N-((N-chlorambucilamino)alcanoyl)-DL-o-, L-m- and L-p-tyrosinol (7b, 9b and 11b):

The *N*-((*N*-chlorambucilamino)alcanoyl)-tyrosine methyl ester (**7a**, **9a** or **11a**) (0.12 mmol) was dissolved in diethyl ether and dichloromethane and was stirred under nitrogen atmosphere. The resulting solution was cooled down with an ice and water bath; afterwards lithium borohydride (0.73 mmol) was added. The mixture was kept at 0°C for 3 h. Afterwards, sodium sulfate decahydrate (0.3 g) was added. Work-up was done by diluting with diethyl ether and washing the organic phase with saturated ammonium chloride solution (2x) and with water (4x). The organic phase was dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated. The product was purified by flash chromatography (hexanes: acetone, 3: 2) to give a pure compound in 82% yield.

Spectral data for *N*-((6-*N*-chlorambucilamino)hexanoyl)-*DL*-*o*-tyrosinol (**7b**, *m* = 5). IR (ATR, ν_{\max} , cm⁻¹): 3100-3400 (2x O-H and 2x N-H), 1638 (2x C=O, 2x NHCO), 1520 and 1242 (C-N-H). ¹H-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 9.16 (1H, br s, OH), 7.37 (1H, d, *J* = 6.6 Hz, CHNHCO), 7.17 (1H, br t, *J* = 5.1 Hz, CH₂NHCO), 7.02-7.11 (2H, *m* apparent, 3-CH tyr and 5-CH tyr), 7.06 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, 3-CH CLL), 6.70-6.88 (2H, *m* apparent, 4-CH tyr and 6-CH tyr), 6.71 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, 2-CH CLL), 4.01

(1H, m, CHNH), 3.89 (1H, m, CH₂OH), 3.74 (8H, dt, J = 1.6 Hz and J = 5.1 Hz, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.51 (2H, d apparent, J = 5.8 Hz, CH₂OH), 3.19 (2H, dq, J = 1.8 Hz and J = 6.8 Hz, CH₂NHCO), 2.71-2.93 (2H, m, CH₂CHNH), 2.51 (2H, t, J = 7.4 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.19 (4H, m apparent, CH₂NHCOCH₂ and CHNHCOCH₂), 1.78-1.93 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.27-1.67 (6H, #m, 3x CH₂). ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 173.8 (CONH), 172.4 (CONH), 156.0 (1-C tyr), 144.7 (1-C CLL), 131.0 (4-C CLL), 130.7 (3-C tyr), 129.5 (2C, 3-C CLL), 127.7 (5-C tyr), 124.7 (2-C tyr), 119.3 (4-C tyr), 115.7 (6-C tyr), 112.2 (2C, 2-C CLL), 62.6 (CH₂OH), 53.2 (CHNH), 53.0 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 40.8 (2x C, 2x NCH₂CH₂Cl), 38.6, 35.7, 35.4, 34.0, 31.8, 29.2, 27.7, 26.1, 25.1. ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₂₉H₄₂Cl₂N₃O₄ = 566.2547; found = 566.2540.

Spectral data for *N*-((6-*N*-chlorambucilamino)hexanoyl)-*L*-*m*-tyrosinol (**9b**, *m* = 5). IR (ATR, ν_{max}, cm⁻¹): 3100-3400 (2x O-H and 2x N-H), 1683 (2x C=O, 2x NHCO), 1520 and 1253 (C-N-H). ¹H-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 8.59 (1H, s, OH), 7.20 (1H, br t, J = 5.3 Hz, CH₂NHCO), 7.07 (1H, t, J = 7.4 Hz, 5-CH tyr), 7.06 (2H, d, J = 8.6 Hz, 3-CH CLL), 6.98 (1H, d, J = 8.5 Hz, CHNHCO), 6.64-6.76 (3H, m, 2-CH tyr, 4-CH tyr and 6-CH tyr), 6.71 (2H, d, J = 8.5 Hz, 2-CH CLL), 4.13 (2H, m, CHNH and CH₂OH), 3.74 (8H, dt, J = 1.2 Hz and J = 5.1 Hz, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.52 (2H, t, J = 5.1 Hz, CH₂OH), 3.16 (2H, m, CH₂NHCO), 2.64-2.91 (2H, m, CH₂CHNH), 2.51 (2H, t, J = 7.6 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.14 (4H, m apparent, CH₂NHCOCH₂ and CHNHCOCH₂), 1.82-1.89 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.20-1.58 (6H, #m, 3x CH₂). ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 172.51 (CONH), 172.46 (CONH), 157.5 (1-C tyr), 144.6 (1-C CLL), 140.5 (3-C tyr), 130.6 (4-C CLL), 129.5 (2C, 3-C CLL), 129.0 (5-C tyr), 120.3 (4-C tyr), 116.3 (2-C tyr), 113.1 (6-C tyr), 112.2 (2C, 2-C CLL), 63.4 (CH₂OH), 53.0 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 52.8 (CHNH), 40.8 (2x C, 2x NCH₂CH₂Cl), 38.7 (CH₂NHCO), 36.8 (CH₂CHNH), 35.9 (CHNHCOCH₂), 35.6 (CH₂CH₂Ph), 35.4 (CH₂NHCOCH₂), 34.0, 27.7, 26.2, 25.3. ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₂₉H₄₂Cl₂N₃O₄ = 566.2547; found = 566.2541.

Spectral data for *N*-((6-*N*-chlorambucilamino)hexanoyl)-*L-p*-tyrosinol (**11b**, *m* = 5). The spectral data for this particular compound were reported elsewhere and are in accordance with the literature (Descoteaux et al. 2010).

Spectral data for *N*-((11-*N*-chlorambucilamino)undecanoyl)-*DL-o*-tyrosinol (**7b**, *m* = 10). IR (ATR, ν_{\max} , cm^{-1}): 3100-3400 (2x O-H and 2x N-H), 1631 (2x C=O, NHCO), 1524 and 1246 (C-N-H). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 9.11 (1H, s, OH), 7.36 (1H, d, *J* = 5.9 Hz, CHNHCO), 7.02-7.10 (3H, m, 3-CH tyr, 5-CH tyr and CH₂NHCO), 7.07 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, 3-CH CLL), 6.68-6.86 (2H, m, 4-CH tyr and 6-CH tyr), 6.71 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, 2-CH CLL), 4.11 (1H, m, CHNH), 3.74 (8H, dt, *J* = 1.6 Hz and *J* = 5.1 Hz, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.58 (2H, br d, *J* = 5.1 Hz, CH₂OH), 3.18 (2H, q, *J* = 5.8 Hz, CH₂NHCO), 2.70-2.93 (3H, m and br s, CH₂CHNH and CH₂OH), 2.52 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.22 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, CH₂NHCOCH₂), 2.16 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, CHNHCOCH₂), 1.81-1.93 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.29-1.59 (16H, #m and s, 8x CH₂). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 173.9 (CONH), 172.0 (CONH), 156.0 (1-C tyr), 144.7 (1-C CLL), 130.9 (4-C CLL), 130.7 (3-C tyr), 129.4 (2C, 3-C CLL), 127.7 (5-C tyr), 124.6 (2-C tyr), 119.2 (4-C tyr), 115.8 (6-C tyr), 112.2 (2C, 2-C CLL), 62.3 (CH₂OH), 53.1 (CHNH), 53.0 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 40.7 (2x C, 2x NCH₂CH₂Cl), 38.8, 35.7, 35.3, 34.0, 31.9, 29.6, 29.2 (3C), 29.0 (2C), 26.7. ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₃₄H₅₂Cl₂N₃O₄ = 636.3329; found = 636.3318.

Spectral data for *N*-((11-*N*-chlorambucilamino)undecanoyl)-*L-m*-tyrosinol (**9b**, *m* = 10). IR (ATR, ν_{\max} , cm^{-1}): 3100-3400 (2x O-H and 2x N-H), 1634 (2x C=O, NHCO), 1520 and 1246 (C-N-H). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 8.45 (1H, s, OH), 7.14 (1H, br t apparent, CH₂NHCO), 7.07 (1H, t, *J* = 7.6 Hz, 5-CH tyr), 7.06 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, 3-CH CLL), 6.97 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, CHNHCO), 6.65-6.77 (3H, m, 2-CH tyr, 4-CH tyr and 6-CH tyr), 6.71 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, 2-CH CLL), 4.08 (1H, m, CHNH), 3.74 (8H, dt, *J* = 1.6 Hz and *J* = 5.1 Hz, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.52 (2H, t, *J* = 5.1 Hz, CH₂OH), 3.19 (2H, q, *J* = 6.5 Hz, CH₂NHCO), 2.92 (1H, s, CH₂OH), 2.65-2.91 (2H, m, CH₂CHNH), 2.52 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.13 (4H, m apparent, CH₂NHCOCH₂ and CHNHCOCH₂), 1.82-1.93 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph),

1.25-1.56 (16H, #m and s, 8x CH₂). ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 172.5 (CONH), 172.2 (CONH), 157.5 (1-C tyr), 144.6 (1-C CLL), 140.6 (3-C tyr), 130.7 (4-C CLL), 129.5 (2C, 3-C CLL), 129.0 (5-C tyr), 120.3 (4-C tyr), 116.2 (2-C tyr), 113.1 (6-C tyr), 112.2 (2C, 2-C CLL), 63.3 (CH₂OH), 53.0 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 52.8 (CHNH), 40.7 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 38.8, 36.8, 36.0, 35.4, 34.0, 29.6, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 27.7, 26.7, 25.6. ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₃₄H₅₂Cl₂N₃O₄ = 636.3329; found = 636.3326.

Spectral data for *N*-((11-*N*-chlorambucilamino)undecanoyl)-*L*-*p*-tyrosinol (**11b**, *m* = 10). The spectral data for this particular compound were reported elsewhere and are in accordance with the literature (Descoteaux et al. 2010).

Biology

In vitro cytotoxic activity

The cytotoxicity of the tyrosine-chlorambucil regioisomers (**6a-11a** and **6b-11b**, *m* = 5 or 10) was evaluated on MCF-7 (ER⁺) and MDA-MD-231 (ER⁻) breast cancer cell lines. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-phenyl-tetrazolium bromide) assay, a standard colorimetric test, was used for measuring cellular proliferation (Carmichael et al. 1987). Briefly, tumor cell lines were added into 96-well tissue culture plates in culture medium and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Dilutions were done using cremophore: ethanol (1: 1) solution. Cells were incubated with or without drugs for 72 h. Culture plates were processed using MTT for 3.5 h afterwards SDS solubilisation solution (HCl 0.010 M, sodium dodecyl sulfate solution 10%) was added. The absorbance was read using a scanning multiwell spectrophotometer (FLUOStar OPTIMA) at 565 nm. All measurements were carried in triplicates. The results were compared with those of a control reference plate fixed on the treatment day, and the growth inhibition percentage was calculated for each drug contact period.

Molecular modelling

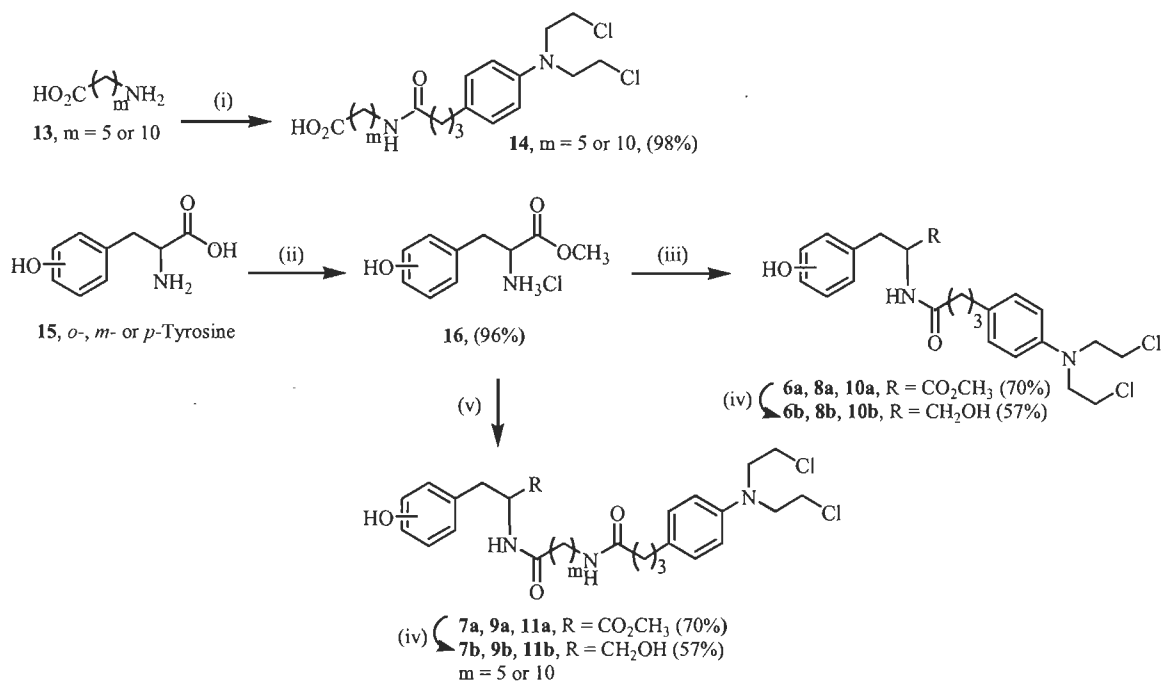
17 β -estradiol (**2**), L-*o*-N-acetyltyrosinol (**12**, *ortho*-), L-*m*-N-acetyltyrosinol (**12**, *meta*-) and L-*p*-N-acetyltyrosinol (**12**, *para*-), our model compounds, were docked into the ER α . This was done using ArgusDock docking engine, implemented in ArgusLab 4.0. This software is freely distributed for Windows platforms by Planaria Software (<http://www.ArgusLab.com>) (Thompson, 2004). Although lagging behind in accuracy when compared to other docking programs, previous research proved that results from ArgusLab are biologically meaningful (Joy et al. 2006). The crystal structure of ER α in complexation with 17 β -estradiol (1A52) was extracted from the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) (Tanenbaum et al. 1998; Berman et al. 2000). Ions, ligands and subunits not involved in the ligand binding were removed from the original structure file. The receptor input pdb file was then generated. Separately, ligands files were prepared. The *N*-acetyl-tyrosinols (**12**) (Fig. 3) were used as a model for two main reasons: 1) smaller ligand involve less calculation time and more accurate results and 2) the *N*-acetyl-tyrosinol derivatives show similarities with our final tyrosine-chlorambucil hybrid molecules. For each ligand (17 β -estradiol (**2**), L-*o*-, L-*m*- and L-*p*-N-acetyltyrosinol (**12**)), structural optimization was performed according to molecular mechanics (MM2) calculations with ChemBio3D Ultra 11.0 program. Even if the synthesis was achieved with a mixture of DL-*ortho*-tyrosine precursor, the pure L-*o*-tyrosinol enantiomer was chosen for docking calculations. The resulting ligand file was saved as a pdb file. Next, in ArgusLab, the binding site was defined. ArgusDock search docking engine was used with a grid resolution of 0.40 Å. Then, docking calculations were performed with a flexible ligand mode.

Results and discussion

Synthesis of tyrosine-chlorambucil hybrid regioisomers

The synthesis of regioisomers **6-11** was accomplished using the convergent synthesis previously reported for the *para*-tyrosine-chlorambucil series (Descoteaux et al. 2010) (Scheme 1). The ease of synthesis and the excellent global yields obtained in our

previous study encourage us to use this methodology for the two other commercially available regioisomers of tyrosine (*ortho*- and *meta*-). Moreover, as proved in our earlier study, the initial stereochemistry of the amino acids (with *D*- or *L*-*para*-tyrosine) was maintained all along the synthesis, giving optically pure final compounds (Descoteaux et al. 2010). For this study, *DL*-*ortho*-tyr and *L*-*meta*-tyr are used as the starting material. So, the stereochemistry of the final hybrids made from *L*-*meta*-tyrosine was maintained during the course of the synthesis.



Reagents: i) 1. HMDS, H₂SO₄ cat., DCM, triethylamine, TMSCl; 2. CLL, HOBt, DCC, triethylamine, DMF;
 (ii) MeOH, SOCl₂; (iii) CLL, HOBt, DCC, triethylamine, DMF; (iv) LiBH₄, Et₂O, 0°C to 22°C; (v) 14, $m = 5$ or 10 , HOBt, DCC, triethylamine, DMF.

Scheme 1. Synthesis of tyrosine-chlorambucil hybrid regioisomers (6a-11a and 6b-11b)

6-Aminohexanoic acid (**13**, $m = 5$) and 11-aminoundecanoic acid (**13**, $m = 10$) were first coupled to chlorambucil (**1**). Thus, chlorambucil (**1**) was activated (with isobutylchloroformate (ClCO₂^tBu)) and then coupled to the amino acid function using hexamethyldisilazane and trimethylsilyl chloride in acidic conditions. Separately, *DL*-*o*-tyrosine (**15**, *ortho*-), *L*-*m*-tyrosine (**15**, *meta*-) and *L*-*p*-tyrosine (**15**, *para*-) were transformed into the corresponding methyl ester hydrochloride salt (**16**) with thionyl

chloride in methanol. The corresponding tyrosine methyl ester hydrochloride salts were obtained in 96 to 100 % yield. Then, under standard reaction conditions (HOBt and DCC), the resulting tyrosine esters were coupled to chlorambucil (**1**) via an amide function giving the tyrosine-chlorambucil hybrids without spacer. Purification gave compounds **6a**, **8a** and **10a** in 68%, 81% and 81% yield, respectively. The tyrosine methyl esters (**16**) were also linked to chlorambucil (**1**) via an alkyl chain spacer. The six carbon atoms and the eleven carbon atoms derivatives prepared earlier (**14**, $m = 5$ or 10) were coupled to the tyrosine ester (**16**) moiety. Again, standard reaction conditions (HOBt and DCC) were used for the coupling reaction. Subsequently, purification gave compounds **7a** ($m = 5, 10$), **9a** ($m = 5, 10$) and **11a** ($m = 5, 10$) in good yields (about 72%). Finally, all tyrosine-chlorambucil methyl ester derivatives (**6a**, **7a**, **8a**, **9a**, **10a**, and **11a**) were submitted to selective reduction of the ester function with lithium borohydride in dry diethyl ether. The corresponding tyrosinol-chlorambucil hybrids (**6b**, **7b**, **8b**, **9b**, **10b** and **11b**) were obtained in good to excellent yields (36 to 88%). All the new compounds were fully characterized by their respective IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and mass spectra.

In vitro biological activity

All the DL-*o*-, L-*m*- and L-*p*-tyrosine-chlorambucil hybrid regioisomers (**6-11**) were evaluated for their cytotoxic activity on estrogen-receptor positive (MCF-7, ER⁺) and estrogen-receptor negative (MDA-MB-231, ER⁻) tumor cell lines using the MTT colorimetric assay (Carmichael et al. 1987). Chlorambucil (**1**) was used as the control on both human mammary carcinomas.

As shown by the MTT assays, all the derivatives tested were more cytotoxic than the parent drug, chlorambucil (from 1.7 to 7.4 times), on both breast cancer cell lines (Tables 1 and 2). The methyl ester (**6a-11a**) ($m = 5, 10$) as well as the tyrosinol (**6b-11b**) ($m = 5, 10$) derivatives presented comparable biological activity. Chlorambucil is a known bis-alkylation agent which forms covalent adducts with DNA (Armitage 1993). It can initiate apoptosis regardless of the presence or absence of the ER protein. However, the new tyrosine-chlorambucil hybrids show greater activity than chlorambucil (**1**) itself,

which is already used for solid breast cancer treatments. This could reveal a possible beneficial role of the tyrosine ligand to target the drug where it is needed. Thus, the objective to increase the activity of chlorambucil by using an estrogen-like ligand was achieved. This particular molecular combination could possibly diversify the use for this type of nitrogen-mustard anticancer agent in the future.

The new tyrosine-chlorambucil hybrids were active on both breast cancer cell lines (ER⁺ and ER⁻). This can be explained by the complexity of the protein contents of these cell types. The hormone-independent MDA-MB-231 cancer cell line does not express the ER α protein, unlike the MCF-7 cell line. However, other similar proteins, which can be ER subtypes, are also present in ER⁻ cell lines. A possible interaction of the tyrosine with one (or more) of these proteins could explain the activity observed on ER⁻ cells with the tyrosine derivatives. Moreover, the new tyrosine-chlorambucil molecules, being bis-alkylating agents, show the same pattern of activity *in vitro* than chlorambucil. They are active on both cell types. It is important to indicate that the desired selectivity towards ER⁺ cancer cells might be expressed more clearly *in vivo* as it was previously reported for other anticancer agents (Otto et al. 1991; Karl et al. 1988).

Table 1

Cytocidal activity of tyrosine-chlorambucil regioisomers (**6a-11a** and **6b-11b**, $m = 5, 10$) on estrogen receptor positive (ER⁺) MCF-7 breast cancer cell lines

Compound	DL- <i>o</i>		Compound	L- <i>m</i>		Compound	L- <i>p</i>	
	IC ₅₀ , μM ^a	CLL ratio		IC ₅₀ , μM ^a	CLL ratio		IC ₅₀ , μM ^a	CLL ratio
6a	52.63 ± 4.68	2.48	8a	17.72 ± 1.27	7.36	10a	31.92 ± 0.89	4.08
6b	20.54 ± 1.97	6.35	8b	23.42 ± 2.94	5.57	10b	34.11 ± 2.04	3.82
7a , $m = 5$	44.97 ± 3.93	2.90	9a , $m = 5$	18.63 ± 2.32	7.00	11a , $m = 5$	25.43 ± 2.06	5.13
7b , $m = 5$	43.71 ± 5.37	2.98	9b , $m = 5$	48.31 ± 1.36	2.70	11b , $m = 5$	62.16 ± 5.50	2.10
7a , $m = 10$	NR	-----	9a , $m = 10$	41.00 ± 3.97	3.18	11a , $m = 10$	67.90 ± 8.68	1.92
7b , $m = 10$	47.73 ± 3.61	2.73	9b , $m = 10$	21.68 ± 2.63	6.01	11b , $m = 10$	19.39 ± 2.66	6.72
1				130.36 ± 2.92				

^aInhibitory concentration (IC₅₀, μM) as obtained by the MTT assay. Experiments were performed in duplicates and the results represent the mean ± SEM of three independent experiments. The cells were incubated for a period of 72 h

Table 2

Cytocidal activity of tyrosine-chlorambucil regioisomers (**6a-11a** and **6b-11b**, $m = 5, 10$) on estrogen receptor negative (ER⁻) MDA-MB-231 breast cancer cell lines

Compound	DL- <i>o</i>		Compound	L- <i>m</i>		Compound	L- <i>p</i>	
	IC ₅₀ , μM ^a	CLL ratio		IC ₅₀ , μM ^a	CLL ratio		IC ₅₀ , μM ^a	CLL ratio
6a	57.45 ± 5.38	2.38	8a	32.24 ± 2.85	4.24	10a	37.83 ± 1.52	3.62
6b	26.47 ± 2.09	5.17	8b	28.71 ± 3.51	4.77	10b	39.57 ± 2.40	3.46
7a , $m = 5$	38.18 ± 2.77	3.58	9a , $m = 5$	34.01 ± 3.37	4.02	11a , $m = 5$	36.81 ± 3.97	3.72
7b , $m = 5$	33.97 ± 3.19	4.03	9b , $m = 5$	45.07 ± 5.04	3.04	11b , $m = 5$	55.09 ± 5.33	2.48
7a , $m = 10$	NR	-----	9a , $m = 10$	63.03 ± 4.00	2.17	11a , $m = 10$	NR	-----
7b , $m = 10$	79.37 ± 6.54	1.72	9b , $m = 10$	71.83 ± 5.65	1.91	11b , $m = 10$	NR	-----
1				136.85 ± 6.79				

^a Inhibitory concentration (IC₅₀, μM) as obtained by the MTT assay. Experiments were performed in duplicates and the results represent the mean ± SEM of three independent experiments. The cells were incubated for a period of 72 h

Aforementioned, this study was undertaken in order to verify the influence of the position of the phenol hydroxyl group on the biological activity. Interestingly, among all the regioisomers tested, compound **8a**, with the phenol group located in *meta* position, showed the most significant cytotoxic activity (7.36 times more active than chlorambucil (**1**)). Generally, all the L-*m*-tyrosine methyl ester derivatives are more active than their corresponding DL-*o*- and their L-*p*- analogs. Furthermore, in most cases, the L-*m*-tyrosine-chlorambucil hybrids reveals to be slightly more specific (more active) on hormone-dependent breast cancer cells compared to hormone-independent breast cancer cells. This specificity could be explained by the phenol group in *meta* position, which could possibly adopt a structure which favors better orientation and stronger interactions within the ER α compared to the other two regioisomers (*ortho* and *para*). Otherwise, the location of the phenol group itself (*ortho*-, *meta*- or *para*-) might play a role in the overall cytotoxic activity observed with these various hybrids. Indeed, it is reported that *m*-tyrosine is significantly more phytotoxic than its structural isomers *o*- and *p*-tyrosine (Bertin et al. 2007). Furthermore, it is reported that phenolic compounds exhibiting antioxidant properties can contribute to the destruction of cancer cells (Durand et al. 2009). The slightly greater activity observed for the *m*-tyrosine regioisomer might be explained by these factors being more important for the *meta* isomer compared to the *ortho* and *para* isomers.

Some molecules (**9a**, **9b**, **11a** and **11b**) ($m = 5$) have been submitted to estrogen receptor alpha affinity evaluation. Even if these specific molecules presented non negligible cytotoxic activity, only very little affinity was observed experimentally. Consequently, further investigations will be done to elucidate the exact mode of action of these novel tyrosine-chlorambucil hybrids.

Docking

To the best of our knowledge, to date, no study have been performed in order to verify if tyrosine can theoretically bind into the ER α pocket. In attempt to explain the mode of binding, preliminary molecular docking calculations have been done using Arguslab

program. This was done in order to verify if the amino acid skeleton could assume an orientation close to specific residue (Arg394, Glu353 and His524) within the ER α and, by doing so, establish H bonding interactions as estradiol. Such interactions could allow the tyrosine moiety reach cells expressing ER α and then allow chlorambucil to act on cancer cells more specifically.

In light of our molecular modeling results, the three regioisomers (L-*o*-, L-*m*- and L-*p*-*N*-acetyltyrosinol, (**12**)) seem to be oriented in different ways into the ER α binding pocket (Fig. 3). Figure 3a shows the native ligand, 17 β -estradiol (**2**), within the active site of the ER α . The *m*-tyrosinol derivative (**12**, *meta*-) (Fig. 3b) adopts a conformation similar to that of estradiol (Fig. 3a). The docking calculations demonstrate that the phenol group of the *m*-tyrosinol is located in the A-ring region of estradiol, near residues Arg394 and Glu353. Beside, the same docking calculations were performed with the *para* regioisomer (**12**, *para*-). This time, the same phenol group appears to be close to the His524 residue (Fig. 3c) an orientation completely opposite to that observed with *m*-tyrosinol. The L-*o*-*N*-acetyltyrosinol (**12**, *ortho*-) behaves as its *para* regioisomer (figure not shown). Hence, these results demonstrate that the *meta*-tyrosine derivative mimics the estradiol ligand much better than its *ortho* and *para* analogs. Also, all *N*-acetyltyrosine methyl esters were docked into the ER α . Each molecule behaves as its corresponding *ortho*, *meta* or *para* tyrosinol analog (**12**) where, in each cases, the phenol group is oriented similarly into the ER α pocket (figure not shown). The *m*-tyrosine ester derivative still positions itself into the ER α like the natural ligand. Of note, the docking of the various tyrosinol and tyrosine ester derivatives led repeatedly to the same results.

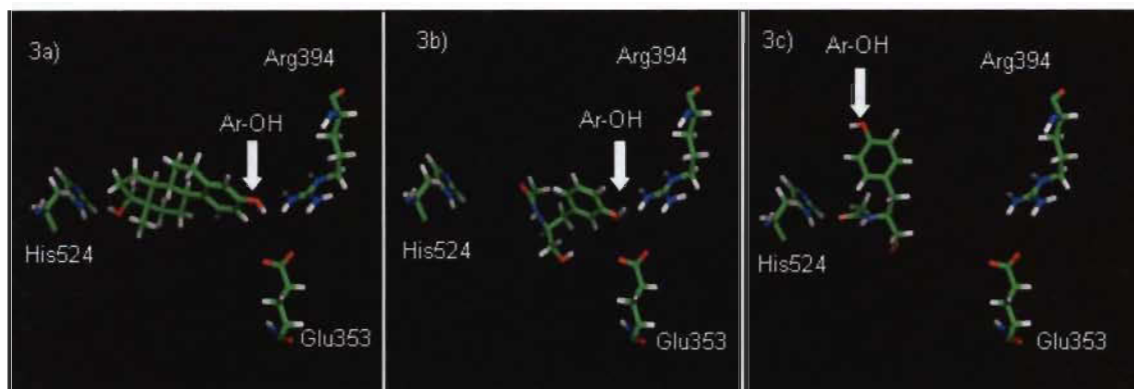


Figure 3. 17β -estradiol (**2**), L-*m*- (**12**, *meta*-) and L-*p*- (**12**, *para*-) *N*-acetyltyrosinol within the active site of the ER α . The main interactions are occurring on ring A of the steroid nucleus (**3a**) or on the aromatic hydroxy group (Ar-OH) of the tyrosinol derivatives (**3b** and **3c**)

Furthermore, the tyrosine ligand is much smaller than estradiol. It is already known that the hydroxyl functions on the estrogenic nucleus are involved in the receptor recognition (Gabano et al. 2005). It is also known that the optimal distance between the two polar regions (3-OH and 17β -OH) should be approximately 11Å to achieve suitable binding (Muthyala et al. 2003). Probably, the distance between the two polar regions of the tyrosine unit studied (between Ar-OH and $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ for the tyrosine methyl ester analogs or between Ar-OH and $-\text{CH}_2\text{OH}$ for the tyrosinol analogs) are not sufficiently distant to allow H bonding interactions being formed between the ligand and all the known ER α binding sites (Arg394, Glu353 and His524). So, molecules with polar regions more distant from each other would possibly fit much better into the ER α binding cavity.

Conclusion

Regiosomers of tyrosine were coupled to chlorambucil (**1**), directly or via a 5 carbon or a 10 carbon atoms spacer. Eighteen compounds were synthesized in 38 to 67% overall yield using an efficient synthetic methodology. The association of tyrosine to chlorambucil gave compounds with higher cytotoxicity than chlorambucil itself when tested on human breast cancer cell lines. One goal of this study was to verify the

influence of the phenol group location on the biological activity of the new compounds. The *m*-tyrosine-chlorambucil hybrids (**6** and **8**, $m = 5, 10$) showed greater cytotoxicity compared to the other regioisomers. Moreover, the *m*-tyrosine molecules were slightly more specific for hormone-dependent cancer cells. Docking calculations gave us insight to the mode of binding of the *m*-tyrosine derivatives. The *m*-tyrosine regioisomer seems to mimic closely the 3-OH group of estradiol into the ER α pocket when compared to the two other regioisomers. This can explain, in part, the greater biological activity observed for the *meta* regioisomer. Also, the antioxidant properties of the *meta* phenolic compounds could contribute to the overall cytotoxicity. This exploratory study also suggests that larger ligands could fit more adequately into the ER α binding cavity. Hence, a second series of bulkier tyrosine-chlorambucil hybrids are presently designed in our laboratory in order to obtain ligand with enhanced affinity for the ER α .

Acknowledgments

The authors wish to thank the Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies du Québec (FQRNT) for essential financial support. The NSERC student fellowship for Caroline Descôteaux is gratefully acknowledged.

References

Armitage JO (1993) Leukeran^R (Chlorambucil). In Borroughs Wellcome Co (ed) Current Clinical Guide, 2nd edn. Oncology Products Wellcome Oncology NMC Publ. Inc., New York, p.37

Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28 (1): 235-242

Bertin C, Weston LA, Huang T, Jander G, Owens T, Meinwald J, Schroeder FC (2007) Grass roots chemistry: meta-Tyrosine, an herbicidal nonprotein amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (43): 16964

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47 (4): 936-942

Chrzanowski K, Bielawska A, Palka J (2003) Proline analogue of melphalan as a prodrug susceptible to the action of prolidase in breast cancer MDA-MB-231 cells. *Farmaco* 58 (11): 1113-1119

Contino-Pépin C, Parat A, Périno S, Lenoir C, Vidal M, Galons H, Karlik S, Pucci B (2009) Preliminary biological evaluations of new thalidomide analogues for multiple sclerosis application. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19 (3): 878-881

Demyttenaere-Kovatcheva A, Cronin MTD, Benfenati E, Roncaglioni A, LoPiparo E (2005) Identification of the Structural Requirements of the Receptor-Binding Affinity of Diphenolic Azoles to Estrogen Receptors α and β by Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship and Structure-Activity Relationship Analysis. *J Med Chem* 48(24): 7628-7636

Descoteaux C, Leblanc V, Brasseur K, Gupta A, Asselin E, Berube G (2010) Synthesis of D- and L-tyrosine-chlorambucil analogs active against breast cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20 (24):7388-7392. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.10.039

Durand G, Prosak RA, Han Y, Ortial S, Rockenbauer A, Pucci B, Villamena FA (2009) Spin Trapping and Cytoprotective Properties of Fluorinated Amphiphilic Carrier Conjugates of Cyclic versus Linear Nitrones. *Chemical research in toxicology* 22 (9): 1570-1581

Gabano E, Cassino C, Bonetti S, Prandi C, Colangelo D, Ghiglia A, Osella D (2005) Synthesis and characterisation of estrogenic carriers for cytotoxic Pt(II) fragments : biological activity of the resulting complexes. *Org Biomol Chem* 3 (19): 3531-3539. doi: 10.1039/b507716h

Gengrinnovitch S, Izakovich E (2005) Conjugates of amino acids with drugs or with imaging agents for cancer therapy and diagnosis Israel Patent, WO 2005072061

Gupta A, Saha P, Descoteaux C, Leblanc V, Asselin E, Berube G (2010) Design, synthesis and biological evaluation of estradiol-chlorambucil hybrids as anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20 (5): 1614-1618. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.01.053

Gust R, Beck W, Jaouen G, Schönenberger H (2009) Optimization of cisplatin for the treatment of hormone dependent tumoral diseases : Part 1 : Use of steroidal ligands. *Coordination Chemistry Reviews* 253 (21-22):2742-2759. doi: 10.1016/j.ccr.2009.02.025

Joy S, Nair PS, Hariharan R, Pillai MR (2006) Detailed comparison of the protein-ligand docking efficiencies of GOLD, a commercial package and ArgusLab, a licensable freeware. *In Silico Biol* 6 (6): 601-605

Karl J, Gust R, Spruss T, Schneider MR, Schoenenberger H, Engel J, Wrobel KH, Lux F, Haeblerlin ST (1988) Ring-substituted [1, 2-bis (4-hydroxyphenyl) ethylenediamine] dichloroplatinum (II) complexes: compounds with a selective effect on the hormone-dependent mammary carcinoma. *J Med Chem* 31 (1): 72-83

Magrath IT (1994) Targeted approaches to cancer therapy. *Int J Cancer* 56 (2): 163-166

Muthyala RS, Carlson KE, Katzenellenbogen JA (2003) Exploration of the bicyclo[3.3.1]nonane system as a template for the development of new ligands for the estrogen receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13 (24): 4485-4488

Ortial S, Durand G, Poeggeler B, Polidori A, Pappolla MA, Böker J, Hardeland R, Pucci B (2006) Fluorinated amphiphilic amino acid derivatives as antioxidant carriers : a new class of protective agents. *J Med Chem* 49 (9): 2812-2820

Otto AM, Faderl M, Schönenberger H (1991) Dissociation of estrogenic and cytotoxic properties of an estrogen receptor-binding platinum complex in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 51 (12): 3217

Palmer AJ, Wallace HM (2010) The polyamine transport system as a target for anticancer drug development. *Amino acids* 38 (2): 415-422

Perrin D, Armarego W (1988) Purification of laboratory chemicals. Pergamon Press edn., Oxford

Sachdeva MS (1998) Drug targeting systems for cancer chemotherapy. *Expert Opin Investig Drugs* 7 (11): 1849-1864. doi: 10.1517/13543784.7.11.1849

Shanle EK, Xu W (2010) Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62 (13): 1265-1276. doi: 10.1016/j.addr.2010.08.001

Still W, Kahn M, Mitra A (1978) Rapid chromatographic techniques for preparative separation with moderate resolution. *J Org Chem* 43(14): 2923

Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB (1998) Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (11): 5998-6003

Thompson MA Molecular docking using ArgusLab, an efficient shape-based search algorithm and the AScore scoring function. In: ACS meeting, Philadelphia, 2004

Thompson MA ArgusLab 4.0. Seattle

Van Themsche C, Parent S, Leblanc V, Descoteaux C, Simard AM, Berube G, Asselin E (2009) VP-128, a novel oestradiol-platinum(II) hybrid with selective anti-tumour activity towards hormone-dependent breast cancer cells in vivo. *Endocr Relat Cancer* 16 (4): 1185-1195. doi: 10.1677/ERC-09-0113

CHAPITRE IV

DESIGN DE NOUVELLES MOLÉCULES HYBRIDES TYROSINE-MOUTARDE AZOTÉE ACTIVES SUR LES LIGNÉES CELLULAIRES CANCÉREUSES DE L'UTÉRUS, DE L'OVAIRE ET DU SEIN

Caroline Descôteaux, Kevin Brasseur, Valérie Leblanc, Sophie Parent, Éric Asselin et Gervais Bérubé*

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue Steroids. La référence de cet article est la suivante : Steroids (2012) 77: 403-412.

DOI 10.1016/j.steroids.2011.12.021

4.1 Contribution des auteurs

La majeure partie des travaux présentés fut réalisée par Caroline Descôteaux, sous la supervision des Drs Bérubé et Asselin. La synthèse chimique de l'ensemble des molécules a été effectuée par celle-ci. L'évaluation biologique fut également réalisée par Caroline Descôteaux et Kevin Brasseur, avec le soutien de Valérie Leblanc. Des essais préliminaires d'affinité pour le récepteur estrogénique alpha (non présentés) ont été effectués par Sophie Parent. Première auteure de cette publication, Caroline Descôteaux a rédigé, soumis, corrigé le manuscrit et répondu aux interrogations et suggestions des examinateurs sous la supervision du Dr Bérubé.

4.2 Résumé

La L-*para*-tyrosine fut liée l'*ortho*-hydroxyaniline, à la *méta*-hydroxyaniline et à la *para*-hydroxyaniline formant trois molécules tyrosinamides distinctes. Les nouveaux dérivés d'acide aminé au squelette élargi ont été construits dans le but d'imiter, en

partie, l'estradiol (hormone sexuelle féminine naturelle, E2). Les tyrosinamides résultant furent ensuite liés au chlorambucil soit directement, ou via une chaîne de 5 ou 10 atomes de carbone. Cela fut réalisé dans le but de cibler les cellules cancéreuses exprimant le récepteur estrogénique alpha ($RE\alpha$) et pour obtenir un agent chimiothérapeutique plus sélectif. Les molécules tyrosinamide-chlorambucil ont été conçues et synthétisées avec de bons rendements, selon deux approches synthétiques différentes. L'activité anticancéreuse des nouveaux composés fut évaluée sur les cellules cancéreuses du sein hormono-dépendantes et hormono-indépendantes ($RE+$; MCF-7 et $RE-$; MDA-MB-231). Il fut intéressant de constater que les dérivés *mé*ta-hydroxyphényl-tyrosine-chlorambucil étaient plus actifs que les analogues *ortho* et *para*. Les molécules porteuses d'une chaîne à 5 atomes de carbone furent sélectionnées pour effectuer une étude biologique plus poussée en utilisant une série de cellules cancéreuses féminines; sein (ZR-75-1, MDA-MB-436, MDA-MB-468), ovaire (OVCAR-3, A2780) et utérus (Ishikawa, HEC-1A). Il fut constaté qu'avec les cellules cancéreuses du sein, les nouveaux composés étaient 4,2 fois plus actifs que le chlorambucil.

4.3 Troisième article scientifique

Design of novel tyrosine-nitrogen mustard hybrid molecules active against uterine, ovarian and breast cancer cell lines

Caroline Descôteaux, Kevin Brasseur, Valérie Leblanc, Sophie Parent, Éric Asselin and Gervais Bérubé*

*Groupe de Recherche en Oncologie et Endocrinologie Moléculaires,
Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500,
Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7*

* Corresponding author:

Gervais BÉRUBÉ, Ph.D.

Département de Chimie-Biologie,

GROEM, Université du Québec à Trois-Rivières,

C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

Téléphone: 819-376-5011 ext. 3353

FAX: 819-376-5084

E-mail: Gervais.Berube@uqtr.ca

Abstract

L-*para*-tyrosine was linked to *ortho*-hydroxyaniline, *meta*-hydroxyaniline and *para*-hydroxyaniline giving three distinct tyrosinamide molecules. The new extended amino acid derivatives were constructed to imitate, in part, the estradiol (E₂, the natural female sex hormone) nucleus. The resulting tyrosinamides were then linked to chlorambucil either directly, or via a 5 and 10 carbon atoms spacer chain. This was done in an attempt to target cancerous cells expressing the estrogen receptor alpha (ER α) and to obtain a more specific chemotherapeutic agent. The tyrosinamide-chlorambucil molecules were designed and synthesized in good yields, according to two different approaches. The novel compounds were evaluated for their anticancer efficacy in hormone-dependent and hormone-independent (ER+; MCF-7 and ER-; MDA-MB-231) breast cancer cell lines. Interestingly, the *meta*-hydroxyphenyl-tyrosinamide-chlorambucil derivatives were more active than the *ortho*- and *para*- analogs. The molecules bearing a 5 carbon atoms spacer were selected for additional biological study using a panel of female cancerous cells; breast (ZR-75-1, MDA-MB-436, MDA-MB-468), ovarian (OVCAR-3, A2780) and uterine (Ishikawa, HEC-1A). It was discovered that for breast cancer cells, the new compounds were up to 4.2 times more active than chlorambucil itself.

Key words: Ortho-, meta- and para-hydroxyphenyl-tyrosinamide-chlorambucil derivatives; female cancers; estrogen receptor alpha; chlorambucil; biological activity

Introduction

Chemotherapy is a very common anticancer treatment which uses anti-proliferative molecules to kill cancerous cells. These chemotherapeutic agents are highly active drugs which also affect healthy cells, leading to severe side effects [1]. Drug targeting is a challenging research subject which can be applied to various diseases such as cancer. In recent years, many cytotoxic compounds have been designed in order to get more specific anticancer drugs and as a result, to minimize toxic side effects [2, 3]. Targeting strategies have been applied to cases where characteristic physiological differences exist between diseased and healthy tissues [4].

Female organs (breast, ovary and uterus) are known to express a specific protein, the estrogen receptor alpha ($ER\alpha$) [5]. The $ER\alpha$ is a member of the nuclear receptor superfamily which is responsible for the concentration of physiological levels of estradiol (E_2) (1, Fig. 1), the most active steroidal female hormone [6]. In most cases, female cancers are classified as hormone-dependent, which means that the tumor development is stimulated by the presence of the $ER\alpha$. Also, when normal cells become cancerous, $ER\alpha$ is found to be overexpressed [7]. Hence, $ER\alpha$ is an attractive target which has been recognized as a useful tool for endocrine therapy.

The $ER\alpha$ has already been targeted in an attempt to accumulate a known chemotherapeutic agent to breast cancer cells [4]. Endogenous hormones have been used as potential carrier ligands for the $ER\alpha$. These have been modified and designed to create ligand-cytotoxic molecules targeting $ER\alpha$ overexpressing cells [8]. Anti-proliferative drugs have been linked to the steroidal ligand. E_2 -based anticancer molecules reported have shown cytotoxic activity against hormone-dependent cancer cells at a higher level than the parent drug given alone [9, 10, 11, 12]. Therefore, the use of a shuttle ligand such as E_2 has demonstrated enhanced effectiveness of known anticancer drug giving further evidence of the transport role of E_2 [13]. Moreover, such steroidal-anticancer molecules have shown to reach the $ER\alpha$ and then, induce E_2 -like genomic effects through the targeted protein [14].

In an attempt to avoid the promotion of cancer in response to estrogenic activity, non-steroid ligands conjugated to cytotoxic compounds were also designed [8]. There are numerous reports of compounds with unusual structural skeleton binding to the ER α [15]. Among these molecules, some are selective and have high binding affinity for the ER α . Hence, many different molecules can bind to the ER α , even if their structures are quite dissimilar to the natural hormone steroidal backbone. This can also be explained by the known mobility of protein segments upon ligand binding [16]. Therefore, the binding cavity of the ER α is known to accommodate various non-steroidal synthetic ligands.

Several structural characteristics need to be considered in order to build an estrogen-like ligand. A phenol ring, similar to the A-ring of E₂, must be a part of the molecule [17]. Moreover, two polar functional groups, such as hydroxyl, must be also present. The 3-OH and 17 β -OH located at the two extremities of E₂ skeleton are involved in the E₂-ER binding [18]. The interatomic distance of the hydroxyl groups in E₂ is 10.9 Å. Thus, in order to bind to the corresponding residue into the ER α , a molecule must have two polar groups far away from each other. Other molecules, with polar functional groups from 10.3 to 12.1 Å apart, have also shown interesting binding affinity for the ER α [18].

Recently, several tyrosine-chlorambucil derivatives (**2** and **3**, with R = CO₂CH₃ or CH₂OH, Fig. 1) have been reported [9, 19]. Chlorambucil was linked, directly or via a tether chain, to tyrosine ester (R = CO₂CH₃) or tyrosine hydroxymethyl (R = CH₂OH) molecules. Chlorambucil is a known anticancer agent which structure is shown in Fig. 1. In this article, tyrosine (**4**, Fig. 1) was selected as a template to mimic, at least in part, the A-ring phenol of the estradiol nucleus. Tyrosine is a natural amino acid reported to have a structure similar to that of the phenol group of E₂ [18]. Molecular modeling study showed that the phenol group of tyrosine can interact into the ER α binding cavity in the same manner as the A-ring phenol of E₂ does [19]. The tyrosine-chlorambucil hybrid molecules **2** and **3** showed enhanced cytotoxicity when compared to chlorambucil itself and this can possibly indicate the role of tyrosine as a cytotoxic agent carrier.

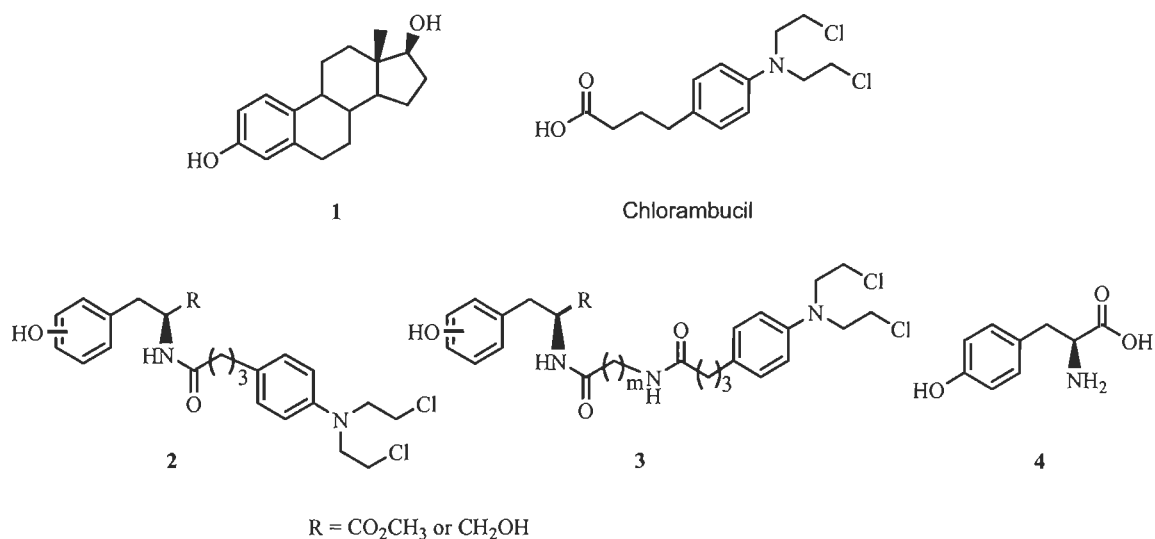


Figure 1. Structure of 17β-estradiol (1), chlorambucil, tyrosine-chlorambucil hybrid molecules (2 and 3) and L-para-tyrosine (4).

In spite of the non negligible cytotoxicity observed, molecular docking calculations showed that the tyrosine skeleton does not fully occupy the ER α binding cavity. Tyrosine seems too small to fit correctly (and completely) into the ER α binding pocket [19]. Hence, there is a reason to believe that perhaps, tyrosine-based molecules with extended skeleton could interact more adequately into the receptor network and consequently, be more active.

The new tyrosine-based molecules were designed and synthesized keeping in mind the minimal structural requirements needed to create ER α ligands. Tyrosine was modified and coupled to a hydroxyaniline moiety in order to obtain an extended backbone bearing two phenol groups distant from each other. Then, tyrosine ester (R = CO₂CH₃) and tyrosine hydroxymethyl (R = CH₂OH) derivatives previously synthesized were replaced by a tyrosinamide entity. The two phenol groups of the tyrosinamide unit could possibly create hydrogen bonding interactions with the same residue than E₂ does. It is hypothesized that these molecules with an extended shape could fit more effectively into the receptor than the smaller tyrosine-chlorambucil analogs, previously reported [19]. In addition, adding an aromatic moiety to the ligand structure would certainly increase the lipophilicity of the final derivatives. Such molecule would be less polar than tyrosine

and consequently, more comparable to the steroid backbone. Hence, tyrosine-hydroxyaniline conjugates would be more susceptible to imitate the natural steroid, estradiol.

In this particular study, *ortho*, *meta* and *para*-hydroxyaniline moieties have been linked to the L-*para*-tyrosine (**4**), in attempt to obtain ligands with different binding abilities. The position of a second hydroxyl group, as a part of the hydroxyaniline moiety, was varied. The tyrosinamide regioisomers were linked to chlorambucil, directly or via a 5 and a 10 carbon atoms spacer chain.

This manuscript gives the detailed synthesis of all the tyrosinamide-chlorambucil regioisomers made (**5** and **6**, Fig. 2). Two methodologies were used and compared; the linear and the convergent synthesis. Then, the biological activity of all the cytotoxic molecules synthesized was evaluated on hormone-dependent (MCF-7) and hormone-independent (MDA-MB-231) breast cancer cell lines. The influence of hydroxyl group location (*ortho*, *meta* and *para*) on the tyrosinamide-chlorambucil hybrids was studied. Next, the molecules bearing a 5 carbon atoms spacer were selected for a more thorough biological evaluation. These L-*para*-tyrosinamide-chlorambucil derivatives were further tested on a panel of hormone-dependent and hormone-independent female cancer cell lines; breast: ZR-75-1 (ER+), MDA-MB-468 (ER-), MDA-MB-436 (ER-); ovarian: OVCAR-3 (ER+), A2780 (ER-); uterine: Ishikawa (ER+), HEC-1A (ER-).

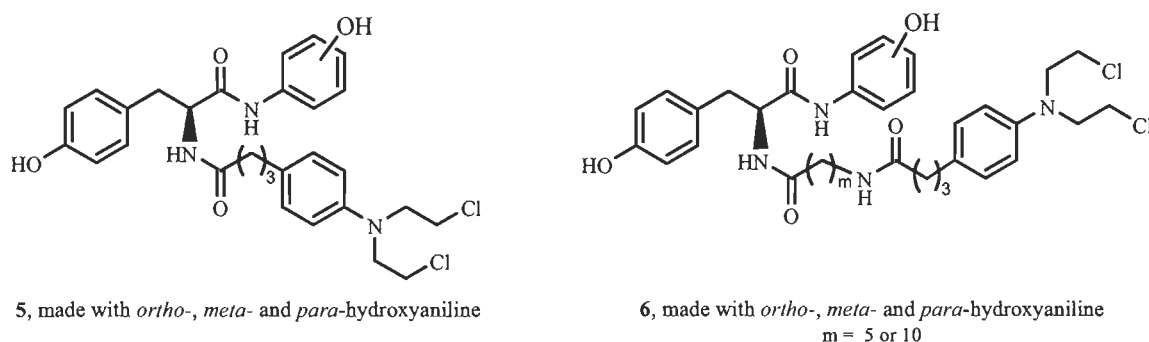


Figure 2. Structures of the tyrosinamide-chlorambucil hybrid molecules (**5** and **6**).

Experimental

Chemistry

All reactions were performed with ACS Fisher solvents. In some cases, solvent, as well as starting materials and reactants, were first purified and dried by standard means [20]. Anhydrous reactions required an inert atmosphere of dry nitrogen. The 6-aminohexanoic acid, 11-aminoundecanoic acid, *N*-Boc-tyrosine and all hydroxyaniline isomers (*ortho*, *meta* and *para*) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada. All reactions were monitored by UV fluorescence or staining with iodine on Sigma T 6145 commercial TLC plates (polyester silica gel 60 Å, 0.25 mm). Purifications were done using flash column chromatography according to the method of Still et al. [21] on Silicycle UltraPure Flash Silica Gel, 40-63 µm mesh. Hexanes and acetone were distilled before their use as chromatography eluent. Chloroform and methanol were used without any prior purification.

The infrared spectra were taken on a Nicolet Impact 420 FT-IR and a Thermo Nicolet IS10 FT-IR with ATR. Sodium chloride, potassium bromide pellets or ATR diamond accessory were used for analysis. Mass spectral assays were obtained using a MS model 6210, Agilent technology instrument. The high resolution mass spectra (HRMS) were obtained by TOF (time of flight) using ESI (electrospray ionization) using the positive mode (ESI+) (analysis at Université du Québec à Montréal).

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Varian 200 MHz NMR apparatus. Samples were dissolved in deuterioacetone (acetone- d_6) for data acquisition using tetramethylsilane as internal standard (TMS, δ 0.0 ppm for ^1H -NMR and ^{13}C -NMR). Chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm), the coupling constants (J) are expressed in hertz (Hz). Multiplicities are described by the following abbreviations: s for singlet, d for doublet, dd for doublet of doublets, dt for doublet of triplets, t for triplet, q for quartet, m for multiplet, #m for several multiplets, br s for broad singlet, br d for broad doublet and br t for broad triplet.

Preparation of the hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide-chlorambucil molecules with the linear methodology

General procedure for the preparation of the *N*-Boc-hydroxyphenyl-*L*-*para*-tyrosinamide (**8**):

The hydroxyaniline (*ortho*, *meta* and *para*) (3.09 mmol, 1.05 eq.) was dissolved in dimethylformamide (5.0 mL) and triethylamine (2.94 mmol, 1.00 eq.) was added. Separately, *N*-Boc-tyrosine **7** (2.94 mmol, 1.00 eq.) derivative was dissolved in dimethylformamide (5.0 mL), and DCC (3.24 mmol, 1.10 eq.) followed by HOBT (3.24 mmol, 1.10 eq.) were added to activate the acid function. Then, the hydroxyaniline solution was added to the activated tyrosine solution. The resulting mixture was stirred at room temperature for 25 h. A precipitate of dicyclohexylurea was formed during the course of the reaction. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (30 mL) and water (20 mL), and then washed with water (4x 20 mL). The organic phase was dried with sodium sulfate, filtered and evaporated. The product was further purified by flash chromatography (hexanes: acetone, 7: 3) to give a pure compound in 92 to 96% yield.

Spectral data for N-Boc-para-hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide (8, made with para-hydroxyaniline). IR (KBr, ν_{\max} , cm^{-1}): 3100-3600 (2x O-H and 2x N-H), 1669 (2x C=O, NHCOO and NHCO), 1516 and 1246 (C-N-H). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 9.05 (1H, s, OH AP), 8.24 (2H, br s, OH tyr and NH AP), 7.41 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, 3-CH AP), 7.10 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, 3-CH tyr), 6.76 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, 2-CH AP), 6.74 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 2-CH tyr), 6.11 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, NH-Boc), 4.42 (1H, m, CHNH), 2.80-3.16 (2H, m, CH_2CHNH), 1.36 (9H, s, 3x CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 170.2 (CONH), 156.3 (1-C tyr), 155.7 (NHCOO), 154.0 (1-C AP), 131.1 (4-C AP), 130.6 (2C, 3-C tyr), 128.4 (4-C tyr), 121.8 (2C, 3-C CLL), 115.3 (4C, 2-C tyr and 2-C CLL), 78.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 57.0 (CHNH), 37.8 (CH_2CHNH), 27.9 (3C, 3x CH_3). ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{NaO}_5 = 395.1577$; found = 395.1572; $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_5 = 373.1758$; found = 373.1756.

Spectral data for N-Boc-meta-hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide (8, made with meta-hydroxyaniline). IR (KBr, ν_{\max} , cm^{-1}): 3100-3600 (2x O-H and 2x N-H), 1671 (2x C=O,

NHCOO and NHCO), 1514 and 1240 (C-N-H). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 9.20 (1H, s, OH AP), 8.39 (1H, br s, OH tyr), 8.27 (1H, br s, NH AP), 7.34 (1H, t, $J = 2.0$ Hz, 4-CH AP), 7.10 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, 3-CH tyr), 7.06 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, 2-CH AP), 6.97 (1H, dt, $J = 1.2$ Hz and $J = 8.6$ Hz, 5-CH AP), 6.74 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 2-CH tyr), 6.56 (1H, dq, $J = 1.2$ Hz and $J = 7.8$ Hz, 6-CH AP), 6.16 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, NH-Boc), 4.45 (1H, m, CHNH), 2.85-3.15 (2H, m, CH₂CHNH), 1.36 (9H, s, 3x CH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 170.8 (CONH), 158.0 (1-C AP), 156.3 (1-C tyr), 155.8 (NHCOO), 140.1 (3-C AP), 130.6 (2C, 3-C tyr), 129.6 (5-C AP), 128.2 (4-C tyr), 115.4 (2C, 2-C tyr), 111.1 (2C, 4-C AP and 6-C AP), 107.2 (2-C AP), 78.6 (C(CH₃)₃), 57.2 (CHNH), 37.7 (CH₂CHNH), 27.9 (3C, 3x CH₃). ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calculated for C₂₀H₂₄N₂NaO₅ = 395.1577; found = 395.1578; $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculated for C₂₀H₂₅N₂O₅ = 373.1758; found = 373.1760.

Spectral data for N-Boc-ortho-hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide (8, made with ortho-hydroxyaniline). IR (KBr, ν_{max} , cm⁻¹): 3100-3500 (2x O-H and 2x N-H), 1686 (2x C=O, NHCOO and NHCO), 1519 and 1257 (C-N-H). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 9.21 (2H, br s, 2x OH), 8.26-9.19 (1H, br s, NH AP), 7.73 (1H, dd, $J = 1.6$ Hz and $J = 7.8$ Hz, 3-CH AP), 7.15 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 3-CH tyr), 6.78 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 2-CH tyr), 6.74-7.04 (3H, #m, 4-CH AP, 5-CH AP and 6-CH AP), 6.41 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, NH-Boc), 4.55 (1H, m, CHNH), 2.92-3.26 (2H, m, CH₂CHNH), 1.37 (9H, s, 3x CH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 171.8 (CONH), 156.4 (1-C tyr), 156.0 (NHCOO), 148.1 (1-C AP), 130.6 (2C, 3-C tyr), 128.3 (4-C tyr), 126.5 (2-C AP), 125.6 (5-C AP), 121.9 (3-C AP), 120.0 (4-C AP), 116.9 (6-C AP), 115.5 (2C, 2-C tyr), 79.3 (C(CH₃)₃), 57.3 (CHNH), 37.2 (CH₂CHNH), 27.9 (3C, 3x CH₃). ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calculated for C₂₀H₂₄N₂NaO₅ = 395.1577; found = 395.1582.

General procedure for the preparation of the *N*-chlorambucil-hydroxyphenyl-*L*-*para*-tyrosinamide (**5**):

The *N*-Boc-hydroxyphenyl-*L*-*para*-tyrosinamide **8** (0.16 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in dichloromethane (5.0 mL) and trifluoroacetic acid (1.60 mmol, 10.00 eq.) was added. The solution was stirred at room temperature for 24 h. After evaporation, the resulting

trifluoroacetic salt was dissolved in dimethylformamide (2.5 mL) and neutralized with triethylamine (0.16 mmol, 1.00 eq.). Simultaneously, chlorambucil (0.24 mmol, 1.50 eq.) was dissolved in dimethylformamide (2.5 mL) and DCC (0.25 mmol, 1.60 eq.) followed by HOBt (0.25 mmol, 1.60 eq.) were added. Then, the hydroxyphenyltyrosinamide solution was added to the activated chlorambucil solution. The resulting mixture was stirred at room temperature for 27 h. A precipitate of dicyclohexylurea was formed during the course of the reaction. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (30 mL) and water (20 mL), and then washed with water (4x 20 mL). The organic phase was dried with sodium sulfate, filtered and evaporated. The product was further purified by flash chromatography (hexanes: acetone, 7: 3) to give a pure compound in 37 to 44% yield.

Spectral data for N-chlorambucil-para-hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide (5, made with para-hydroxyaniline). IR (KBr, ν_{\max} , cm^{-1}): 3100-3600 (2x O-H and 2x N-H), 1654 (2x C=O, NHCO), 1517 and 1244 (C-N-H). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 9.15 (1H, s, OH AP), 8.18 and 8.20 (2H, 2s, OH tyr and NH AP), 7.41 (1H, d, partly hidden, NH tyr), 7.40 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, 3-CH AP), 7.11 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 3-CH tyr), 7.01 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, 3-CH CLL), 6.66-6.77 (6H, 3d, $J = 9.0$ Hz, $J = 8.6$ Hz and $J = 9.0$ Hz, 2-CH AP, 2-CH tyr and 2-CH CLL), 4.78 (1H, m, CHNH), 3.73 (8H, m, 2x CH_2Cl and 2x NCH_2), 2.84-3.15 (2H, m, CH_2CHNH), 2.44 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.21 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, NHCOCH_2), 1.76-1.87 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 172.9 (CO CLL), 170.0 (CO tyr), 156.3 (1-C tyr), 154.0 (1-C AP), 144.8 (1-C CLL), 131.2 (4-C AP), 130.9 (4-C tyr), 130.6 (2C, 3-C tyr), 129.7 (2C, 3-C CLL), 128.5 (4-C CLL), 121.6 (2C, 3-C AP), 115.3 (4C, 2-C tyr and 2-C AP), 112.4 (2C, 2-C CLL), 55.6 (CHNH), 53.3 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 41.0 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 37.5, 35.2, 34.1, 27.7. ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_4 = 558.1921$; found = 558.1929.

Spectral data for N-chlorambucil-meta-hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide (5, made with meta-hydroxyaniline). IR (NaCl, ν_{\max} , cm^{-1}): 3100-3500 (2x O-H and 2x N-H), 1656 (2x C=O, NHCO), 1516 and 1239 (C-N-H). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 9.30

(1H, s, OH AP), 8.40 (1H, s, OH tyr), 8.22 (1H, s, NH AP), 7.44 (1H, d, J = 8.2 Hz, NH tyr), 7.34 (1H, t, J = 2.1 Hz, 4-CH AP), 7.11 (2H, d, J = 8.6 Hz, 3-CH tyr), 7.01 (2H, d, J = 9.0 Hz, 3-CH CLL), 6.96-7.14 (2H, m apparent, partly hidden, 2-CH and 5-CH AP), 6.73 (2H, d, J = 8.6 Hz, 2-CH tyr), 6.68 (2H, J = 8.6 Hz, 2-CH CLL), 6.55 (1H, dq, J = 1.2 Hz and J = 7.8 Hz, 6-CH AP), 4.80 (1H, m, CHNH), 3.73 (8H, m, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 2.84-3.17 (2H, m, CH₂CHNH), 2.44 (2H, t, J = 7.6 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.22 (2H, t, J = 7.2 Hz, NHCOCH₂), 1.73-1.87 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph). ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 173.1 (CO CLL), 170.4 (CO tyr), 158.0 (1-C AP), 156.3 (1-C tyr), 144.8 (1-C CLL), 140.2 (3-C AP), 130.8 (4-C tyr), 130.5 (2C, 3-C tyr), 129.7 (2C, 3-C CLL), 129.6 (5-C AP), 128.4 (4-C CLL), 115.3 (2C, 2-C tyr), 112.4 (2C, 2-C CLL), 110.9 (2C, 4-C AP and 6-C AP), 107.0 (2-C AP), 55.8 (CHNH), 53.3 (2C, NCH₂CH₂Cl), 41.0 (2C, NCH₂CH₂Cl), 37.3, 35.2, 34.0, 27.7. ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₂₉H₃₄Cl₂N₃O₄ = 558.1921; found = 558.1925.

Spectral data for N-chlorambucil-ortho-hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide (5, made with ortho-hydroxyaniline). IR (NaCl, ν_{max}, cm⁻¹): 3100-3400 (2x O-H and 2x N-H), 1704 and 1656 (2x C=O, NHCO), 1523 and 1257 (C-N-H). ¹H-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 9.16 (1H, s, OH AP), 8.29 (1H, d, J = 7.5 Hz, NH tyr), 8.16 (1H, s, OH tyr), 7.58 (1H, d, J = 7.5 Hz, 3-CH AP), 6.97-7.17 (7H, #m apparent, 3-CH CLL, 3-CH tyr, 4-CH AP, 5-CH AP and NH AP), 6.66-6.80 (5H, #m apparent, 2-CH tyr, 2-CH CLL and 6-CH AP), 4.72 (1H, m, CHNH), 3.73 (8H, m, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 2.79-3.24 (2H, m, CH₂CHNH), 2.63 (2H, t, J = 7.6 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.20 (2H, t, J = 7.4 Hz, CHNHCOCH₂), 1.76-1.87 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph). ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 174.0 (CONH), 171.6 (CO tyr), 156.3 (1-C tyr), 145.0 (1-C AP), 144.9 (1-C CLL), 130.7 (4-C tyr), 130.5 (2C, 3-C tyr), 129.7 (2C, 3-C CLL), 128.6 (4-C CLL), 126.0 (2-C AP), 123.8 (5-C AP), 122.9 (3-C AP), 121.5 (4-C AP), 115.4 (2C, 2-C tyr), 112.5 (6-C AP), 112.4 (2C, 2-C CLL), 55.9 (CHNH), 53.3 (2C, NCH₂CH₂Cl), 41.0 (2C, NCH₂CH₂Cl), 35.2, 34.1, 34.0, 27.8. ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₂₉H₃₄Cl₂N₃O₄ = 558.1921; found = 558.1925.

General procedure for the preparation of the *N*-Boc-amino acid alkyl chains (**10**, $m = 5$ or 10):

A solution of a commercially available aminoacid alkyl chain **9** (7.77 mmol, 1.00 eq.) in water (10.0 mL) and dioxane (15.0 mL) was stirred at room temperature. Triethylamine (11.65 mmol, 1.50 eq.) was added slowly followed by Boc-ON (8.54 mmol, 1.10 eq.). The solution was kept for 23 h under nitrogen. Afterwards, the mixture was diluted with diethyl ether (75 mL) and water (50 mL) and then washed with water (6x 50 mL). The aqueous layers were then combined and a few drops of 10% aqueous HCl solution were slowly added in order to reach pH 2.5. The resulting solution was then washed with dichloromethane (3x 60 mL). The organic layers were washed with saturated sodium chloride salt solution (1x 50 mL). The organic phase was dried with magnesium sulfate, filtered and evaporated. Flash chromatography (hexanes: acetone, 4: 1) was performed to yield a colorless yellow viscous oil in 63 to 97% yield.

Spectral data for 6-Boc-amino-hexanoic acid (10, m = 5). IR (NaCl, ν_{\max} , cm^{-1}): 3339 (N-H), 2860-3100 (O-H), 1711 (2x C=O), 1527 and 1250 (C-N-H), 1173 (C-O-C). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 8.91 (1H, br s, COOH), 4.74 (1H, s, NH), 3.02 (2H, m, CH_2NH), 2.27 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, CH_2COOH), 1.24-1.68 (6H, #m, 3 x CH_2), 1.37 (s, 9H, 3 x CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 178.7 (COOH), 156.4 (OCONH), 79.4 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 40.5 (NH CH_2), 34.1 (CH_2COOH), 29.8 (NH CH_2CH_2), 28.6 (3 x CH_3), 26.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 24.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$). ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{NNaO}_4 = 254.1363$; found = 254.1360.

Spectral data for 11-Boc-amino-undecanoic acid (10, m = 10). IR (NaCl, ν_{\max} , cm^{-1}): 3365 (N-H), 2850-3100 (O-H), 1704 (C=O, COOH), 1683 (C=O OCONH), 1526 (C-N-H), 1171 (C-O-C). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 10.98 (1H, br s, COOH), 4.55 (1H, s, NH), 3.06 (2H, m, CH_2NH), 2.32 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, CH_2COOH), 1.61 (2H, m, CH_2), 1.43 (s, 11H, 3 x CH_3 and 1x CH_2), 1.26 (br s, 12H, 6 x CH_2). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 179.7 (COOH), 156.3 (OCONH), 79.3 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 40.8 (NH CH_2), 34.3 (CH_2COOH), 30.2, 29.6, 29.5, 29.4 (2C), 29.2, 28.6 (3 x CH_3), 27.0, 24.9. ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{NNaO}_4 = 324.2145$; found = 324.2145.

General procedure for the preparation of the *N*-((*N*-Boc-amino)alkanoyl)-*p*-hydroxyphenyl-*L*-*para*-tyrosinamide (**12**):

The *N*-Boc-*para*-hydroxyphenyl-*L*-*para*-tyrosinamide derivative **8** (0.57 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in dichloromethane (3.0 mL) and trifluoroacetic acid (5.70 mmol, 10.00 eq.) was added. The solution was stirred at room temperature for 29 h. After evaporation, the resulting trifluoroacetic salt was dissolved in dimethylformamide (2.0 mL) and neutralized with triethylamine (0.57 mmol, 1.00 eq.). Separately, *N*-Boc-amino acid alkyl chain **10** ($m = 5$, 0.60 mmol, 1.05 eq.) was dissolved in dimethylformamide (2.0 mL), and DCC (0.63 mmol, 1.10 eq.) followed by HOBT (0.63 mmol, 1.10 eq.) were added. Then, the *para*-hydroxyphenyltyrosinamide solution was added to the activated amino acid chain solution. The resulting mixture was stirred at room temperature for 28 h. A precipitate of dicyclohexylurea was formed during the course of the reaction. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (30 mL) and water (20 mL), and then washed with water (4x 20 mL). The organic phase was dried with sodium sulfate, filtered and evaporated. The product was further purified by flash chromatography (hexanes: acetone, 7: 3) to give a pure compound in 45 to 46% yield.

Spectral data for *N*-((*N*-Boc-amino)hexanoyl)-*para*-hydroxyphenyl-*L*-*para*-tyrosinamide (**12**, $m = 5$). IR (KBr, ν_{\max} , cm^{-1}): 3150-3450 (2x O-H and 3x N-H), 1666 (3x C=O, NHCOO and 2x NHCO). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 9.36 (1H, s, OH AP), 8.44 (1H, br s, OH tyr), 7.71 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, NH AP), 7.41 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, 3-CH AP), 7.10 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, 3-CH tyr), 6.76 and 6.74 (4H, 2d, $J = 9.0$ Hz and $J = 8.6$ Hz, 2-CH AP and 2-CH tyr), 5.97 (1H, br t, $J = 5.9$ Hz, NH-Boc), 4.86 (1H, m, CHNH), 2.85-3.18 (4H, 2m, CH₂CHNH and CH₂NHCO), 2.19 (2H, t apparent, partly hidden, NHCOCH₂), 1.41 (9H, s, 3x CH₃), 1.21-1.51 (6H, #m, 3x CH₂). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 173.4 (CONH), 170.3 (CONH), 156.3 (2C, 1-C tyr and NHCOO), 154.1 (1-C AP), 131.0 (4-C AP), 130.6 (2C, 3-C tyr), 128.4 (4-C tyr), 121.8 (2C, 3-C CLL), 115.4 (4C, 2-C tyr and 2-C CLL), 78.1 (C(CH₃)₃), 59.9 (CHNH), 40.4 (CH₂NH), 37.8 (CH₂CHNH), 35.9 (NHCOCH₂), 29.6, 28.1 (3C, 3x CH₃), 26.4, 25.5. ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calculated for C₂₆H₃₅N₃NaO₆ = 508.2418; found = 508.2422; $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculated for C₂₆H₃₆N₃O₆ = 486.2599; found = 486.2606.

Spectral data for *N*-((*N*-Boc-amino)undecanoyl)-*para*-hydroxyphenyl-*L*-*para*-tyrosinamide (**12**, *m* = 10). IR (KBr, ν_{\max} , cm^{-1}): 3100-3400 (2x O-H and 3x N-H), 1667 and 1681 (3x C=O, NHCOO and 2x NHCO). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 9.05 (1H, s, OH AP), 8.18 (2H, s, OH tyr and NH), 7.40 (2H, d, J = 9.0 Hz, 3-CH AP), 7.28 (1H, br d, J = 7.8 Hz, NH), 7.09 (2H, d, J = 8.6 Hz, 3-CH tyr), 6.73 and 6.75 (4H, 2d, J = 8.6 Hz and J = 9.0 Hz, 2-CH tyr and 2-CH AP), 5.93 (1H, br s, NH-Boc), 4.70 (1H, m, CHNH), 2.94-3.10 (4H, 2m, CH₂CHNH and CH₂NHCO), 2.19 (2H, t, J = 7.2 Hz, NHCOCH₂), 1.40 (9H, s, 3x CH₃), 1.26-1.50 (16H, #m, 8x CH₂). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 172.7 (CONH), 169.6 (CONH), 156.3 (2C, 1-C tyr and NHCOO), 153.9 (1-C AP), 131.3 (4-C AP), 130.5 (2C, 3-C tyr), 128.5 (4-C tyr), 121.5 (2C, 3-C CLL), 115.2 (4C, 2-C tyr and 2-C CLL), 77.7 (C(CH₃)₃), 55.5 (CHNH), 40.4 (CH₂NH), 37.3 (CH₂CHNH), 35.9 (NHCOCH₂), 32.0, 26.8, 25.7, 22.7 (7C hidden). ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calculated for C₃₁H₄₅N₃NaO₆ = 578.3201; found = 578.3200; $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculated for C₃₁H₄₆N₃O₆ = 556.3381; found = 556.3381.

General procedure for the preparation of the *N*-((*N*-chlorambucilamino)alcanoyl)-*para*-hydroxyphenyl-*L*-*para*-tyrosinamide (**6**):

The *N*-((*N*-Boc-amino)alcanoyl)-*para*-hydroxyphenyl-*L*-*para*-tyrosinamide **12** (0.17 mmol, 1.10 eq.) was dissolved in dichloromethane (3.0 mL) and treated with trifluoroacetic acid (1.70 mmol, 10.00 eq.). The solution was stirred at room temperature for 22.5 h. After evaporation, the resulting trifluoroacetic salt was dissolved in dimethylformamide (1.0 mL) and neutralized with triethylamine (0.18 mmol, 1.05 eq.). Simultaneously, chlorambucil (0.17 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in dimethylformamide (1.0 mL) and treated with DCC (0.19 mmol, 1.10 eq.) and with HOBT (0.19 mmol, 1.10 eq.). Then, the *N*-alkylated tyrosamide solution was added to the activated chlorambucil solution. The resulting mixture was stirred at room temperature for 44 h. A precipitate of dicyclohexylurea was formed during the course of the reaction. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (20 mL) and water (15 mL), and then washed with water (4x 15 mL). The organic phase was dried with sodium sulfate, filtered and evaporated. The product was further purified by flash chromatography (chloroform: methanol, 97: 3) to give a pure compound in 17 to 19% yield.

Spectral data for N-((N-chlorambucilamino)hexanoyl)-para-hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide (6, m = 5). IR (KBr, ν_{\max} , cm^{-1}): 3100-3500 (2x O-H and 3x N-H), 1639-1613 (3x C=O, NHCO), 1516 and 1230 (C-N-H). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 9.13 (1H, s, OH AP), 8.24 and 8.34 (2H, 2s, OH tyr and NH AP), 7.41 (2H, d, J = 9.0 Hz, 3-CH AP), 7.34 (1H, d, J = 8.20 Hz, NH tyr), 7.13 (1H, br t, J = 6.0 Hz, CH_2NHCO), 7.09 (2H, d, J = 8.6 Hz, 3-CH tyr), 7.06 (2H, d, J = 8.6 Hz, 3-CH CLL), 6.69-6.78 (6H, 3d, J = 9.0 Hz, J = 8.6 Hz and J = 8.6 Hz, 2-CH AP, 2-CH tyr and 2-CH CLL), 4.74 (1H, m, CHNH), 3.74 (8H, m, 2x CH_2Cl and 2x NCH_2), 2.80-3.20 (4H, 2m, CH_2CHNH and CH_2NHCO), 2.51 (2H, t, J = 7.6 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.17 (2H, t, J = 7.6 Hz, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2$), 2.11-2.19 (2H, t partly hidden, CHNHCOCH_2), 1.81-1.92 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 1.12-1.54 (6H, #m, 3x CH_2). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 172.74 (CONH), 172.70 (CONH), 170.0 (CONH tyr), 156.4 (1-C tyr), 154.0 (1-C AP), 145.0 (1-C CLL), 131.2 (4-C AP), 130.9 (4-C tyr), 130.5 (2C, 3-C tyr), 129.7 (2C, 3-C CLL), 128.5 (4-C CLL), 121.6 (2C, 3-C AP), 115.4 (2C, 2-C tyr), 115.3 (2C, 2-C AP), 112.5 (2C, 2-C CLL), 55.5 (CHNH), 53.3 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 41.0 (2C, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 39.1, 37.5, 35.9, 35.6, 34.2, 27.9, 26.4, 25.5, (1C hidden). ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{45}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_5 = 671.2762$; found = 671.2754.

Spectral data for N-((N-chlorambucilamino)undecanoyl)-para-hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide (6, m = 10). IR (KBr, ν_{\max} , cm^{-1}): 3100-3500 (2x O-H and 3x N-H), 1643 (3x C=O, NHCO), 1517 and 1227 (C-N-H). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 9.11 (1H, s, OH AP), 8.34 (2H, br s, OH tyr and NH AP), 7.41, (2H, d, J = 9.0 Hz, 3-CH AP), 7.36 (1H, d, partly hidden, NH tyr), 7.15 (1H, br t, J = 6.0 Hz, CH_2NHCO), 7.09 (2H, d, J = 8.6 Hz, 3-CH tyr), 7.06 (2H, d, J = 8.6 Hz, 3-CH CLL), 6.69-6.78 (6H, 3d, J = 9.0 Hz, J = 8.6 Hz and J = 8.6 Hz, 2-CH AP, 2-CH tyr and 2-CH CLL), 4.73 (1H, m, CHNH), 3.74 (8H, m, 2x CH_2Cl and 2x NCH_2), 2.83-3.25 (4H, 2m, CH_2CHNH and CH_2NHCO), 2.52 (2H, t, J = 7.6 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.18 (4H, 2t overlapped, J = 7.2 Hz, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2$ and CHNHCOCH_2), 1.82-1.93 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 1.20-1.56 (16H, m, 8x CH_2). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 172.98 (CONH), 172.71 (CONH), 169.8 (CONH tyr), 156.4 (1-C tyr), 154.0 (1-C AP), 145.0 (1-C CLL), 131.2 (4-C AP), 130.9 (4-C tyr), 130.5 (2C, 3-C tyr), 129.7 (2C, 3-C CLL), 128.5 (4-C CLL), 121.5 (2C,

3-C AP), 115.3 (4C, 2-C tyr and 2-C AP), 112.5 (2C, 2-C CLL), 55.6 (CHNH), 53.3 (2C, NCH₂CH₂Cl), 41.0 (2C, NCH₂CH₂Cl), 39.0, 37.3, 35.9, 35.6, 34.2, 29.8 (2C), 29.4 (3C), 27.9, 26.8, 25.7, (1C hidden). ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₄₀H₅₅Cl₂N₄O₅ = 741.3544; found = 741.3548.

Preparation of the hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide-chlorambucil molecules with the convergent methodology.

General procedure for the preparation of the *N*-chlorambucil-amino acid alkyl chain (**14**, m = 5 or 10):

The amino acid **9** (6.57 mmol, 2.00 eq.) was dissolved in dichloromethane (2.0 mL). Hexamethyldisilazane (21.69 mmol, 6.60 eq.) and concentrated sulfuric acid (1 drop, cat) were added. The mixture was stirred and heated to reflux under nitrogen atmosphere until complete dissolution. The solution was kept to reflux for 0.5 h. After cooling down, benzene (2.0 mL), triethylamine (4.91 mmol, 0.67 eq.) and chlorotrimethylsilane (4.91 mmol, 0.67 eq.) were added. The resulting mixture was stirred at room temperature for 12 h. In another flask, chlorambucil (3.29 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in dichloromethane (2.0 mL) at 0° C. Triethylamine (3.62 mmol, 1.10 eq.) and isobutylchloroformate (3.62 mol, 1.10 eq) were added and the mixture was kept at 0°c for 1 h. Then, the chlorambucil solution was added to the activated amino acid solution and the mixture was stirred at room temperature for 4 h. Work-up was done by diluting with ethyl acetate (20 mL) and by washing the organic phase with HCl 10% solution (2x 15 mL) and with a saturated sodium chloride solution (2x 15 mL). The organic phase was dried with anhydrous magnesium sulfate, filtered and evaporated. The product was purified by flash chromatography (hexanes: acetone, 7: 3) to give the desired material in 68 to 98% yield.

Spectral data for N-6-chlorambucil-hexanoic acid (14, m = 5). IR (NaCl, ν_{\max} , cm⁻¹): 3300 (N-H), 3200-2600 (O-H), 1716 (C=O, COOH), 1622 (C=O, NHCOO), 1522 and 1255 (C-N-H). ¹H-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 7.26 (1H, br s, NH), 7.06 (2H, d, J = 8.6 Hz, 3-CH CLL), 6.70 (2H, d, J = 8.6 Hz, 2-CH CLL), 3.73 (8H, m, 2x CH₂Cl

and 2x NCH₂), 3.19 (2H, m, CH₂NHCO), 2.51 (2H, t, J = 7.4 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.27 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH₂COOH), 2.18 (2H, t, J = 7.4 Hz, CH₂NHCOCH₂), 1.78-1.96 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.28-1.67 (6H, m, 3x CH₂), (1H, COOH hidden). ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 174.3 (COOH), 173.0 (CONH), 144.8 (1-C CLL), 130.9 (4-C CLL), 129.7 (2C, 3-C CLL), 112.5 (2C, 2-C CLL), 53.3 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 41.0 (2x C, 2x NCH₂CH₂Cl), 39.1, 35.6, 34.3, 33.6, 29.4, 27.9, 26.5, 24.7. ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₂₀H₃₁Cl₂N₂O₃ = 417.1706; found = 417.1707.

Spectral data for N-6-chlorambucil-undecanoic acid (14, m = 10). IR (NaCl, ν_{max}, cm⁻¹): 3300 (N-H), 3200-2600 (O-H), 1714 (C=O, COOH), 1618 (C=O, NHCOO), 1526 and 1250 (C-N-H). ¹H-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 7.07 (2H, d, J = 8.6 Hz, 3-CH CLL), 7.03 (1H, br s, NH), 6.72 (2H, d, J = 9.0 Hz, 2-CH CLL), 3.75 (8H, m, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.17 (2H, m, CH₂NHCO), 2.90 (1H, br s, COOH), 2.51 (2H, t, J = 7.4 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.27 (2H, t, J = 7.4 Hz, CH₂COOH), 2.14 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH₂NHCOCH₂), 1.80-1.92 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.41-1.62 (4H, m, 2x CH₂), 1.30 (12H, 6x CH₂). ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 174.0 (COOH), 172.1 (CONH), 144.9 (1-C CLL), 131.0 (4-C CLL), 129.7 (2C, 3-C CLL), 112.5 (2C, 2-C CLL), 53.3 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 41.0 (2C, 2x NCH₂CH₂Cl), 39.0, 35.5, 34.2, 33.6, 29.8, 29.5 (2C), 29.3 (3C), 27.9, 27.0, 25.0. ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₂₅H₄₁Cl₂N₂O₃ = 487.2489; found = 487.2485.

General procedure for the preparation of the *N*-((*N*-chlorambucilamino)alcanoyl)-hydroxyphenyl-*L*-*para*-tyrosinamide (**6**):

The appropriate *N*-Boc-hydroxyphenyl-*L*-*para*-tyrosinamide **8** (0.38 mmol, 1.00 eq.) was dissolved in dichloromethane (3.0 mL) and treated with trifluoroacetic acid (3.80 mmol, 10.0 eq.). The solution was stirred at room temperature for 24 h. After evaporation, the resulting trifluoroacetic salt was dissolved in dimethylformamide (1.5 mL) and neutralized with triethylamine (0.40 mmol, 1.05 eq.). At the same time, the *N*-chlorambucil-amino acid derivative **6** (0.40 mmol, 1.05 eq.) was dissolved in dimethylformamide (1.5 mL), and DCC (0.42 mmol, 1.10 eq.) followed by HOBT (0.42 mmol, 1.10 eq.) were added. Then, the hydroxyphenyltyrosinamide solution was

added to the activated chlorambucil-amino acid derivative (**14**) solution. The resulting mixture was stirred at room temperature for 29 h. A precipitate of dicyclohexylurea was formed during the course of the reaction. The reaction mixture was diluted with ethyl acetate (30 mL) and water (20 mL), and then washed with water (4x 20 mL). The organic phase was dried with sodium sulfate, filtered and evaporated. The product was further purified by flash chromatography (hexanes: acetone, 7: 3) to give a pure compound in 25 to 51% yield.

Spectral data for N-((N-chlorambucilamino)hexanoyl)-para-hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide (6, m = 5). The spectral data of this derivative were identical to those previously described for the same derivative made by the linear synthesis.

Spectral data for N-((N-chlorambucilamino)undecanoyl)-para-hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide (6, m = 10). The spectral data of this derivative were identical to those previously described for the same derivative made by the linear synthesis.

Spectral data for N-((N-chlorambucilamino)hexanoyl)-meta-hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide (isomer of 6, m = 5). IR (NaCl, ν_{\max} , cm^{-1}): 3100-3600 (2x O-H and 3x N-H), 1619 (3x C=O, NHCO), 1515 and 1239 (C-N-H). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 9.20 (1H, s, OH AP), 8.49 (1H, s, OH tyr), 8.34 (1H, s, NH AP), 7.29-7.35 (2H, d, J = 8.2 Hz, NH tyr and t apparent, J = 2.34 Hz, 4-CH AP), 7.13 (1H, br t, J = 5.1 Hz, CH₂NHCO), 7.09 (2H, d, J = 8.2 Hz, 3-CH tyr), 7.07 (2H, d, J = 8.6 Hz, 3-CH CLL), 6.99-7.11 (2H, m apparent, partly hidden, 2-CH and 5-CH AP), 6.74 (2H, d, J = 8.2 Hz, 2-CH tyr), 6.71 (2H, J = 9.0 Hz, 2-CH CLL), 6.54 (1H, dq, J = 1.2 Hz and J = 7.8 Hz, 6-CH AP), 4.73 (1H, m, CHNH), 3.74 (8H, m, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 2.79-3.21 (2H, m, CH₂CHNH), 3.15 (2H, m, CH₂NHCO), 2.52 (2H, t, J = 7.6 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.18 (4H, 2t overlapped, J = 7.2 Hz, CH₂NHCOCH₂ and CHNHCOCH₂), 1.82-1.93 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.18-1.59 (6H, #m, 3x CH₂). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 172.9 (CONH), 172.8 (CONH), 170.3 (CO tyr), 158.1 (1-C AP), 156.4 (1-C tyr), 144.9 (1-C CLL), 140.2 (3-C AP), 130.9 (4-C tyr), 130.5 (2C, 3-C tyr), 129.7 (2C, 3-C CLL), 129.6 (5-C AP), 128.4 (4-C CLL), 115.4 (2C, 2-C tyr), 112.4 (2C, 2-C CLL), 110.9 (2C, 4-C

AP and 6-C AP), 107.0 (2-C AP), 55.7 (CHNH), 53.3 (2C, NCH₂CH₂Cl), 41.0 (2C, NCH₂CH₂Cl), 39.1, 37.1; 35.8, 35.6, 34.2, 27.9, 26.3, 25.5, (1C hidden). ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₃₅H₄₅Cl₂N₄O₅ = 671.2762; found = 671.2757.

Spectral data for N-((N-chlorambucilamino)undecanoyl)-meta-hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide (isomer of 6, m = 10). IR (NaCl, ν_{\max} , cm⁻¹): 3100-3500 (2x O-H and 3x N-H), 1704, 1649 and 1622 (3x C=O, NHCO), 1526 and 1222 (C-N-H). ¹H-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 9.34 (1H, s, OH AP), 8.55 (1H, s, OH tyr), 8.45 (1H, s, NH AP), 7.47 (1H, d, J = 8.2 Hz, NH tyr), 7.33 (1H, t, J = 2.1 Hz, 4-CH AP), 7.21 (1H, br t, J = 5.7 Hz, CH₂NHCO), 7.10 (2H, d, J = 8.2 Hz, 3-CH tyr), 7.06 (2H, d, J = 8.2 Hz, 3-CH CLL), 6.96-7.12 (2H, m apparent, partly hidden, 2-CH and 5-CH AP), 6.74 (2H, d, J = 8.2 Hz, 2-CH tyr), 6.70 (2H, J = 8.6 Hz, 2-CH CLL), 6.56 (1H, dq, J = 1.2 Hz and J = 7.8 Hz, 6-CH AP), 4.78 (1H, m, CHNH), 3.73 (8H, m, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.20 (2H, q, J = 5.9 Hz, CH₂NHCO), 2.83-3.15 (2H, m, CH₂CHNH), 2.52 (2H, t, J = 7.6 Hz, CH₂CH₂Ph), 2.19 (4H, 2t overlapped, J = 7.2 Hz, CH₂NHCOCH₂ and CHNHCOCH₂), 1.79-1.96 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.22-1.59 (16H, #m and s, 8x CH₂). ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 173.3 (CONH), 172.9 (CONH), 170.4 (CO tyr), 158.1 (1-C AP), 156.5 (1-C tyr), 144.9 (1-C CLL), 140.3 (3-C AP), 130.9 (4-C tyr), 130.5 (2C, 3-C tyr), 129.7 (2C, 3-C CLL), 129.6 (5-C AP), 128.3 (4-C CLL), 115.3 (2C, 2-C tyr), 112.4 (2C, 2-C CLL), 110.9 (2C, 4-C AP and 6-C AP), 107.1 (2-C AP), 55.8 (CHNH), 53.3 (2C, NCH₂CH₂Cl), 41.0 (2C, NCH₂CH₂Cl), 39.1, 35.9, 35.7, 34.3, 29.4 (3C), 29.1 (2C), 28.0, 28.0 (2C), 26.8, 25.7. ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₄₀H₅₅Cl₂N₄O₅ = 741.3544; found = 741.3541.

Spectral data for N-((N-chlorambucilamino)hexanoyl)-ortho-hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide (isomer of 6, m = 5). IR (NaCl, ν_{\max} , cm⁻¹): 3100-3400 (2x O-H and 3x N-H), 1646 (3x C=O, NHCO), 1526 and 1246 (C-N-H). ¹H-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 9.60 (1H, br s, OH AP), 9.17 (1H, br s, OH tyr), 7.90 (1H, d, J = 7.8 Hz, NH tyr), 7.68 (1H, d, J = 7.8 Hz, 3-CH AP), 7.45 (1H, br t, J = 5.7 Hz, CH₂NHCO), 7.13 (2H, d, J = 8.6 Hz, 3-CH tyr), 7.06 (2H, d, J = 8.6 Hz, 3-CH CLL), 6.96 (2H, 2x d overlapped, J = 3.9 Hz, 4-CH AP and 5-CH AP), 6.78 (2H, d, J = 8.6 Hz, 2-CH tyr), 6.70 (2H, d,

$J = 8.6$ Hz, 2-CH CLL), 6.68-6.83 (2H, m apparent, partly hidden, 6-CH AP and NH AP), 4.86 (1H, m, CHNH), 3.72 (8H, m, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.16 (2H, m, CH₂NHCO), 2.86-3.29 (2H, m, CH₂CHNH), 2.51 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, CH₂CH₂Ph), 2.22 (4H, m apparent, CH₂NHCOCH₂ and CHNHCOCH₂), 1.80-1.95 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.11-1.63 (6H, #m, 3x CH₂). ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 173.7 (CONH), 173.6 (CONH), 170.8 (CO tyr), 156.5 (1-C tyr), 147.7 (1-C AP), 144.8 (1-C CLL), 130.9 (4-C tyr), 130.5 (2C, 3-C tyr), 129.7 (2C, 3-C CLL), 128.4 (4-C CLL), 126.7 (2-C AP), 125.0 (5-C AP), 121.2 (3-C AP), 120.0 (4-C AP), 116.9 (6-C AP), 115.5 (2C, 2-C tyr), 112.5 (2C, 2-C CLL), 55.9 (CHNH), 53.3 (2C, NCH₂CH₂Cl), 41.0 (2C, NCH₂CH₂Cl), 39.3, 36.7, 35.9, 35.6, 34.2, 33.6, 27.9, 26.3, 25.6. ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₃₅H₄₅Cl₂N₄O₅ = 671.2762; found = 671.2763.

Spectral data for N-((N-chlorambucilamino)undecanoyl)-ortho-hydroxyphenyl-L-para-tyrosinamide (isomer of **6**, $m = 10$). IR (NaCl, ν_{\max} , cm⁻¹): 3100-3600 (2x O-H and 3x N-H), 1690, 1646 and 1615 (3x C=O, NHCO), 1526 and 1250 (C-N-H). ¹H-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 9.21 (1H, br s, OH tyr), 7.70 (1H, dd, $J = 1.4$ Hz and $J = 7.8$ Hz, 3-CH AP), 7.49 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, NH tyr), 7.13 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 3-CH tyr), 7.11-7.15 (1H, hidden, CH₂NHCO), 7.06 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 3-CH CLL), 6.83-7.02 (2H, #m, 4-CH AP and 5-CH AP), 6.76 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 2-CH tyr), 6.71 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, 2-CH CLL), 6.68-6.80 (2H, m apparent, partly hidden, 6-CH AP and NH AP), 4.83 (1H, m, CHNH), 3.74 (8H, m, 2x CH₂Cl and 2x NCH₂), 3.20 (2H, m, CH₂NHCO), 2.88-3.25 (2H, m, CH₂CHNH), 2.52 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, CH₂CH₂Ph), 2.22 (4H, 2x d, $J = 7.2$ Hz and $J = 7.4$ Hz, CH₂NHCOCH₂ and CHNHCOCH₂), 1.82-1.93 (2H, m, CH₂CH₂CH₂Ph), 1.24-1.56 (16H, #m and s, 8x CH₂), (1H, OH AP, hidden). ¹³C-NMR (Acetone-*d*₆, δ ppm): 173.2 (CONH), 172.7 (CONH), 171.2 (CO tyr), 156.5 (1-C tyr), 148.1 (1-C AP), 144.9 (1-C CLL), 130.9 (4-C tyr), 130.5 (2C, 3-C tyr), 129.7 (2C, 3-C CLL), 128.3 (4-C CLL), 126.7 (2-C AP), 125.4 (5-C AP), 121.7 (3-C AP), 119.8 (4-C AP), 116.9 (6-C AP), 115.4 (2C, 2-C tyr), 112.5 (2C, 2-C CLL), 55.6 (CHNH), 53.3 (2C, NCH₂CH₂Cl), 41.0 (2C, NCH₂CH₂Cl), 39.0, 36.7, 35.9, 35.8, 35.6, 34.2, 33.6, 29.0 (2C), 28.0, 26.7, 25.7, (2C hidden). ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₄₀H₅₅Cl₂N₄O₅ = 741.3544; found = 741.3531.

Biology

In vitro cytotoxic activity

The cytotoxicity of all the hydroxyphenyl-tyrosinamide-chlorambucil regioisomers (**5** and **6**, $m = 5$ or 10) was evaluated on MCF-7 (ER+) and MDA-MD-231 (ER-) breast cancer cell lines. Chlorambucil was used for control. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-phenyl-tetrazolium bromide) assay, a standard colorimetric test, was used for measuring cellular proliferation [22]. Briefly, tumor cell lines were added into 96-well tissue culture plates in culture medium and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Dilutions were done using cremophore: ethanol (1: 1) solution. The cremophore: ethanol solution was used in line with our standard protocol for the *in vivo* biological assays that we might perform in the future [14]. Cells were incubated with or without drugs for 72 h. Culture plates were processed using MTT for 3.5 h afterwards SDS solubilisation solution (HCl 0.010 M, sodium dodecyl sulfate solution 10%) was added. The absorbance was read using a scanning multiwell spectrophotometer (FLUOStar OPTIMA) at 565 nm. All measurements were carried in triplicates. The results were compared with those of a control reference plate fixed on the treatment day, and the growth inhibition percentage was calculated for each drug contact period.

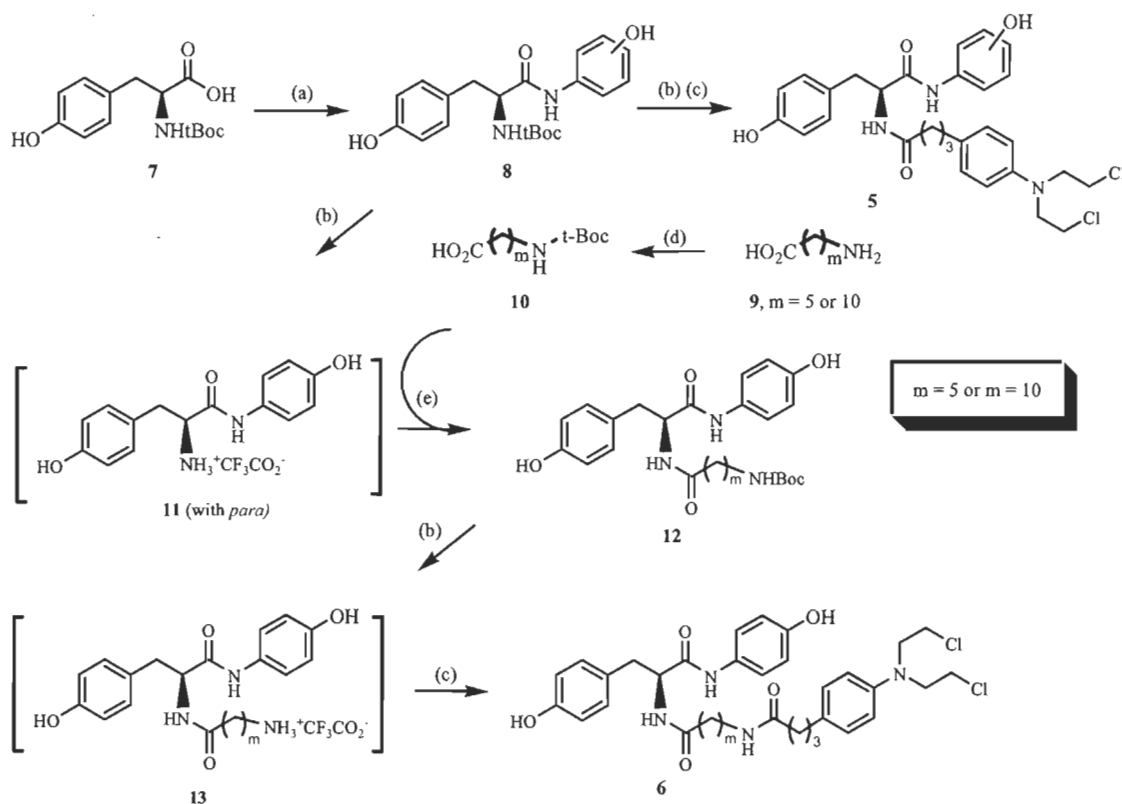
Ortho-, *meta*- and *para*-hydroxyphenyl-tyrosinamide-chlorambucil derivatives bearing a 5 carbon atoms spacer were used for a more exhaustive biological analysis. The three selected molecules were submitted to the same MTT assay as described earlier, on a panel of female hormone-dependent (ER+) and hormone-independent (ER-) breast, uterine and ovarian cancer cell lines. The human cancerous cell lines used were MCF-7 and ZR-75-1 (breast; ER+), MDA-MB-231, MDA-MB-436 and MDA-MB-468 (breast; ER-), Ishikawa (uterine; ER+), HEC-1A (uterine; ER-), OVCAR-3 (ovarian; ER+) and A2780 (ovarian; ER-).

Results and discussion

Synthesis of *ortho*-, *meta*- and *para*-hydroxyphenyl-tyrosinamide-chlorambucil hybrid molecules (5 and 6)

As shown in Scheme 1, the chlorambucil entity was directly linked to *ortho*-, *meta*- and *para*-hydroxyphenyl-*L*-*para*-tyrosine. Commercially available *N*-Boc-*L*-tyrosine (**7**) was coupled with hydroxyaniline (*ortho*-, *meta*- and *para*-) upon treatment with HOBt, DCC in DMF to give derivative **8** with a 96% optimal yield. This compound was readily deprotected under acidic conditions and coupled with chlorambucil using standard reaction conditions (HOBt, DCC) to give derivative **5** with a 44% optimal yield.

Chlorambucil was also linked to the *para*-hydroxyphenyl-*L*-*para*-tyrosinamide by means of a 5 or a 10 carbon atoms spacer. These molecules were designed and synthesized according to two different methodologies; the linear synthesis (Scheme 1) and the convergent synthesis (Scheme 2). Initially, following Scheme 1, the linear synthesis was applied. The amino acids, 6-aminohexanoic acid **9** ($m = 5$) and 11-aminoundecanoic acid **9** ($m = 10$), were protected using BOC-ON given the corresponding *N*-Boc-protected molecules (**10**). Beside, derivative **8** was deprotected with TFA to give trifluoroacetic ammonium salt intermediate **11**. Next, the tyrosine based compound (**11**) was easily coupled with *N*-Boc-6-aminohexanoic acid or *N*-Boc-11-aminoundecanoic acid (**10**, $m = 5$ or 10) to give derivative **12** with a 46% optimal yield. Subsequent deprotection of compound **12**, with TFA in dichloromethane, given the trifluoroacetic ammonium salt intermediate **13**, followed by coupling with chlorambucil, using HOBt, DCC and triethylamine in DMF, gave hybrid **6** with a 19% optimal yield.



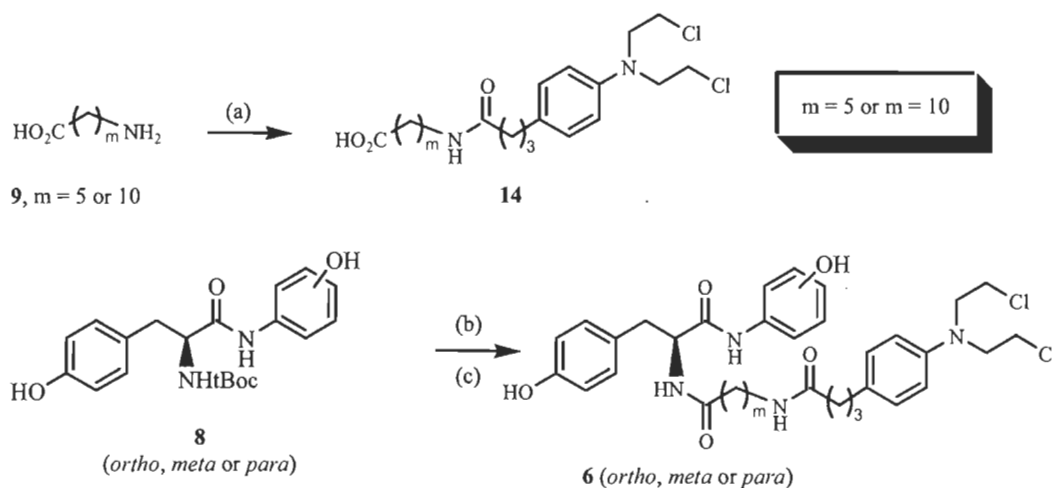
Reagents: (a) hydroxyaniline, HOBt, DCC, DMF (92-96%); (b) TFA, CH_2Cl_2 , 10 min (100%); (c) CLL, HOBt, DCC, triethylamine, DMF (37-44% for **5**; 17-19% for **6**); (d) 2-(t-butoxycarbonyloxymino)-2-phenylacetonitrile (BOC-ON), 1,4-dioxane, water, triethylamine, 22°C (63-97%); (e) $\text{BocNH}(\text{CH}_2)_m\text{CO}_2\text{H}$ (**10**), HOBt, DCC, triethylamine, DMF (45-46%).

Scheme 1. Synthesis of the *ortho*-, *meta*- and *para*-hydroxyphenyl-L-*para*-tyrosinamide-chlorambucil molecules by the linear path.

Alternatively, the final molecules bearing a 5 or 10 carbon atoms spacer (**6**) were synthesized using a convergent and more efficient approach. This method was used for the preparation of all the regioisomers, the *ortho*-, *meta*- and *para*-hydroxyphenyl-L-*para*-tyrosinamide-chlorambucil derivatives. As shown in Scheme 2, 6-aminohexanoic acid (**9**, $m = 5$) and 11-aminoundecanoic acid (**9**, $m = 10$) were initially coupled with chlorambucil to give cytotoxic chains (**14**) with a 98% optimal yield. This transformation was performed upon treatment of the corresponding amino acid with 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (HMDS) in the presence trimethylchlorosilane (TMSCl) and catalytic sulfuric acid in DCM and triethylamine to give the silylated amino acid intermediate. The latter was then added to activated chlorambucil to produce derivative **14** with excellent yields. Then, the *N*-protected *ortho*-, *meta*- or *para*-hydroxyphenyl-L-*para*-tyrosinamide derivative (**8**), prepared as previously described,

was treated with TFA. The resulting trifluoroacetic ammonium salt was coupled with **14** using standard reaction conditions (HOBt, DCC) to give hybrid **6** with a 51% optimal yield.

The optimal overall yield for the synthesis of **6** (*para*-hydroxyphenyl) was 8% via the linear synthesis (scheme 1) and 24% via the convergent synthesis (scheme 2). Moreover, considering *N*-Boc-L-tyrosine (**7**) as the starting material, the same final compounds were prepared in only two chemical steps with the convergent path as compared to five chemical steps with the linear path. The convergent synthesis is, as anticipated, more efficient (3 times more) and more rapid than the linear synthesis. Of note, all the new compounds were fully characterized by their respective IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and mass spectra.



Reagents: (a) 1. HMDS, H_2SO_4 cat., TMSCl, DCM, triethylamine; 2. CLL, HOBt, DCC, triethylamine, DMF (66-98%); (b) TFA, CH_2Cl_2 , 10 min (100%); (c) **14**, HOBt, DCC, triethylamine, DMF (25-51%).

Scheme 2. Synthesis of the hydroxyphenyl-L-*para*-tyrosine-chlorambucil molecules by the convergent path.

In vitro cytotoxic activity

The cytotoxicity of the newly synthesized molecules was evaluated on several tumor cell lines using the MTT colorimetric assay [22]. Chlorambucil, the parent drug, was tested as the control on all human mammary carcinomas.

Initially, all the regioisomers (**5** and **6**, *ortho*-, *meta*- and *para*-hydroxyphenyl, with or without a spacer chain) were tested against estrogen-receptor positive (ER+, MCF-7) and estrogen-receptor negative (ER-, MDA-MB-231) breast cancer cells. As shown by the MTT assays, in most cases, the tyrosinamide-chlorambucil hybrid molecules (*ortho*-, *meta*- and *para*-**5** and **-6**, $m = 5$) were more cytotoxic than chlorambucil itself (up to 4 times) (Table 1). For example, the IC_{50} for compound *meta*-**5** was 31.25 μM as compared to an IC_{50} of 130.36 μM for chlorambucil. Thus, the tyrosine entity contributes to the higher activity of the novel molecules, either by concentrating the drug to the estrogen receptor site or by its own antioxidant effect contributing to the overall activity of the hybrid.

According to the *in vitro* biological assays, the newly synthesized molecules were active on both hormone-dependent (MCF-7) and hormone-independent (MDA-MB-231) breast cancer cell lines. Even if the $ER\alpha$ content is much greater in MCF-7 cells, no specificity was observed with the tyrosinamide-chlorambucil compounds. It is possible that the tyrosinamide part of the molecules interact with other estrogen receptors, which might be present in both cancer cell lines. However the specificity could be noticed more clearly *in vivo*, as it was previously reported for other studies [23, 24]. Further *in vivo* studies will be performed.

Unlike other tyrosine-chlorambucil derivatives, the molecules bearing a 10 carbon atoms chain (**6**, $m = 10$) did not present any activity on both cancer cell types. This lack of cytotoxicity could be explained by a decrease in solubility resulting from the longer alkyl chain. Interestingly, this study shows a superior biological activity for the *meta*-hydroxyphenyl derivatives (*meta*-**5**, $m = 5$ and *meta*-**6**, $m = 5$) when compared to their analogs, *ortho*- and *para*-hydroxyphenyl (*ortho*-**5**, *para*-**5**, and *ortho*-**6**, *para*-**6**, $m = 5$). On both ER+ (MCF-7) and ER- (MDA-MB-231) cells lines, the *meta* derivatives (*meta*-**5**, and *meta*-**6**, $m = 5$) were from 1.3 to 5.0 times more active than the two other regioisomers (*ortho*-**5**, *para*-**5** and *ortho*-**6**, *para*-**6**, $m = 5$). For example, on MCF-7 cancer cells lines, the *meta*-**5** regioisomer showed an IC_{50} of 31.25 μM as compared to 155.11 and 118.59 μM for the *ortho*-**5** and *para*-**5** regioisomers, respectively. A previous

study reported that hybrids made from *meta*-L-tyrosine isomer (see 2 and 3) produced compounds exhibiting higher cytotoxic activity [19]. Then, according to these new data, it is possible to confirm that the *meta*-hydroxyphenyl derivatives (*meta*-5, and *meta*-6, $m = 5$) also provide more active molecules.

Table 1

Inhibitory concentrations (IC_{50} , μM^a) of chlorambucil and the hybrids (5, 6; $m = 5$ and 10) on both ER+ and ER- breast cancer cell lines.

Compound	MCF-7 (ER+)	MDA-MB-231 (ER-)
Chlorambucil	130.36 \pm 2.92	136.85 \pm 6.79
<i>ortho</i> -5	155.11 \pm 19.31	115.07 \pm 7.61
<i>meta</i> -5	31.25 \pm 2.29	48.61 \pm 6.28
<i>para</i> -5	118.59 \pm 3.90	100.66 \pm 4.62
<i>ortho</i> -6, $m = 5$	90.24 \pm 6.03	73.99 \pm 3.80
<i>meta</i> -6, $m = 5$	57.57 \pm 2.04	53.70 \pm 6.26
<i>para</i> -6, $m = 5$	137.61 \pm 6.92	69.31 \pm 4.15
<i>ortho</i> -6, $m = 10$	NR	NR
<i>meta</i> -6, $m = 10$	NR	NR
<i>para</i> -6, $m = 10$	NR	NR

^a Inhibitory concentration (IC_{50} , μM) as obtained by the MTT assay. Experiments were performed in duplicates and the results represent the mean \pm SEM of three independent experiments. The cells were incubated for a period of 72 hours. NR : Not reached.

In order to explore the biological activity of the *ortho*-, *meta*- and *para*-hydroxyphenyl-tyrosinamide molecules on other female cancer types, derivatives bearing a 5 carbon atoms spacer (*ortho*-6, *meta*-6 and *para*-6 with $m = 5$) were selected and tested for a more complete study using a panel of female cancer cell lines. The choice of these molecules was based on their interesting biological activity on breast cancer cells (Table 1). The MTT colorimetric assays were performed using ZR-75-1 (breast, ER+), MDA-MB-468 and MDA-MB-436 (breast, ER-), OVCAR-3 (ovarian, ER+), A2780 (ovarian, ER-) Ishikawa (uterine, ER+) and HEC-1A (uterine, ER-) cancer cell lines.

Once again, in most cases, on all the female cancer cell lines used, the novel hybrid molecules were more cytotoxic than their parent drug, chlorambucil (Table 2). When looking at the *meta*-hydroxyphenyl compound (*meta-6*, $m = 5$), its enhanced activity (when compared to the two others regioisomers; *ortho-6* and *para-6*, $m = 5$) was still observed with breast and ovarian cancer cell lines. Derivative *meta-6*, $m = 5$ possesses an IC_{50} of 31.79 μM as compared to 66.11 μM for chlorambucil on OVCAR-3 ovarian cancer cells lines. This marked cytotoxicity for the *meta*-hydroxyphenyl molecules (*meta-6*, $m = 5$) was more obvious with the ER+ breast (MCF-7) and ER+ ovarian (OVCAR-3) cancer cell lines, which express the ER α protein.

Table 2

Inhibitory concentrations (IC₅₀, μM^a) of chlorambucil and the hybrids (**6**, m = 5) on both ER+ and ER- breast, ovarian and uterine cancer cell lines.

Compound	ZR-75-1 (breast, ER+)	MDA-MB-468 (breast, ER-)	MDA-MB-436 (breast, ER-)	OVCAR-3 (ovarian, ER+)	A2780 (ovarian, ER-)	Ishikawa (uterine, ER+)	HEC-1A (uterine, ER-)
Chlorambucil	100.48 ± 7.01	131.83 ± 7.87	146.88 ± 10.69	66.11 ± 3.43	63.17 ± 6.32	198.03 ± 814	244.98 ± 26.61
<i>ortho-6</i> , m = 5	65.87 ± 3.21	53.24 ± 5.14	63.87 ± 5.30	61.43 ± 2.55	30.57 ± 1.62	103.78 ± 2.31	116.55 ± 3.93
<i>meta-6</i> , m = 5	52.10 ± 4.76	35.42 ± 2.73	NA	31.79 ± 2.91	48.91 ± 4.82	118.10 ± 6.91	219.01 ± 7.66
<i>para-6</i> , m = 5	58.51 ± 4.03	45.03 ± 0.92	69.67 ± 1.47	58.27 ± 4.05	24.10 ± 2.13	NR	131.37 ± 11.32

^a Inhibitory concentration (IC₅₀, μM) as obtained by the MTT assay. Experiments were performed in duplicates and the results represent the mean ± SEM of three independent experiments. The cells were incubated for a period of 72 hours. NR: Not reached.

Conclusion

In conclusion, the natural amino acid, *L-para*-tyrosine, was modified in order to get a structure similar to the steroid backbone. *Ortho*-, *meta*- and *para*-hydroxyaniline were added to the tyrosine entity via an amide bonding. Chlorambucil was linked directly or via a carbon atom spacer (5 carbon or 10 carbon atoms) to create cytotoxic molecules. The design, the synthesis and the biological evaluation were presented in this manuscript.

The various *L-para*-tyrosinamide regioisomers were made using two different synthetic paths: linear and convergent methodologies were applied. The convergent synthesis exceeds the linear synthesis with a global overall yield of 24% compared to 8% for the latter. *In vitro* cytotoxicity assays revealed that all the tyrosinamide-chlorambucil molecules synthesized (*ortho*-, *meta*- *para*-**5** and **-6**, with $m = 5$) were generally more active than chlorambucil itself on breast, ovarian and uterine cancer cells. Hence, the tyrosinamide entity contributes to the enhanced cytotoxicity of the newly synthesized molecules. In addition, all the cytotoxic compounds were active on both hormone-dependent and hormone-independent cancer cells tested. Further biological *in vivo* studies will be performed in order to elucidate the mechanism of action of these new cytotoxic molecules.

Moreover, the *meta*-hydroxyphenyl derivative was more cytotoxic than its *ortho* and *para* analogs on breast and ovarian cancer cells. These results are in line with an earlier reported which showed that derivatives made of *meta*-tyrosine as the starting material were more active than those made with *ortho*-tyrosine and *para*-tyrosine. So, the specific combination of *L-meta*-tyrosine and *meta*-hydroxyaniline will be investigated in our laboratory in an attempt to obtain even more powerful compounds.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies du Québec (FQRNT) for key financial support. The NSERC student fellowship for Caroline Descôteaux is gratefully acknowledged.

References

- [1] Sachdeva MS. Drug targeting systems for cancer chemotherapy. *Expert Opin Investig Drugs* 1998;7(11): 1849-64.
- [2] Dubowchik GM, Walker MA. Receptor-mediated and enzyme-dependent targeting of cytotoxic anticancer drugs. *Pharmacol Ther* 1999;83(2): 67-123.
- [3] Jaracz S, Chen J, Kuznetsova LV, Ojima I. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorg Med Chem* 2005;13(17): 5043-54.
- [4] Keely N, Meegan M. Targeting tumors using estrogen receptor ligand conjugates. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9(3): 370-80.
- [5] Kuiper GGJM., Carlsson BO, Grandien KAJ, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors {alpha} and {beta}. *Endocrinology* 1997;138(3): 863-70.
- [6] Belcher SM. Rapid signaling mechanisms of estrogens in the developing cerebellum. *Brain Res Rev* 2008;57(2): 481-92.
- [7] Shanle EK, Xu W. Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment. *Adv Drug Deliver Rev* 2010;62(13): 1265-76.
- [8] Bai Z, Gust R. Breast cancer, estrogen receptor and ligands. *Arch Pharm* 2009;342(3): 133-49.
- [9] Descôteaux C, Leblanc V, Bélanger G, Parent S, Asselin É, Bérubé G. Improved synthesis of unique estradiol-linked platinum (II) complexes showing potent cytotoxic activity and affinity for the estrogen receptor alpha and beta. *Steroids* 2008;73(11): 1077-89.
- [10] Gupta A, Saha P, Descôteaux C, Leblanc V, Asselin É, Bérubé G. Design, synthesis and biological evaluation of estradiol-chlorambucil hybrids as anticancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2010;20(5): 1614-8.
- [11] Kuduk SD, Zheng FF, Sepp-Lorenzino L, Rosen N, Danishefsky SJ. Synthesis and evaluation of geldanamycin-estradiol hybrids. *Bioorg Med Chem Lett* 1999;9(9): 1233-8.

- [12] Devraj R, Barrett JF, Fernandez JA, Katzenellenbogen JA, Cushman M. Design, synthesis, and biological evaluation of ellipticine-estradiol conjugates. *J Med Chem* 1996;39(17): 3367-74.
- [13] Gagnon V, St-Germain ME, Descôteaux C, Provencher-Mandeville J, Parent S, Mandal SK, et al. Biological evaluation of novel estrogen-platinum (II) hybrid molecules on uterine and ovarian cancers--molecular modeling studies. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14(23): 5919-24.
- [14] Van Themsche C, Parent S, Leblanc V, Descôteaux C, Simard AM, Bérubé G, et al. VP-128, a novel oestradiol-platinum(II) hybrid with selective anti-tumour activity towards hormone-dependent breast cancer cells in vivo. *Endocr-Relat Cancer* 2009;16(4): 1185-95.
- [15] Sun J, Huang YR, Harrington WR, Sheng S, Katzenellenbogen JO, Katzenellenbogen BS. Antagonists selective for estrogen receptor α . *Endocrinology* 2002;143(3): 941-7.
- [16] Sampson NS, Knowles JR. Segmental motion in catalysis: investigation of a hydrogen bond critical for loop closure in the reaction of triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 1992;31(36): 8488-94.
- [17] Muthyala RS, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. Exploration of the bicyclo[3.3.1]nonane system as a template for the development of new ligands for the estrogen receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13(24): 4485-8.
- [18] Anstead GM, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* 1997;62(3): 268-303.
- [19] Descôteaux C, Brasseur K, Leblanc V, Parent S, Asselin É, Bérubé G. SAR study of tyrosine chlorambucil hybrid regioisomers; synthesis and biological evaluation against breast cancer cell lines. *Amino Acids* 2011;20(24): 7388-92.
- [20] Perrin D, Armarego W. Purification of laboratory chemicals. 3rd ed. Oxford: Pergamon Press; 1988.
- [21] Still W, Kahn M, Mitra A. Rapid chromatographic techniques for preparative separation with moderate resolution. *J Org Chem* 1978;43(14): 2923-25.
- [22] Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987;47(4): 936-42.

- [23] Karl J, Gust R, Spruss T, Schneider MR, Schoenenberger H, Engel J, et al. Ring-substituted [1, 2-bis (4-hydroxyphenyl) ethylenediamine] dichloroplatinum (II) complexes: compounds with a selective effect on the hormone-dependent mammary carcinoma. *J Med Chem* 1988;31(1): 72-83.
- [24] Otto AM, Faderl M, Schöenenberger H. Dissociation of estrogenic and cytotoxic properties of an estrogen receptor-binding platinum complex in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 1991;51(12): 3217-23.

CHAPITRE V

EXPLORATION DE LA SYNTHÈSE DE MOLÉCULES L-TYROSINE- PLATINE(II) COMME AGENTS ANTICANCÉREUX POTENTIELS

Caroline Descôteaux, Kevin Brasseur, Valérie Leblanca, Éric Asselina et
Gervais Bérubé*

Le contenu de ce chapitre fera l'objet d'une publication dans une revue scientifique appropriée sous la forme d'un article rédigé en anglais.

5.1 Contribution des auteurs

La majeure partie des travaux présentés fut réalisée par Caroline Descôteaux, sous la supervision des Drs Bérubé et Asselin. La synthèse chimique de l'ensemble des molécules a été effectuée par celle-ci. L'évaluation biologique fut réalisée par Kevin Brasseur et Valérie Leblanc. Première auteure de cette publication, Caroline Descôteaux a rédigé ce manuscrit sous la supervision du Dr Bérubé.

5.2 Résumé

La recherche de nouveaux agents chimiothérapeutiques sélectifs conçus pour diminuer les effets secondaires associés à la chimiothérapie demeure un sujet d'intenses recherches. L'objectif de cette étude était de concevoir un dérivé du platine(II) au squelette non-stéroïdien qui pourrait cibler le récepteur estrogénique alpha ($RE\alpha$) sans induire la prolifération cellulaire. Dans cette optique, l'acide aminé L-tyrosine fut modifié et lié à un analogue du cisplatine. Ainsi, la L-tyrosine pourrait possiblement agir comme un transporteur pour interagir avec le $RE\alpha$ et concentrer la portion cytotoxique au niveau des cellules cancéreuses du sein hormono-dépendantes. Ici, nous décrivons trois méthodologies alternatives qui ont été utilisées pour fabriquer ces nouvelles molécules anticancéreuses.

5.3 Quatrième article scientifique

Exploring the synthesis of L-tyrosine-platinum(II) molecules as potential anticancer agents

Caroline Descôteaux , Kevin Brasseur, Valérie Leblanc, Éric Asselina and
Gervais Bérubé*

Département de Chimie-Biologie, Groupe de Recherche en Oncologie et Endocrinologie Moléculaires, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7, e-mail: Caroline.Descoteaux@uqtr.ca, Kevin.Brasseur@uqtr.ca, Valerie.Leblanc@uqtr.ca, Eric.Asselin@uqtr.ca, Gervais.Berube@uqtr.ca

* Corresponding author: Gervais Bérubé;

Phone: 819-376-5011 ext. 3353,

Fax: 819-376-5084,

e-mail: Gervais.Berube@uqtr.ca.

Département de Chimie-Biologie,

Groupe de Recherche en Oncologie et Endocrinologie Moléculaires,

Université du Québec à Trois-Rivières,

C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

Abbreviations List: Tyrosine, tyr; estrogen receptor alpha, ER α ; estrogen receptor positive, ER+; estrogen receptor negative, ER-.

Abstract

The search for new specific chemotherapeutic drugs designed to minimize the toxic side effects resulting from chemotherapy is still a subject of intense research. The objective of the current study was to design a non-steroidal-platinum(II) derivative that would target the estrogen receptor alpha (ER α) without triggering estrogenic cell proliferation. For this purpose, L-tyrosine amino acid was modified and attached to a cisplatin analog. Hence, the L-tyrosine entity could possibly act as a transporter, interact with the ER α protein and concentrate the cytotoxic moiety to hormone-dependent breast cancer cells. Herein, we describe three different alternative methodologies that were used to make these new anticancer molecules. Preliminary biological activity on breast cancer cell lines is also reported.

Key words: L-tyrosine; Platinum(II); Anticancer agent; Breast cancer

Introduction

Lately, much research has been performed in order to develop more potent and selective anticancer drugs. Different approaches have been used in attempt to concentrate a known therapeutic compound to a specific organ or tissue [1-3]. Hence, the systemic distribution of the drug and deleterious toxic side effects induced by chemotherapy were expected to be considerable reduced.

Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum(II)) (1) is a bisalkylating agent already used for the treatment of several types of cancer, such as lung, head and neck, bladder, ovarian and testicular tumors [4]. This small and effective anticancer agent has already been linked to estradiol (2), the natural female sex hormone, giving new estrogen-cytotoxic hybrid molecules (3) (Figure 1) [5-7]. The effectiveness of one of these compounds has been confirmed *in vitro* and *in vivo* on hormone-dependent breast cancers [8]. It has been established that the estradiol portion of the molecule contributes to target the ER α protein and then allows the platinum(II) moiety to effectively kill cancerous cells. Nevertheless, in spite of the interesting biological activity observed, the estradiol-platinum(II) molecule also induce transcriptional activity, which could contribute to cancer progression.

Non-estrogenic cytotoxic molecules bearing platinum(II) entity have also been synthesized [9]. Ligand with structural analogies to estradiol were designed and linked to platinum(II) unit in an attempt to interact with the ER α and let the toxic moiety reach and accumulate into hormone-dependent cancer cells. However, the steroid-like cytotoxic molecules did not have significant binding affinity for the ER α and it was found that the cytotoxic effects observed were not mediated through the ER α .

Recently, the natural amino acid L-tyrosine was transformed in order to act as an estrogen receptor ligand. This particular amino acid had been already recognized as a potential estrogen ligand as a part of its structure seems to imitate the phenol portion of estradiol [10]. Chlorambucil, a chemotherapeutic drug mainly used for the treatment of chronic lymphocytic leukemia, was linked to tyrosine, which acted as a transporter

[11-13]. These innovative anticancer compounds (**4**) presented interesting *in vitro* activity against breast cancer cell lines.

Although chlorambucil, given alone, can inhibit cancer cells proliferation, previous study had revealed that it is less active than cisplatin on breast cancer cells [14]. In an attempt to use the L-tyrosine skeleton as a potential estrogen receptor ligand, as well as the powerful activity of cisplatin, L-tyrosine-Pt(II) hybrid molecules (**5**) have been designed. These compounds were synthesized using three different synthetic methodologies. This manuscript presents the chemical synthesis employed to make the desired final compounds. To the best of our knowledge, it is the first time the synthesis of tyrosine-Pt(II) molecules is reported. Preliminary *in vitro* biological results on two breast cancer cell lines are reported in this manuscript.

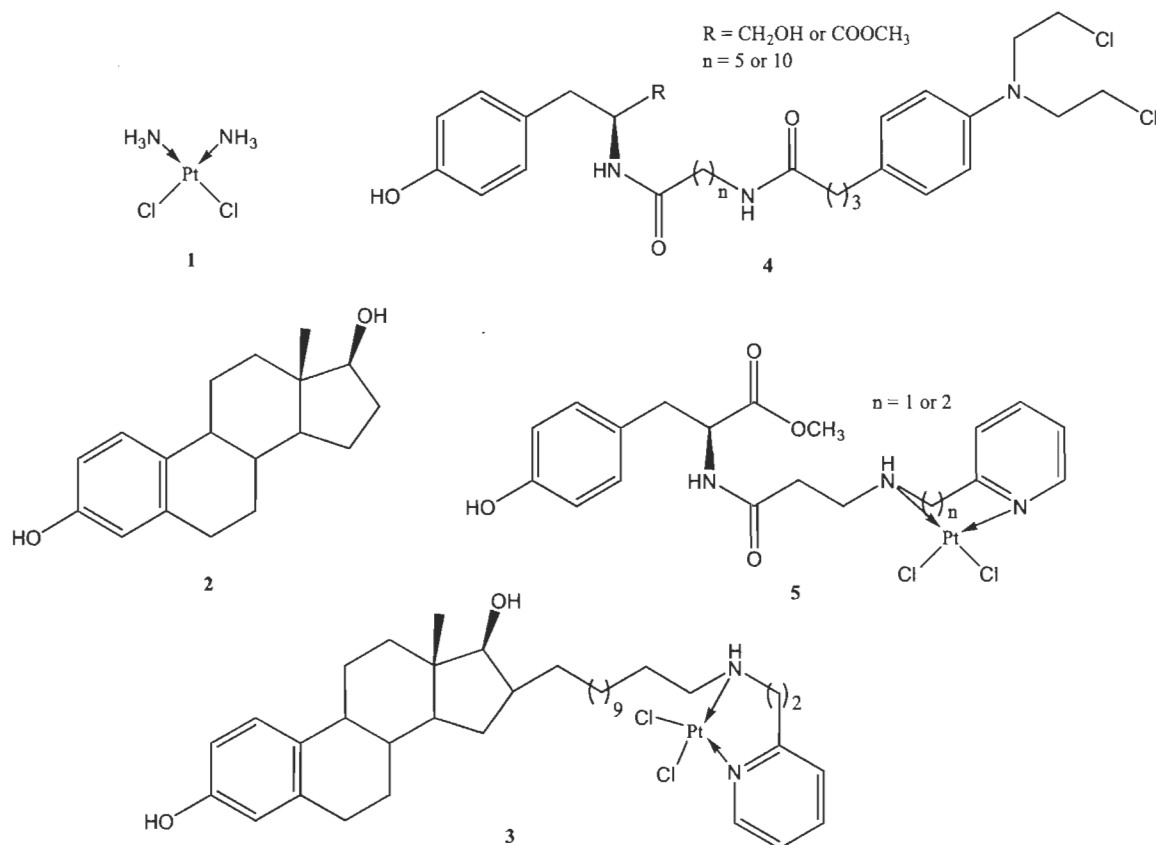
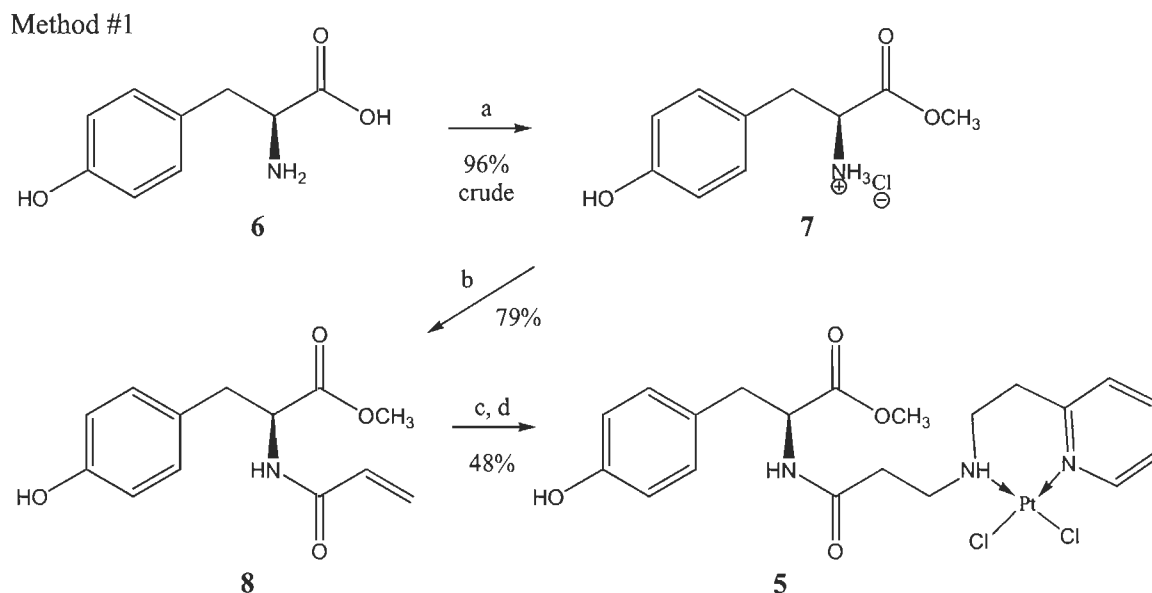


Figure 1. Structure of cisplatin (**1**), estradiol (**2**), estradiol-Pt(II) hybrid molecule (**3**), L-tyrosine-chlorambucil hybrid molecules (**4**) and L-tyrosine-Pt(II) hybrid molecules (**5**)

Results and discussion

Synthesis of L-tyrosine methyl ester platinum(II) hybrids (**5**)

The L-tyrosine-Pt(II) hybrid (**5**) was synthesized using three different methodologies. The first method is depicted in Scheme 1. L-tyrosine (**6**) was initially esterified using standard reaction conditions (with thionyl chloride in methanol). The resulting hydrochloride salt (**7**) was obtained in 96% yield. Then, in presence of isobutyl chloroformate and triethylamine in *N,N*-dimethylformamide (DMF) at room temperature (22°C), it was coupled to acrylic acid giving an amide (**8**) in 79% yield. Conjugate addition of 2-(2-aminoethyl)pyridine to the conjugated amide (**8**) in the presence of lithium perchlorate (LiClO₄) was performed at room temperature (22°C). This solvent-free Michael addition accelerates the reaction and makes possible the 1,4-conjugate addition of amines to less reactive substituted α,β -unsaturated amides [15]. Subsequently, the resulting crude gummy solid was treated with potassium tetrachloroplatinate (K₂PtCl₄) in a mixture of DMF and water (1:1) to give the corresponding L-tyrosine methyl ester platinum(II) complex (**5**, *n* = 2) in 48% yield. This first method provides the desired L-tyrosine platinum(II) cytotoxic hybrid (**5**, *n* = 2) in four chemical steps with 36% overall yield.

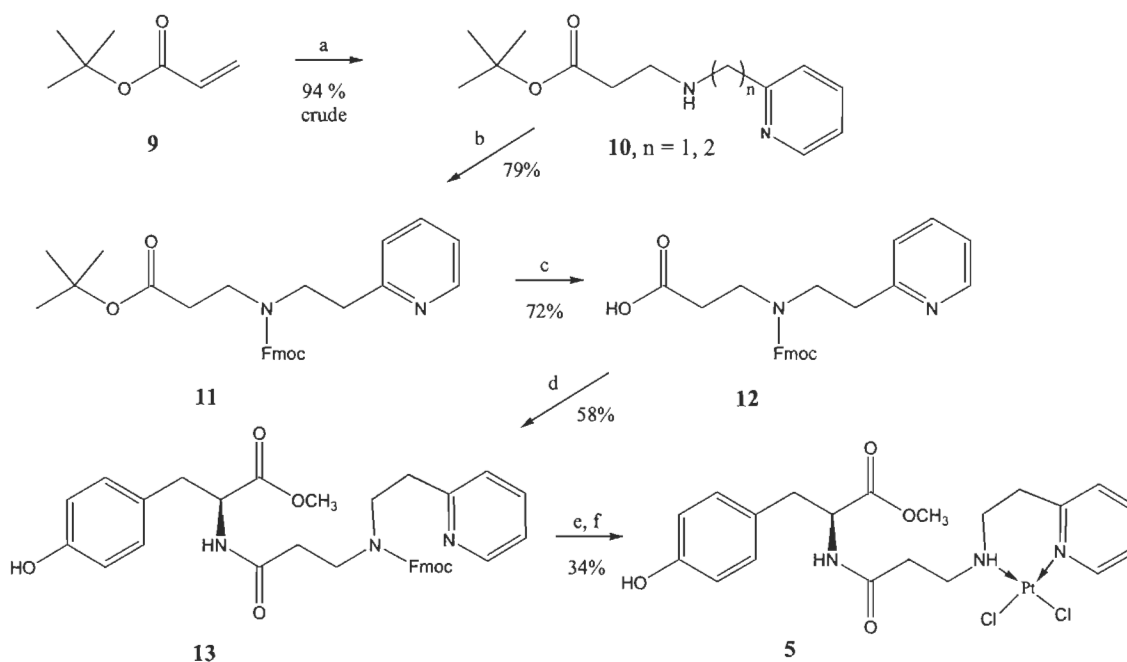


Reagents: a) SOCl_2 , MeOH, reflux; b) $\text{ClCO}_2\text{iso-Bu}$, acrylic acid, Et_3N , CH_2Cl_2 ;
c) LiClO_4 , 2-(2-aminoethyl)pyridine, N_2 ; d) K_2PtCl_4 , DMF, H_2O , darkness.

Scheme 1. Synthesis of L-tyrosine-Pt(II) hybrid molecule (**5**, $n = 2$) using the first synthetic method

The same molecule (**5**, $n = 2$) was also synthesized starting from *tert*-butyl acrylate (**9**) (Scheme 2). Under standard Michael conditions (reflux in methanol), 2-(2-aminoethyl)pyridine was added to the *tert*-butyl acrylate (**9**) in 94% yield. The product (**10**) was sufficiently pure to be used at the next step without any purification. The amino functionality was then protected. Fmoc-OSu was used as protecting group and it was added to the corresponding free amino *tert*-butyl ester in basic reaction conditions (NaHCO_3). The fully protected molecule (**11**) was obtained in 79% yield. Subsequently, selective deprotection of the *tert*-butyl ester in the presence of Fmoc was performed using ZnBr_2 in methylene chloride [16]. The free acid N-protected intermediate (**12**) was generated in 72% yield. In presence of HOBT, DCC and triethylamine in DMF, compound **12** was coupled to L-tyrosine methyl ester hydrochloride salt (**7**) previously synthesized. The pure molecule (**13**) was isolated in 58% yield. Then, *N*-deprotection (with morpholine in DMF) followed by complexation (with K_2PtCl_4 in DMF: H_2O (1:1)) gave the desired molecule (**5**, $n = 2$) in 34% yield. Using this second methodology, the desired L-tyrosine platinum(II) cytotoxic compound (**5**, $n = 2$) was obtained in six chemical steps with 11% overall yield.

Method #2

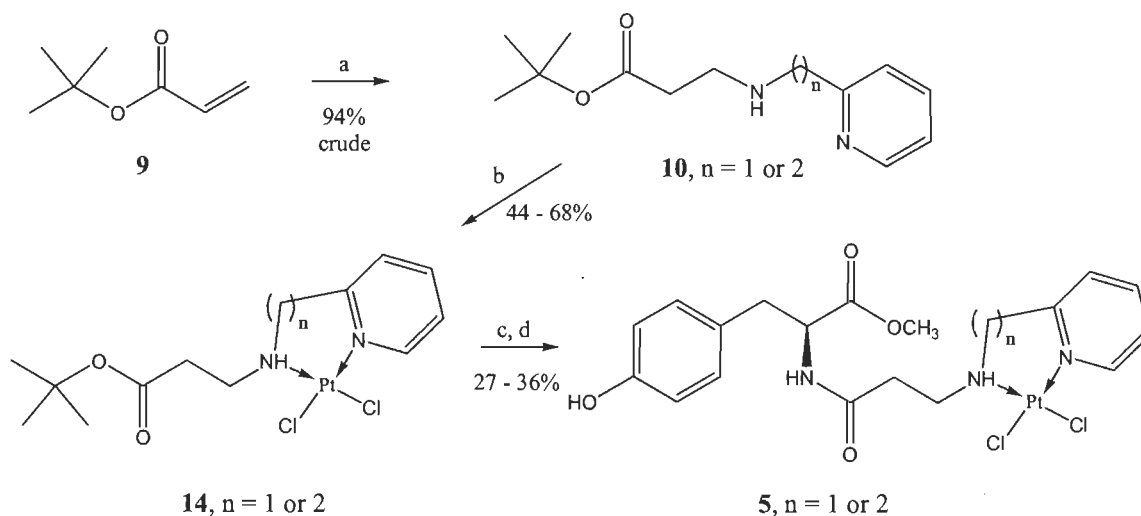


Reagents: a) Relevant 2-(aminoalkyl)pyridine, dry MeOH, reflux; b) Only with 10, n = 2, Fmoc-OSu, NaHCO₃, H₂O, 1,4-dioxane; c) ZnBr₂, CH₂Cl₂; d) L-tyrosine-methyl ester hydrochloride (7), HOBt, DCC, Et₃N, DMF; e) morpholine, DMF; f) K₂PtCl₄, DMF, H₂O, darkness.

Scheme 2. Synthesis of L-tyrosine-Pt(II) hybrid molecule (**5**, n = 2) using the second synthetic method

The third method involved the formation of the platinum(II) complex at an earlier stage of the synthesis (Scheme 3). Hence, the 2-(2-aminoethyl)pyridine *tert*-butylacrylate derivative (**10**, n = 1 or 2, synthesized in 94% yield as described for the second synthesis) has been immediately complexed to platinum(II) under usual conditions (K₂PtCl₄, DMF:H₂O (1:1)). The platinum(II) molecules (**14**, n = 1 or 2) were obtained in 44 and 68% yield, respectively. Then, the *tert*-butyl protecting group was removed with trifluoroacetic acid (TFA) and the resulting salt was condensed with the L-tyrosine methyl ester hydrochloride salt (**7**, synthesized in 96% yield as previously described). The coupling reaction was performed in presence of HOBt, DCC and triethylamine in DMF. The final L-tyrosine-Pt(II) derivatives (**5**, n = 1 or 2) were obtained in yields ranging from 27 to 36%. Using this third methodology, the desired final cytotoxic hybrids were obtained in four chemical steps with a 23% optimal overall yield.

Method #3



Reagents: a) Relevant 2-(aminoalkyl)pyridine, dry MeOH, reflux; b) K_2PtCl_4 , DMF, H_2O , darkness; c) TFA, CH_2Cl_2 , darkness; d) L-tyrosine-methyl ester hydrochloride (7), HOBT, DCC, Et_3N , DMF.

Scheme 3. Synthesis of L-tyrosine-Pt(II) hybrid molecules (5, n = 1 or 2) using the third synthetic method

In vitro cytotoxic activity

The cytotoxicity of the newly L-tyrosine based platinum(II) hybrids was evaluated on hormone-dependent (MCF-7) and hormone-independent (MDA-MB-231) breast cancer cell lines. First, the MTT colorimetric assay was performed for the two final L-tyrosine-Pt(II) hybrids, synthesized from 2-(aminomethyl)pyridine (5, n = 1) and 2-(2-aminoethyl)pyridine (5, n = 2). Unfortunately, no activity was observed with the final hybrids. These products were only partially soluble in cells medium and this could explain this lack of cytotoxicity. Subsequently, in order to verify if the toxic part of these hybrids (without the ligand, L-tyrosine) was active, the corresponding precursors, 2-(aminomethyl)pyridine-Pt(II) (14, n = 1) and 2-(2-aminoethyl)pyridine-Pt(II) (14, n = 2) were tested. These molecules exhibited comparable cytotoxicity to the parent drug, cisplatin (1) on both breast cancer cell lines. Moreover, the 2-(aminomethyl)pyridine derivative (14, n = 1) was slightly more active than its 2-(2-aminoethyl)pyridine (14, n = 2) analog.

Table 1. Inhibitory concentrations (IC_{50} , μM) of cisplatin (**1**), 2-methylaminopyridine-Pt(II) (**14**, $n = 1$) and 2-(2-ethylamino)pyridine-Pt(II) (**14**, $n = 2$) derivatives on ER⁺ and ER⁻ breast cancer cell lines.

Compound	MCF-7, ER ⁺ (μM)	MDA-MB-231, ER ⁻ (μM)
Cisplatin (1)	30.1 \pm 3.0	12.9 \pm 1.2
14 , $n = 1$	27.8 \pm 0.5	15.3 \pm 1.6
14 , $n = 2$	36.0 \pm 1.7	28.9 \pm 0.3

^aInhibitory concentration (IC_{50} , μM) as obtained by the MTT assay. Experiments were performed in triplicates and the results represent the mean \pm SEM of three independent experiments. The cells were incubated for a period of 72 h.

These preliminary *in vitro* biological results confirm that the platinum(II) portion of the molecules presents interesting cytotoxic activity, similar to that of cisplatin (**1**), and that the binding to a L-tyrosine moiety reduced considerably its solubility and, consequently, its anticancer activity.

Conclusion

In conclusion, L-tyrosine methyl ester platinum(II) hybrids (**5**) were synthesized by three distinct methodologies. The desired molecules were made in four chemical steps (36% yield) following the first method, in six chemical steps (11% yield) following the second method and in four chemical steps (23% yield) following the third synthesis. This shows the feasibility of the synthesis as well as the variety of methods available to make this type of product. The new compounds (**5**, $n = 1$ or 2) were tested against hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. No activity was observed for the L-tyrosine-Pt(II) hybrid molecules (**5**, $n = 1$ or 2), but their platinum(II) precursors (**14**, $n = 1$ or 2) presented similar activity to cisplatin (**1**). Hence, work is presently in progress to modify the amino acid portion of the molecules in order to make it more soluble and consequently, to improve their overall cytotoxic activity. This preliminary study shows that it is possible to make such compounds by a variety of synthetic methods paving the way for further development of this type of platinum(II) complexes.

Experimental section

Chemistry

All reactions were performed with ACS Fisher solvents. Anhydrous reactions were performed under an inert atmosphere, the set-up assembled and cooled under dry nitrogen. Unless otherwise noted, starting material, reactant and solvents were obtained commercially and were used as such or purified and dried by standard means [17]. Organic solutions were dried over magnesium sulfate, evaporated on a rotatory evaporator and under reduced pressure. All reactions were monitored by UV fluorescence, or staining with iodine. Commercial TLC plates were Sigma T 6145 (polyester silica gel 60 Å, 0.25mm). Flash column chromatography was performed according to the method of Still and co-workers on Merck grade 60 silica gel, 230-400 mesh [18]. All solvents used in chromatography had been distilled.

The infrared spectra were taken on a Nicolet Impact 420 FT-IR and a Thermo Nicolet IS10 FT-IR with ATR. Mass spectral assays were obtained using a MS model 6210, Agilent technology instrument. The high resolution spectra were obtained by TOF (time of flight) using ESI (electrospray ionisation) (Université du Québec à Montréal).

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Varian 200 MHz NMR apparatus. Samples were dissolved in deuteriochloroform (CDCl_3), deuterioacetone (acetone- d_6) or deuterodimethylsulfoxide (DMSO- d_6) for data acquisition using tetramethylsilane or chloroform as internal standard (TMS, δ 0.0 ppm for ^1H -NMR and CDCl_3 δ 77.0 ppm for ^{13}C -NMR). Chemical shifts (δ) are expressed in parts per million (ppm), the coupling constants (J) are expressed in hertz (Hz). Multiplicities are described by the following abbreviations: s for singlet, d for doublet, dd for doublet of doublets, t for triplet, dt for doublet of triplets, q for quartet, dq for doublet of quartets, m for multiplet, #m for several multiplets, br for broad signal.

*First synthetic method (Scheme 1):**L-tyrosine methyl ester hydrochloride (7)*

A solution of tyrosine **6** (3.89 mmol) in anhydrous methanol was stirred at 0°C. Thionyl chloride (11.69 mmol) was then added slowly. The mixture was heated to reflux for 3.5 h. Then, the solvent was evaporated and the residue was recrystallized in diethyl ether. The desired compound was filtered, washed with cold ether and dried in a desiccator for a 1 day. Crude salt (**7**), obtained in a 100% yield, was sufficiently pure to be use at the next step. The spectral data for this compound are as reported in the literature [11]. IR (KBr, ν_{\max} , cm^{-1}): 3354 (N-H), 3078 (O-H), 1742 (C=O ester), 1224 (CO-O-C). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm): 9.46 (1H, br s, OH), 8.60 (3H, br s, NH_3), 7.01 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 3-CH tyr), 6.73 (2H, d, $J = 8.60$ Hz, 2-CH tyr), 4.16 (1H, m, CHNH_3), 3.67 (3H, s, OCH_3), 3.03 (2H, m, CH_2CH). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , δ ppm): 170.1 (COOCH_3), 157.4 (1-C tyr), 131.0 (2C, 3-C tyr), 125.0 (4-C tyr), 116.1 (2C, 2-C tyr), 54.1 (CHNH_3), 53.2 (OCH_3), 35.7 (CH_2CH). ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_3 = 196.0968$; found = 196.0968.

N-acryloyl-L-tyrosine methyl ester (8)

A solution of acrylic acid (1.19 mmol) in dichloromethane was neutralized with triethylamine (1.31 mmol) and stirred at 0°C. Then, isobutylchloroformate (1.31 mmol) was added. The solution was kept at 0°C for 1 h afterwards a solution of L-tyrosine methyl ester hydrochloride (**7**, 3.89 mmol) in dichloromethane and triethylamine (1.42 mmol) was added. The resulting mixture was stirred at room temperature for 24 h. Work-up was done by diluting with ethyl acetate and by washing the organic phase with water (4x). The organic phase was dried with anhydrous magnesium sulfate, filtered and evaporated. The product was purified by flash chromatography (hexanes: acetone, 8:2) to give a pure compound (**8**) in 79% yield. IR (ATR, ν_{\max} , cm^{-1}): 3200-3450 (N-H and O-H), 1738 (C=O ester), 1231 (CO-O-C). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 8.26 (1H, s, OH), 7.56 (1H, br d, $J = 7.4$ Hz, NH), 7.04 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 3-CH tyr), 6.74 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, 2-CH tyr), 6.26 (2H, m, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.59 (1H, dd, $J = 9.6$ Hz and $J = 2.5$ Hz, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 4.74 (1H, m, CHNH), 3.65 (3H, s, OCH_3), 2.99 (2H, m, CH_2CH). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 170.2 (COOCH_3), 165.0 (NHCO), 156.5 (1-C tyr), 131.3

($\underline{\text{C}}\text{H}_2=\underline{\text{C}}\text{H}$), 130.4 (2C, 3-C tyr), 127.7 ($\text{C}\underline{\text{H}}_2=\underline{\text{C}}\text{H}$), 125.8 (4-C tyr), 115.4 (2C, 2-C tyr), 54.2 ($\text{C}\underline{\text{H}}\text{NH}$), 51.6 (OCH_3), 36.9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}$). ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_4 = 250.1074$; found = 250.1067.

N-3-(2-pyridin-2-yl-ethylamino)-propionyl-L-tyrosine methyl ester dichloroplatinate(II) (**5**, $n = 2$)

The *N*-acryloyl-L-tyrosine-methyl ester (**8**, 0.38 mmol) solid was placed in a flask in the presence of LiClO_4 (0.38 mmol). The mixture was kept under nitrogen. 2-(2-Ethylamino)pyridine (in excess) was added and the mixture was stirred at room temperature for 4 h. The gummy solid was then filtered and washed with dichloromethane in order to isolate the crude product from the solid phase. After evaporating the filtrate, the resulting oil was diluted with ethyl acetate and washed with water (2x). The organic phase was dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated. Crude compound (0.18 mmol) was dissolved in DMF. The starting pH value was 9. Potassium tetrachloroplatinate(II) (0.19 mmol) dissolved in DMF/ H_2O (1:1) was added and the solution was stirred in darkness for 4 days. The final pH value was 5. Then, 4 drops of DMSO were added to the resulting mixture to destroy the excess of K_2PtCl_4 and the solution was stirred for two additional hours. Next, KCl (1 g) was added and the mixture was stirred overnight. The KCl was filtered and the filtrate was completely evaporated to give the crude material. Then, it was purified by flash chromatography (chloroform: methyl alcohol, 9.5:0.5) to give a pure compound (**5**, $n = 2$) in 48% yield. After flash column chromatography, the fractions were collected using diethyl ether. It was observed that the product recrystallized in contact with ether. IR (ATR, ν_{max} , cm^{-1}): 3100-3400 (N-H and O-H), 1738 (C=O ester), 1652 (C=O amide), 1217 (CO-O-C). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 9.07 (1H, dm, $J = 5.9$ Hz, 6-CH pyr), 8.22 (1H, s, OH), 8.03 (1H, dt, $J = 1.4$ Hz and $J = 7.6$ Hz, 4-CH pyr), 7.55 (1H, d, $J = 6.2$ Hz, 3-CH pyr), 7.53 (1H, partly hidden, NH amide), 7.42 (1H, t, $J = 6.9$ Hz, 5-CH pyr), 7.04 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 3-CH tyr), 6.75 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, 2-CH tyr), 6.12 (1H, br s, NH-Pt), 4.62 (1H, m, $\text{C}\underline{\text{H}}\text{NH}$), 3.63 (3H, s, OCH_3), 2.88 (2H, m, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 171.9 ($\underline{\text{C}}\text{OOCH}_3$), 169.8 (NHCO), 156.3 (2-C pyr), 156.1 (6-C pyr), 153.5 (1-C tyr), 139.2 (4-C pyr), 130.2 (2C, 3-C tyr), 127.6 (4-C tyr),

124.7 (3-C pyr), 123.7 (5-C pyr), 115.1 (2C, 2-C tyr), 52.4 (CHNH), 51.3 (OCH₃), 39.3, 36.5, 33.6, 29.2. ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₂₀H₂₆Cl₂N₃O₄Pt = 638.0929; found = 638.0927.

Second synthetic method (Scheme 2):

3-(2-Pyridin-2-yl-alkylamino)-propionic acid tert-butyl ester (10)

The relevant 2-(aminoalkyl)pyridine (13.65 mmol) was dissolved in anhydrous methanol (20 mL) and *tert*-butyl acrylate (**9**, 6.83 mmol) was added. The mixture was stirred and heated to reflux for 5 h. The solvent was then evaporated and the residue was diluted with diethyl ether. The organic phase was washed with water (6x). The organic phases were combined, dried with anhydrous sodium sulfate and evaporated to an orange viscous oil (**10**, n = 1 or 2) in 94%. No further purification was needed.

3-(2-Pyridin-2-yl-methylamino)-propionic acid tert-butyl ester (10, n = 1): IR (ATR, ν_{\max} , cm⁻¹): 3324 (N-H), 1720 (C=O ester), 1247 (CO-O-C). ¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 8.48 (1H, dm, J = 3.9 Hz, 6-CH pyr), 7.57 (1H, dt, J = 2.0 Hz and J = 7.8 Hz, 4-CH pyr), 7.26 (1H, d, J = 7.8 Hz, 3-CH pyr), 7.08 (1H, m, 5-CH pyr), 3.85 (2H, s, NHCH₂pyr), 2.83 (2H, t, J = 6.6 Hz, CH₂NHCH₂pyr), 2.41 (2H, t, J = 6.8 Hz, COCH₂), 2.37 (1H, br s, NH), 1.38 (9H, s, 3x CH₃). ¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 172.0 (CO), 159.7 (2-C pyr), 149.2 (6-C pyr), 136.3 (4-C pyr), 122.0 (3-C pyr), 121.8 (5-C pyr), 80.4 (C(CH₃)₃), 55.0 (NHCH₂pyr), 44.9 (CH₂NHCH₂pyr), 35.9 (COCH₂), 28.0 (3C, CH₃). ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₁₃H₂₁N₂O₂ = 237.1598; found = 237.1591.

3-(2-Pyridin-2-yl-ethylamino)-propionic acid tert-butyl ester (10, n = 2): IR (NaCl, ν_{\max} , cm⁻¹): 3320 (N-H), 1728 (C=O ester), 1266 (CO-O-C). ¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 8.47 (1H, dm, J = 3.9 Hz, 6-CH pyr), 7.54 (1H, dt, J = 2.0 Hz and J = 7.6 Hz, 4-CH pyr), 7.12 (1H, d, J = 7.8 Hz, 3-CH pyr), 7.09 (1H, m, 5-CH pyr), 2.94-2.95 (4H, 2d overlapped, CH₂NHCH₂CH₂pyr), 2.82 (2H, t, J = 6.6 Hz, NHCH₂CH₂pyr), 2.36 (2H, t, J = 6.6 Hz, COCH₂), 2.08 (1H, br s, NH), 1.36 (9H, s, 3x CH₃). ¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 172.3 (CO), 160.4 (2-C pyr), 149.5 (6-C pyr), 136.6 (4-C pyr), 123.5 (3-C pyr), 121.4 (5-C pyr), 80.6 (C(CH₃)₃), 49.4 (NHCH₂CH₂pyr), 45.3 (CH₂NHCH₂CH₂pyr), 38.6

(CH₂pyr), 36.1 (COCH₂), 28.3 (3C, CH₃). ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₁₄H₂₃N₂O₂ = 251.1754; found = 251.1747.

3-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-(2-pyridin-2-yl-ethyl)-amino]-propionic acid tert-butyl ester (11)

3-(2-Pyridin-2-yl-ethylamino)-propionic acid *tert*-butyl ester (**10**, n = 2, 2.31 mmol) was slowly dissolved in water (6 mL) in the presence of NaHCO₃ (0.4 g). In another flask, Fmoc-OSu (3.47 mmol) was dissolved in dioxane (6 mL) at 0°C for 1 h. The latter solution was added to the *tert*-butyl ester solution. The mixture was stirred at room temperature for 28 h. Work-up was done by diluting with ethyl acetate and by washing the organic phase with water (4x). The organic phase was dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated. The product was purified by flash chromatography (hexanes: acetone, 8.8:1.2) to give a pure compound (**11**) in 79% yield. IR (NaCl, ν_{max}, cm⁻¹): 1732 (C=O, *t*-Bu-ester), 1705 (C=O, NCOO). ¹H-NMR (CDCl₃, δ ppm): 8.51 (1H, d, J = 4.3 Hz, 6-CH pyr), 7.74 (2H, d, J = 6.6 Hz, 6-CH Fmoc), 7.57 (2H, d, J = 6.3 Hz, 3-CH Fmoc), 7.56 (1H, t partly hidden, 4-CH pyr), 7.34 (4H, m, 4-CH Fmoc and 5-CH Fmoc), 7.11 (1H, m, 5-CH pyr), 6.83 and 7.15 (2x 0.5H, 2x d, J = 7.8 Hz, 3-CH pyr), 4.48 (2H, t apparent, J = 5.3 Hz, COOCH₂CH), 4.21 (1H, q apparent, J = 5.9 Hz, COOCH₂CH), 3.49 (4H, m apparent, CH₂NCH₂), 2.74 and 3.00 (2x 1H, 2x t, J = 7.2 Hz, NHCH₂CH₂pyr), 2.21 and 2.42 (2x 1H, 2x d, J = 7.2 Hz, COCH₂), 1.41 and 1.43 (9H, 2x s, 3x CH₃). ¹³C-NMR (CDCl₃, δ ppm): 170.9 (CO *tert*-butyl ester), 158.9 (CO Fmoc), 155.8 (2-C pyr), 149.3 (6-C pyr), 144.0 (2C, 2-C Fmoc), 141.4 (2C, 1-C Fmoc), 136.3 (4-C pyr), 127.6, 127.1 and 124.9 (6C, 3-C Fmoc, 4-C Fmoc and 6-C Fmoc), 123.5 (3-C pyr), 121.4 (5-C pyr), 120.0 (2C, 5-C Fmoc), 80.9 (C(CH₃)₃), 47.6, 44.4, 37.5, 34.5, 28.3 (3C, CH₃). ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₂₉H₃₃N₂O₄ = 473.2435; found = 473.2437.

3-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-(2-pyridin-2-yl-ethyl)-amino]-propionic acid (12)

Fmoc-(2-pyridin-2-yl-ethyl)-amino]-propionic acid *tert*-butyl ester (**11**, 0.18 mmol) was dissolved in dichloromethane (4 mL) and ZnBr₂ (0.2 g) was added. The mixture was stirred at room temperature for 4 days. Next, water (2 mL) was added and the mixture

was stirred for two additional hours. The aqueous phase was then washed with dichloromethane (2x) and the organic phase was dried with anhydrous magnesium sulfate, filtered and evaporated. The product was purified by flash chromatography (chloroform: methanol, 9.5:5) to give a pure compound (**12**) in 72% yield. IR (NaCl, ν_{\max} , cm^{-1}): 3230-3570 (COOH), 1692 (C=O, NCOO). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 8.54 (1H, t apparent, $J = 6.5$ Hz, 6-CH pyr), 7.76 (3H, d and br s partly hidden, $J = 7.0$ Hz, 6-CH Fmoc and COOH), 7.61 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, 3-CH Fmoc), 7.37 (6H, m apparent, 4-CH pyr, 5-CH pyr, 4-CH Fmoc and 5-CH Fmoc), 6.70 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, 3-CH pyr), 4.45 and 4.72 (2x 1H, 2d, $J = 4.7$ Hz and $J = 6.6$ Hz, COOCH_2CH), 4.24 (1H, m apparent, COOCH_2CH), 3.49, 3.18, 2.67 and 2.54 (8H, #m apparent, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{pyr}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , δ ppm): 174.3 (COOH), 156.2 (CO Fmoc), 155.9 (2-C pyr), 146.8 (6-C pyr), 144.2 (2C, 2-C Fmoc), 141.6 (2C, 1-C Fmoc), 139.5 (4-C pyr), 127.9, 127.4 and 125.2 (7C, 3-C Fmoc, 4-C Fmoc, 6-C Fmoc and 3-C pyr), 122.8 (5-C pyr), 120.2 (2C, 5-C Fmoc), 67.6, 47.5, 43.8, 37.5, 35.4, 33.9. ESI+ HRMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4 = 417.1809$; found = 417.1801.

*2-{3-[(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-(2-pyridin-2-yl-ethyl)-amino]-propionylamino}-3-(4-hydroxy-phenyl)-propionic acid methyl ester (**13**)*

Fmoc-(2-pyridin-2-yl-ethyl)-amino]-propionic acid (**12**, 0.26 mmol) was dissolved in DMF (2.5 mL) and the acid was activated using DCC (0.27 mmol) and HOBT (0.27 mmol). Beside, tyrosine methyl ester hydrochloride (**7**, 0.25 mmol) was dissolved in DMF (2.5 mL) and treated with triethylamine (0.26 mmol). The tyrosine solution was then added to the activated acid solution. The mixture was stirred at room temperature for 27 h. The solution was diluted with ethyl acetate and water, and then washed with water (4x). The organic phase was dried with sodium sulfate, filtered and evaporated. The product was further purified by flash chromatography (hexanes: acetone, 1:1) to give a pure compound (**13**) in 58% yield. IR (ATR, ν_{\max} , cm^{-1}): 3100-3400 (COOH), 1745 (CO ester), 1670-1702 (2x C=O, NCOCH_2 and NCOO). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 8.56 (1H, d, $J = 4.3$ Hz, 6-CH pyr), 7.93 (1H, m, 4-CH pyr), 7.86 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, 6-CH Fmoc), 7.70 (2H, d, $J = 5.9$ Hz, 3-CH Fmoc), 7.38 (6H, m apparent, 3-CH pyr, 5-CH pyr, 4-CH Fmoc and 5-CH Fmoc), 7.05 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, 3-CH tyr),

6.76 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, 2-CH tyr), 4.65 (1H, m, CH tyr), 4.44 (2H, m, CH₂ Fmoc), 4.26 (1H, t apparent, $J = 6.1$ Hz, CH Fmoc), 3.63 (3H, s, OCH₃), 2.36, 2.38 and 3.00 (10H, #m apparent, COCH₂CH₂NCH₂CH₂pyr and CH₂ tyr). ¹³C-NMR (Acetone-d₆, δ ppm): 172.2 (NHCOCH₂), 170.5 (CO ester), 158.0 (CO Fmoc), 156.5 (1-C tyr), 155.6 (2-C pyr), 144.6 (3C, 2-C Fmoc and 6-C pyr), 141.5 (3C, 1-C Fmoc and 4-C pyr), 130.5 (2C, 3-C tyr), 127.8, 127.4 and 125.3 (8C, 4-C tyr, 3-C Fmoc, 4-C Fmoc, 6-C Fmoc and 3-C pyr), 120.2 (3C, 5-C pyr and 5-C Fmoc), 115.4 (2C, 2-C tyr), 54.1, 51.5, 47.5, 36.8, 33.9. ESI+ HRMS: $[M + H]^+$ calculated for C₃₅H₃₅N₃O₆ = 594.2599; found = 594.2585.

Synthesis of *N*-3-(2-pyridin-2-yl-ethylamino)-propionyl-L-tyrosine methyl ester dichloroplatinate(II) (**5**, $n = 2$)

The *N*-protected (Fmoc) molecule (**13**, 0.077 mmol) was dissolved in DMF (0.50 mL) and morpholine (in excess, 0.50 mL) was added to the solution. The mixture was stirred at room temperature (22°C) for 1.5 h. The solution was diluted with ethyl acetate (15 mL) and was washed with an HCl 10% aqueous solution (10 mL, 2x), and then with a NaOH 10% aqueous solution (10 mL, 1x). The organic phase was further washed with water (10 mL, 1x), before drying with sodium sulfate, filtered and evaporated. The crude product (0.073 mmol) was further dissolved with acetone (1.5 mL) and used for the next reaction, without any purification. The starting pH value was 9. A solution of potassium tetrachloroplatinate(II) (0.070 mmol) in water (0.50 mL) was added to the alkaline mixture and the solution was stirred in darkness for 7 days. The final pH value was 5. Then, KCl (0.5 g) was added and the mixture was stirred for 3.5 h. The solution was filtered, washed with acetone, and the filtrate was completely evaporated. The product was purified by flash chromatography (chloroform: methyl alcohol, 9.5:0.5) to give a pure compound (**5**, $n = 2$) in 34% yield. The spectral data for this compound are identical to those reported above when it was made using the first synthetic method.

Third synthetic method (Scheme 3):

3-(2-Pyridin-2-yl-alkylamino)-propionic acid tert-butyl ester dichloroplatinate(II) (**14**, n = 1 or 2)

To a solution of 3-(2-pyridin-2-yl-alkylamino)-propionic acid *tert*-butyl ester (**10**, n = 1 or 2, 1.00 mmol) in DMF (4 mL) at room temperature, was added potassium tetrachloroplatinate(II) (1.27 mmol) previously dissolved in a mixture of DMF/H₂O (2.0 mL: 2.0 mL). The starting pH value was 10. After 10 days stirring in darkness, pH reached 5. Then, solid KCl (1 g) was added and the mixture was stirred for 3 h. Next, the solvents were evaporated and the residual crude product was purified by flash chromatography (hexanes: acetone, 7:3) to give a pure compound (**14**, n = 1 or 2) in yields ranging from 44 to 68%.

3-(2-Pyridin-2-yl-methylamino)-propionic acid tert-butyl ester dichloroplatinate(II) (**14**, n = 1): IR (ATR, ν_{\max} , cm⁻¹): 3127 (N-H), 1732 (C=O ester). ¹H-NMR (Acetone-d₆, δ ppm): 9.21 (1H, d apparent, J = 5.9 Hz, 6-CH pyr), 8.20 (1H, dt, J = 1.6 Hz and J = 7.8 Hz, 4-CH pyr), 7.75 (1H, d, J = 7.8 Hz, 3-CH pyr), 7.53 (1H, t apparent, J = 6.8 Hz, 5-CH pyr), 6.11 (1H, br s, NH), 4.73 and 4.81 (2x 1H, 2d, J = 5.9 Hz, NHCH₂pyr), 3.15 (2H, m apparent, CH₂NHCH₂pyr), 2.79 (2H, t, J = 1.0 Hz, COCH₂), 1.43 (9H, s, 3x CH₃). ¹³C-NMR (Acetone-d₆, δ ppm): 170.3 (CO), 148.1 (4-C pyr), 138.8 (2-C pyr), 124.4 (2C, 3-C and 6-C pyr), 122.7 (5-C pyr), 80.4 (C(CH₃)₃), 50.9 (NHCH₂pyr), 39.6 (CH₂NHCH₂pyr), 33.1 (COCH₂), 27.4 (3C, CH₃). ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₁₃H₂₀Cl₂N₂NaO₂Pt = 525.0425; found = 525.0417.

3-(2-Pyridin-2-yl-ethylamino)-propionic acid tert-butyl ester dichloroplatinate(II) (**14**, n = 2): IR (ATR, ν_{\max} , cm⁻¹): 3137 (N-H), 1725 (C=O ester). ¹H-NMR (Acetone-d₆, δ ppm): 9.09 (1H, d, J = 5.8 Hz, 6-CH pyr), 8.05 (1H, dt, J = 1.6 Hz and J = 7.6 Hz, 4-CH pyr), 7.56 (1H, d, J = 7.0 Hz, 3-CH pyr), 7.44 (1H, dt apparent, J = 1.6 Hz and J = 7.6 Hz, 5-CH pyr), 6.03 (1H, br s, NH), 2.38-3.71 (8H, #m, COCH₂CH₂NHCH₂CH₂pyr), 1.41 (9H, s, 3x CH₃). ¹³C-NMR (Acetone-d₆, δ ppm): 169.9 (CO), 159.3 (2-C pyr), 153.5 (6-C pyr), 139.2 (4-C pyr), 124.7 (3-C pyr), 123.7 (5-C pyr), 80.4 (C(CH₃)₃), 51.8 (NHCH₂CH₂pyr), 46.2 (CH₂NHCH₂CH₂pyr), 39.3 (CH₂pyr), 33.6 (COCH₂), 27.3 (3C, CH₃). ESI+ HRMS: [M + H]⁺ calculated for C₁₄H₂₂Cl₂N₂NaO₂Pt = 539.0582; found = 539.0577.

N-3-(2-pyridin-2-yl-alkylamino)-propionyl-*L*-tyrosine methyl ester dichloroplatinate(II) (**5**, $n = 1$ or 2)

The 3-(2-pyridin-2-yl-alkylamino)-propionic acid *tert*-butyl ester dichloroplatinate(II) (**14**, $n = 1$ or 2 , 0.24 mmol) was dissolved in dichloromethane (2 mL) and TFA (2.38 mmol) was added. The solution was stirred at room temperature for 6 h in darkness. The solvent was removed by evaporation and the resulting oil was dissolved in DMF (2 mL) with triethylamine (0.26 mmol). Then, DCC (0.26 mmol) followed by HOBt (0.26 mmol) were added. Beside, the *L*-tyrosine methyl ester hydrochloride (**7**, 0.29 mmol) was dissolved in DMF (2 mL) and triethylamine (0.29 mmol) was added in order to neutralize the hydrochloride salt. Then, the amine solution was added to the acid solution, and the mixture was stirring for 24 h in darkness. Afterwards, ethyl acetate was added and the organic phase was washed with water (4x). The organic phase was dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated. Purification was done by flash chromatography with a mixture of chloroform and methanol (9.5:0.5). The corresponding platinum(II) complexes (**5**, $n = 1$ or 2) were isolated with yields ranging from 27 to 36%.

N-3-(2-pyridin-2-yl-methylamino)-propionyl-*L*-tyrosine methyl ester

dichloroplatinate(II) (**5**, $n = 1$): IR (ATR, ν_{\max} , cm^{-1}): 3100-3450 (N-H and O-H), 1734 (C=O ester), 1649 (C=O amide), 1217 (CO-O-C). $^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 9.67 (1H, d, $J = 5.9$ Hz, 6-CH pyr), 8.22 (2H, s and t overlapped, OH and 4-CH pyr), 7.80 (1H, t apparent, $J = 6.9$ Hz, 3-CH pyr), 7.52 (2H, t apparent and d partly hidden, 5-CH pyr and NH amide), 7.02 (2H, m apparent, 3-CH tyr), 6.75 (2H, m apparent, 2-CH tyr), 6.09 (1H, br s, NH-Pt), 4.33-4.82 (3H, #m, CHNH and CH_2pyr), 3.64 (3H, s, OCH_3), 2.78-2.99 (6H, CH_2CH , $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (Acetone- d_6 , δ ppm): 171.7 (COOCH_3), 169.9 (NHCO), 161.9 (2-C pyr), 156.1 (6-C pyr), 150.7 (1-C tyr), 139.0 (4-C pyr), 130.3 (2C, 3-C tyr), 127.5 (4-C tyr), 125.1 (3-C pyr), 122.9 (5-C pyr), 115.1 (2C, 2-C tyr), 53.9 (CHNH), 51.4 (OCH_3), 36.6, 36.5, 33.6, 33.2.

The spectral data for derivative **5** ($n = 2$) are identical to those described above when it was made using the first synthetic method.

Biology

In vitro cytotoxic activity

The cytotoxicity of L-tyrosine-Pt(II) (**5**, n = 1 or 2) and their precursors (**14**, n = 1 or 2) was evaluated on MCF-7 (ER⁺) and MDA-MD-231 (ER⁻) breast cancer cell lines. Cisplatin (**1**) was used for control. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-phenyl-tetrazolium bromide) assay, a standard colorimetric test, was used for measuring cellular proliferation [19]. Briefly, tumor cell lines were added into 96-well tissue culture plates in culture medium and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Dilutions were done using cremophore:ethanol (1:1) solution. The cremophore:ethanol solution was used in line with our standard protocol for the *in vivo* biological assays that we might perform in the future. Cells were incubated with or without drugs for 72 h. Culture plates were processed using MTT for 3.5 h afterwards SDS solubilisation solution (HCl 0.01 M, sodium dodecyl sulfate solution 10%) was added. The absorbance was read using a scanning multiwell spectrophotometer (FLUOStar OPTIMA) at 565 nm. All measurements were carried in triplicates. The results were compared with those of a control reference plate fixed on the treatment day, and the growth inhibition percentage was calculated for each drug contact period.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies du Québec (FQRNT) for key financial support. The NSERC student fellowship for Caroline Descôteaux is gratefully acknowledged.

References

1. P. Couvreur, C. Vauthier, Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease, *Pharm. Res.* 23 (2006) 1417-1450.
2. G. Szakács, J.K. Paterson, J.A. Ludwig, C. Booth-Genthe, M.M. Gottesman, Targeting multidrug resistance in cancer, *Nature Rev. Drug Disc.* 5 (2006) 219-234.
3. M.J. Vicent, R. Duncan, Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer, *Trends in biotech.* 24 (2006) 39-47.
4. I. Ott, R. Gust, Preclinical and clinical studies on the use of platinum complexes for breast cancer treatment, *Anti-Cancer Agents in Med. Chem. (Formerly Curr. Med. Chem.)* 7 (2007) 95-110.
5. R. Devraj, J.F. Barrett, J.A. Fernandez, J.A. Katzenellenbogen, M. Cushman, Design, synthesis, and biological evaluation of ellipticine-estradiol conjugates, *J. Med. Chem.* 39 (1996) 3367-3374.
6. S. D. Kuduk, F.F. Zheng, L. Sepp-Lorenzino, N. Rosen, S.J. Danishefsky, Synthesis and evaluation of geldanamycin-estradiol hybrids, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9 (1999) 1233-1238.
7. C. Descôteaux, V. Leblanc, G. Bélanger, S. Parent, É. Asselin, G. Bérubé, Improved synthesis of unique estradiol-linked platinum(II) complexes showing potent cytotoxic activity and affinity for the estrogen receptor alpha and beta, *Steroids* 73 (2008) 1077-1089.
8. C. Van Themsche, S. Parent, V. Leblanc, C. Descôteaux, A.M. Simard, G. Bérubé, E. Asselin, VP-128, a novel oestradiol-platinum(II) hybrid with selective anti-tumour activity towards hormone-dependent breast cancer cells in vivo, *Endocr. Relat. Cancer* 16 (2009) 1185-1195.
9. A.M. Otto, M. Faderl, H. Schönenberger, Dissociation of estrogenic and cytotoxic properties of an estrogen receptor-binding platinum complex in human breast cancer cell lines, *Cancer Res.* 51 (1991) 3217-3223.
10. G.M. Anstead, K.E. Carlson, J.A. Katzenellenbogen, The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site, *Steroids* 62 (1997) 268-303.

11. C. Descôteaux, V. Leblanc, K. Brasseur, A. Gupta, É. Asselin, G. Bérubé, Synthesis of D-and L-tyrosine-chlorambucil analogs active against breast cancer cell lines, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 7388-7392.
12. C. Descôteaux, K. Brasseur, V. Leblanc, S. Parent, É. Asselin, G. Bérubé, SAR study of tyrosine-chlorambucil hybrid regioisomers; synthesis and biological evaluation against breast cancer cell lines, *Amino acids* 43 (2012) 923-935.
13. C. Descôteaux, K. Brasseur, V. Leblanc, S. Parent, É. Asselin, G. Bérubé, Design of novel tyrosine-nitrogen mustard hybrid molecules active against uterine, ovarian and breast cancer cell lines, *Steroids* 77 (2011) 403-412.
14. R.L. Schechter, M.A. Alaoui-Jamali, A. Woo, W.E. Fahl, G. Batist, Expression of a rat glutathione-S-transferase complementary DNA in rat mammary carcinoma cells: impact upon alkylator-induced toxicity, *Cancer Res.* 53 (1993) 4900-4906.
15. N. Azizi, M.R. Saidi, LiClO₄ Accelerated Michael addition of amines to [alpha],[beta]-unsaturated olefins under solvent-free conditions, *Tetrahedron* 60 (2004) 383-387.
16. Y. Wu, D.C. Limburg, D.E. Wilkinson, M.J. Vaal, G.S. Hamilton, A mild deprotection procedure for tert-butyl esters and tert-butyl ethers using ZnBr₂ in methylene chloride, *Tet. Lett.* 41 (2000) 2847-2849.
17. D.D. Perrin, W.L.F. Armarego, In *Purification of Laboratory Chemicals*; 3rd ed. Pergamon Press: Oxford, 1988.
18. W.C. Still, M. Kahn, A. Mitra, Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution, *J. Org. Chem.* 43 (1978) 2923-2925.
19. J. Carmichael, W.G. DeGraff, A.F. Gazdar, J.D. Minna, J.B. Mitchell, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Res.* 47 (1987) 936-942.

CHAPITRE VI

DISCUSSION GÉNÉRALE

Le cancer demeure l'une des préoccupations les plus grandes dans le monde, notamment au Canada. Depuis quelques décennies déjà, la recherche de nouveaux moyens efficaces pour vaincre cette maladie a fait l'objet de plusieurs études. Aujourd'hui, l'une des tendances est le ciblage thérapeutique via un vecteur tel des anticorps monoclonaux, des hormones et autre. Des médicaments anticancéreux forts puissants existent sur le marché, seulement ces derniers sont souvent non spécifiques aux cellules cancéreuses, ce qui occasionne des effets toxiques indésirables importants. Dans l'espoir d'améliorer la qualité de vie des malades, des chercheurs concentrent leurs efforts sur la conception de nouveaux composés pour viser spécifiquement les organes touchés par le cancer. Le groupe des Drs Bérubé et Asselin figure parmi les nombreuses équipes qui travaillent sur le développement de tels médicaments.

Notre équipe a récemment synthétisé un composé hybride estradiol-Pt(II) dans le but de traiter les cancers féminins, plus précisément le cancer du sein hormono-dépendant (94). La portion estrogénique de la molécule agit comme vecteur pour transporter un dérivé du cisplatine au niveau des cellules exprimant le récepteur aux estrogènes. Les résultats biologiques de ce nouveau composé cytotoxique se sont avérés très intéressants. Toutefois, il fut démontré que la portion hormonale activait la transcription des cellules exprimant le récepteur. Ainsi, cette étude a permis de mettre en évidence qu'un composé cytotoxique pouvait être amené au niveau d'un organe précis dans le corps, mais que le ligand stéroïdien pouvait, en contre-partie, favoriser la prolifération cellulaire à cet endroit, ce qui n'est pas souhaitable dans le cas d'un cancer.

Suite à cette étude, nous avons entrepris un nouveau projet sur lequel reposent les travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat. Nous avons décidé d'appliquer le concept

du ciblage thérapeutique aux cancers féminins surexprimant le RE α , mais cette fois-ci en ayant recours à un ligand au squelette non-stéroïdien. Ainsi, notre hypothèse était qu'en possédant une structure similaire à celle de l'estradiol, ce ligand pourrait se fixer dans le récepteur au même titre que l'hormone naturelle, sans toutefois engendrer d'activité transcriptionnelle. De plus, nous avons choisi d'utiliser comme molécule vectrice un produit naturel. L'avantage d'avoir recours à un tel composé est que ce dernier est, probablement, bien toléré par l'organisme et qu'il est facile de se le procurer. Nous avons donc décidé de concevoir des nouveaux composés hybrides cytotoxiques à base de tyrosine, un acide aminé connu. À notre avis, la portion phénolique de la tyrosine pourrait imiter le cycle A du noyau stéroïde et permettre la fixation de l'acide aminé dans la pochette de liaison du récepteur, soit en agissant comme ligand. Les travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat ont porté sur le design, la synthèse, la caractérisation et l'analyse biologique de ces molécules tyrosine cytotoxiques.

Premier article

Dans un premier temps, le chlorambucil fut couplé à la L-tyrosine, l'acide aminé naturel, ainsi qu'à la D-tyrosine, son isomère non naturel. L'objectif était d'abord d'étudier la faisabilité de lier le chlorambucil à une telle entité biologique, et ensuite, de comparer l'action ces dérivés naturel et non naturel sur les cellules cancéreuses du sein.

Ainsi, le composé cytotoxique fut lié soit directement à la fonction amine de l'acide aminé ou encore, séparé via une chaîne carbonée. Des acides aminés linéaires, l'acide aminocaproïque et l'acide aminoundécanoïque, servaient d'espaceurs. Également, la fonction acide carboxylique de l'entité tyrosine fut transformée pour produire les dérivés esters ou hydroxyméthyles correspondants. Ceci fut réalisé dans le but de faciliter la synthèse chimique, mais aussi pour créer, possiblement, de nouvelles interactions (liaisons hydrogène) avec des résidus spécifiques dans le récepteur estrogénique alpha.

Deux méthodologies différentes ont été exploitées et ont servi à fabriquer les molécules hybrides cytotoxiques. La voie linéaire a d'abord permis d'obtenir les composés désirés

en quatre et cinq étapes chimiques avec des rendements de 31 et 54 %. La voie convergente fut ensuite appliquée et s'avéra une amélioration notable de la synthèse avec l'obtention des mêmes produits en moins d'étapes et avec de meilleurs rendements, soit 67 et 38 % en deux et trois étapes respectivement.

Avant de procéder à l'évaluation biologique, les douze produits synthétisés ont tous été soumis à une caractérisation complète par spectroscopie infrarouge, spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C , de même que par spectrométrie de masse. Également, afin de s'assurer que les molécules aient maintenu leur activité optique, les énantiomères D- et L-tyrosine ont été transformés en une paire de diastéréoisomères pouvant être distingués par analyse spectrale.

En effet, les composés à base de tyrosine étudiés sont tous optiquement actifs. Deux énantiomères distincts constituent en réalité deux composés différents. Des études pharmacologiques ont démontré que deux stéréoisomères, c'est-à-dire des molécules ne différant que par la disposition de leurs atomes dans l'espace, pouvaient engendrer des réponses complètement différentes chez l'individu (113). Ainsi, il est donc primordial qu'un médicament soit optiquement pur. Dans le cadre des travaux réalisés, il est probable qu'en cours de synthèse les molécules aient subi une épimérisation et aient ainsi perdu leur pureté optique. La première étape des séquences réactionnelles étudiées pour la synthèse des molécules tyrosine cytotoxiques, soit l'estérification, représente l'étape où les conditions sont les plus propices à un tel changement de conformation. Il fut donc convenu de vérifier la stéréochimie des molécules immédiatement après leur estérification.

L'utilisation de réactifs chiraux est très utile en chimie pour déterminer la pureté énantiomérique ou la configuration absolue de molécules optiquement actives (114). La synthèse des amides de Mosher et leur analyse par spectroscopie de résonance magnétique est une technique très prisée qui permet de distinguer facilement deux énantiomères.

Dans le cadre des travaux réalisés, deux dérivés amides de Mosher ont été synthétisés à partir des analogues D-tyrosine et L-tyrosine estérifiés. Pour ce faire, le réactif acide α -méthoxyphényl acétique de configuration absolue *S* fut couplé à chacun des dérivés acides aminés via un lien amide, et ce de manière à créer deux diastéréoisomères distincts, *S,S* et *R,S*. Ensuite, une analyse des spectres RMN ^1H de ces composés a permis de noter une différence au niveau du déplacement chimique de certains signaux. De manière plus spécifique, les protons méthyle ($-\text{OCH}_3$) étaient positionnés à des endroits différents sur le spectre RMN ^1H des deux diastéréoisomères, soit à 3,28 δ ppm (OCH_3 méthoxy) et 3,65 δ ppm (OCH_3 ester) pour le dérivé *R,S* (D-tyrosine) et à 3,33 δ ppm (OCH_3 méthoxy) et 3,71 δ ppm (OCH_3 ester) pour le dérivé *S,S* (L-tyrosine). Afin de mieux observer cette différenciation de déplacement chimique, un mélange 1 : 2 des analogues *S,S* et *R,S* fut également soumis à une analyse spectrale. Le spectre RMN ^1H illustré à la Figure 6.1 montre bien les signaux différents pour chacun des constituants du mélange, et ce en respectant les proportions 1 : 2 (*S,S* : *R,S*). Cette analyse nous a permis de conclure que les stéréoisomères L-tyrosine et D-tyrosine maintenaient leur activité optique suite à l'estérification, et que les composés finaux pouvaient donc être qualifiés d'optiquement purs. Les autres étapes de la synthèse étant relativement plus douces, nous jugeons que ces dernières ne devraient pas modifier la stéréochimie des molécules.

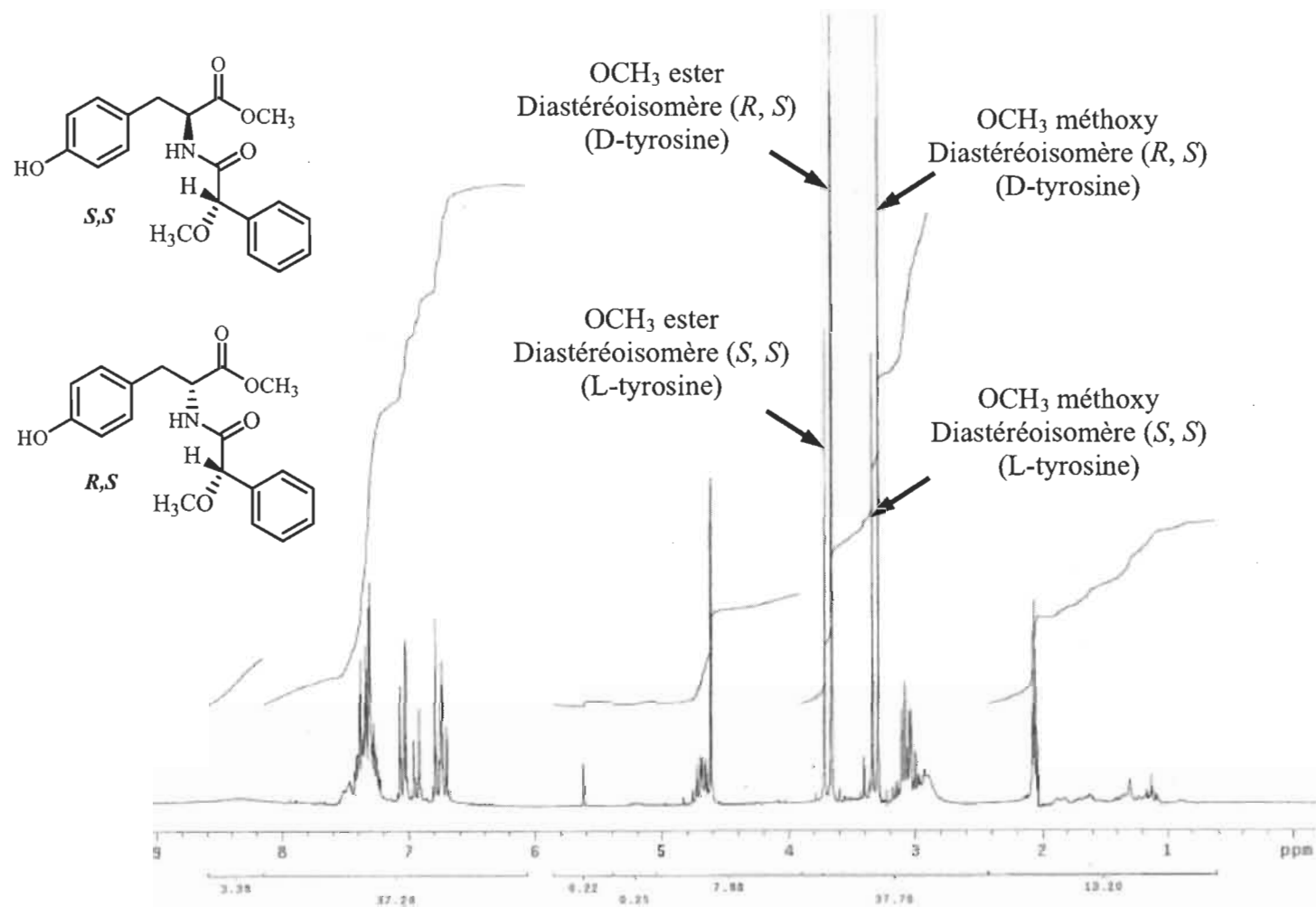


Figure 6.1 Spectre RMN ¹H d'un mélange 1 : 2 des amides de Mosher L-tyrosine (*S, S*) et D-tyrosine (*R, S*) estérifiés.

Ensuite, les composés optiquement purs ont tous été soumis à une analyse biologique réalisée *in vitro* avec deux lignées cellulaires connues, soit les cellules cancéreuses du sein hormono-dépendantes MCF-7 et hormono-indépendantes MDA-MB-231. Cet examen préliminaire a permis de tirer quelques conclusions.

Dans un premier temps, de manière générale, les molécules conjuguées tyrosine-chlorambucil étaient plus actives que le chlorambucil administré seul. Cette observation suggère que la portion tyrosine joue effectivement un rôle dans l'activité cytotoxique des nouvelles molécules, et ce possiblement en raison de l'implication du ligand acide aminé dans le ciblage thérapeutique.

Également, les premiers résultats biologiques ont permis de conclure que dans bien des cas, les dérivés L-tyrosine étaient plus actifs que leurs analogues D-tyrosine. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la forme non naturelle de cet acide aminé cristallise plus rapidement que la forme naturelle dans l'eau (104). Il est possible que ce phénomène se produise également dans les solvants biologiques, ce qui se traduirait par une insolubilité plus marquée de la D-tyrosine comparativement à la L-tyrosine. L'accès aux cellules étant ainsi limité, ceci expliquerait la faible activité biologique des dérivés D-tyrosine. Évidemment, il est aussi possible que l'isomère naturel soit tout simplement plus actif que l'isomère non naturel.

Parmi le groupe de molécules dont il a été question dans les premiers travaux publiés, certains composés se sont démarqués des autres avec une activité cytotoxique spécifique pour les cellules cancéreuses du sein hormono-dépendantes (MCF-7). Il est à noter que ceux-ci se distinguent des autres molécules de par la chaîne de dix atomes de carbone séparant le ligand de l'entité cytotoxique. Ces molécules présentaient une activité inhibitrice significative (IC_{50} atteignant $16,27 \mu\text{M}$) sur les cellules hormono-dépendantes (MCF-7) alors qu'elles étaient totalement inactives sur les cellules hormono-indépendantes (MDA-MB-231). Afin de confirmer cette spécificité, une étude plus approfondie fut menée avec les lignées cellulaires du sein hormono-indépendantes MDA-MB-468 et MDA-MB-436. Encore une fois, les molécules avec un espaceur de

dix atomes de carbone étaient inactives sur ces cellules hormono-indépendantes contrairement aux analogues sans espaceur et ceux porteurs d'une chaîne carbonée plus courte (5 atomes de carbone). Or, avec ces molécules spécifiques pour les cancers hormono-dépendants, l'espaceur carboné situé entre l'acide aminé et le chlorambucil semble être d'une longueur adéquate pour permettre au ligand d'interagir convenablement avec le récepteur. La portion cytotoxique étant ainsi suffisamment éloignée, celle-ci ne semble par nuire à la liaison du ligand dans la protéine. Ces résultats corroborent avec des études menées antérieurement qui affirment qu'une chaîne d'une longueur approximative de onze atomes de carbone contribue à une activité biologique optimale (115).

De cette étude, deux molécules hybrides se sont démarquées des autres avec des activités de sept (IC_{50} : 19,39 μ M) et huit (IC_{50} : 16,27 μ M) fois supérieures à celle du chlorambucil (IC_{50} : 130,36 μ M). Au niveau de leur structure, non seulement ces composés portent une chaîne de dix atomes de carbone, mais il s'agit également de dérivés hydroxyméthyles. Ici, la réduction de la fonction ester favorise sans doute la formation de nouvelles interactions ligand-récepteur, ce qui pourrait expliquer, en partie, cette activité cytotoxique accrue. Également, la portion hydroxyméthyle rend l'ensemble de la molécule plus hydrosoluble. En formant des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau et les entités biologiques du milieu, les conjugués tyrosine-chlorambucil peuvent possiblement accéder plus facilement à l'environnement de la cellule. Un point intéressant est que le simple fait d'augmenter la portion carbonée d'une molécule devrait normalement contribuer à rendre celle-ci moins soluble. Seulement dans ce cas-ci, il semble que le groupement hydroxyméthyle vienne contrebalancer ce fait, du moins partiellement, en augmentant la solubilité des molécules porteuses d'une chaîne de dix atomes de carbone.

Afin de vérifier si les nouvelles molécules synthétisées exerçaient leur activité cytotoxique suite à une interaction avec le $RE\alpha$, une molécule fut sélectionnée pour procéder à une étude de l'affinité estrogénique. Cette analyse constitue un test de compétitivité entre le ligand naturel, l'estradiol, et un compétiteur. Dans un premier

temps, le RE α est placé en présence de l'hormone, laquelle est marquée de manière à émettre un signal lumineux lorsque liée au récepteur. En absence d'autres ligands, le taux de luminosité est de 100 %. En présence d'un compétiteur, une compétition s'établira entre les deux ligands potentiels. Celui dont l'affinité est la plus forte pour la protéine visée déplacera le ligand en place dans le récepteur ou encore maintiendra sa place dans le site de liaison. Ainsi, dans l'éventualité où le nouveau ligand aurait une plus forte affinité pour le récepteur que l'hormone naturelle, cette dernière se dissocierait de la protéine et perdrait de son activité lumineuse. Une baisse de signal lumineux se traduit alors par la présence d'un ligand ayant une forte affinité pour le RE α .

Dans le cadre de ce projet, la molécule L-tyrosine-chlorambucil hydroxyméthyle avec un espaceur avec cinq atomes de carbone fut soumise à un essai de compétitivité pour le RE α . Malgré l'activité cytotoxique des conjugués tyrosine-chlorambucil, cette molécule ne présenta aucune affinité pour la protéine visée. La Figure 6.2 illustre l'affinité de l'estradiol, du chlorambucil et de la molécule L-tyrosine-chlorambucil hydroxyméthyle (n = 5) pour le RE α . L'analyse de ce graphique démontre bien que même à de fortes concentrations, la molécule L-tyrosine-chlorambucil ne parvient pas à déplacer l'hormone naturelle, au même titre que le chlorambucil.

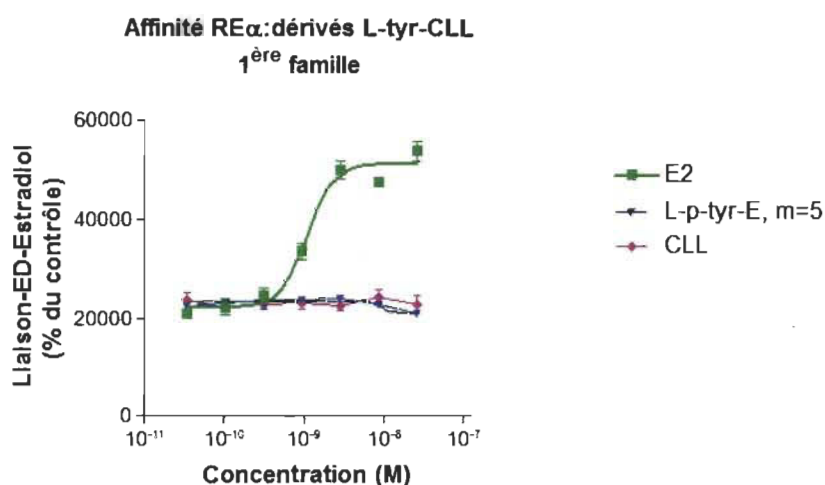


Figure 6.2 Affinité de l'estradiol (E2), du chlorambucil (CLL) et de la molécule hybride L-*para*-tyrosine-chlorambucil hydroxyméthyle avec un espaceur contenant cinq atomes de carbone (L-*p*-tyr-E, m = 5) pour le RE α .

Cette analyse nous laissa croire que, possiblement, la structure du ligand *L-para*-tyrosine ne permettait pas la formation de liaisons hydrogène dans la cavité de liaison du récepteur comme le faisait l'estradiol. En d'autres termes, l'emplacement du groupement phénol de la *L-para*-tyrosine ne favorise probablement pas sa liaison dans le récepteur.

Deuxième article

Dans le même ordre d'idée que les travaux menés précédemment, le chlorambucil fut couplé à la tyrosine dans le but de cibler l'action de ce médicament au niveau des cellules cancéreuses du sein. Toutefois, l'objectif de cette deuxième étude était d'avoir recours aux différents régioisomères de la *L*-tyrosine et d'utiliser ces derniers comme ligands. Ainsi, la *DL-ortho*-tyrosine et la *L-méta*-tyrosine furent modifiées de manière à former des molécules couplées au chlorambucil. Ainsi, en modifiant la position du groupement phénol, il est probable que cela puisse donner lieu à de nouvelles interactions plus favorables avec le RE α et que l'activité cytotoxique en soit améliorée.

Les travaux présentés dans la revue *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* ayant démontré que le stéréoisomère de configuration absolue *L*- était plus efficace comparativement à son analogue de configuration *D*-, la *L-méta*-tyrosine fut choisie pour la conception des nouvelles molécules. En ce qui a trait à l'isomère *ortho*, ce dernier fut utilisé sous la forme d'un mélange racémique 50 : 50, et ce en raison du fait que l'énantiomère pur n'était pas commercialement disponible.

Les acides aminés *DL-ortho* et *L-méta*-tyrosine ont donc été utilisés comme produits de départ pour la synthèse de molécules tyrosine-hydroxyméthyle et tyrosinol. L'entité cytotoxique fut couplée à l'amine de l'acide aminé soit directement, soit via un espaceur (5 ou 10 atomes de carbone). Pour les mêmes raisons que mentionnées précédemment, nous avons eu recours à la synthèse convergente pour la conception des molécules. Également, ayant antérieurement confirmé que les produits maintenaient leur activité optique pendant l'estérification, et en supposant toujours que les autres étapes chimiques étaient plus douces que cette dernière, nous avons considéré que les molécules finales étaient optiquement pures. Au total, dix-huit composés tyrosine-chlorambucil ont été synthétisés avec des rendements globaux variant de 38 à 67 %.

L'activité biologique des différents isomères fut ensuite comparée. Des essais de cytotoxicité au MTT ont été effectués avec les cellules cancéreuses du sein hormono-dépendantes (MCF-7) et hormono-indépendantes (MDA-MB-231). Tout comme pour les travaux menés précédemment, tous les dérivés testés présentaient une activité cytotoxique supérieure à celle du chlorambucil. Encore une fois, ceci révèle que la portion tyrosine contribue, d'une manière ou d'une autre, à augmenter l'activité cytotoxique du chlorambucil. Par contre, cette fois, les résultats biologiques n'ont pu permettre de montrer une différence entre les dérivés tyrosine hydroxyméthyle et tyrosinol. Les deux types de composés présentaient des activités similaires.

Un des objectifs de ce travail était d'obtenir de nouvelles molécules anticancéreuses spécifiques pour les cancers du sein hormono-dépendants. Toutefois, suite à l'analyse biologique effectuée *in vitro*, aucune spécificité ne fut observée sur les cellules cancéreuses mammaires. Une explication possible à ce résultat pourrait être la complexité du contenu protéique au sein des lignées cellulaires utilisées. Effectivement, il est probable que les conjugués anticancéreux nouvellement synthétisés interagissent avec une autre entité biologique présente dans les deux types de lignées, hormono-dépendante et hormono-indépendante. Mise à part la surexpression du RE α , d'autres différenciations biologiques existent entre les cellules cancéreuses et les cellules normales. Entre autres, des protéines telles HER-2 et GPR30 sont surexprimées au niveau des tumeurs mammaires cancéreuses comparativement aux tissus mammaires sains (116). Ces entités permettraient à l'estradiol d'agir via une voie non génomique. En effet, l'estradiol peut aussi se lier à des récepteurs membranaires permettant l'activation de voies de signalisation (PI3K-AKT, MAPK), lesquelles ont un impact important sur la survie des cellules cancéreuses. Par exemple, la protéine GPR30 est un récepteur membranaire auquel l'estradiol peut se lier. Cette protéine est surexprimée dans de nombreux cancers hormono-dépendants, comme les cancers du sein (116). Elle pourrait expliquer l'action persistante des estrogènes en l'absence du RE α . Également, la protéine HER-2 est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase dont le gène est amplifié chez 20 à 30 % des patientes atteintes du cancer du sein. La surexpression de cette protéine induit une augmentation de la croissance cellulaire et du potentiel

métastatique. Ainsi, il est possible que les molécules dérivées de la tyrosine empruntent une voie de signalisation autre que celle du récepteur estrogénique. Ceci pourrait expliquer, en partie, pourquoi les composés testés étaient actifs sur les deux lignées cellulaires, et ce indépendamment de leur caractère estrogénique potentiel.

À la suite de cette étude, un résultat demeure particulièrement intéressant et positif. Parmi tous les composés tyrosine-chlorambucil synthétisés, les dérivés du régioisomère *L-méta*-tyrosine présentaient, dans bien des cas, la plus forte activité. La plus importante cytotoxicité observée fut de 17,72 μM avec le conjugué *L-méta*-tyrosine-chlorambucil hydroxyméthyle (sans espaceur). Ce résultat représente une activité 7,36 fois supérieure à celle du chlorambucil sur les cellules cancéreuses du sein hormono-dépendantes MCF-7. Sur les deux lignées cellulaires, les molécules à base de la *L-méta*-tyrosine estérifiée (hydroxyméthyle) se sont révélées les plus actives, soit avec une cytotoxicité supérieure à celle de leurs analogues *DL-ortho*-tyrosine et *L-para*-tyrosine. Un fait intéressant à soulever est qu'en plus de l'action anticancéreuse des dérivés du régioisomère *L-méta*-tyrosine, une certaine sélectivité pour les cellules hormono-dépendantes fut notée pour ce type de composés. En effet, une comparaison de l'activité des molécules à base de la *L-méta*-tyrosine démontre que, dans la majorité des cas, la lignée cancéreuse hormono-dépendante MCF-7 est plus sensible à l'action de ces dernières comparativement aux cellules hormono-indépendantes MDA-MB-231.

Cette activité anticancéreuse et cette spécificité du régioisomère *L-méta*-tyrosine pourraient s'expliquer par la position de groupement phénol. L'emplacement de ce dernier pourrait possiblement favoriser le positionnement du ligand tyrosine dans le récepteur estrogénique et créer des interactions plus fortes au sein de la protéine. Bien entendu, cette hypothèse suggère ici que le récepteur estrogénique soit la principale cible des molécules étudiées. En d'autres termes, le phénol en position *méta* pourrait permettre une meilleure liaison du ligand dans le récepteur et de ce fait, être responsable de cette cytotoxicité marquée pour les dérivés de ce régioisomère. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié le mode de liaison des différents ligands tyrosine dans le $\text{RE}\alpha$. Pour ce faire, nous avons eu recours au modelage moléculaire ou plus

précisément, à la technique de docking. Dans le but d'expliquer, de manière théorique, le mode de liaison des dérivés tyrosine dans le RE α , nous avons effectué des calculs en utilisant le programme Arguslab. Arguslab est un programme de modélisation moléculaire simple d'utilisation. Cet outil permet de donner des résultats fiables et reproductifs avec de petites molécules. Ainsi, Arguslab représentait un moyen simple et efficace d'obtenir les résultats préliminaires nécessaires à notre étude. Toutefois, afin d'alléger le temps de calcul et de diminuer les causes d'erreurs, nous avons choisi de modéliser des analogues de la L-*ortho*, L-*méta* et L-*para*-tyrosine, soit les molécules N-acétyl-tyrosine méthyl ester et N-acétyl-tyrosinol. De la sorte, nous pouvions étudier l'influence des différentes structures phénoliques (*ortho*, *méta* et *para*) sur le positionnement du ligand dans le récepteur, ce qui était le but principal de notre étude. Ainsi, après avoir procédé au docking pour chacun des ligands dans le RE α , une comparaison des différents résultats nous a permis de constater que les dérivés *méta*-tyrosine adoptaient une conformation similaire à celle de l'hormone naturelle (estradiol) dans le récepteur. Tandis que l'atome d'oxygène appartenant au groupement phénolique de l'isomère *méta* crée des liaisons hydrogène avec les acides aminés Arg394 et Glu353 de la protéine, au même titre que l'estradiol, le phénol des deux autres isomères s'oriente dans une tout autre direction. Ces résultats préliminaires nous ont donc permis de conclure que l'isomère *méta* de la tyrosine imitait l'hormone naturelle dans le récepteur contrairement à ses analogues *ortho* et *para*. Les mêmes calculs ont été effectués avec les dérivés tyrosine ester et hydroxyméthyle. Les molécules se sont positionnées de la même manière, et ce indépendamment de cette différence structurale (ester ou hydroxyméthyle). Les résultats obtenus avec les régioisomères hydroxyméthyle sont présentés à la Figure 6.3.

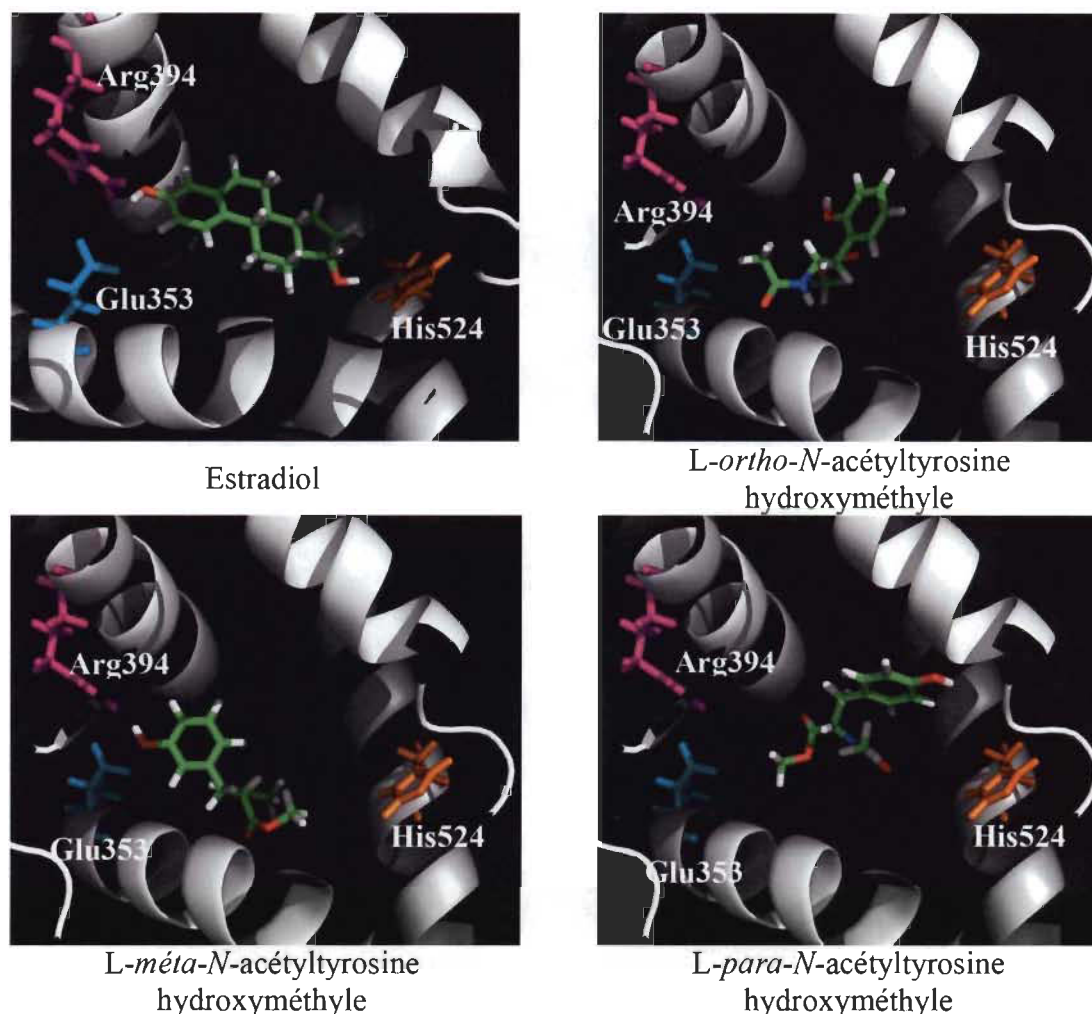


Figure 6.3 Estradiol et dérivés L-ortho, L-méta et L-para-N-acétyltyrosine hydroxyméthyle dans le RE α .

Une autre explication à cette activité supérieure notée avec les conjugués L-méta-tyrosine-chlorambucil pourrait provenir du caractère phytotoxique déjà observé pour l'acide aminé *méta*-tyrosine (117). Des études antérieures ont démontré que ce composé présentait un caractère toxique sur certaines plantes, ce qui n'était pas le cas pour ses analogues *ortho* et *para*-tyrosine. Étant donné la structure de l'isomère *méta* de la tyrosine, certains ont soulevé l'idée que ce composé pourrait interférer dans le métabolisme de certaines plantes. Dans le même sens, d'autres études ont révélé que la *méta*-tyrosine servait parfois de substituant à la phénylalanine dans les bactéries et dans les cellules du sein, ce qui se traduisait par un accroissement du renouvellement cellulaire (118,119). En ce sens, la portion acide aminé des molécules *méta*-tyrosine-

chlorambucil synthétisées pourrait possiblement s'incorporer dans les protéines mammaires où la portion cytotoxique pourrait alors exercer son action.

Finalement, les travaux qui ont donné lieu à une publication dans la revue *Amino Acids* ont permis de démontrer que l'isomère *méta* de la tyrosine, une fois conjugué au chlorambucil, augmentait l'activité cytotoxique de ce dernier. Les analogues *ortho* et *para*-tyrosine-chlorambucil étaient moins puissants que les molécules L-*méta*-tyrosine-chlorambucil. Une étude du mode de liaison théorique des différentes molécules étudiées a permis de donner une explication possible à cette activité supérieure du régioisomère *méta*. Il fut démontré, par la technique de modélisation moléculaire, que le noyau phénolique de la *méta*-tyrosine adoptait une position similaire à celle du cycle A du stéroïde au sein du RE α , ce qui n'était pas le cas pour les deux autres isomères. En plus de nous informer sur le rôle important du ligand *méta*-tyrosine, les analyses de modélisation moléculaire nous ont informés quant à l'espace occupé par les différentes molécules dans la pochette de liaison du récepteur. Les résultats obtenus nous ont révélé que les ligands tyrosine, moins volumineux que l'estradiol, n'occupaient pas tout l'espace disponible dans le site de liaison. Ainsi, il est probable qu'il y ait moins d'interactions avec les résidus clés du récepteur, ou du moins que ces dernières soient moins fortes. Cette hypothèse nous amena donc à diriger nos travaux vers une autre étude, soit la conception de molécules tyrosine-chlorambucil avec une structure plus élargie.

Troisième article

Les travaux de modélisation moléculaire menés dans le cadre de ce doctorat nous ont clairement démontré que la portion tyrosine des molécules hybrides préalablement synthétisées imitait, mais uniquement en partie, l'hormone naturelle dans le récepteur. Les résultats que nous avons obtenus nous ont effectivement permis de constater que la portion phénol de la tyrosine pouvait se positionner tel le noyau A du stéroïde dans le récepteur. Seulement, l'acide aminé n'étant pas aussi volumineux que l'estradiol, nous avons observé que ce dernier n'occupait pas la totalité du site de liaison du ligand, créant ainsi moins d'interactions dans la protéine en question.

De même, il est connu que les groupements fonctionnels phénol et alcool en position 3 et 17 du noyau estrogénique sont responsables de la liaison de l'hormone féminine avec le récepteur (73). L'alcool en position 3 du stéroïde se lie aux acides aminés Arg394 et Glu353 de la protéine tandis que l'alcool en position 17 se lie au résidu His524. En ce qui a trait à l'estradiol, ces deux entités sont situées à 10,9 Å l'une de l'autre. Cette distance semble optimale pour permettre des liaisons avec les résidus de la protéine. Par contre, dans le cas de la tyrosine, une seule de ces interactions semble possible pour l'isomère *méta*, soit celle impliquant le phénol et les résidus Ar394 et Glu353. Le ligand, avec un squelette plus petit, rend impossible la formation d'une deuxième liaison hydrogène, et ce en raison de la distance séparant la région polaire du ligand et le résidu His524.

Ces conclusions nous ont permis d'orienter nos recherches vers la conception de dérivés tyrosinamides résultant de l'association entre la tyrosine et l'hydroxyaniline, via une liaison amide. Ainsi, le squelette de ce nouveau type de ligand, plus volumineux, pourrait théoriquement rendre possible la formation de nouvelles liaisons hydrogène dans le récepteur, entre autres avec le résidu His524. Nous avons également choisi de varier la position de groupement hydroxyle de l'entité hydroxyaniline utilisée afin d'obtenir une variété de ligands. Ainsi, l'objectif de cette étude était non seulement de concevoir des molécules tyrosine-chlorambucil avec un squelette plus élargi, mais aussi d'étudier l'effet des différents régioisomères *ortho*, *méta* et *para*-hydroxyphényl-tyrosine-chlorambucil sur l'activité biologique de ces derniers.

Dans l'ensemble, neuf composés ont été formés à partir de la L-*para*-tyrosine protégée. Les différents régioisomères de l'hydroxyaniline ont été couplés à l'acide aminé de départ, après quoi le chlorambucil fut lié soit directement ou via un espaceur (acide aminé linéaire avec 5 ou 10 atomes de carbone). Comme pour les molécules présentées précédemment et qui ont fait l'objet de la publication dans la revue *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, les composés tyrosinamides pour lesquels la portion chlorambucil était séparée d'un espaceur furent synthétisés selon deux méthodes de synthèse : la voie linéaire et la voie convergente. La voie de synthèse linéaire permettait d'obtenir les

molécules voulues en cinq étapes chimiques avec 8 % de rendement global comparativement à deux étapes et 24 % pour la voie convergente. Ceci corrobore avec les travaux antérieurs qui attestent que la voie de synthèse convergente surpasse la voie linéaire en étant à la fois plus efficace et plus rapide.

L'ensemble des molécules synthétisées fut également soumis à une analyse biologique sur les cellules cancéreuses du sein, hormono-dépendantes (MCF-7) et hormono-indépendantes (MDA-MB-231). Comme pour les études précédentes, dans la majorité des cas, les nouveaux conjugués tyrosinamides cytotoxiques synthétisés étaient plus actifs que le chlorambucil lui-même, soit avec une activité jusqu'à quatre fois supérieures à celle du médicament administré seul. Ainsi, encore une fois, ces observations nous permettent de conclure que le fait d'ajouter un dérivé de la tyrosine au chlorambucil permet d'augmenter son efficacité sur les cellules cancéreuses du sein.

Toutefois, ce constat ne fut pas le même pour les molécules porteuses d'un espaceur avec dix atomes de carbone. Ces dernières étaient inactives sur les deux types de cellules étudiées, hormono-dépendantes (MCF-7) et hormono-indépendantes (MDA-MB-231). Cette inactivité s'explique probablement par l'insolubilité des molécules porteuses d'une chaîne carbonée plus longue. En effet, les hydrocarbures sont difficilement solubilisés dans les solvants polaires, tels l'eau et les liquides biologiques. Ainsi, l'augmentation de la chaîne alkyle contribue vraisemblablement à faire diminuer la solubilité d'un composé. Malgré le fait que des études antérieures portant sur des molécules estradiol-Pt(II) révèlent que l'utilisation d'une chaîne de dix à douze atomes de carbone permet d'obtenir une meilleure activité biologique, il semble que ce ne soit pas le cas pour les molécules tyrosinamides. Probablement que la structure plus ample de ces nouveaux composés augmente le caractère hydrophobe de ces derniers, ce qui expliquerait pourquoi l'utilisation d'une chaîne alkyle plus longue (10 atomes de carbone) nuit à la solubilité et affecte, par le fait même, leur activité biologique.

Également, cette étude ne nous permet pas de tirer de conclusions quant à la sélectivité des molécules hybrides sur les cellules cancéreuses du sein. En effet, les composés

étudiés présentait des activités comparables sur les deux types de lignées cellulaires, hormono-dépendante et hormono-indépendante, et ce indépendamment de la teneur en RE α retrouvée au niveau de ces cellules. Nos conclusions sont donc que la portion tyrosinamide pourrait interagir avec d'autres récepteurs estrogéniques, tel le récepteur estrogénique β , présents chez les deux types de cellules (MCF-7 et MDA-MB-231). Il est aussi probable que l'activité cytotoxique observée soit occasionnée par autre chose qu'une interaction entre le ligand tyrosinamide et un récepteur. Les propriétés antioxydantes de la tyrosine pourraient possiblement contribuer, elles aussi, à l'action anticancéreuse des composés étudiés (120). En effet, suite à diverses réactions, des radicaux libres peuvent s'accumuler dans le corps et causer des lésions au niveau cellulaire. Le groupement phénol de la tyrosine peut agir en tant qu'antioxydant, réagir avec les substances réactives et former un radical phénolique relativement stable. Dans la cellule, celui-ci pourrait provoquer la formation d'autres espèces réactives et endommager cette dernière.

Malgré l'absence de spécificité pour les cancers hormono-dépendants, cette étude nous a permis de tirer une conclusion intéressante en ce qui a trait à l'influence des différents régioisomères de la portion hydroxyaniline sur l'activité biologique des molécules. Suite aux travaux publiés dans la revue *Amino Acids*, nous avons démontré l'importance de l'isomère *L-méta*-tyrosine sur l'activité anticancéreuse. Encore une fois, nos récents travaux nous ont permis de constater que l'isomère *méta*-hydroxyaniline permettait d'obtenir des composés plus actifs sur l'ensemble des cellules cancéreuses étudiées. Dans un premier temps, cette observation fut notée sur les cellules cancéreuses du sein MCF-7 et MDA-MB-231. Les molécules dérivées de la *méta*-hydroxyaniline étaient de 1,3 à 5,0 fois plus cytotoxiques que les analogues couplés à l'*ortho*-hydroxyaniline et à la *para*-hydroxyaniline.

Afin de vérifier si les molécules nouvellement synthétisées pouvaient également être actives sur d'autres types de cancer, la cytotoxicité des molécules hydroxyphényl-tyrosine-chlorambucil (chaîne avec cinq atomes de carbone) fut étudiée sur une vaste gamme de lignées cellulaires. Les cellules cancéreuses ZR-75-1 (hormono-dépendantes

du sein), MDA-MB-468 et MDA-MB-436 (hormono-indépendantes du sein), OVCAR-3 (hormono-dépendantes de l'ovaire), A2780 (hormono-indépendantes de l'ovaire), Ishikawa (hormono-dépendantes de l'utérus) et HEC-1A (hormono-indépendantes de l'utérus) ont été utilisées. Encore une fois, dans la majorité des cas, les nouvelles molécules étaient plus actives que le chlorambucil lui-même, ce qui démontre bien que le ligand à base de tyrosine contribue à la cytotoxicité des nouveaux composés. Également, avec les cellules cancéreuses hormono-dépendantes du sein et de l'ovaire (ZR-75-1 et OVCAR-3), le dérivé L-tyrosine couplé à la *mé*ta-hydroxyaniline présentait une activité anticancéreuse supérieure à ses analogues *ortho* et *para*. Cette activité supérieure observée avec les régioisomères *mé*ta pourrait encore une fois être attribuable soit à un positionnement plus adéquat du ligand dans le récepteur ou encore au caractère cytotoxique possible des dérivés *mé*ta-phénoliques.

Un des objectifs de mes travaux était de synthétiser des molécules dérivées de la L-tyrosine, mais avec un squelette plus élargi, et ce afin de permettre d'éventuelles liaisons hydrogène entre le ligand et le récepteur. Les études de modélisation moléculaire qui ont fait l'objet de la deuxième publication de ce projet de doctorat (travaux publiés dans la revue *Amino Acids*) nous avaient clairement démontré la nécessité de concevoir un ligand plus volumineux avec une portion polaire pouvant interagir avec le résidu His524 du récepteur. Ainsi, la portion tyrosinamide des nouvelles molécules fut modélisée dans les mêmes conditions que pour les travaux précédents, soit avec le programme Arguslab et la protéine RE α . Aussi, pour les mêmes raisons qu'énumérées précédemment, les analogues simplifiés *N*-acétyl-tyrosinamides (*ortho*, *mé*ta et *para*) ont été utilisés pour la modélisation. Comme le démontre la Figure 6.4, la modélisation de chacune de ces entités nous a permis de constater que le fragment hydroxyaniline nouvellement ajouté à la tyrosine ne se positionnait non pas à proximité de l'acide aminé His524 comme nous le présagions, mais plutôt dans une petite cavité hydrophobe du récepteur. À cet endroit se retrouvent les résidus Met421 et Phe425 appartenant à l'hélice 8 de la protéine. Des études ont déjà démontré que ce site sert souvent d'emplacement pour certains groupements (121). Ainsi, avec les ligands *ortho* et *mé*ta-*N*-acétyl-tyrosinamides nouvellement synthétisés, le groupement phénol

de la portion tyrosine interagit avec les résidus Arg394 et Glu353 du récepteur tandis que le groupement hydroxyaniline occupe la cavité hydrophobe délimitée par les résidus Met421 et Phe425. Avec le ligand *para-N*-acétyl-tyrosinamide, le contraire est observé. Ainsi dans les trois cas, aucune liaison n'est observée avec le résidu His524. Ce qui pourrait expliquer ces résultats est la flexibilité de la protéine du ligand induite par la rotation libre de la liaison amide. Le mouvement du ligand pourrait sans doute permettre le positionnement du deuxième phénol dans une région plus favorable, soit en raison d'un plus grand espace ou encore étant donné le caractère hautement hydrophobe de cette région.

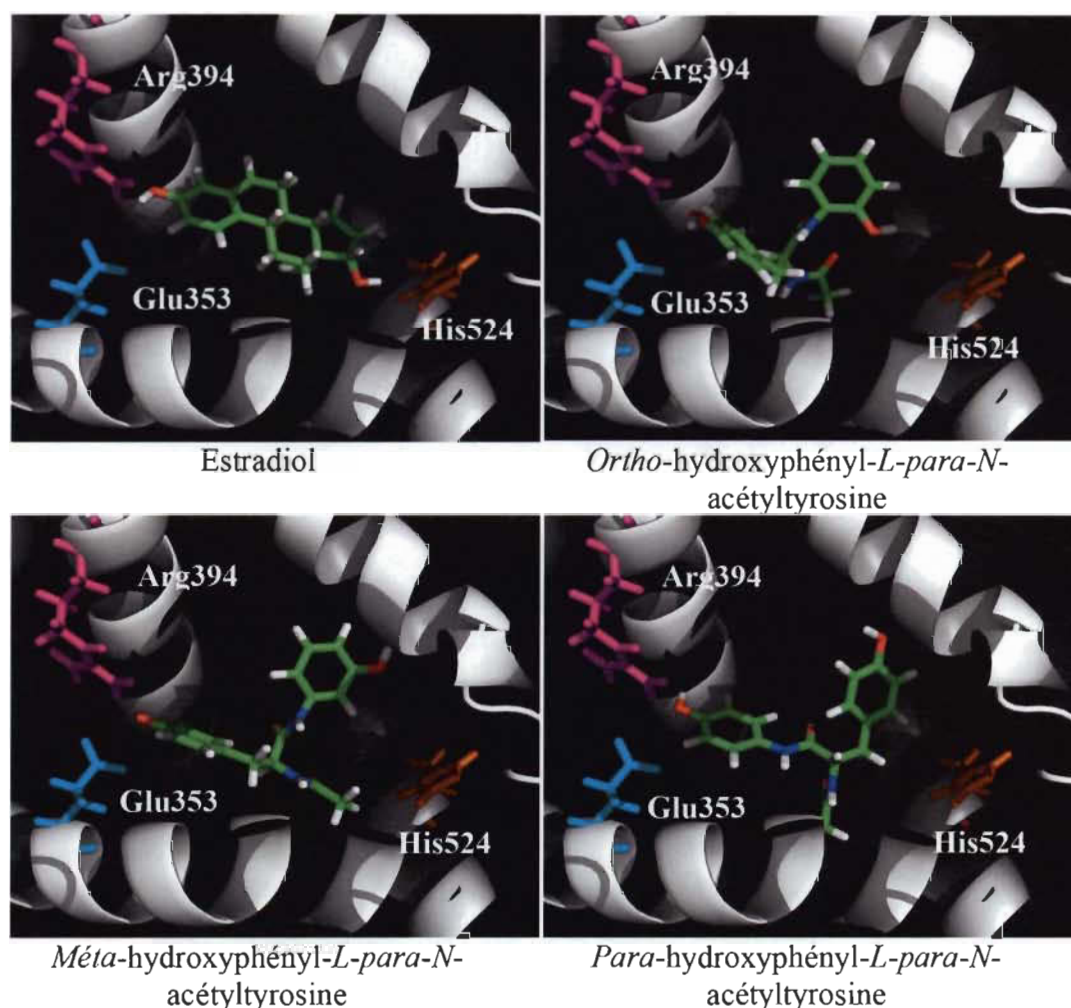


Figure 6.4 Estradiol et dérivés *ortho*, *méta* et *para*-hydroxyphényl-L-*para-N*-acétyltyrosine dans le RE α .

Finalement, les résultats présentés dans la revue Steroids témoignent de la possibilité de fabriquer des molécules L-tyrosinamide-chlorambucil avec une activité cytotoxique accrue comparativement au chlorambucil. Ces travaux ont aussi permis de constater que les analogues de la *mé*ta-hydroxyaniline étaient plus actifs que les deux autres régioisomères, *ortho* et *para*, et ce sur les cellules cancéreuses du sein et de l'ovaire. Toutefois, la modélisation moléculaire a mis en évidence que la rotation du lien amide pouvait permettre au ligand d'adopter une conformation différente de celle de l'estradiol dans le RE α .

Quatrième article

Jusqu'à présent, les travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat portaient sur le développement de molécules tyrosine-chlorambucil. L'utilisation d'un ligand non-stéroïdien, tel l'acide aminé L-tyrosine, permettait théoriquement de concentrer un médicament connu comme le chlorambucil au niveau des cellules exprimant le RE α . Cependant, bien que parfois utilisé pour traiter certains cancers du sein, le chlorambucil demeure toutefois moins actif contre ce type de cancer. La principale raison pour laquelle notre choix s'était arrêté sur cet agent anticancéreux était la facilité avec laquelle ce composé pouvait être modifié chimiquement. De plus, une nouvelle utilisation du chlorambucil contre le cancer du sein pouvait ainsi être explorée.

Le cisplatine, bien que plus difficile à transformer chimiquement, demeure un composé très actif contre les cellules cancéreuses du sein. Ainsi, nous avons décidé d'appliquer le concept de ciblage thérapeutique en couplant la L-tyrosine à un dérivé du cisplatine, et ce toujours dans l'optique de traiter les cancers féminins hormono-dépendants. Pour ce faire, nous nous sommes inspirés de travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire pour la conception de molécules estradiol-Pt(II) (94). Nous avons créé un analogue du cisplatine, soit un dérivé aminopyridine-Pt(II) résultant de la complexation d'un sel de platine (K_2PtCl_4) avec l'aminopyridine.

La principale difficulté de ce projet était la synthèse chimique des molécules L-tyrosine-Pt(II). Les réactions chimiques impliquant des complexes de platine sont souvent plus difficiles à réaliser, soit en raison de la difficulté à solubiliser ces derniers ou encore étant donné leur instabilité. Ainsi, les travaux présentés dans cet article montrent trois méthodes de synthèse qui ont été élaborées afin de fabriquer ces nouvelles entités L-tyrosine-Pt(II).

La première méthode étudiée utilise la L-tyrosine comme réactif de départ. Celle-ci fut soumise à quatre transformations chimiques consécutives. Cette séquence réactionnelle a permis d'isoler le produit désiré (L-tyrosine-2-éthylaminopyridine-Pt(II)) avec 36 % de rendement global. La particularité de cette voie de synthèse est qu'elle fait appel à une réaction singulière, soit l'addition de Michael en milieu solide. En présence du perchlorate de lithium, l'addition conjuguée d'une amine sur un amide α,β -insaturé devient possible à température ambiante (122).

La deuxième méthode débute par le couplage du ligand de type aminopyridine à l'acrylate de *tert*-butyle, suivi de la liaison avec la portion L-tyrosine. Ces transformations ont nécessité plusieurs réactions chimiques, dont la déprotection sélective de l'acide carboxylique en présence du réactif ZnBr_2 . Cette séquence réactionnelle s'est terminée par la complexation avec le sel de platine(II) pour obtenir la molécule L-tyrosine-2-éthylaminopyridine-Pt(II) en six étapes chimiques avec 11 % de rendement global.

Pour la troisième méthode, la différence est que nous avons procédé à la complexation en cours de synthèse, après quoi nous avons couplé le dérivé cytotoxique au ligand L-tyrosine. Cette séquence réactionnelle a permis d'isoler les produits convoités en quatre étapes chimiques et 23 % de rendement global. Deux molécules ont été synthétisées selon cette méthode, soit les analogues du méthylaminopyridine et de l'éthylaminopyridine.

Les deux molécules L-tyrosine-Pt(II) synthétisées ont ensuite été soumises à une analyse biologique *in vitro* sur les cellules cancéreuses du sein hormono-dépendantes (MCF-7) et hormono-indépendantes (MDA-MB-231). Toutefois, contre toute attente, aucune des molécules ne présentait d'activité cytotoxique. D'importants problèmes de solubilité étaient observés, ce qui explique principalement l'inactivité de ces composés. Effectivement, les complexes de platine sont peu solubles dans les solvants polaires comme l'eau, constituant principal du milieu de culture cellulaire utilisé (RPMI-1640).

Afin de vérifier si la portion platine(II) des molécules fabriquées pouvait exercer son action sur les cellules cancéreuses, l'activité biologique des précurseurs non liés à la L-tyrosine, soient le méthylaminopyridine-Pt(II) et l'éthylaminopyridine-Pt(II), fut étudiée. Les résultats ont été que ces entités étaient aussi actives que le cisplatine lui-même sur les deux types de lignées cellulaires. Ainsi, cette analyse nous a permis de conclure que la portion aminopyridine-Pt(II) des molécules nouvellement synthétisées pouvait agir sur les cellules cancéreuses et que l'inactivité observée pour les molécules complètes L-tyrosine-Pt(II) résultait du couplage à la L-tyrosine. Il est possible que la liaison du ligand avec le dérivé Pt(II) ait contribué à modifier les propriétés physico-chimiques du composé résultant et à le rendre moins soluble, et ce en raison de l'augmentation du volume de la molécule.

Pendant la réalisation des travaux qui font l'objet de cette quatrième publication, d'autres molécules Pt(II) couplées à la L-tyrosine ont été synthétisées. Il s'agit des molécules de type tyrosinamide-Pt(II) illustrées à la Figure 6.5.

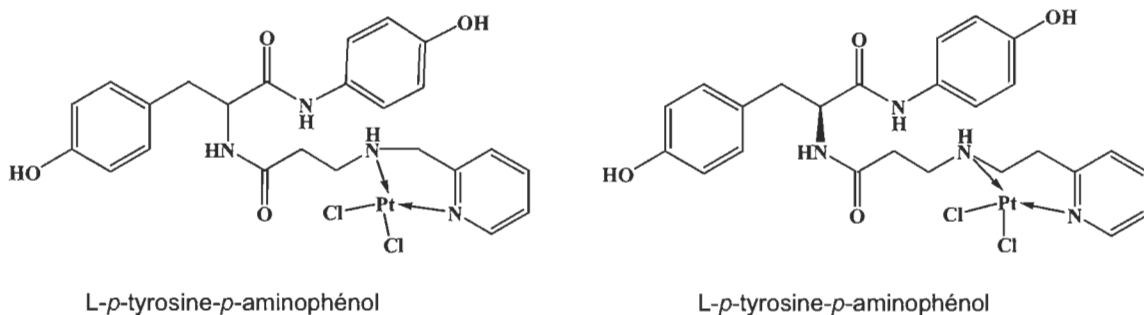


Figure 6.5 Molécules L-tyrosinamide-Pt(II).

Celles-ci ont été conçues pour produire des analogues Pt(II) des composés tyrosinamide-chlorambucil présentés dans la revue Steroids. Les molécules tyrosinamide-Pt(II) ont été synthétisées en empruntant la troisième voie de synthèse des molécules L-tyrosine-Pt(II) décrite précédemment. Chacun des composés a été fabriqué en quatre étapes chimiques et 13 % de rendement global. Ces deux molécules ont aussi été soumises à une évaluation biologique sur les cellules cancéreuses du sein hormono-dépendantes (MCF-7) et hormono-indépendantes (MDA-MB-231). Bien que ces résultats étaient prévisibles, les composés L-tyrosinamide-Pt(II) ne présentaient aucune activité biologique. Tout comme pour leurs analogues plus petits L-tyrosine-Pt(II), cette inactivité s'explique majoritairement par l'insolubilité des composés. Des composés très polaires, donc présentant un faible caractère lipophile, pourraient plus difficilement traverser la membrane cellulaire et agir à l'intérieur de la cellule.

CHAPITRE VII

CONCLUSION

Les travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat nous ont permis de constater qu'il est possible de modifier un acide aminé telle la tyrosine et d'y lier des agents cytotoxiques connus. Une vaste gamme de molécules à base de tyrosine conjuguée à des dérivés chlorambucil et cisplatine a été synthétisée. Ces dernières se sont avérées posséder une activité très intéressante sur les cellules cancéreuses féminines étudiées, voire même supérieure à celle de leurs analogues non liés à la tyrosine (pour le chlorambucil). Une étude de modélisation moléculaire nous a également aidés à mieux comprendre le mode de liaison du ligand tyrosine dans le $RE\alpha$, ce qui nous a permis d'orienter le design des nouveaux composés.

Ces résultats ne sont toutefois que préliminaires. Pour approfondir les recherches, d'autres études devront éventuellement être réalisées. Entre autres, en ce qui concerne le design des molécules, il pourrait être intéressant de synthétiser des molécules *L-méta*-tyrosine-*L-méta*-aminophénol couplées au chlorambucil. En effet, les régioisomères *L-méta*-tyrosine et *L-para*-tyrosine-*méta*-aminophénol ayant démontré une activité anticancéreuse supérieure à leurs analogues *ortho* et *para*, il est fort probable que la combinaison des deux entités *méta* donne lieu à un conjugué encore plus puissant. De même, les travaux de modélisation nous ont permis de constater que le squelette de la tyrosine devait être plus volumineux pour faciliter l'interaction du ligand dans le récepteur. Également, nous avons pu remarquer que la rotation de la liaison amide des dérivés tyrosine-aminophénol permettait à ces derniers d'adopter une conformation différente de celle de l'hormone naturelle dans la protéine. Ainsi, il serait alors fort intéressant de rigidifier la structure de ce type de ligand de manière à ce que celui-ci puisse mieux imiter le noyau stéroïde dans le récepteur. Nous pourrions ainsi, possiblement, obtenir l'affinité désirée pour le $RE\alpha$. En ce qui a trait aux molécules

tyrosine-Pt(II), la complexation au platine(II) avait comme conséquence une grande diminution de la solubilité des composés. Pour contrer ce problème, l'addition de groupements polaires telle une chaîne polyéthylène glycol pourrait être envisageable.

Des essais biologiques supplémentaires pourraient également permettre de mieux comprendre le mode d'action des molécules nouvellement synthétisées. Entre autres, une analyse *in vitro* sur des cellules saines permettrait de constater si l'action des conjugués couplés à la tyrosine se limite aux cellules cancéreuses. Un effet cytotoxique sur des cellules non atteintes serait, bien entendu, non souhaitable. Les composés tyrosine-chlorambucil et tyrosine-Pt(II) pourraient être mis en présence de cellules épithéliales mammaires humaines (MCF-10A) et leur action pourrait alors être comparée à celle observée chez les cellules cancéreuses.

De même, des études ont déjà démontré que les analyses *in vitro* et *in vivo* pouvaient révéler des résultats complètement différents. En effet, en milieu cellulaire, une molécule est mise en contact direct avec la cellule ce qui rend son action beaucoup plus facile. Par contre, au sein d'un organisme vivant, cette même molécule doit coexister avec une multitude d'autres composantes biologiques et se frayer un chemin pour pouvoir agir au niveau des cellules atteintes. Il y a aussi la possibilité que cette dernière soit métabolisée avant même de pouvoir agir. De ce fait, en raison de l'importante différence qui existe entre les milieux, il est normal que les analyses *in vitro* et *in vivo* donnent des résultats différents. En ce sens, afin de vérifier si les molécules nouvellement synthétisées peuvent exercer leur action au sein d'un organisme vivant, des essais *in vivo* pourraient être effectués. Il serait intéressant d'évaluer l'action qu'auront les dérivés tyrosine cytotoxiques chez les animaux. Nous pourrions avoir recours à des souris immunodéficientes auxquelles nous aurions greffé des tumeurs mammaires humaines ou encore à des rates chez lesquelles nous aurions induit un cancer au niveau des glandes mammaires.

Finalement, la réalisation de ce travail constitue un avancement pour la Société, plus spécifiquement en ce qui a trait au développement de nouveaux médicaments pour

traiter le cancer. À notre connaissance, le fait d'avoir eu recours à un acide aminé naturel pour transporter un médicament à un endroit spécifique dans le corps représente une innovation importante dans le domaine du ciblage thérapeutique. Bien certainement, avant de voir ce type de composé sur le marché, d'autres travaux devront être réalisés. Cependant, les recherches effectuées par notre équipe constituent un pas important dans le développement de ce nouveau type de médicaments.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Statistique Canada (2011) « Les principales causes de décès au Canada », URL : [http : //www.statcan.gc.ca/pub/84-215-x/84-215-x2011001-fra.htm](http://www.statcan.gc.ca/pub/84-215-x/84-215-x2011001-fra.htm).
2. Société canadienne du cancer (2012) « Statistiques canadiennes sur le cancer », Québec, Statistique Canada, Registres provinciaux et territoriaux du cancer, Agence de la santé publique du Canada, 77 pp.
3. Tubiana, M. (2003) « Le cancer », 5^e éd., Presses Universitaires de France, Paris, France, 128 pp.
4. Andrieu, J.-M. (1987) « Traitements actuels des cancers », Medsi, Paris, France, 555 pp.
5. Mandeville, R. (1988) « Le cancer du sein : le comprende pour le prévenir et le guérir », La Presse, Montréal, Canada, 312 pp.
6. Béliveau, R., Gingras D. (2005) « Les aliments contre le cancer : la prévention et le traitement du cancer par l'alimentation », Trécarré, Outremont, Québec, Canada, 213 pp.
7. Cabarrot, É., Lagrange J.-L., Zucker, J.-M. (2002) « Cancérologie générale », Masson, Paris, France, 216 pp.
8. Weis, S.M., Cheresh D.A. (2011) « Tumor Angiogenesis : Molecular Pathways and Therapeutic Targets » *Nature Medicine*, **17**(11) : 1359-1370.
9. Heywang-Köbrunner, S.H., Schreer I., Bässler R. (2007) « Imagerie diagnostique du sein : mammographie, échographie, IRM, techniques interventionnelles » 2^e éd., Masson, Issy-les-Moulineaux, France, 513 pp.
10. Stevens, A., Lowe J.S., Young B. (2004) « Anatomie pathologique : atlas de Wheater », De Boeck, Paris, France, 295 pp.
11. Brulé, G. (1973) « Traitements médicaux des cancers », Organisation mondiale de la santé, Genève, Suisse, 175 pp.

12. Chauvergne, J., Hoerni, B. (1992) « Chimiothérapie anticancéreuse », 2^e éd., Masson, Paris, France, 97 pp.
13. Zhu, J., Zhao, Y., Zhu, Y., Wu, Z., Lin, M., He, W., Wang, Y., Chen, G., Dong, L., Zhang, J. (2009) « DNA Cross-Linking Patterns Induced by an Antitumor-Active Trinuclear Platinum Complex and Comparison with Its Dinuclear Analogue » *Chemistry-A European Journal* **15**(21) : 5245-5253.
14. Patel, M.N., Bhatt, B.S, Dosi, P.A. (2013) « Synthesis and Evaluation of Gold(III) Complexes as Efficient DNA Binders and Cytotoxic Agents » *Biomolecular Spectroscopy* **110** : 20-27.
15. Begleiter, A., Mowat, M., Israels, L.G., Johnston, J.B. (1996) « Chlorambucil in Chronic Lymphocytic Leukemia : Mechanism of Action » *Leukemia & Lymphoma* **23**(3-4) : 187-201.
16. Armitage, J.O. (1993) « Leukeran (chlorambucil), in Current Clinical Guide », Wellcome Oncology NCM, New York, U.S.A, pp.37-45.
17. Hernandez, M.A., Rathinavelu A. (2006) « Basic Pharmacology Understanding Drug Actions and Reactions », CRC, Boca Raton, Floride, U.S.A, 369 pp.
18. Bank, B.B., Kanganis, D., Liebes, L.F., Silber, R. (1989) « Chlorambucil Pharmacokinetics and DNA Binding in Chronic Lymphocytic Leukemia Lymphocytes », *Cancer Research* **49**(3) : 554-559.
19. Yoon, J.H., Lee C.S. (1997) « Sequence Specificity for DNA Interstrand Cross-linking Induced by Anticancer Drug Chlorambucil », *Archives of Pharmacal Research* **20**(6) : 550-554.
20. Parker, L.J., Ciccone, S., Italiano, L.C., Primavera, A., Oakley, A.J., Morton, C.J., Hancock, N.C., Bello, M.L., Parker, M.W. (2008) « The Anti-cancer Drug Chlorambucil as a Substrate for the Human Polymorphic Enzyme Glutathione Transferase P1-1 : Kinetic Properties and Crystallographic Characterisation of Allelic Variants », *Journal of Molecular Biology* **380**(1) : 131-144.
21. Rosenberg, B., Van Camp, L., Krigas, T. (1965) « Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode », *Nature* **205**(4972) : 698-699.

22. Reedijk, J. (2003) « New Clues for Platinum Antitumor Chemistry : Kinetically Controlled Metal Binding to DNA » *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(7) : 3611-3616.
23. Ott, I., Gust R. (2007) « Preclinical and Clinical Studies on the Use of Platinum Complexes for Breast Cancer Treatment », *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry)* **7**(1) : 95-110.
24. Fabian, C., Warren A. (1993) « Le cancer du sein : Traverser l'épreuve, étape par étape », Éditions de l'Homme, Montréal, Canada, 216 pp.
25. Jung, Y., Lippard S.J. (2007) « Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA Damage », *ChemInform* **107** : 1387-1407.
26. Kartalou, M., Essigmann, J.M. (2001) « Recognition of Cisplatin Adducts by Cellular Proteins », *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **478**(1-2) : 1-21.
27. Jamieson, E.R., Lippard S.J. (1999) « Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts », *Chemical Reviews-Columbus* **99**(9) : 2467-2498.
28. Wang, D., Lippard S.J. (2005) « Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs », *Nature Reviews Drug Discovery* **4**(4) : 307-320.
29. Dorr, R., Fritz W.L. (1982) « Cancer Chemotherapy Handbook », Elsevier, New York, U.S.A., 650 pp.
30. Kvasnica, M., Budesinsky, M., Swaczynova, J., Pouzar, V., Kohout, L. (2008) « Platinum (II) Complexes with Steroidal Esters of L-Methionine and L-Histidine : Synthesis, Characterization and Cytotoxic Activity », *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **16**(7) : 3704-3713.
31. Trédan, O., Grantab, R., Dumontet C. (2008) « L'hypoxie tumorale peut-elle devenir un avantage pour la chimiothérapie? », *Bulletin du Cancer* **95**(5) : 528-534.
32. Domellöf, L. (1987) « Drug Delivery in Cancer Treatment », Springer-Verlag, New York, U.S.A., 99 pp.

33. Zutphen, S., Reedijk, J. (2005) « Targeting Platinum Anti-tumour Drugs : Overview of Strategies Employed to Reduce Systemic Toxicity », *Coordination Chemistry Reviews* **249**(24) : 2845-2853.
34. Tapiero, H., Robert, J., Lampidis, T. (1989) « Anticancer Drugs », Editions INSERM, Paris, France, 357 pp.
35. Sachdeva, M.S. (1998) « Drug Targeting Systems for Cancer Chemotherapy », *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **7**(11) : 1849-1864.
36. Orczyk, G.P., Caldwell, B.V., Behrman, H.R. (1974) « Estrogens : Estradiol, Estrone, and Estriol. Methods for Hormone Radioimmunoassay », Academic Press, New York, U.S.A, pp. 333-345.
37. Marieb, E.N. (1999) « Anatomie et physiologie humaines », 2^e éd., Éditions du Renouveau pédagogique, Saint-Laurent, Québec, Canada, 1194 pp.
38. Le Grand, A. (2009) « Etude comparative de récepteurs aux oestrogènes : Aspects moléculaire et cellulaire de la réponse aux oestrogènes et anti-oestrogènes impliqués dans les causes et thérapies du cancer du sein », Thèse de doctorat, Université de Bretagne-Sud.
39. Thibault, C., Levasseur, M.-C. (2001) « La reproduction chez les mammifères et l'homme », Editions Quae, France, 928 pp.
40. Widmaier, E.-P., Raff, H., Strang, K.-T. (2004) « Physiologie humaine : Les mécanismes du fonctionnement de l'organisme », Maloine, Paris, France, 809 pp.
41. Walsh, B.W., Schiff, I., Rosner, B., Greenberg, L., Ravnkar, V., Sacks, F.M. (1991) « Effects of Postmenopausal Estrogen Replacement on the Concentrations and Metabolism of Plasma Lipoproteins », *New England Journal of Medicine* **325**(17) : 1196-1204.
42. Christiansen, C., Christensen, M.S., Larsen, N.E., Transbøl, I.B. (1982) « Pathophysiological Mechanisms of Estrogen Effect on Bone Metabolism. Dose-response Relationships in Early Postmenopausal Women », *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **55**(6) : 1124-1130.
43. Compston, J.E. (2001) « Sex Steroids and Bone », *Physiological Reviews* **81**(1) : 419-447.

44. Hoffman, G.E., Merchenthaler, I., Zup, S.L. (2006) « Neuroprotection by Ovarian Hormones in Animal Models of Neurological Disease », *Endocrine* **29**(2) : 217-231.
45. Simoncini, T., Mannella, P., Genazzani, A.R. (2006) « Rapid Estrogen Actions in the Cardiovascular System », *Annals of the New York Academy of Sciences* **1089**(1) : 424-430.
46. Genazzani, A.R., Pluchino, N., Luisi, S., Luisi, M. (2007) « Estrogen, Cognition and Female Ageing », *Human Reproduction Update* **13**(2) : 175-187.
47. Cooke, P.S., Naaz, A. (2004) « Role of Estrogens in Adipocyte Development and Function », *Experimental Biology and Medicine* **229**(11) : 1127-1135.
48. Price, T.M., O'Brien, S.N., Welter, B.H., George, R., Anandjiwala, J., Kilgore, M. (1998) « Estrogen Regulation of Adipose Tissue Lipoprotein Lipase-possible Mechanism of Body Fat Distribution », *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **178**(1) : 101-107.
49. Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., De Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Bottero, D., Varricchio, L., Nanayakkara, M., Rotondi, A. (2002) « Sex Steroid Hormones Act as Growth Factors », *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **83**(1-5) : 31-35.
50. Kaaks, R., Rinaldi, S., Key, T.J., Berrino, F., Peeters, P.H.M., Biessy, C., Dossus, L., Lukanova, A., Bingham, S., Khaw, K.T. (2005) « Postmenopausal Serum Androgens, Oestrogens and Breast Cancer Risk : the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition », *Endocrine-related Cancer* **12**(4) : 1071-1082.
51. Micheli, A., Muti, P., Secreto, G., Krogh, V., Meneghini, E., Venturelli, E., Sieri, S., Pala, V., Berrino, F. (2004) « Endogenous Sex Hormones and Subsequent Breast Cancer in Premenopausal Women », *International Journal of Cancer* **112**(2) : 312-318.
52. Missmer, S.A., Eliassen, A.H., Barbieri, R.L., Hankinson, S.E. (2004) « Endogenous Estrogen, Androgen, and Progesterone Concentrations and Breast Cancer Risk among Postmenopausal Women », *Journal of the National Cancer Institute* **96**(24) : 1856-1865.

53. Shetty, P.J., Vedicherlla, B., Ahuja, Y.R., Hasan, Q. (2010) « Tissue Specificity in Breast Cancer : A Mini Review », *International Journal of Genetics and Molecular Biology* **2**(9) : 184-188.
54. Gunnarsson, C., Olsson, B.M., Stål, O. (2001) « Abnormal Expression of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases in Breast Cancer Predicts Late Recurrence », *Cancer Research* **61**(23) : 8448-8451.
55. Gagnon, V., St-Germain, M.È., Descôteaux, C., Provencher-Mandeville, J., Parent, S., Mandal, S.K., Asselin, E., Bérubé, G. (2004) « Biological Evaluation of Novel Estrogen-platinum (II) Hybrid Molecules on Uterine and Ovarian Cancers-Molecular Modeling Studies », *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **14**(23) : 5919-5924.
56. Kounelis, S., Kapranos, N., Kouri, E., Coppola, D., Papadaki, H., Jones, M.W. (2000) « Immunohistochemical Profile of Endometrial Adenocarcinoma : a Study of 61 Cases and Review of the Literature », *Modern Pathology* **13**(4) : 379-388.
57. Angerer, E.V. (1993) « Platinum Complexes With Specific Activity Against Hormone-Dependent Tumors in Metal Complexes in Cancer Chemotherapy », VCH, Weinheim, Allemagne, pp. 75-83.
58. Rao, B.R., Slotman, B.J. (1991) « Endocrine Factors in Common Epithelial Ovarian Cancer », *Endocrine Reviews* **12**(1) : 14-26.
59. Wahli, W., Martinez, E. (1991) « Superfamily of Steroid Nuclear Receptors : Positive and Negative Regulators of Gene Expression », *The FASEB Journal* **5**(9) : 2243-2249.
60. Ruff, M., Gangloff, M., Wurtz, J.M., Moras, D. (2000) « Estrogen Receptor Transcription and Transactivation : Structure-function Relationship in DNA-and Ligand-binding Domains of Estrogen Receptors », *Breast Cancer Research* **2**(5) : 353-359.
61. Metzger, D., Ali, S., Bornert, J.M., Chambon, P. (1995) « Characterization of the Amino-terminal Transcriptional Activation Function of the Human Estrogen Receptor in Animal and Yeast Cells », *Journal of Biological Chemistry* **270**(16) : 9535-9542.
62. Freedman, L.P. (1992) « Anatomy of the Steroid Receptor Zinc Finger Region », *Endocrine Reviews* **13**(2) : 129-145.

63. Sommer, S., Fuqua, S.A.W. (2001) « Estrogen Receptor and Breast Cancer », *Cancer Biology* **11** : 339-352.
64. Nichols, M., Rientjes, J.M.J., Stewart, A.F. (1998) « Different Positioning of the Ligand-binding Domain Helix 12 and the F Domain of the Estrogen Receptor Accounts for Functional Differences Between Agonists and Antagonists », *The EMBO Journal* **17**(3) : 765-773.
65. Hawkins, M.B., Thornton, J.W., Crews, D., Skipper, J.K., Dotte, A., Thomas, P. (2000) « Identification of a Third Distinct Estrogen Receptor and Reclassification of Estrogen Receptors in Teleosts », *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(20) : 10751-10756.
66. Hsieh, Y.C., Yu, H.P., Suzuki, T., Choudhry, M.A., Schwacha, M.G., Bland, K.I., Chaudry, I.H. (2006) « Upregulation of Mitochondrial Respiratory Complex IV by Estrogen Receptor- β is Critical for Inhibiting Mitochondrial Apoptotic Signaling and Restoring Cardiac Functions Following Trauma-hemorrhage », *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **41**(3) : 511-521.
67. Lemieux, C. (2005) « Effets et mécanismes d'action d'un modulateur sélectif des récepteurs des oestrogènes sur le métabolisme des lipides », Thèse de doctorat, Université Laval.
68. Drummond, A.E., Fuller, P.J. (2010) « The Importance of ER β Signalling in the Ovary », *Journal of Endocrinology* **205**(1) : 15-23.
69. Liu, M.M., Albanese, C., Anderson, C.M., Hilty, K., Webb, P., Uht, R.M., Price Jr, R.H., Pestell, R.G., Kushner, P.J. (2002) « Opposing Action of Estrogen Receptors α and β on Cyclin D1 Gene Expression », *Journal of Biological Chemistry* **277**(27) : 24353-24360.
70. Pettersson, K., Delaunay, F., Gustafsson, J. (2000) « Estrogen Receptor β Acts as a Dominant Regulator of Estrogen Signaling », *Oncogene* **19** :4970-4978.
71. de Cremoux, P. (2011) « Hormonothérapie des cancers du sein », *Bulletin du Cancer* **98**(11) : 1311-1319.
72. Guo, Z., Yi, X., Xu, Z. (2002) « Molecular Simulation of Interaction between Estrogen Receptor and Selective Estrogen Receptor Modulators », *Acta Pharmacologica Sinica* **23**(3) : 208-212.

73. Anstead, G.M., Carlson, K.E., Katzenellenbogen, J.A. (1997) « The Estradiol Pharmacophore : Ligand Structure-estrogen Receptor Binding Affinity Relationships and a Model for the Receptor Binding Site », *Steroids* **62**(3) : 268-303.
74. Pike, A.C.W., Brzozowski, A.M., Hubbard, R.E., Bonn, T., Thorsell, A.G., Engström, O., Ljunggren, J., Gustafsson, J.Å., Carlquist, M. (1999) « Structure of the Ligand-binding Domain of Oestrogen Receptor Beta in the Presence of a Partial Agonist and a Full Antagonist », *The EMBO Journal* **18**(17) : 4608-4618.
75. Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., Laudet, V. (2006) « Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors », *Pharmacological Reviews* **58**(4) : 685-704.
76. Pujol, P., Maudelonde, T. (2001) « SERM : concept et mécanismes d'action : Prévention de l'ostéoporose », *La Lettre du gynécologue* **258** : 29-36.
77. Fang, H., Tong, W., Shi, L.M., Blair, R., Perkins, R., Branham, W., Hass, B.S., Xie, Q., Stacy, L., Moland, C.L. (2001) « Structure-activity Relationships for a Large Diverse Set of Natural, Synthetic, and Environmental Estrogens », *Chemical Research in Toxicology* **14**(3) : 280-294.
78. Tanenbaum, D.M., Wang, Y., Williams, S.P., Sigler, P.B. (1998) « Crystallographic Comparison of the Estrogen and Progesterone Receptor's Ligand Binding Domains », *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(11) : 5998-6003.
79. Kuiper, G.G.J.M., Carlsson, BO, Grandien, K.A.J., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.Å. (1997) « Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β », *Endocrinology* **138**(3) : 863-870.
80. Gangloff, M. (2000) « Étude de l'agonisme et de l'antagonisme dans le récepteur alpha des hormones oestrogènes par mutagenèse dirigée et cristallographie », Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur.
81. Colton, T., Greenberg, E.R., Noller, K., Resseguie, L., Van Bennekom, C., Heeren, T., Zhang, Y. (1993) « Breast Cancer in Mothers Prescribed Diethylstilbestrol in Pregnancy », *Journal of the American Medical Association* **269**(16) : 2096-2100.

82. Mazellier, P., Méité L., Laats, J.D. (2008) « Photodegradation of the Steroid Hormones 17 β -Estradiol (E2) and 17 α -Ethinylestradiol (EE2) in Dilute Aqueous Solution », *Chemosphere* **73**(8) : 1216-1223.
83. Bai, Z., Gust, R. (2009) « Breast Cancer, Estrogen Receptor and Ligands », *Archiv der Pharmazie* **342**(3) : 133-149.
84. Howell, A., Osborne, C.K., Morris, C., Wakeling, A.E. (2000) « ICI 182,780 (FaslodexTM) », *Cancer* **89**(4) : 817-825.
85. Labrie, F., Labrie, C., Bélanger, A., Simard, J., Gauthier, S., Mérand, Y., Giguere, V., Candas, B., Luo, S., Martel, C. (1999) « EM-652 (SCH 57068), a Third Generation SERM Acting as Pure Antiestrogen in the Mammary Gland and Endometrium », *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **69**(1-6) : 51-84.
86. O'Brien, M.E.R., Wigler, N., Inbar, M., Rosso, R., Grischke, E., Santoro, A., Catane, R., Kieback, D.G., Tomczak, P., Ackland, S.P. (2004) « Reduced Cardiotoxicity and Comparable Efficacy in a Phase III Trial of Pegylated Liposomal Doxorubicin HCl (CAELYXTM/Doxil®) versus Conventional Doxorubicin for First-line Treatment of Metastatic Breast Cancer », *Annals of Oncology* **15**(3) : 440-449.
87. Magrath, I.T. (1994) « Targeted Approaches to Cancer Therapy », *International Journal of Cancer* **56**(2) : 163-166.
88. Beck, W., Purucker, B., Girth, M., Schönenberger, H., Seidenberger, H., Ruckdeschel, G. (1976) « Synthese, in vivo-und in vitro-Untersuchungen zur Tumorhemmenden Wirkung von cis-Dichloro-dipeptidester-platin (II)-Komplexen », *Z Naturforsch* **31** : 832-845.
89. Evrard, A., Cuq, P., Ciccolini, J., Vian, L., Cano, J.P. (1999) « Increased Cytotoxicity and Bystander Effect of 5-Fluorouracil and 5'-Deoxy-5-fluorouridine in Human Colorectal Cancer Cells Transfected with Thymidine Phosphorylase », *British Journal of Cancer* **80**(11) : 1726-1733.
90. Toffoli, G., Cernigoi, C., Russo, A., Gallo, A., Bagnoli, M., Boiocchi, M. (1997) « Overexpression of Folate Binding Protein in Ovarian Cancers », *International Journal of Cancer* **74**(2) : 193-198.

91. Garin-Chesa, P., Campbell, I., Saigo, P.E., Lewis Jr, J.L., Old, L.J., Rettig, W.J. (1993) «Trophoblast and Ovarian Cancer Antigen LK26. Sensitivity and Specificity in Immunopathology and Molecular Identification as a Folate-binding Protein », *The American Journal of Pathology* **142**(2) : 557-567.
92. Lu, Y., Low, P.S. (2002) «Folate-mediated Delivery of Macromolecular Anticancer Therapeutic Agents », *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**(5) : 675-693.
93. Gupta, A., Saha, P., Descoteaux, C., Leblanc, V., Asselin, E., Berube, G. (2010) « Design, Synthesis and Biological Evaluation of Estradiol-chlorambucil Hybrids as Anticancer Agents », *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **20**(5) : 1614-1618.
94. Descôteaux, C., Leblanc, V., Bélanger, G., Parent, S., Asselin, E., Berube, G. (2008) « Improved Synthesis of Unique Estradiol-linked Platinum (II) Complexes Showing Potent Cytocidal Activity and Affinity for the Estrogen Receptor alpha and beta », *Steroids* **73**(11) : 1077-1089.
95. Poirier, D.D., Boivin, R.P., Bérubé, M., Lin, S.X. (2003) « Synthesis of a First Estradiol-adenosine Hybrid Compound », *Synthetic Communications* **33**(18) : 3183-3192.
96. Kuduk, S.D., Zheng, F.F., Sepp-Lorenzino, L., Rosen, N., Danishefsky, S.J. (1999) « Synthesis and Evaluation of Geldanamycin-estradiol Hybrids », *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **9**(9) : 1233-1238.
97. Devraj, R., Barrett, J.F., Fernandez, J.A., Katzenellenbogen, J.A., Cushman, M. (1996) « Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Ellipticine-estradiol Conjugates », *Journal of Medicinal Chemistry* **39**(17) : 3367-3374.
98. Van Themsche, C., Parent, S., Leblanc, V., Descoteaux, C., Simard, A. M., Berube, G., Asselin, E. (2009) « VP-128, a Novel Oestradiol-platinum(II) Hybrid with Selective Anti-tumour Activity towards Hormone-dependent Breast Cancer Cells in vivo », *Endocrine-Related Cancer* **16**(4) : 1185-1195.
99. Dao, K.L., Sawant, R.R., Hendricks, J.A., Ronga, V., Torchilin, V.P., Hanson, R.N. (2012) « Design, Synthesis, and Initial Biological Evaluation of a Steroidal Anti-Estrogen–Doxorubicin Bioconjugate for Targeting Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells », *Bioconjugate Chemistry* **23**(4) : 785-795.

100. Burke, P.J., Koch, T.H. (2004) « Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Doxorubicin-formaldehyde Conjugates Targeted to Breast Cancer Cells », *Journal of Medicinal Chemistry* **47**(5) : 1193-1206.
101. Gengrinovitch, S., Izakovich, E. (Août 2005) « Conjugates of Amino Acids with Drugs or with Imaging Agents for Cancer Therapy and Diagnosis », *Brevet international*, WO 2005072061.
102. Chrzanowski, K., Bielawska, A., Palka, J. (2003) « Proline Analogue of Melphalan as a Prodrug Susceptible to the Action of Prolidase in Breast Cancer MDA-MB 231 Cells », *Farmaco* **58**(11) : 1113-1119.
103. Brändén, C.-I., Tooze, J. (1996) « Introduction à la structure des protéines », De Boeck université, Paris, France, 302 pp.
104. Shinitzky, M., Elitzur, A.C., Deamer, D.W. (2005) « Deviation from Physical Identity Between D- and L-Tyrosine », *ChemInform* **36**(49) : 329-337.
105. McLean, A., Rubinsztein, J.S., Robbins, T.W., Sahakian, B.J. (2004) « The Effects of Tyrosine Depletion in Normal Healthy Volunteers : Implications for Unipolar Depression », *Psychopharmacology* **171**(3) : 286-297.
106. Darche, É. (2010) « L'alimentation idéale des jeunes : Comment favoriser l'équilibre physique et mental des enfants, adolescents ou jeunes adultes », Fernand Lanore, Paris, France, 346 pp.
107. Refat, M.S., El-Korashy, S.A., Ahmed, A.S. (2008) « Preparation, Structural Characterization and Biological Evaluation of L-tyrosinate Metal Ion Complexes », *Journal of Molecular Structure* **881**(1) : 28-45.
108. Thorne Research Inc. (2007) « L-tyrosine », *Monographie, Alternative Medicine Review : A Journal of Clinical Therapeutic* **12**(4) : 364-368.
109. Wu, A., Xu, Y., Qian, X. (2009) « Novel Naphthalimide-Amino Acid Conjugates with Flexible Leucine Moiety as Side Chain : Design, Synthesis and Potential Antitumor Activity », *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**(2) : 592-599.
110. Margiotta, N., Papadia, P., Lazzaro, F., Crucianelli, M., De Angelis, F., Pisano, C., Vesci, L., Natile, G. (2005) « Platinum-based Antitumor Drugs Containing Enantiomerically Pure α -Trifluoromethyl Alanine as Ligand », *Journal of Medicinal Chemistry* **48**(24) : 7821-7828.

111. Auclair, C., Voisin, E., Banoun, H., Paoletti, C., Bernadou, J., Meunier, B. (1984) « Potential Antitumor Agents : Synthesis and Biological Properties of Aliphatic Amino Acid 9-Hydroxyellipticinium Derivatives », *Journal of Medicinal Chemistry* **27**(9) : 1161-1166.
112. Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A. (2000) « Estrogen Receptor Transcription and Transactivation: Estrogen Receptor alpha and Estrogen Receptor beta-Regulation by Selective Estrogen Receptor Modulators and Importance in Breast Cancer », *Breast Cancer Research* **2**(5) : 335-344.
113. McConathy, J., Owens, M.J. (2003) « Stereochemistry in Drug Action », *Primary Care Companion Journal of Clinical Psychiatry* **5**(2) : 70-73.
114. Allen, D.A, Tomaso, A.E., Priest, O.P. (2008) « Mosher Amides: Determining the Absolute Stereochemistry of Optically Active Amines », *Journal of Chemical Education* **85**(5) : 698-700.
115. He, Y., Groleau, S., C-Gaudreault, R., Caron, M., Thérien, H.M., Bérubé, G. (1995) « Synthesis and in vitro Biological Evaluation of New Triphenylethylene Platinum(II) Complexes », *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **5**(19) : 2217-2222.
116. Filardo, E.J. (2002) « Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Transactivation by Estrogen via the G-Protein-coupled Receptor, GPR30: a Novel Signaling Pathway with Potential Significance for Breast Cancer », *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **80**(2) : 231-238.
117. Bertin, C., Weston, L.A., Huang, T., Jander, G., Owens, T., Meinwald, J. (2007) « Grass Roots Chemistry: *meta*-Tyrosine, an Herbicidal Nonprotein Amino Acid », *PNAS* **104**(43) : 16964-16969.
118. Rodgers, K.J., Wang, H., Fu, S., Dean, R.T. (2002) « Biosynthetic Incorporation of Oxidized Amino Acids into Proteins and their Cellular Proteolysis », *Free Radical Biology and Medicine* **32**(8) : 766-775.
119. Gurer-Orhan, H., Ercal, N., Mare, S., Pennathur, S., Orhan, H., Heinecke, J.W. (2006) « Misincorporation of Free *m*-Tyrosine into Cellular Proteins: a Potential Cytotoxic Mechanism for Oxidized Amino Acids », *Biochemical Journal* **395**(2) : 277-284.
120. Moosmann, B., Behl, C. (2000) « Cytoprotective Antioxidant Function of Tyrosine and Tryptophan Residues in Transmembrane Proteins », *European Journal of Biochemistry* **267**(18) : 5687-5692.

121. Nettles, K.W., Bruning, J.B., Gil, G., O'Neill, E.E., Nowak, J., Hughs, A., Kim, Y., DeSombre, E.R., Dilis, R., Hanson, R.N., Joachimiak, A., Greene, G.L. (2007) « Structural Plasticity in the Oestrogen Receptor Ligand-binding Domain », *European Molecular Biology Organization* **8**(6) : 563-568.

122. Azizi, N., Saisi, M.R. (2004) « LiClO₄ Accelerated Michael Addition of Amines to α,β -unsaturated Olefins under Solvent-free Conditions », *Tetrahedron* **60** : 383-387.

ANNEXE

Les travaux effectués et présentés dans le cadre de ce doctorat portent sur le développement de molécules cytotoxiques à base de tyrosine. Parallèlement, une autre étude fut réalisée dans les laboratoires des Drs Bérubé et Asselin. Les résultats de cette dernière sont présentés dans l'article intitulé « Synthèse, activité antiproliférative et affinité sur le RE α de nouveaux complexes estradiol-platine(II) analogues au carboplatine et à l'oxaliplatine. Des complexes vecteurs potentiels pour cibler les tissus hormono-dépendants ». L'objectif principal de ces travaux était de modifier des molécules estradiol-Pt(II) déjà existantes pour former de nouveaux analogues platine(II). Des molécules furent synthétisées auparavant dans notre laboratoire en couplant l'estradiol à un dérivé du cisplatine. Ce même concept fut appliqué cette fois en utilisant des dérivés du carboplatine et de l'oxaliplatine, d'autres agents anticancéreux connus. Les molécules de départ furent synthétisées selon une méthodologie déjà publiée par notre équipe, à l'exception de la dernière étape de synthèse, soit la transformation en dérivés du carboplatine et de l'oxaliplatine (93). Les molécules platine(II) obtenues ont été soumises à une évaluation biologique *in vitro*, réalisée sur les cellules cancéreuses du sein hormono-dépendantes (MCF-7) et hormono-indépendantes (MDA-B-231), de même qu'à une étude de l'affinité sur le RE α .

Synthèse, activité antiproliférative et affinité pour le récepteur aux estrogènes alpha de nouveaux complexes estradiol-platine(II) analogues au carboplatine et à l'oxaliplatine. Des complexes vecteurs pouvant potentiellement cibler les tissus estrogène-dépendant

Pijus Saha, Caroline Descôteaux, Kevin Brasseur, Sébastien Fortin, Valérie Leblanc, Sophie Parent, Éric Asselin, Gervais Bérubé*

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. La référence de cet article est la suivante : *European Journal of Medicinal Chemistry* (2012) 48 : 385-370.
DOI 10.1016/j.ejmech.2011.12.017

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Les travaux présentés ici étaient sous la supervision des Drs Bérubé et Asselin. La synthèse des molécules fut effectuée par Pijus Saha et Caroline Descôteaux. L'évaluation biologique fut réalisée par Kevin Brasseur, Valérie Leblanc et Sophie Parent. Caroline Descôteaux a participé à la rédaction de ce manuscrit, en collaboration avec Pijus Saha, Sébastien Fortin et Gervais Bérubé. La soumission, la correction et les réponses aux interrogations et suggestions des examinateurs ont été effectuées par le Dr Bérubé.

RÉSUMÉ

À travers les efforts menés pour développer des agents anticancéreux à base de 17β -estradiol ciblant les tissus hormone-dépendants, nous avons identifié trois complexes estradiol-platine(II) analogues au cisplatine (E-CDDP) : VP-128 (1), CD-38 (2) et JMP-39 (3). Ceux-ci démontrent une puissante activité *in vitro* et *in vivo* (pour le

dérivé VP-128) avec une interaction pour le récepteur estrogénique α (RE α). Dans cette étude, nous avons préparé et effectué des analyses biologiques sur deux nouvelles classes de composés estradiol-platine(II) analogues au carboplatine (E-CarboP, **1a-3a**) et à l'oxaliplatine (E-OxaP, **1b-3b**). E-CarboP and E-OxaP furent conçus et inspirés de la structure des dérivés E-CDDP déjà connus. Ainsi, nous avons étudié l'activité antiproliférative des sels de platine(II) sur les lignées cellulaires de carcinomes mammaires MCF-7 et MDA-MB-231 ainsi que leur affinité pour le RE α suite au remplacement du groupement dichloroplatine(II) par les groupements cyclobutane-1,1-dicarboxylateplatine(II) ou oxalateplatine(II). À l'exception du composé **3b**, lequel était inactif aux concentrations utilisées, les activités antiprolifératives de tous les composés sur les deux lignées cellulaires du sein sont de l'ordre du micromolaire. Ceux-ci sont plus actifs que le carboplatine et l'oxaliplatine administrés seuls, mais moins actifs que leurs analogues E-CDDP (**1-3**). Également, les dérivés E-CarboP **1a-3a** présentent une très faible affinité pour le RE α tandis que les dérivés E-OxaPs **1b** et **2b** montrent une affinité supérieure pour le RE α que les molécules semblables E-CDDPs (**1-2**), ce qui suggère que la nature du sel de platine(II) dont il est question dans les complexes est très importante pour l'activité antiproliférative, pour la sélectivité pour le RE α et possiblement pour le ciblage des tissus hormono-dépendants. Finalement, les molécules E-OxaPs **1b** et **2b** représentent des alternatives prometteuses pour cibler les tissus hormono-dépendants.

ARTICLE EN ANNEXE

**Synthesis, antiproliferative activity and estrogen receptor α affinity of novel estradiol-linked platinum(II) complex analogs to carboplatin and oxaliplatin.
Potential vector complexes to target estrogen-dependent tissues**

Pijus Saha, Caroline Descôteaux, Kevin Brasseur, Sébastien Fortin, Valérie Leblanc,
Sophie Parent, Éric Asselin, Gervais Bérubé*

Département de Chimie-Biologie, Groupe de Recherche en Oncologie et Endocrinologie Moléculaires, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7, e-mail : Pijus.Saha@uqtr.ca, Caroline.Descoteaux@uqtr.ca, Kevin.Brasseur@uqtr.ca, Sebastien.Fortin1@uqtr.ca, Valerie.LebLANC@uqtr.ca, Sophie.Parent@uqtr.ca, Eric.Asselin@uqtr.ca, Gervais.Berube@uqtr.ca

*Corresponding author : Gervais Bérubé; Phone : 819-376-5011 ext. 3353, Fax : 819-376-5084, e-mail : Gervais.Berube@uqtr.ca. Département de Chimie-Biologie, Groupe de Recherche en Oncologie et Endocrinologie Moléculaires, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

Abbreviations List : estrogen-receptor positive, ER+; estrogen-receptor negative, ER-; estradiol-linked platinum(II) complex analog to cisplatin; E-CDDP; estradiol-linked platinum(II) complex analog to carboplatin, E-CarboP; estradiol-linked platinum(II) complex analog to oxaliplatin, E-OxaP.

Abstract

In the course of efforts to develop 17β -estradiol-linked to anticancer agents targeting estrogen-dependent tissue, we identified three estradiol-linked platinum(II) complex analogs to cisplatin (E-CDDP) derivatives namely : VP-128 (**1**), CD-38 (**2**) and JMP-39 (**3**) that exhibit potent *in vitro* and *in vivo* (for derivative VP-128) activity along with interaction with the estrogen receptor α (ER α). In this study, we prepared and biologically evaluated two novel classes of estradiol-linked platinum(II) complex analogs to carboplatin (E-CarboP, **1a-3a**) and oxaliplatin (E-OxaP, **1b-3b**). E-CarboP and E-OxaP were designed and based on the estradiol-linker scaffold of E-CDDP derivatives previously identified. Consequently, we assessed the importance of the nature of platinum(II) salt on the antiproliferative activity on MCF-7 and MDA-MB-231 human mammary carcinoma cell lines together with affinity for the ER α by replacing the dichloroplatinum(II) moiety by a cyclobutane-1,1-dicarboxylateplatinum(II) or an oxalateplatinum(II) moiety. Except for compound **3b** which is inactive at the concentration tested, the antiproliferative activity of all compounds on both human mammary carcinomas cell lines are in micromolar range and are more active than carboplatin and oxaliplatin alone but less active than their E-CDDP counterparts (**1-3**). In addition, E-CarboP derivatives **1a-3a** show very low affinity for ER α whereas E-OxaPs **1b** and **2b** show higher affinity for ER α than their parents E-CDDPs (**1-2**), suggesting that the nature of the platinum(II) salt involved in the vector complexes is extremely important to both retain significant antiproliferative activity and selectivity for the ER α and possibility to target estrogen-dependent tissues. Finally, E-OxaPs **1b** and **2b** are potentially promising alternatives vector complexes to target estrogen-dependent tissues.

Keywords: Estradiol-carboplatin analogs; Estradiol-oxaliplatin analogs; Vectorization therapy; Anticancer agents; Estrogen receptor; Breast cancer

Introduction

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum(II)) is an effective anticancer drug widely used against ovarian carcinoma, lung, head and neck cancers. Its discovery has triggered numerous research programs to find platinum(II) derivatives with enhanced biological activities, decreased toxicities and not triggering chemoresistance of cancer cells. Hence, the screening of hundreds of platinum(II) drugs has resulted in the discovery of carboplatin (cis-diammine(cyclobutane-1,1-dicarboxylato)-platinum(II)) and oxaliplatin (1,2-diaminocyclohexaneoxalato platinum(II)) [1, 2]. The latter is in use for the treatment of metastatic colorectal cancer and is less prone to side effects than cisplatin [2, 3]. Another new drug, nedaplatin (cis-diammine-glycolato-O,O-platinum(II)) that is tenfold more water soluble than cisplatin, and is significantly less nephrotoxic than cisplatin and carboplatin has been recently approved in Japan for the treatment of non-small-cell lung carcinoma, small cell lung cancer, oesophageal and head and neck cancers (Fig. 1) [2, 3].

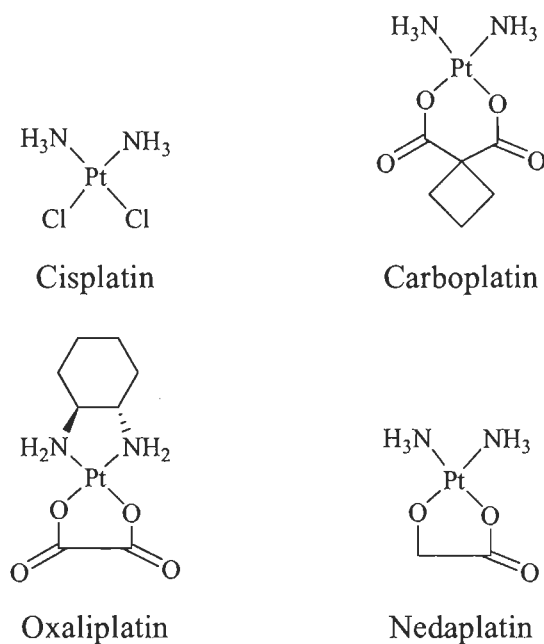


Figure 1. Structure of cisplatin, carboplatin, oxaliplatin and nedaplatin

The platinum(II)-based anticancer agents cause damages to tumors by the formation of reactive platinum species that bind to nucleophilic groups such as purine present in DNA, resulting in intrastrand [4] and interstrand [5] cross-links that ultimately lead to apoptosis [1, 2]. Apoptosis resulting from platinum salts cytotoxicity is also responsible for the characteristic nephrotoxicity, ototoxicity and other toxicities described for platinum(II)-based drugs, that are a direct consequence of their systemic effects and lack of selectivity toward cancer cells. Another major drawback of platinum(II)-based drugs treatments is the triggering of tumor cell chemoresistance notably : (1) reduction of drug uptake and/or increased drug efflux, (2) degradation and deactivation by intracellular thiols and (3) improvement of repair or tolerance of DNA–cisplatin adducts [1-3].

Several strategies have been used to increase tumor cell selectivity of platinum drugs, including their conjugation to potentially site-directing molecules, such as folate, porphyrins, adenine, terpenoids, peptides and many others [6-14]. The approach used by our research group and few others is based on their potential site-direction through their conjugation to estrogen analogs and derivatives to target estrogen-dependent tissues such as breast, ovarian and uterus [15-20]. In the course of our research program, we have selected three potent derivatives amongst three different series of estradiol-linked platinum(II) complex analogs to cisplatin (E-CDDP) exhibiting favorable *in vitro* biological activity compared to the corresponding cisplatin against breast cancer cell lines [16-19]. These derivatives selected are namely : 16 α , β -[11-(2-pyridylethylamino)undecanyl]-1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol dichloroplatinum(II) (VP-128, **1**), 16 β -hydroxymethyl-16 α -[10-(2-pyridylethylamino)decyl]-1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol dichloroplatinum(II) (CD-38, **2**) and 16 β -hydroxymethyl-16 α -[8-(2-pyridylethylamino)-3,6-dioxaoctyl]-1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol dichloroplatinum(II) (JMP-39, **3**) (Fig. 2) [16-19]. E-CDDP derivatives **1**, **2** and **3** showed better *in vitro* activity than cisplatin against breast cancer cell lines along with higher affinity with the estrogen receptor α (ER α), RNA and DNA [21-24]. In addition, a human breast cancer tumors estrogen-receptor positive (ER $^{+}$) xenograft model using MCF-7 cells on mice showed that E-CDDP derivative **1** achieved a better tumor regression than cisplatin [24].

This demonstrates that E-CDDP is a good approach to increase both tumor cell selectivity of platinum(II) drugs and selectively target estrogen-dependent tissues.

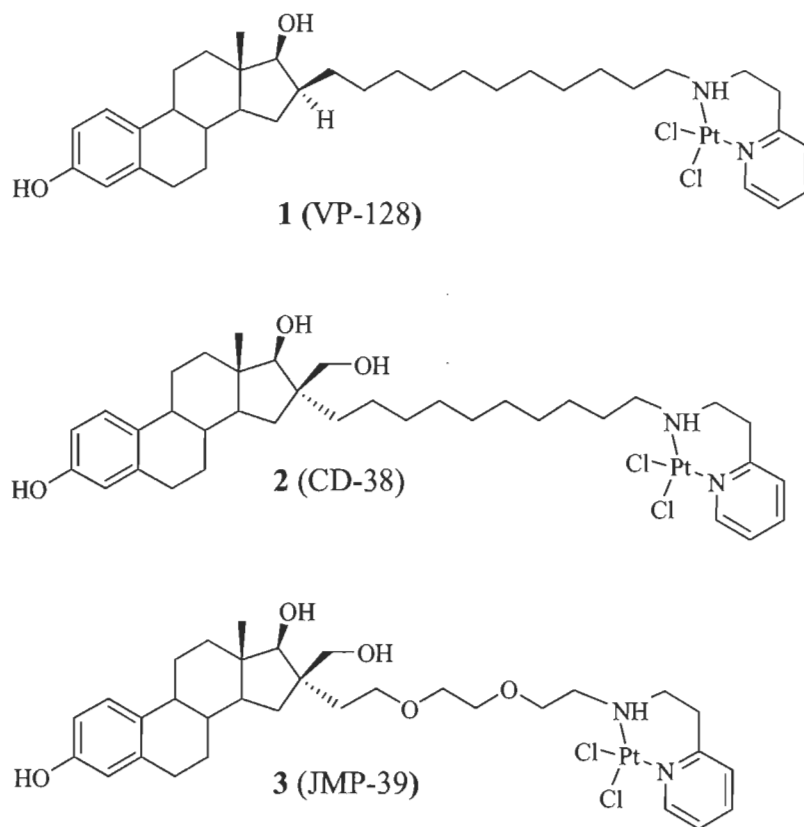


Figure 2. Structure of the E-CDDP selected to make E-CarboP and E-OxaP

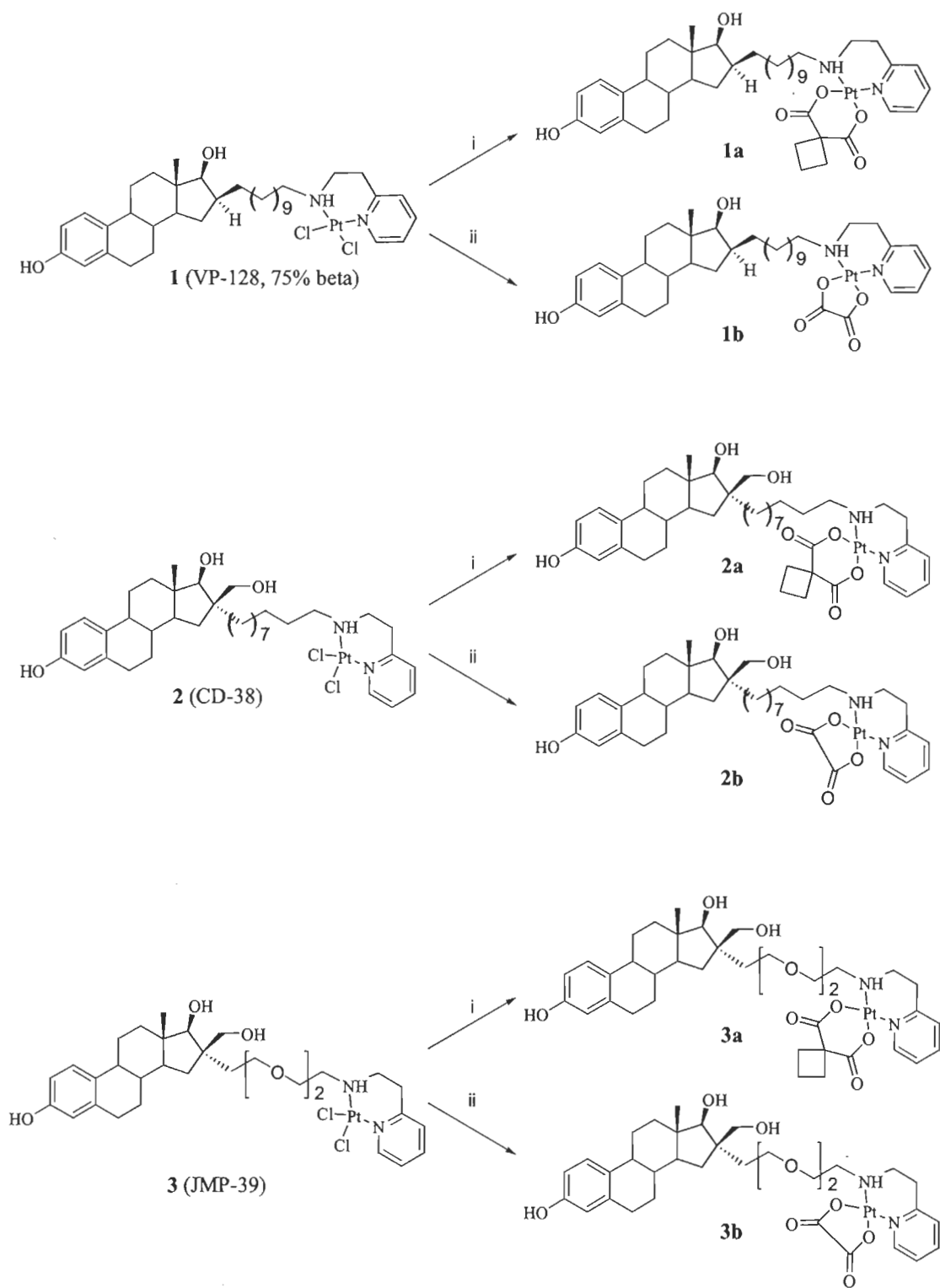
In the aim to improve selectivity and efficacy while minimizing the potential deleterious effects of our E-CDDP, we prepared and assessed the biological activity of two novel classes of estradiol-linked platinum(II) complex analogs to carboplatin (E-CarboP, **1a-3a**) and oxaliplatin (E-OxaP, **1b-3b**). These two novel classes were designed and based on the estradiol-linker scaffold of E-CDDP derivatives previously identified. In this study, we assessed the importance of the nature of platinum(II) salt by replacing the dichloroplatinum(II) moiety of our E-CDDP derivatives by a cyclobutane-1,1-dicarboxylateplatinum(II) or a oxalateplatinum(II) moiety on the antiproliferative activity on ER+ (MCF-7) and ER- (MDA-MB-231) human mammary carcinomas cells together with their affinity for the ER α .

Results and discussion

Chemistry

Cisplatin, carboplatin and oxaliplatin were linked to the estradiol framework at position 16 (α or β) of the steroid nucleus. The starting E-CDDP derivatives **1**, **2** and **3** material were obtained from estrone with overall yields of 21%, 28% and 22%, respectively using procedures described previously [16-19]. The different platinum complexes were linked to estrone using either an eleven (derivative **1**) or a ten carbon atom alkyl chain (derivative **2**) or a triethylene glycol chain (derivative **3**). For compound **1**, the chain substitutes position 16 β of the steroid nucleus whereas for compounds **2** and **3** the substitution is at position 16 α of the steroid nucleus and bears a 16 β -hydroxymethyl side chain (Fig. 2).

The method used for the preparation of E-CarboP derivatives (**1a-3a**) and E-OxaP derivatives (**1b-3b**) is described in Scheme 1. Briefly, compounds **1a-3b** were prepared by treating compounds **1**, **2** or **3** with silver cyclobutane-1,1-dicarboxylate or silver oxalate in a mixture of acetone/H₂O (2 : 1) at room temperature for 1 to 15 days to afford the desired material in yields ranging from 34% to 67%. It was observed that the reaction time was significantly different following the solubility of the starting material. The completion of the reaction took 7-15 days for compounds **1**, **2** and only 1 day for compound **3**.



Scheme 1. Reagents : (i) Silver cyclobutane-1,1-dicarboxylate, acetone, H₂O; (ii) Silver oxalate, acetone, H₂O.

Antiproliferative activity

The antiproliferative activity of E-CarboP derivatives (**1a-3a**) or E-OxaP derivatives (**1b-3b**) was evaluated on the human ER+ MCF-7 and ER- MDA-MB-231 mammary carcinomas using the MTT colorimetric assay [25]. The antiproliferative activity of compounds **1a-3b** was tested along with E-CDDP derivatives (**1-3**), cisplatin, carboplatin and oxaliplatin. As shown in Table 1, compound **3b** and carboplatin is inactive at the concentration evaluated (80 μ M) whereas antiproliferative activities of E-CarboP derivatives (**1a-3a**) and E-OxaP derivatives (**1b-2b**) are in the micromolar range on both human mammary carcinomas cell lines. They are more active than carboplatin and oxaliplatin but less active than their parent E-CDDP derivatives (**1-3**). Consequently, the general order of activities is as follow : E-CDDP > E-OxaP > E-CarboP. In general, the antiproliferative activity trend into two different classes of E-CarboP and E-OxaP is similar to parent E-CDDP and the general order of antiproliferative activities is as follow : compound **1** > compound **2** > compound **3**. For that reason, the importance of the nature of the platinum(II) salts used seems to affect only slightly the antiproliferative activity of E-OxaP derivatives whereas more significantly E-CarboP derivatives, decreasing activity of 1.2 (**1b/1**) to 2.6-fold (**2b/2**) and 2.2 (**3a/3**) to 7.8-fold (**2a/2**), respectively, comparatively to the E-CDDP derivatives. As expected the nature of platinum(II) salts in the vector complexes seems to play an important role in the antiproliferative activity. This difference activity could be related to different biological and biophysical properties of platinum salt together with different conformations and steric hindrance for the binding to DNA.

Table 1

Antiproliferative activity on both ER+ MCF-7 and ER- MDA-MB-231 human mammary carcinoma cell lines and affinity for the ER α of novel E-CarboP derivatives (compounds **1a**, **2a** and **3a**) and E-OxaP derivatives (compounds **1b**, **2b** and **3b**) together with parent E-CDDP derivatives (compounds **1**, **2**, **3**), cisplatin, carboplatin, oxaliplatin and 17 β -estradiol

Compounds	IC ₅₀ (μ M) ^a		EC ₅₀ (nM) [26]
	MCF-7 (ER ⁺)	MDA-MB-231 (ER ⁻)	
17β-estradiol [16, 17]	NT ^b	NT ^b	0.40 - 0.66
Cisplatin [16]	19.0 \pm 0.4	17 \pm 2	NA ^c
1 [16]	3.81 \pm 0.05	1.88 \pm 0.04	2.75
2 [17]	4.0 \pm 0.6	5 \pm 3	2.26
3 [18, 19]	33 \pm 2	18 \pm 1	4.25
Carboplatin	NR ^d	NR ^d	NA ^c
1a	21 \pm 2	13.1 \pm 0.7	59500
2a	31 \pm 1	16.0 \pm 0.4	299400
3a	74 \pm 3	53 \pm 4	3000
Oxaliplatin	21 \pm 3	19 \pm 1	NA ^c
1b	8.7 \pm 0.6	2.2 \pm 0.1	2.73
2b	10.5 \pm 0.9	7.6 \pm 0.1	1.30
3b	NR ^d	NR ^d	NT ^b

^a Inhibitory concentration (IC₅₀, μ M) as obtained by the MTT assay and expressed as the concentration of drug inhibiting cell growth by 50%. Experiments were performed in duplicates and the results represent the mean \pm SEM of three independent experiments;

^b NT = Not tested; ^c NA = No affinity; ^d NR = Not reached.

Estrogen receptor binding affinity

E-CDDPs (**1-3**) were linked to the estradiol framework at position 16 (α or β) of the steroid nucleus (Fig. 2). Although this position is close to the estrogenic binding site, its substitution does not affect drastically its binding to the estrogen receptor α . As depicted in Table 1, we observed that the use of estradiol as a drug-carrier moiety for E-CDDP (**1-3**) provides hybrids exhibiting good to excellent receptor binding affinity [16-19]. In this study, we showed that all E-CarboP derivatives (**1a-3a**) exhibit also some affinity

for the ER α , albeit very low. More interestingly, E-OxaP derivatives **1b** and **2b** had excellent affinities for ER α with EC₅₀ of 2.73 nM and 1.30 nM, respectively, which are higher than their E-CDDP counterparts. Compound **3b** was devoid of antiproliferative activity and therefore its affinity for ER α was not assessed. As expected, cisplatin, carboplatin and oxaliplatin had no affinity for ER α [16]. As shown in our previous study, the estrogen analogs and linker moieties of 17 β -estradiol-linked to platinum(II) salts play an important role for the antiproliferative activity and the affinity of the drug for the ER α [16-19]. Unexpectedly, the nature of platinum(II) salts in the vector complexes seems to play also a key role in the affinity of the drugs for the ER α and the possibility to target estrogen-dependent tissues. We hypothesized that the final folding conformation of the vector complexes obtain with different platinum(II) salts could interfere in the interaction occurring between the estrogen analog moiety and ER α . Therefore, further SAR studies must be conducted to assess the relationship between affinity of the estrogen analog for the ER α and the structure of the platinum salt involved in the complex.

Conclusions

This manuscript describes the synthesis, the *in vitro* biological evaluation and the affinity for the ER α of two novel classes of E-CarboP and E-OxaP derivatives. The aim of this study was to evaluate the effect of converting the dichloroplatinum(II) moiety into cyclobutane-1,1-dicarboxylateplatinum(II) and oxalateplatinum(II) moieties on the antiproliferative activity and the affinity of the drugs for the ER α to develop alternative vectors for the targeting of anticancer drugs to estrogen-dependent tissues. The results showed that the modification of dichloroplatinum(II) moiety by oxalateplatinum(II) (E-OxaP, derivatives **1b** and **2b**) seems to affect only slightly the antiproliferative activity whereas modification of dichloroplatinum(II) moiety by cyclobutane-1,1-dicarboxylateplatinum(II) (E-CarboP, derivatives **1a-3a**) affect more significantly antiproliferative activity. In addition, E-CarboP derivatives are losing their affinity for ER α whereas E-OxaP derivatives **1b** and **2b** maintain an excellent affinity for the ER α .

Consequently, the nature of platinum(II) salt in the vector complexes is extremely important to retain significant antiproliferative activity and selectivity for the ER α and possibility to target estrogen-dependent tissues. Finally, E-OxaP derivatives **1b** and **2b** will be further studied for their *in vitro* and *in vivo* biological potential on animal models and potentially be promising alternatives vector complexes to target estrogen-dependent tissues.

Experimental protocols

Biological Methods

Human breast carcinoma cell lines MCF-7 (ER+) and MDA-MB-468 (ER-) were generously provided by Dr René C.-Gaudreault (CHUQ Research Center, Québec, Canada) and maintained in RPMI medium containing 10% bovine growth serum containing 50 mg/mL gentamycin. The cells were maintained at 37°C in a moisture-saturated atmosphere containing 5% CO₂.

Antiproliferative activity MTT assay

Cells were plated in 96-well plates 48 h before the assay. Stock solutions of the compounds were prepared by dissolving them in cremophor EL™ : ethanol (1 : 1). Cells were treated for 72 h with serial dilution of the drugs between 80 and 1 μ M in a total volume of 100 μ L per well. The final concentration of cremophor : ethanol (1 : 1) in the culture media was 0.1% and was kept constant in all experiment conditions. After 68 h of incubation, 10 μ L of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (5 mg/mL) was added to each well. 4 h later, 100 μ L of the solubilization solution (10% SDS in 0.01 M HCl) was added and the plate was incubated overnight (37°C, 5% CO₂). The optical density was read with Fluostar OPTIMA BMG (BMG LABTECH inc., Durham, NC) at 550 nm.

Estrogen receptor α binding affinity

The ER α affinity assay was performed using recombinant hER α (Calbiochem/EMD BioSciences, Darmstadt, Germany) and the HitHunterTM Enzyme Fragment Complementary (EFC) Estrogen Receptor Assay kit (Discoverex Corporation, Fremont, CA) according to manufacturer's protocol [26]. HitHunterTM EFC technology is based on a genetically engineered β -galactosidase enzyme that consists of two fragments termed Enzyme Acceptor and Enzyme Donor. Briefly, different concentrations of drugs were added to wells containing Estrogen Steroid Receptor + Enzyme Donor in a 96-well black plate. Incubation provided competition for the estrogen receptor binding against labeled Enzyme Donor-Estrogen Steroid hormone conjugate, a small peptide fragment of β -galactosidase. Then, Enzyme Acceptor, an inactive β -galactosidase protein fragment, and a Fluorescent substrate were added to each well. Unbound Donor-Estrogen Steroid hormone conjugate bind to Enzyme Acceptor to form an active enzyme, which subsequently hydrolyses the fluorescent substrate for EFC detection by a microplate reader (FLUOStar OPTIMA). The excitation wave is 530 nm and luminosity is detected at 620 nm. The amount of free Enzyme Donor conjugate in the assay is proportional to the concentration of drugs bound to the estrogen receptor [26]. A standard curve of 17 β -estradiol was run in parallel. All assays were done in triplicate.

Chemistry

Proton NMR spectra were recorded on a Varian 200 MHz NMR apparatus and carbon NMR spectra were recorded on a Varian 50 MHz NMR apparatus. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million. IR spectra were recorded on a Nicolet Impact 420 FT-IR spectrophotometer (Nicolet instrument corporation, Madison, WI, USA). All reactions were conducted under a dried nitrogen atmosphere. Chemicals were supplied by Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI, USA) or VWR International (Mont-Royal, Qc, Canada). Liquid flash chromatography was performed on silica gel Merck grade 60 Silica Gel, 230-400 mesh and solvent mixture expressed as volume/volume ratios. The progress of all reactions was monitored using commercial TLC plates from Sigma

T6145 (polyester silica gel 60 Å plates, 0.25 mm). The chromatograms were viewed under UV light at 254 and/or 265 nm. The platinum(II) complexes were analyzed using a MS model 6210, Agilent technology instrument. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained by TOF (time of flight) using ESI (electrospray ionization) using the positive mode (ESI+). The syntheses of estradiol-linked cisplatin **1**, **2** and **3** have been described previously [16-19].

General procedure for the synthesis of E-CarboP derivatives (compounds 1a, 2a and 3a).

Compounds **1**, **2**, or **3** (0.06 mmol) was taken in a flask and dissolved in acetone (2 mL) and water (1 mL). Silver cyclobutane-1,1-dicarboxylate (0.06 mmol) was added slowly to the solution. The reaction mixture was stirred in the dark until the disappearance of the starting material (**1**, **2** or **3**) as indicated by thin layer chromatography. The reaction mixture was filtered and the solvent evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography using a mixture of dichloromethane/methanol (92 : 8) as the eluent.

Note : The silver salt was initially prepared from cyclobutane-1,1-dicarboxylic acid (1.0 g, 6.93 mmol) upon treatment with NaOH (555 mg, 13.87 mmol) in water (10 mL), followed by addition of AgNO₃ (2.47 g, 14.57 mmol) in H₂O (2 mL). The reaction mixture was stirred vigorously for 2 h and the precipitate silver salt was filtered, washed with water (100 mL) and dried in a desiccator before use. This preparation yielded 2.32 g (94% yield) of silver cyclobutane-1,1-dicarboxylate. The same procedure was used for the preparation of silver oxalate using oxalic acid as the starting material instead of cyclobutane-1,1-dicarboxylic acid.

16 α , β -[11-(2-Pyridylethylamino)undecanyl]-1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol

cyclobutane-1,1-dicarboxylateplatinum(II) (**1a**): Yield : 46% (reaction time 14 days); IR : 3339, 1644 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD) δ 8.67 (d, *J* = 5.90 Hz, 1H), 7.98 (t, *J* = 7.05 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 7.80 Hz, 1H), 7.40 (t, *J* = 6.85 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.60 Hz, 1H, ArH), 6.84 (bs, 1H, NH), 6.55-6.46 (m, 2H, ArH), 3.65 (m apparent,

1H, OH), 3.30 (m apparent, 1H, CHOH), 3.16-2.68 (several m, 13H, CH₂-NCH₂CH₂Pyridyl, 6-CH₂, 9-CH, 2x CH₂-carboPt), 2.29-1.30 (several m, 34H, 15xCH₂, 3xCH, 1xOH), 0.79 and 0.75 (2s, 3H, 18-CH₃, 16 α,β (1 : 3)); ¹³C NMR (50 MHz, CD₃OD) δ 180.3, 179.8, 159.5, 154.5, 151.2, 139.5, 137.4, 131.3, 125.8, 124.9, 123.5, 114.7, 112.3, 81.9, 55.9, 53.4, 48.6, 48.2, 45.9, 44.0, 43.8, 40.2, 38.6, 37.8, 37.7, 32.2, 31.6, 30.8, 30.4, 29.6, 29.4, 29.2, 29.1, 28.5, 27.4, 26.5, 26.2, 15.1, 11.9; HRMS (ES+) m/z (M+H)⁺ and (M+Na)⁺ calculated for C₄₂H₆₁N₂O₆Pt and C₄₂H₆₀N₂NaO₆Pt: 884.4176 and 906.3995; found = 884.4154 and 906.3982, respectively.

16 β -Hydroxymethyl-16 α -[10-(2-pyridylethylamino)decyl]-1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol cyclobutane-1,1-dicarboxylateplatinum(II) (2a): Yield: 61% (reaction time 7 days); IR: 3342, 1644 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD) δ 8.70 (d, J = 5.50 Hz, 1H), 8.00 (t, J = 7.50 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 7.50 Hz, 1H), 7.40 (t, J = 6.50 Hz, 1H), 7.10 (d, J = 8.40 Hz, 1H, ArH), 6.83 (bs, 1H, NH), 6.59-6.41 (m, 2H, ArH), 3.72 (2d, 2H, parts A and B of an AB system, J_{AB} = 7.40 Hz, CH₂OH), 3.40 (s, 1H, CHOH), 3.25-2.50 (several m, 13H, CH₂-NCH₂CH₂Pyridyl, 6-CH₂, 9-CH, 2x CH₂-carboPt), 2.40-1.18 (several m, 33H, 14xCH₂, 2xCH, 3xOH), 0.87 (s, 3H, 18-CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 180.3, 179.8, 159.5, 154.5, 151.1, 139.5, 137.3, 131.2, 125.8, 124.9, 123.5, 114.6, 112.3, 89.1, 66.0, 55.9, 54.6, 46.0, 44.8, 44.0, 43.7, 39.1, 38.3, 37.8, 34.2, 30.9, 30.3, 29.3, 29.2, 29.0, 27.3, 26.4, 26.2, 24.0, 15.1, 11.3; HRMS (ES+) m/z (M+H)⁺ and (M+Na)⁺ calculated for C₄₂H₆₁N₂O₇Pt and C₄₂H₆₀N₂NaO₇Pt: 900.4125 and 922.3944; found = 900.4115 and 922.3931, respectively.

16 β -Hydroxymethyl-16 α -[8-(2-pyridylethylamino)-3,6-dioxaoctyl]-1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol cyclobutane-1,1-dicarboxylateplatinum(II) (3a): Yield: 65% (reaction time 24 hours); IR: 3362, 1610 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD) δ 8.68 (d, J = 5.80 Hz, 1H), 8.00 (t, J = 7.80 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 7.40 Hz, 1H), 7.40 (t, J = 6.65 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 8.20 Hz, 1H, ArH), 6.82 (bs, 1H, NH), 6.55-6.46 (m, 2H, ArH), 3.94 (m, 1H, CH_aH_bOH), 3.75-2.70 (several m, 23H, CHOH, CH_aH_bOH, 4xOCH₂ on PEG chain, CH₂-NCH₂CH₂Pyridyl, 6-CH₂, 9-CH, 2xCH₂-carboPt), 2.50-1.18 (several m, 17H,

6xCH₂, 2xCH, 3xOH), 0.84 (s, 3H, 18-CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 180.2, 179.9, 159.6, 154.5, 151.1, 139.6, 137.3, 131.1, 125.8, 124.8, 123.4, 114.6, 112.4, 89.1, 69.7, 68.1, 67.9, 67.6, 66.1, 55.9, 53.8, 44.8, 44.0, 38.8, 38.7, 38.3, 38.0, 35.3, 31.3, 31.2, 30.0, 29.8, 29.3, 28.1, 27.3, 26.1, 15.1, 11.4; HRMS (ES+) *m/z* (M+H)⁺ and (M+Na)⁺ calculated for C₃₈H₅₃N₂O₉Pt and C₃₈H₅₂N₂NaO₉Pt : 876.3397 and 898.3216; found = 876.3377 and 898.3206, respectively.

General procedure for the synthesis of E-OxaP derivatives (compounds 1b, 2b and 3b).

Compounds **1**, **2**, or **3** (0.10 mmol) was taken in a flask and dissolved in acetone (2 mL) and water (1 mL). Silver oxalate (0.10 mmol) was added slowly to the solution. The reaction mixture was stirred in the dark until the disappearance of the starting material (**1**, **2** or **3**) as indicated by thin layer chromatography. The reaction mixture was filtered and the solvent evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography using a mixture of dichloromethane/methanol (92 : 8) as the eluent.

16α,β-[11-(2-Pyridylethylamino)undecanyl]-1,3,5(10)-estratrien-3,17β-diol

oxalateplatinum(II) (1b) : Yield : 46% (reaction time 15 days); IR : 3361, 1695 cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD) δ 8.70 (d, *J* = 6.20 Hz, 1H), 8.01 (t, *J* = 7.40 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 7.80 Hz, 1H), 7.39 (t, *J* = 6.80 Hz, 1H), 7.07 (d and bs overlapped, *J* = 8.20 Hz, 2H, ArH and NH), 6.54-6.47 (m, 2H, ArH), 3.62 (m, 1H, OH), 3.30 (m, 1H, CHOH), 3.16-2.67 (several m, 9H, CH₂-NCH₂CH₂Pyridyl, 6-CH₂, 9-CH), 2.31-1.29 (several m, 32H, 14xCH₂, 3xCH, 1xOH), 0.79 and 0.76 (2s, 3H, 18-CH₃, 16α,β (1 : 3)); ¹³C NMR (CD₃OD) δ 168.4, 167.5, 159.1, 154.5, 151.3, 139.6, 137.4, 131.3, 125.8, 125.4, 123.6, 114.6, 112.3, 81.9, 43.8, 38.6, 37.7, 37.2, 31.5, 29.3, 28.9, 28.4, 27.4, 27.2, 26.4, 26.2, 16.9, 11.8; HRMS (ES+) *m/z* (M+H)⁺ and (M+Na)⁺ calculated for C₃₈H₅₅N₂O₆Pt and C₃₈H₅₄N₂NaO₆Pt : 830.3706 and 852.3525; found = 830.3698 and 852.3514, respectively.

16β-Hydroxymethyl-16α-[10-(2-pyridylethylamino)decyl]-1,3,5(10)-estratrien-3,17β-

diol oxalateplatinum(II) (2b) : Yield : 67% (reaction time 10 days); IR : 3354,

1695 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.78 (d, $J = 5.50$ Hz, 1H), 8.00 (t, $J = 7.50$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 7.50$ Hz, 1H), 7.40 (t, $J = 6.50$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J = 8.40$ Hz, 1H, ArH), 7.00 (bs, 1H, NH), 6.60-6.41 (m, 2H, ArH), 3.72 (2d, 2H, parts A and B of an AB system, $J_{AB} = 7.40$ Hz, CH_2OH), 3.41 (s, 1H, OH), 3.30 (m apparent, 1H, CHOH), 3.25-2.50 (several m, 9H, $\text{CH}_2\text{-NCH}_2\text{CH}_2\text{Pyridyl}$, 6- CH_2 , 9- CH), 2.40-1.20 (several m, 31H, 13 $\times\text{CH}_2$, 3 $\times\text{CH}$, 2 $\times\text{OH}$), 0.87 (s, 3H, 18- CH_3); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 168.4, 167.5, 159.0, 154.5, 151.3, 139.6, 137.3, 131.2, 125.8, 125.4, 123.6, 114.6, 112.3, 89.0, 66.0, 54.6, 45.9, 44.8, 44.0, 39.0, 38.3, 37.8, 37.2, 34.2, 30.2, 29.3, 29.1, 28.9, 27.3, 27.1, 26.4, 26.2, 24.0, 11.3; HRMS (ES+) m/z ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ and ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ calculated for $\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{N}_2\text{O}_7\text{Pt}$ and $\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{NaO}_7\text{Pt}$: 846.3655 and 868.3474; found = 846.3647 and 868.3475, respectively.

16 β -Hydroxymethyl-16 α -[8-(2-pyridylethylamino)-3,6-dioxaoctyl]-1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol oxalateplatinum(II) (3b): Yield: 34% (reaction time 24 hours); IR: 3324, 1698 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.70 (d, $J = 5.80$ Hz, 1H), 8.00 (t, $J = 7.80$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 7.00$ Hz, 1H), 7.40 (t, $J = 7.40$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J = 8.60$ Hz, 1H, ArH), 6.55-6.45 (m, 2H, ArH), 3.92 (m, 1H, $\text{CH}_a\text{H}_b\text{OH}$), 3.75-2.70 (several m, 19H, CHOH , $\text{CH}_a\text{H}_b\text{OH}$, 4 $\times\text{OCH}_2$ on PEG chain, $\text{CH}_2\text{-NCH}_2\text{CH}_2\text{Pyridyl}$, 6- CH_2 , 9- CH), 2.50-1.21 (several m, 17H, 5 $\times\text{CH}_2$, 3 $\times\text{CH}$, 3 $\times\text{OH}$, NH), 0.85 (s, 3H, 18- CH_3); ^{13}C NMR (CD_3OD) δ 168.3, 167.5, 159.1, 154.5, 151.3, 139.6, 137.3, 131.1, 125.8, 125.4, 123.6, 114.6, 112.3, 89.1, 69.8, 69.5, 68.1, 67.1, 66.1, 54.3, 45.8, 44.7, 43.9, 38.2, 37.8, 37.3, 35.0, 29.3, 27.3, 26.1, 11.4; HRMS (ES+) m/z ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ and ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$ calculated for $\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_9\text{Pt}$ and $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{NaO}_9\text{Pt}$: 822.2927 and 844.2746; found = 822.2908 and 844.2735, respectively.

Acknowledgments

This work was supported by the Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies du Québec (FQRNT, Grant #132839). The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) student fellowship to C. Descôteaux is gratefully acknowledged. S. Fortin is recipient of a studentship from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

References

- [1] T. Boulikas, M. Vougiouka, Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review), *Oncol. Rep.* 10 (2003) 1663-1682.
- [2] E. Wong, C.M. Giandomenico, Current status of platinum-based antitumor drugs, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2451-2466.
- [3] N.J. Wheate, S. Walker, G.E. Craig, R. Oun, The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials, *Dalton Trans.* 39 (2010) 8113-8127.
- [4] K. Stehlikova, H. Kosthunova, J. Kasparikova, V. Brabec, DNA bending and unwinding due to the major 1,2-GG intrastrand cross-link formed by antitumor cis-diamminedichloroplatinum(II) are flanking-base independent, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 2894-2898.
- [5] H. Huang, L. Zhu, B.R. Reid, G.P. Drobny, P.B. Hopkins, Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link, *Science (New York)* 270 (1995) 1842-1845.
- [6] O. Aronov, A.T. Horowitz, A. Gabizon, M.A. Fuertes, J.M. Perez, D. Gibson, Nuclear localization signal-targeted poly(ethylene glycol) conjugates as potential carriers and nuclear localizing agents for carboplatin analogues, *Bioconjug. Chem.* 15 (2004) 814-823.
- [7] O. Aronov, A.T. Horowitz, A. Gabizon, D. Gibson, Folate-targeted PEG as a potential carrier for carboplatin analogs. Synthesis and in vitro studies, *Bioconjug. Chem.* 14 (2003) 563-574.
- [8] C. Lottner, R. Knuechel, G. Bernhardt, H. Brunner, Distribution and subcellular localization of a water-soluble hematoporphyrin-platinum(II) complex in human bladder cancer cells, *Cancer Lett.* 215 (2004) 167-177.
- [9] S. Mukhopadhyay, C.M. Barnes, A. Haskel, S.M. Short, K.R. Barnes, S.J. Lippard, Conjugated platinum(IV)-peptide complexes for targeting angiogenic tumor vasculature, *Bioconjug. Chem.* 19 (2008) 39-49.
- [10] M. Galanski, B.K. Keppler, Searching for the magic bullet : anticancer platinum drugs which can be accumulated or activated in the tumor tissue, *Anticancer Agents Med. Chem.* 7 (2007) 55-73.

- [11] S. Moradell, J. Lorenzo, A. Rovira, S. van Zutphen, F.X. Aviles, V. Moreno, R. de Llorens, M.A. Martinez, J. Reedijk, A. Llobet, Water-soluble platinum(II) complexes of diamine chelating ligands bearing amino-acid type substituents : the effect of the linked amino acid and the diamine chelate ring size on antitumor activity, and interactions with 5'-GMP and DNA, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1933-1946.
- [12] J.F. Arambula, J.L. Sessler, M.E. Fountain, W.H. Wei, D. Magda, Z.H. Siddik, Gadolinium texaphyrin (Gd-Tex)-malonato-platinum conjugates : synthesis and comparison with carboplatin in normal and Pt-resistant cell lines, *Dalton Trans.* (2009) 10834-10840.
- [13] P. Starha, Z. Travnicek, I. Popa, Platinum(II) oxalato complexes with adenine-based carrier ligands showing significant in vitro antitumor activity, *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 639-647.
- [14] G. Amr Ael, K.A. Ali, M.M. Abdalla, Cytotoxic, antioxidant activities and structure activity relationship of some newly synthesized terpenoidal oxaliplatin analogs, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 901-907.
- [15] I. Ott, R. Gust, Preclinical and clinical studies on the use of platinum complexes for breast cancer treatment, *Anticancer Agents Med. Chem.* 7 (2007) 95-110.
- [16] C. Descoteaux, V. Leblanc, G. Belanger, S. Parent, E. Asselin, G. Berube, Improved synthesis of unique estradiol-linked platinum(II) complexes showing potent cytotoxic activity and affinity for the estrogen receptor α and β , *Steroids.* 73 (2008) 1077-1089.
- [17] C. Descoteaux, J. Provencher-Mandeville, I. Mathieu, V. Perron, S.K. Mandal, E. Asselin, G. Berube, Synthesis of 17β -estradiol platinum(II) complexes : biological evaluation on breast cancer cell lines, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 3927-3931.
- [18] J. Provencher-Mandeville, C. Debnath, S.K. Mandal, V. Leblanc, S. Parent, E. Asselin, G. Berube, Design, synthesis and biological evaluation of estradiol-PEG-linked platinum(II) hybrid molecules : comparative molecular modeling study of three distinct families of hybrids, *Steroids.* 76 (2011) 94-103.
- [19] J. Provencher-Mandeville, C. Descoteaux, S.K. Mandal, V. Leblanc, E. Asselin, G. Berube, Synthesis of 17β -estradiol-platinum(II) hybrid molecules showing cytotoxic activity on breast cancer cell lines, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (2008) 2282-2287.

- [20] A.R. Yaya, M. Touaibia, G. Massarweh, F.D. Rochon, L. Breau, Synthesis of 17 α -substituted ethynylestradiols : potential ligands for drug vectors, *Steroids*. 75 (2010) 489-498.
- [21] C.N. N'Soukpoe-Kossi, C. Descoteaux, E. Asselin, J. Bariyanga, H.A. Tajmir-Riahi, G. Berube, Transfer RNA bindings to antitumor estradiol-platinum(II) hybrid and cisplatin, *DNA Cell. Biol.* 27 (2008) 337-343.
- [22] C.N. N'Soukpoe-Kossi, C. Descoteaux, E. Asselin, H.A. Tajmir-Riahi, G. Berube, DNA interaction with novel antitumor estradiol-platinum(II) hybrid molecule : a comparative study with cisplatin drug, *DNA Cell. Biol.* 27 (2008) 101-107.
- [23] E. Froehlich, A. Gupta, J. Provencher-Mandeville, E. Asselin, J. Bariyanga, G. Berube, H.A. Tajmir-Riahi, Study of DNA Interactions with Steroidal and Nonsteroidal Estrogen-Platinum (II)-Based Anticancer Drugs, *DNA Cell. Biol.* 28 (2009) 31-39.
- [24] C. Van Themsche, S. Parent, V. Leblanc, C. Descoteaux, A.M. Simard, G. Berube, E. Asselin, VP-128, a novel oestradiol-platinum(II) hybrid with selective anti-tumour activity towards hormone-dependent breast cancer cells in vivo, *Endocr. Relat. Cancer*. 16 (2009) 1185-1195.
- [25] J. Carmichael, W.G. DeGraff, A.F. Gazdar, J.D. Minna, J.B. Mitchell, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Res.* 47 (1987) 936-942.
- [26] R.M. Eglen, Enzyme fragment complementation : a flexible high throughput screening assay technology, *Assay Drug Dev. Technol.* 1 (2002) 97-104.