

Chapitre 2

Adhésion cellulaire

De grands progrès ont été réalisés depuis une quinzaine d'années dans la compréhension des interactions moléculaires responsables de l'adhésion des cellules mammaliennes. Ces phénomènes régulent une bonne partie des processus physiologiques normaux comme la migration, la prolifération ainsi que la différenciation cellulaire, mais aussi certains phénomènes pathologiques telle la progression tumorale [1].

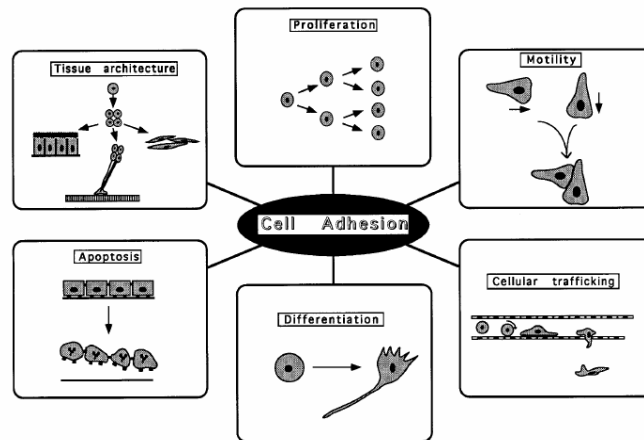


Figure 2.1 : Rôles de l'adhésion cellulaire [2].

Les interactions des cellules avec leur environnement sont d'une importance cruciale pour leur devenir et leur comportement. Divers mécanismes entrent en jeu suivant le partenaire avec lequel la cellule interagit : une autre cellule ou la matrice extracellulaire. Cette matrice est formée de collagène, de protéoglycans, d'élastine, d'acide hyaluronique, de kératine et de diverses glycoprotéines qui vont interagir avec les cellules de manière spécifique.

Sur base de critères structurels et fonctionnels, les recherches ont abouti à la mise en évidence de diverses classes de protéines responsables de ces phénomènes d'adhésion : parmi elles, citons la superfamille des immunoglobulines, les sélectines, les cadhérines, ainsi que les intégrines qui nous intéressent plus particulièrement.

A. Les molécules d'adhésion

Ces macromolécules sont des glycoprotéines exprimées à la surface des cellules où elles interviennent dans le contact intercellulaire et dans les interactions entre la cellule et la matrice extracellulaire [3], par des interactions homophiliques (comme la formation de culot plaquettaire) ou hétérotypiques (comme l'adhésion de leucocytes aux vaisseaux sanguins).

Leur caractéristique essentielle est la capacité de transmettre, à partir du milieu extracellulaire, des informations et des signaux qui peuvent engendrer, via une cascade de réponses intracellulaires, une modification dans le comportement et le métabolisme de la cellule toute entière. Cette transmission de signaux passe par la reconnaissance de régions particulières des ligands qui se trouvent dans la matrice extracellulaire, tels la laminine, la fibronectine ou le collagène.

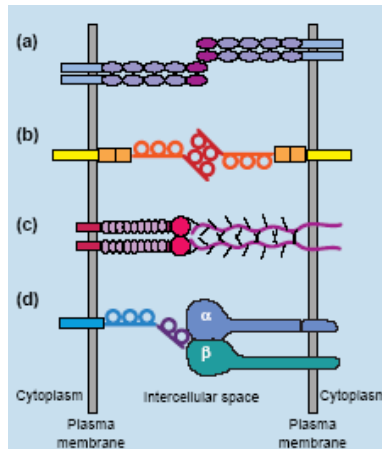


Figure 2.2 : Représentation schématisée des différentes classes de molécules d'adhésion [1] ; (a) les cadhérines, (b) la superfamille des immunoglobulines, (c) les sélectines et (d) les intégrines.

1. Les cadhérines

Les cadhérines se placent au premier plan dans les phénomènes d'adhésion cellulaire. C'est une famille de molécules d'adhésion "calcium dépendantes" qui intervient de manière cruciale dans les jonctions cellulaires de type homophiliques. On peut distinguer notamment :

- la E-Cadherine (épithélium)
- la N-Cadherine (système nerveux, cristallin)
- la P-Cadherine (placenta)

- la V-cadhérine (vasculaire)

On dénombre actuellement une vingtaine de récepteurs différents chez les vertébrés ayant une partie cytoplasmique commune, reliée aux filaments d'actine du cytosquelette. A l'instar des autres récepteurs d'adhésion, le phénomène de regroupement ou "*clustering*" est de première importance à leur activité.

Bien qu'on pensait il y a quelques années encore que les cadhérines n'adhéraient que de manière homotypique, il est apparu que certaines d'entre elles pouvaient également interagir avec d'autres types de protéines, rajoutant ainsi un nouveau niveau de complexité [3].

2. La superfamille des immunoglobulines

Ces protéines membranaires existent dans une large gamme de diversité structurelle et fonctionnelle. Elles sont impliquées dans la reconnaissance des antigènes ainsi que dans le phénomène d'adhésion cellulaire. Suivant leur localisation, on les appelle L-CAM (*liver*) pour les cellules hépatiques, N-CAM pour les cellules neuronales, I-CAM (*Intercellular Adhesion Molecule*) pour les cellules du système immunitaire, MAdCAM (*Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule*) pour les cellules des veinules mucoales, EpCAM-1 pour les cellules épithéliales et V-CAM pour les cellules vasculaires. C'est une famille très diversifiée qui englobe, chez les vertébrés, une centaine de membres recensés.

Elles sont impliquées dans des interactions homotypiques, ou hétérotypiques avec d'autres molécules d'adhésion comme les intégrines, mais également avec des protéines de la matrice extracellulaire. Leur rôle est critique dans le développement du système nerveux, les réponses immunitaires et inflammatoires, ainsi que dans l'embryogenèse.

3. Les sélectines

Dernières dans l'ordre chronologique des découvertes des molécules d'adhésion cellulaire, les sélectines ne sont exprimées que dans l'endothélium et les cellules sanguines des vertébrés [4, 5]. Elles sont responsables du recrutement de leucocytes et de l'agrégation entre leucocytes et plaquettes. Elles comportent trois polypeptides fortement homologues :

- la sélectine E (CD62E ou ELAM-1 pour *Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1*), de 95 à 115 kD selon son degré de glycosylation, est exprimée par les cellules endothéliales stimulées par les cytokines ;

- la sélectine P (CD62P, GMP-140, PADGEM), de 140 kD, est exprimée dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales et dans les granules des plaquettes. Leur mobilisation en surface se fait en l'espace de quelques minutes après stimulation par la thrombine, l'histamine ou certaines cytokines ;
- la sélectine L (CD62L, LECAM-1, LAM-1, gp90^{MEL-14}) est exprimée chez les leucocytes. Sa taille varie de 74 kD (chez les lymphocytes) à 90-100 kD (chez les neutrophiles).

Elles interviennent dans des interactions hétérophiles dépendantes des cations divalents, et plus particulièrement du Ca⁺⁺. Elles interviennent dans le processus d'adhésion cellulaire via la reconnaissance et l'interaction de leur domaine extracellulaire de type lectine avec des ligands de type carbohydrate exprimés à la surface des cellules.

Les sélectines sont impliquées dans des phénomènes tels que l'adhérence lâche des leucocytes aux endothéliums veineux, leur déplacement sur la paroi des vaisseaux avant leur adhérence forte, leur diapédèse jusqu'au site d'inflammation, ainsi que l'adhérence des monocytes et des neutrophiles aux plaquettes activées.

4. Les intégrines

Les intégrines sont une classe de molécules d'adhésion cellulaire massivement exprimées. Elles sont impliquées dans les phénomènes d'adhésion cellulaire homotypiques et hétérotypiques ainsi que dans l'adhésion des cellules avec la matrice extracellulaire. Nous les détaillons dans le point suivant.

D'autres molécules d'adhésion cellulaire récemment identifiées ne tombent dans aucune de ces quatre classifications. Citons notamment CD44, la protéine d'adhésion vasculaire 1, CD34 ou encore la GlyCAM-1. Toutes ces molécules sont impliquées dans le recrutement de lymphocytes, dans les interactions intercellulaires ou l'activation cellulaire.

De nombreux états pathologiques ont pu être associés au dysfonctionnement ou à la surexpression de certaines de ces molécules d'adhésion cellulaire (ou MAC) [6]. Un intérêt grandissant du domaine pharmaceutique pour ces dernières a donc été remarqué ces dernières années.

Tableau 2.1 : Implication des molécules d'adhésion cellulaire dans diverses applications thérapeutiques envisageables.

Cibles thérapeutiques	Maladies	MAC impliquées
Cardiovasculaire	Thromboembolismes restenoses athéroscléroses hémostases	$\alpha_{IIb}\beta_3$ $\alpha_v\beta_3$, sélectines β_1 , β_2 , VCAM-1
Inflammatoire	Arthrites rhumatoïdes, osteoarthrites	β_1 , β_2 , sélectines, ICAM-1
Cancer	Métastases	$\alpha_v\beta_3$, β_1 , β_4 , β_5
Oculaire	Rétinopathie diabétique, dégénération maculaire	$\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_5$
Respiratoire	Asthme, allergies, bronchoconstriction	$\alpha_4\beta_1$, VCAM-1
Os	Ostéoporose	$\alpha_v\beta_3$, β_1 , β_5
Foie	Désordres rénaux	β_1
Nerveux	Scléroses multiples, désordres neurologiques	$\alpha_4\beta_1$, VCAM-1, ICAM-1
Digestif	Maladie de Crohn, ulcères et colites	β_1 , β_4 , β_6 , β_7

B. Les intégrines

Elles constituent une classe de récepteurs glycoprotéiniques transmembranaires qui jouent un rôle très important dans les interactions d'adhésion cellulaires [7] (cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire). Ces phénomènes régulent une bonne partie des fonctions cellulaires comme la migration, la prolifération ainsi que la différenciation des cellules [8-13].

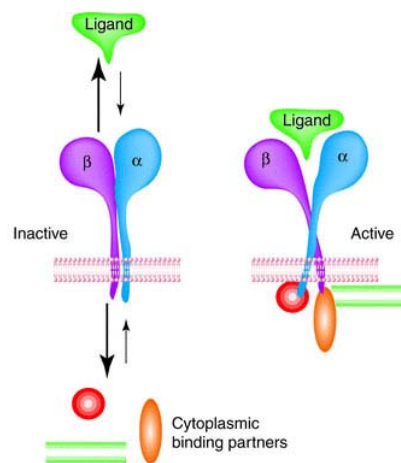


Figure 2.3 : Structure schématique d'une intégrine et de l'interaction avec son ligand [14].

Elles doivent leur nom à l'équipe de Hynes qui les a pour la première fois isolées, séquencées et caractérisées en 1986 [15]. Ils proposèrent cette dénomination pour souligner leurs rôles en tant que complexe membranaire intégral induit dans l'association transmembranaire entre la matrice extracellulaire d'une part et le cytosquelette d'autre part. On retrouve des intégrines chez tous les métazoaires, même les plus simples.

Elles sont formées de deux sous-unités α et β , liées de manière non covalente, qui jouent un rôle particulier lors des interactions ligands-récepteurs (cf. figure 2.3). Chacune de ces sous-unités consiste en de grandes régions extracellulaires, domaine de liaison au ligand, ainsi que de courtes régions transmembranaires reliées à une partie cytoplasmique de longueur variable.

La chaîne α (de 120 à 180 kDa) contient des acides aminés ayant des liaisons divalentes avec des ions, comme Mn^{++} ou Mg^{++} (effet promoteur du *binding*, MIDAS pour *Metal Ion-Dependent Adhesion Site*) et Ca^{++} (effet inverse) et régule la spécificité des interactions avec les ligands [16, 17] ; la chaîne β (de 90 à 110 kDa) contient quant à elle des régions riches en cystéine (ponts disulfures) et est responsable des phénomènes d'adhésion [18, 19].

Les ligands naturels des intégrines sont soit des protéines de la matrice extracellulaire (tels le collagène, la fibronectine, la vitronectine) ou des protéines sanguines (telle le fibrinogène) soit des immunoglobulines [20]. Ces interactions intégrines-ligands ne peuvent avoir lieu qu'en présence de cations bivalents.

Actuellement, on dénombre 18 sous-unités α et 8 sous-unités β . Malgré le grand nombre de combinaisons possibles, seules 24 intégrines ont été découvertes à ce jour. Elles sont caractérisées par de grandes variations dans leur fonction biologique ainsi que par leur spécificité de ligands.

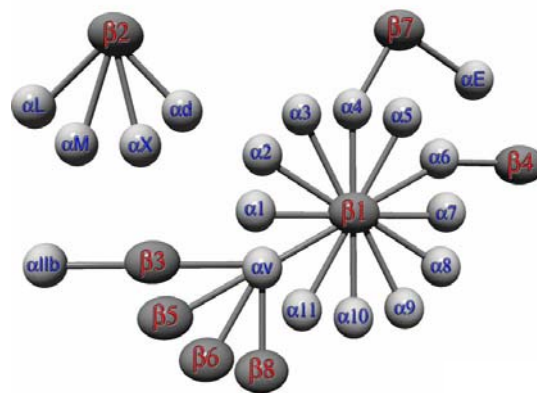


Figure 2.4 : Représentation schématique des familles d'intégrines.

Les interactions de type adhésives des intégrines incluent une série d'événements complexes et variés : l'activation, la reconnaissance du ligand, la réorganisation du cytosquelette et, finalement, l'adhésion [21]. Les intégrines jouent donc un rôle primordial dans la communication intercellulaire et la transduction de signaux biologiques [11, 13]. Elles interviennent dans la progression du cycle cellulaire, l'expression de gènes tout en ayant également un effet dans l'adhésion et la morphologie cellulaire.

Il est apparu que la connection des intégrines au cytosquelette change la conformation des récepteurs, et augmente leur affinité pour des ligands de la matrice extracellulaire. Ce phénomène, qui s'étale sur un laps de temps inférieur à la seconde, est connu sous le nom de "*inside-out signalling*" ou activation [19, 22, 23]. Il est la base même de la régulation dynamique des propriétés adhésives des intégrines.

D'autre part, l'"*outside-in signalling*" consiste en la réponse intracellulaire qui découle de la reconnaissance extracellulaire du récepteur et de son ligand et du regroupement d'intégrines à la surface de la cellule [13]. De nombreux efforts ont été menés pour élucider les mécanismes moléculaires qui se cachent sous ces phénomènes, et beaucoup de choses sont encore à découvrir dans ce domaine.

Néanmoins, de nombreux partenaires cytoplasmiques participant à la réorganisation du cytosquelette, aux multiples jeux de phosphorylation et de rétrocontrôles complexes menant finalement à la régulation de l'expression de gènes ont pu être étudiés [24]. De nombreuses revues ont fait l'objet de ces phénomènes complexes [25-33]. Les intégrines sont également fréquemment associées à d'autres protéines transmembranaires, comme les tetraspanines, ce qui contribue à la diversité des réponses cellulaires qui découlent de leurs activités [34, 35].

Une modulation de leur activité peut notamment s'opérer par deux mécanismes distincts : le changement de conformation [36] ainsi que l'agrégation de plusieurs intégrines ou "*clustering*" [13, 19, 37-41], une combinaison de ces deux événements étant également possible. Une autre découverte intéressante fut celle de l'existence d'une communication entre intégrines : l'interaction d'une intégrine et de son ligand entraîne une augmentation rapide de l'expression d'intégrines du même type ou même différent [26, 42]. Il faut également savoir que les intégrines existent sous une multitude de conformations possibles, étant à l'origine de la régulation fine de leur activité [43].

L'importance des contacts intégrines-matrice extracellulaire peut également être illustrée par l'apoptose ou "*anoikis*" chez certaines lignées cellulaires chez qui ce contact vient à faire défaut [44].

C.Ligands d'intégrines : naturels et synthétiques

Les ligands naturels des intégrines (repris dans le tableau 2.2) sont des protéines de la matrice extracellulaire ou des membres de la superfamille des immunoglobulines exprimées à la surface d'autres cellules.

La majorité des intégrines reconnaissent plusieurs ligands bien que certaines d'entre elles ne reconnaissent qu'un seul ligand spécifique. Chaque intégrine a une fonction biologique spécifique, de sorte que les intégrines qui reconnaissent un seul et même ligand n'induisent pas nécessairement la même réponse intracellulaire [3, 45, 46].

Un des points communs entre beaucoup d'intégrines est la reconnaissance d'un motif peptidique court centré sur un résidu acide (aspartate ou glutamate) bien spécifique [47] : la séquence Arginine-Glycine-Acide Aspartique (RGD), également connue sous le nom de séquence universelle d'adhésion [48, 49] ainsi que la séquence Leucine-Acide aspartique-Valine (LDV) [50, 51]. Ces tripeptides se retrouvent largement dans les protéines de la matrice extracellulaire, et notamment chez la fibronectine, le fibrinogène, la vitronectine, la laminine, le collagène, la thrombospondine, l'ostéopontine et le facteur de von Willebrand [52, 53]. Il est apparu que l'environnement immédiat et la structure tertiaire de ces séquences actives régissent de manière significative la spécificité de l'interaction ligand-récepteur.

Tableau 2.2 : Ligands naturels des intégrines [3].

beta1	alpha1	Collagène, Laminine
	alpha2	Collagène, Laminine
	alpha3	Laminine, Fibronectine, Thrombospondine
	alpha4	Fibronectine, VCAM
	alpha5	Fibronectine
	alpha6	Laminine
	alpha7	Laminine
	alpha8	Fibronectine, Tenascine
	alpha9	Tenascine
	alpha10	Collagène
	alpha11	Collagène
	alphaV	Fibronectine, Vitronectine
beta2	alphaL	ICAMs
	alphaM	Fibrinogène, ICAMs, iC3b
	alphaX	Fibrinogène, Collagène, iC3B
	alphaD	VCAM, ICAMs
beta3	alphaIIb	Collagène, Fibronectine, Vitronectine,

		Fibrinogène, facteur de Von willebrand, Thrombospondine
	alphaV	Fibronectine, Vitronectine, Fibrinogène, facteur de Von willebrand, Thrombospondine
beta4	alpha6	Laminine
beta5	alphaV	Vitronectine
beta6	alphaV	Fibronectine, Tenascin
beta7	alpha4	Fibronectine, VCAM, MAdCAM
	alphaE	E-cadherine
beta8	alphaV	Collagène, Laminine, Fibronectine

La recherche de ligands synthétiques des intégrines est devenue un axe d'intérêt majeur en chimie médicinale [6, 52, 54]. En effet, l'utilisation d'anticorps spécifiques a démontré avec succès l'implication directe des intégrines dans une série de pathologies chroniques [55]. Malgré ces résultats positifs, il s'avère que l'utilisation d'anticorps en tant que médicaments est sujet à certaines limitations thérapeutiques [56]¹.

La recherche d'antagonistes des intégrines est actuellement en pleine expansion. La figure 2.5 reprend le nombre d'articles publiés ces dernières années dans le domaine. Un grand nombre de molécules ont été synthétisées et testées, principalement dans le cadre de la recherche d'agents antithrombotiques, anticancéreux et anti-inflammatoires.

¹ L'utilisation des anticorps en tant que médicaments implique qu'ils soient de nature chimérique et humanisée afin de réduire l'ampleur des effets secondaires (immunogénicité). En effet, la plupart des anticorps sont en général produits chez le rat, le lapin ou la souris et doivent donc être rendus permissifs à l'homme.

Les essais cliniques reposant sur l'administration d'anticorps murins n'ont pas permis de vérifier leur activité puisqu'ils n'agissent probablement que partiellement sur des protéines ou des récepteurs humains, d'où l'intérêt des travaux ayant permis de fabriquer des anticorps plus proches sur le plan structural des anticorps humains. Les anticorps monoclonaux sont de larges protéines, et de ce fait, ont une cinétique de distribution plus lente que des petites molécules, ce qui limite les propriétés de pénétration dans les tissus. Par ailleurs l'efficacité de ces anticorps monoclonaux peut également être entravée par le développement d'anticorps produits par le receveur et dirigés contre l'anticorps monoclonal (HAMA : anticorps humains antimurins). Leur apparition provoque une diminution de la concentration du médicament et de ce fait, altère l'efficacité du traitement. Etant donné qu'ils persistent dans le sang plusieurs mois après l'administration, cela a pour conséquence une survenue plus rapide d'effets indésirables, lors de la réintroduction de l'anticorps murin en thérapie.

Le développement des techniques de génie génétique est à l'origine de l'expansion des thérapies par utilisation d'anticorps monoclonaux. Elles permettent de transformer un anticorps monoclonal murin en un anticorps chimérique humain/ murin ou de produire des anticorps humanisés. Il est ainsi possible d'en limiter l'immunogénicité et d'améliorer leur propriété cinétique.

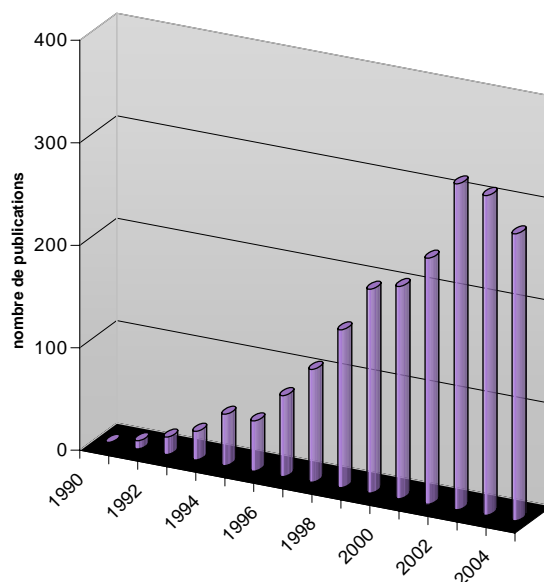


Figure 2.5 : Evolution du nombre de publications reprenant le mot-clé “*integrin antagonist*” de 1990 à 2004.

Idéalement, la première étape dans la conception de tels inhibiteurs consiste en la résolution tridimensionnelle du complexe récepteur-ligand. Malheureusement, seules quelques structures ont pu être co-cristallisées [36, 57-60], et la recherche de nouveaux ligands débute généralement avec l’identification des domaines d’interaction du récepteur avec son ligand [61].

La découverte d’un nombre croissant de peptides à activité biologique intéressante a mené à la recherche des pharmacophores correspondants, qui sont actuellement utilisés en chimie médicinale dans le développement de nouveaux médicaments.

Les inhibiteurs peptidiques d’intégrines influencent la communication intercellulaire et contrôlent une série de fonctions essentielles telles le métabolisme, la défense immunitaire, la digestion, la respiration, la division, ainsi que le comportement cellulaire. Les applications potentielles de tels médicaments sont donc évidentes, l’obstacle majeur en étant le métabolisme trop rapide par protéolyse et les interactions avec de multiples récepteurs différents. Ces inconvénients limitent leur utilisation en tant que médicaments.

Dès lors, la recherche de peptidomimétiques ou de molécules ayant une activité inhibitrice sélective vis-à-vis de ces intégrines s’avère donc être une stratégie thérapeutique très intéressante. Les peptidomimétiques sont des composés qui miment la structure et par conséquent la fonction des peptides bioactifs. Ils présentent de nombreux avantages face à leurs peptides parents qui sont caractérisés par une faible absorption au niveau des membranes intestinales, une digestion

rapide par les enzymes protéolytiques, ainsi que par une destruction potentielle par le système immunitaire.

La recherche de peptidomimétiques à haute biodisponibilité mais moins vite catabolisés évite donc toutes ces complications. Les avantages qu'ils présentent sont indéniables : une stabilité *in vivo* et une affinité accrues, une meilleure absorption par voie orale, une distribution facilitée, ainsi qu'une sélectivité affinée. Par conséquent, l'intérêt pour les peptidomimétiques n'a fait que croître ces dernières années.

La conception de médicaments peptidomimétiques requiert l'utilisation et la combinaison de diverses techniques. Le développement de nouvelles molécules prometteuses passe par la connaissance de la conformation bioactive du peptide originel, la position spatiale des groupes fonctionnels indispensables à la reconnaissance, ainsi que des informations stériques et des propriétés électroniques des deux intervenants : le récepteur cible et le peptide. Cette étape est cruciale, vu que les peptides natifs, bien que flexibles, n'adoptent qu'une seule conformation au site actif du récepteur. La perte de degré de liberté de rotation devrait donc accroître de manière significative l'activité du peptidomimétique face à celle du peptide.

Une des stratégies utilisées est la synthèse de peptides hybrides résultant de l'optimisation du peptide natif par le remplacement de certaines fonctionnalités par des blocs de construction bioisostères. L'utilisation d'unités de conformation contrainte fournit des renseignements pertinents quant à la conformation bioactive du peptide. L'étude structure-activité (SAR) effectuée sur ces molécules mène à la détermination d'un pharmacophore modèle qui sert alors de point de départ pour le design de nouveaux peptidomimétiques.

Une autre stratégie passe par la synthèse et par l'étude systématique d'une série de peptides cycliques. La contrainte imposée par la tension de cycle induit une conformation particulière aux molécules. La recherche du peptide contraint le plus actif mène à la détermination de la conformation bioactive. Elle sert alors de guide au design de peptidomimétiques présentant les résidus pharmacophores dans la disposition spatiale adéquate. L'étude structure-activité opérée sur ces molécules mène enfin aux dérivés les plus actifs.

Un grand nombre de peptides et de peptidomimétiques RGD ont été synthétisés et testés quant à leur activité antagoniste et sélective vis-à-vis des intégrines [62] :

- $\alpha_{IIb}\beta_3$ (dans le cadre de la recherche d'agents anti-thrombotiques), intégrines des plaquettes sanguines [63] ;
- $\alpha_V\beta_3$ (agents anticancéreux via inhibition de l'angiogénèse), intégrines des cellules endothéliales [64-68].

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéressons plus particulièrement aux intégrines exprimées chez les leucocytes. La recherche de dérivés anti-inflammatoires menée actuellement en chimie médicinale nous offre l'opportunité d'accéder au design de ligands de ces intégrines. En effet, l'industrie pharmaceutique s'est penchée sur les intégrines de leucocytes comme nouvelle voie d'accès aux anti-inflammatoires et au traitement d'une série de pathologies [69, 70] telles le thromboembolisme, la réstenose coronaire, les artérioscléroses, hémostases, arthrites rhumatoïdes, ostеоarthrites, cancer, asthme, allergies, broncho-constriction, ostéoporose, maladies auto-immunes, scléroses, maladie de Crohn, psoriasis, ulcères, colites...

Les premiers résultats de ces travaux concernent les ligands des intégrines $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_4\beta_7$, obtenus en partant de la séquence active LDV (Leucine-Acide aspartique-Valine), découverte en 1991 [71]. Nous les passerons en revue dans le point suivant.

D.L'adhésion de leucocytes

D'énormes avancées ont été réalisées dans le domaine de l'adhésion leucocytaire. Plusieurs raisons ont motivé ces recherches. Les leucocytes ont été pendant longtemps intensivement étudiés par les immunologistes, qui ont pu dès lors accumuler de nombreuses données sur la nature des antigènes qu'ils présentent, leurs fonctions, les maladies qui découlent de leur dysfonctionnement, sans réellement comprendre les mécanismes qui entraînent en jeu à l'échelle moléculaire.

Le développement des anticorps monoclonaux, qui ont permis l'identification et l'isolement des molécules présentes à la surface des cellules, et les avancées dans les techniques de clonage et d'expression de gène, ont vu l'élargissement et l'ouverture du champ de cette recherche à la biologie moléculaire. Ce changement est à la base du progrès et de la compréhension accrue et rapide des phénomènes liés à l'adhésion leucocytaire [72].

Il est clairement apparu que l'adhésion des leucocytes est d'une importance physiologique critique et d'une complexité extrême [73]. Elle est finement régulée et le moindre écart à cet équilibre peut avoir de multiples retombées aboutissant à une grande diversité d'états pathologiques graves. Par exemple, l'adhésion des leucocytes dans les régions endommagées des vaisseaux est considérée comme un élément clé dans la pathogenèse de l'athérosclérose et des thromboses. C'est la raison pour laquelle de nombreux laboratoires ont trouvé un grand intérêt à la recherche de moyens de modulation de l'adhésion leucocytaire.

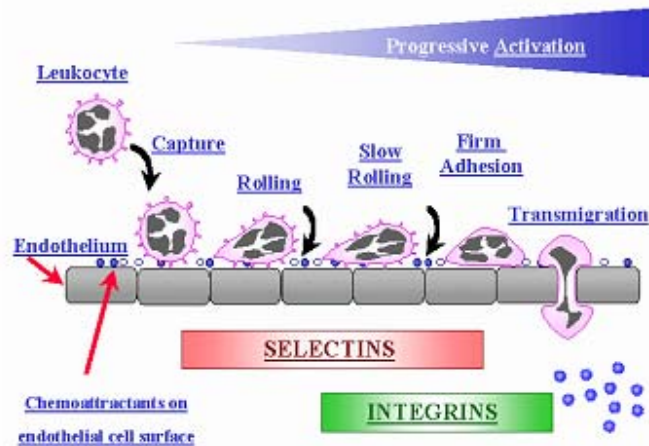


Figure 2.6 : Intervention des sélectines et des intégrines dans le recrutement de leucocytes de la circulation sanguine.

Tout comme l'adhésion cellulaire que nous avons détaillée dans les pages précédentes, l'adhésion des leucocytes à l'endothélium fait participer différents intervenants à divers niveaux, et notamment ; les sélectines, les intégrines et les immunoglobulines. Les sélectines interviennent au niveau du premier contact de faible force, les intégrines et les immunoglobulines prennent quant à elles le relais lors de l'adhésion ferme [74].

La propriété des leucocytes à adhérer à différents substrats et/ou cellules est cruciale pour leur fonction de défense. Pendant la réaction inflammatoire, les leucocytes se lient aux cellules endothéliales et migrent jusqu'au site de l'inflammation. Prenons le cas du recrutement des neutrophiles de la circulation sanguine vers les sites d'inflammation (*cf.* figure 2.6).

Les cellules ralentissent en se liant faiblement à des protéines des cellules endothéliales, les sélectines [75, 76]. Elles sont les premières molécules engagées dans la réponse inflammatoire et permettent l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales malgré le courant de la circulation sanguine, en servant de "frein" à la progression des cellules circulantes par le biais de forces relativement faibles. Après la capture vient le "*rolling*", étapes transitoires indispensables à la mise en place d'une adhésion forte assurée par l'interaction entre intégrines et immunoglobulines, qui sera suivie d'une transmigration ou diapédèse vers le site d'inflammation [74].

Passons en revue de manière plus précise les différents types d'intégrines qui ont retenu notre attention tout au long de ce travail ; plus précisément les intégrines exprimées chez les leucocytes [77]. Il s'agit de la famille des β_2 , de l' $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_4\beta_7$.

E. Les intégrines de leucocytes

Intégrines α_4

- L'intégrine $\alpha_4\beta_1$ (CD49D/CD29 ou VLA-4 pour *Very Late Antigen*)

Membre important de la famille la plus représentée de toutes les intégrines : les β_1 . Ces hétérodimères sont constitués d'une chaîne α de 150 kDa et d'une chaîne β commune de 130 kDa, et se lient aux protéines de la matrice extracellulaire telles la vitronectine, la laminine, la fibronectine et le collagène. Leur activation induit un phénomène d'adhésion cellulaire accéléré [78].

L'intégrine $\alpha_4\beta_1$ qui nous intéresse tout particulièrement dans le cadre de ce travail est impliquée dans l'adhésion des lymphocytes [79], des monocytes, des éosinophiles [80], des basophiles et des macrophages. Les neutrophiles peuvent également exprimer cette intégrine à faible niveau et sous certains stimuli exclusivement [81, 82]. Ses ligands naturels incluent VCAM-1, la fibronectine et la thrombospondine.

Leur implication dans le phénomène du recrutement leucocytaire est très importante. A titre d'exemple, Chen *et al.* ont pu démontrer la présence de pas moins de quatre-vingt mille copies de cette intégrine dans une lignée de lymphocytes T [83].

La séquence active reconnue par cette intégrine a été découverte en 1991 par l'équipe du professeur M. J. Humphries en testant l'activité d'oligopeptides de plus en plus courts : la séquence minimale étant le tripeptide LDV, de la région CS-1 de la fibronectine [51]. Ils ont également souligné l'importance de cette séquence, de par sa conservation dans les fibronectines humaine et chez plusieurs espèces animales.

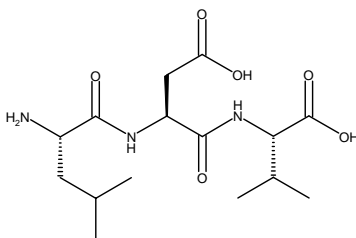


Figure 2.7 : La séquence active LDV (Leucine-Acide Aspartique-Valine).

Cette découverte marqua le point de départ à la recherche d'antagonistes de l'intégrines $\alpha_4\beta_1$. En effet, cette nouvelle cible visée par les chercheurs en chimie médicinale ouvrait la voie à une approche nouvelle dans la conception de dérivés anti-inflammatoires [84, 85].

- L'intégrine $\alpha_4\beta_7$

Cette intégrine est exprimée chez tous les leucocytes, à l'exception des neutrophiles. Ses ligands naturels sont MAdCAM [86] et la fibronectine, ainsi que VCAM-1 à plus faible affinité. Ces interactions jouent un rôle prépondérant dans le recrutement, l'activation et l'apoptose des leucocytes [87].

La séquence active reconnue par cette intégrine est le tripeptide LDT, extrêmement proche du LDV : ces deux tripeptides ne diffèrent que par le remplacement d'un méthyle par un groupement hydroxyle.

La recherche d'antagonistes d' $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_4\beta_7$: revue de la littérature

Cette recherche découle directement des études sur l'efficacité des anticorps monoclonaux de la chaîne α_4 dans le traitement de diverses maladies inflammatoires, comme la sclérose en plaques [88, 89].

En effet, l'efficacité *in vitro* et *in vivo* d'anticorps monoclonaux anti- $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_4\beta_7$ ont démontré avec succès l'importance de leur intervention. Les antagonistes de ces intégrines sont donc devenus une nouvelle cible intéressante en chimie médicinale [90].

Suite à la découverte par Komoryia *et al.* en 1991 de la séquence active LDV [51], de nombreux laboratoires se sont lancés dans la recherche d'inhibiteurs sélectifs visant l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ [91, 92]. Nous n'envisagerons qu'une partie des travaux effectués dans le domaine ces dernières années pour n'en garder que les points les plus importants.

Diverses approches ont été envisagées par les différents protagonistes : la cyclisation du tripeptide via des ponts disulfures [93], l'utilisation de "scaffolds" rigides [94], la mise en œuvre de "templates" particuliers [95-106], ainsi que le *screening* de bibliothèques combinatoires [107] ou *in silico* [108].

Il est apparu que le tripeptide LDV n'était pas un inhibiteur très efficace en lui-même, avec un IC_{50} supérieur au millimolaire. Néanmoins, une amélioration nette de ses capacités antagonistes a été observée en y ajoutant un groupement à ses extrémités N- et/ou C- terminales ou en le cyclisant à l'aide de ponts disulfures [92]. Ces résultats encourageants ont poussé les chercheurs à s'investir dans le développement de dérivés atteignant des affinités pour VLA-4 jusqu'à 10^6 fois supérieures à celle du tripeptide originel.

Les peptides cycliques :

Sur base de l'expérience accumulée notamment dans la recherche d'antagonistes des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et le peptide RGD, de nombreux chercheurs se reposèrent sur le fait bien établi qu'une contrainte appliquée à un peptide linéaire peut augmenter de manière significative l'affinité qu'il présente pour son récepteur. De nombreux dérivés cycliques de complexité croissante ont été synthétisés dans ce but. Les premiers essais ont été opérés avec des peptides cycliques de type RGD qui inhibaient faiblement l'adhésion à la fibronectine [109].

Dès 1990, la firme Tanabe breveta de nombreux composés peptidiques cycliques de type LDV contenant des lactames et des ponts éthers ou disulfures [110]. Divers laboratoires ont aussi publié d'autres analogues cycliques simples [93, 111]. En voici quelques exemples notables :

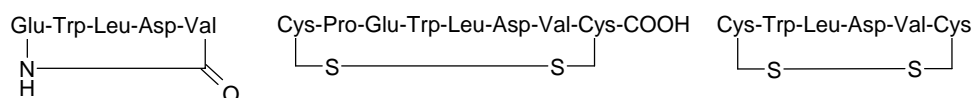


Figure 2.8 : Composés LDV cycliques. IC_{50} respectifs de 10 μ M, de 3 μ M et de 0,05 μ M.

Hoffman-La Roche développa aussi de bons inhibiteurs de structures quelque peu plus complexes [112-115], dont quelques-uns en collaboration avec Genentech [116].

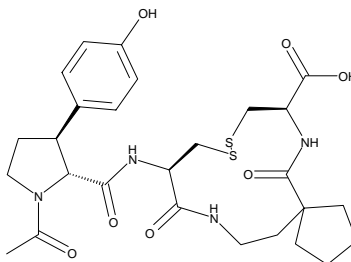


Figure 2.9 : Peptide cyclique modèle de Hoffman-La Roche, $IC_{50} = 0,1$ nM.

Récemment, une première étude de dérivés cycliques du LDT a été publiée dans le cadre de la recherche d'inhibiteurs d' $\alpha_4\beta_7$ [117]. Il faudra encore sûrement attendre quelques années avant de voir apparaître les premiers développements découlant de cette recherche.

Les peptides LDV linéaires modifiés :

Le greffage de substituants plus ou moins volumineux sur les parties N- et C-terminales du tripeptide LDV ont permis le développement de nouveaux dérivés

atteignant des affinités jusqu'à trois mille fois plus importantes que le tripeptide initial.

La firme Biogen s'est énormément illustrée dans ce domaine. Partant du tripeptide, et en faisant varier systématiquement les groupements couplés en position N-terminale, les chercheurs ont pu mettre en évidence une amélioration nette de l'affinité suite à l'incorporation d'un motif diarylurée méthylé.

Le dérivé BIO-1211 repris ci-dessous s'est avéré être un million de fois plus actif que le tripeptide de départ [71]. Cette affinité remarquable vis-à-vis de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ s'accompagne d'une sélectivité appréciable puisque l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ y est aussi sensible, mais à un facteur 1000 près.

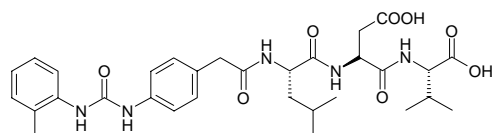


Figure 2.10 : Ajout du motif diarylurée au tripeptide LDV. $IC_{50} = 0,6$ nM.

Ces dérivés ont été testés dans divers modèles inflammatoires avec succès [108]. Une fois de plus, la limitation évidente de ces dérivés réside dans leur nature peptidique. Des études plus approfondies quant à la nature du substituant greffé à la partie C-terminale de ce même dérivé ont pu mettre en évidence un faible impact sur l'affinité des produits obtenus.

Novartis, Aventis et Pfizer ont également travaillé dans ce domaine avec la mise au point de composés linéaires dérivés de BIO-1211 atteignant de bonnes affinités pour VLA-4 [118-120]. Suite à ces résultats encourageants, divers peptides, peptidomimétiques et molécules inhibitrices de ces intégrines ont été synthétisés et testés en vue de leur application potentielle dans le traitement d'une série de maladies inflammatoires chroniques [121] comme l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les scléroses multiples...

Les peptidomimétiques :

Comme nous l'avons souligné dans le point C du présent chapitre, la présence de liens peptidiques pose de gros problèmes lors de l'administration des molécules en tant que médicament, et particulièrement par voie orale. De nombreux efforts ont été menés dans le but de transférer l'affinité des peptides actifs à de nouveaux dérivés peptidomimétiques, ayant par ailleurs de bonnes propriétés pharmacocinétiques dans l'espoir de trouver de nouveaux candidats médicaments.

Hoffman-La Roche s'est lancé dans cette recherche en partant d'un *template* de type N-acyl phénylalanine, suite au *screening* de leur base de données [96]. Dès 2000, ils mettent au point de nombreux inhibiteurs et s'orientent par essai-erreur sur la structure N-benzylpyroglutamyl-L-phenylalanine [95, 122].

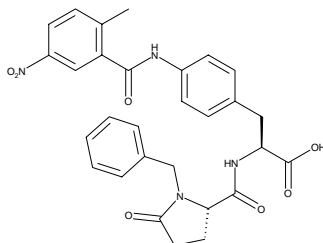


Figure 2.11 : Dérivé de la famille de la N-benzylpyroglutamyl-L-phenylalanine, $IC_{50} = 0,26$ nM.

Les composés de cette famille se sont révélés être trop vite métabolisés après administration (avec des temps de demi-vie de quelques minutes). Suite à un *screening* des banques de données dans le cadre du remplacement de la partie N-benzylpyroglutamyl et aux développements SAR, de nouveaux inhibiteurs ont pu être identifiés [98-100].

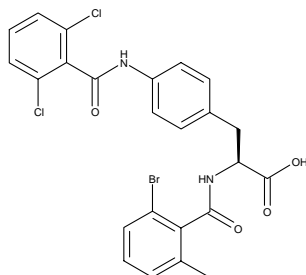


Figure 2.12 : Meilleur dérivé de la famille des N-aryl-4-[(2,6-dichlorophenyl)carbonyl]amino]-L-phenylalanine, $IC_{50} = 0,20$ nM.

Biogen a publié en 2002 les résultats d'une étude utilisant les techniques du *screening in silico* pour remplacer la partie peptidique de leur dérivé le plus actif décrit en 2001 [108]. Leur approche consiste en la détermination du pharmacophore tridimensionnel modèle, suivi du passage en revue de bases de données de produits pour en retirer les structures qui satisfont au maximum les contraintes spatiales et électroniques imposées par le modèle. Le *hit* ainsi obtenu présente un IC_{50} de 1,3 nM, malheureusement accompagné de caractéristiques pharmaco-cinétiques jugées insuffisantes.

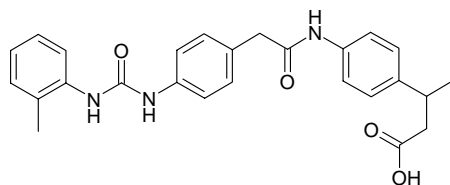


Figure 2.13 : Peptidomimétique de Biogen.

D'autres industries, comme Pfizer et Aventis, se sont également penchées sur l'obtention de dérivés de type diarylurée. Ils ont synthétisé et testé de nouvelles séries de produits, qui gardent comme point commun le motif diarylurée et une fonction acide carboxylique libre, mais sans apporter de quelconque amélioration.

Une autre voie intéressante d'obtention de peptidomimétiques de LDV fut mise en œuvre par l'équipe de Kessler via l'utilisation du β -D-mannose en tant que "répartiteur spatial" [94]. Ils obtinrent ainsi de nouveaux inhibiteurs sélectifs des $\alpha_4\beta_1$ qui satisfont les critères de Lipinski. A notre connaissance, ces recherches n'ont pas été poursuivies.

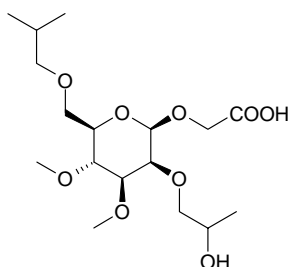


Figure 2.14 : Peptidomimétique de type mannose.

L'approche utilisée chez Merck consistait en la recherche de dérivés contenant une fonction acide carboxylique. Le *screening* de leur banque de donnée a fait ressortir trois dipeptides sulfonylés intéressants [123]. La recherche a continué, via l'utilisation intense de la chimie combinatoire² [107], pour arriver dans un premier temps à des dérivés du type 2(S)-méthyle-proline biphenylalanine, à faible biodisponibilité. Ils ont également démontré le pouvoir antagoniste des N-aryl 2, 6-diméthoxybiphenylalanines [124] ainsi que des N-isonicotinoyl-4-aminophénylalanines [125, 126].

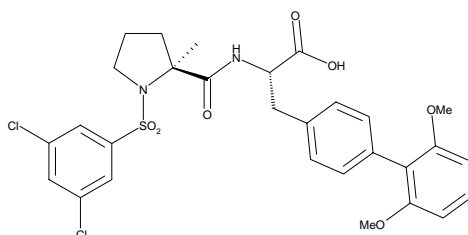


Figure 2.15 : Hit de Merck, $IC_{50} = 0,08$ nM.

² Chimie combinatoire : son principe est d'accroître les chances de trouver une molécule active en multipliant le nombre de molécule étudiées en synthétisant de très nombreuses molécules par combinaison. Il est désormais possible de synthétiser en une seule opération plusieurs centaines de molécules partant d'une structure de base déterminée *a priori* en mettant en présence les réactifs nécessaires. On obtient ainsi d'un seul coup plusieurs centaines de nouvelles molécules à partir d'une famille de composés de départ et d'un réactif unique. Toutes les opérations, synthèse, isolement et identification, sont miniaturisées et robotisées. On peut ainsi constituer une bibliothèque de plusieurs milliers de dérivés en quelques mois. Associé à un criblage biologique à haut débit, ce type de synthèse est utilisé en particulier pour la recherche de molécules pharmacologiquement actives.

Ils se sont ensuite tournés vers l'obtention d'inhibiteurs à double action vis-à-vis des intégrines $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_4\beta_7$ [127]. Ils développèrent des dérivés aux IC_{50} intéressants et tentèrent d'expliquer leurs résultats sur base d'un modèle d'interaction, qui leur servit de guide dans leurs recherches postérieures.

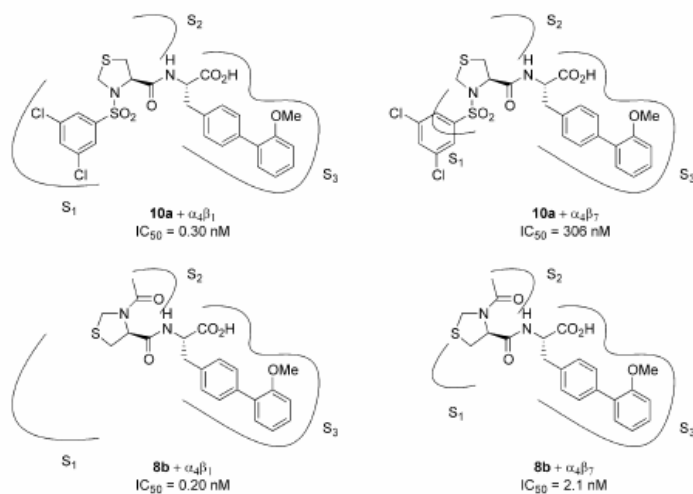


Figure 2.16 : Modèle d'interaction sur $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_4\beta_7$.

En effet, les affinités obtenues avec ces nouveaux dérivés sont très bonnes, mais leurs propriétés pharmacocinétiques sont décevantes, et elles sont accompagnées de faible biodisponibilité par voie orale. Néanmoins, nous pouvons citer quelques-uns de leurs dérivés ayant des IC_{50} remarquables, issus de leurs nombreuses publications [106, 124, 128-135] (cf. tableau 2.3).

Celltech a aussi débuté ses recherches avec des mimes de tetrapeptides cycliques. Les chercheurs ont remplacé le lien disulfure et pris la structure de la cystéine [101], de la tyrosine [136] et de la phénylalanine [102-104, 137] comme squelette de base (*template*) à leur dérivés. Notons la ressemblance nette de leurs dérivés avec ceux obtenus dans d'autres programmes de recherche par Merck ou Hoffman-La Roche.

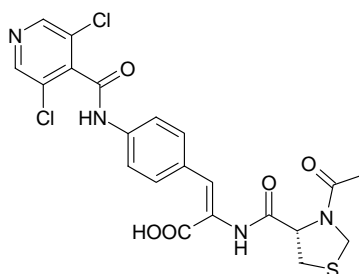
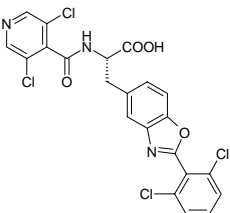
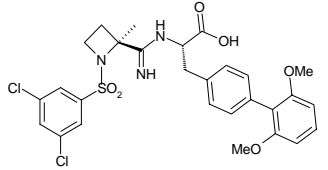
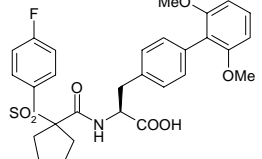
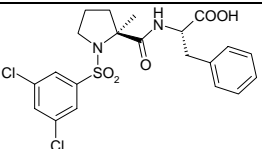
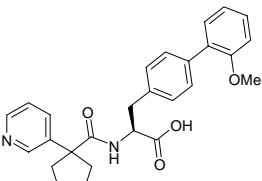


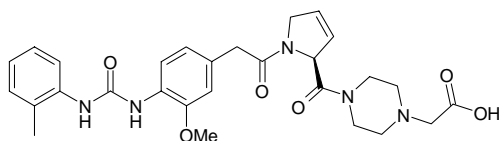
Figure 2.17 : Hit de Celltech, $IC_{50} = 0,5$ nM.

Tableau 2.3 : Activité de quelques têtes de série de Merck.

	IC ₅₀	
	$\alpha_4\beta_1$	$\alpha_4\beta_7$
	0,34 nM	4,2 nM
	0,05 nM	16 nM
	0,07 nM	5 nM
	1 nM	3546 nM
	0,5 nM	9,9 nM

D'autres groupes se sont essayés à la recherche d'antagonistes à double action sur $\alpha_4\beta_1$ et β_7 . Citons notamment les travaux de Genentech [138] et de Johnson & Johnson [139], dont les composés restent nettement moins affins mais néanmoins intéressants de par leurs cibles doubles.

Les dernières publications parues en 2005 reflètent l'état d'avancement de cette recherche d'antagonistes. Chiba *et al.* décrivent une nouvelle famille d'inhibiteurs de VLA-4 découlant directement de BIO-1211 [140].

Figure 2.18 : Daiichi Pharmaceuticals, IC₅₀= 1,4 nM.

D'autre part, des dérivés de type acide 2, 3-diphénylpropionique se sont également révélés être de bons inhibiteurs VLA-4 [141]. Une ressemblance est là aussi à souligner avec des inhibiteurs décrits dans ces dernières pages.

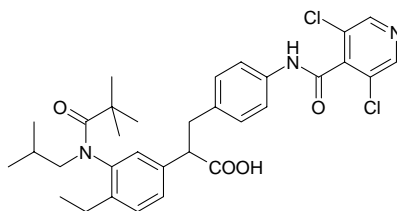


Figure 2.19 : Kaken Pharmaceuticals, $IC_{50} = 0,1$ nM.

Intégrines β_2

Ces intégrines caractéristiques des leucocytes sont constituées de quatre hétérodimères avec des chaînes α spécifiques (CD11a, b, c et d) et une chaîne β commune (CD18) [142, 143]. Largement distribuées dans le système immunitaire, elles participent activement à la réponse immunitaire en jouant un rôle essentiel dans les phénomènes d'adhésion et de recrutement des leucocytes lors des phénomènes d'inflammation [72, 144].

- CD11a/CD18 ($\alpha_L\beta_2$ ou LFA-1 pour *Lymphocyte Function-associated Antigen-1*) est la plus répandue des intégrines β_2 . Elle se retrouve exclusivement chez les lymphocytes. Cette intégrine se lie aux fonctions amines terminales des immunoglobulines ICAM-1, 2 et 3 [145, 146]. Cette interaction est impliquée dans de nombreuses maladies auto-immunes (psoriasis, asthme,...) [147].
- CD11b/CD18 ($\alpha_M\beta_2$ ou Mac-1 pour *Macrophage-1 Antigen*) est principalement exprimée chez les neutrophiles et les monocytes [148]. Elle se lie également à de nombreux ligands : on en dénombre aujourd'hui plus d'une trentaine [149]. Cette intégrine joue, avec le fibrinogène, un rôle prépondérant dans la réponse inflammatoire.
- CD11c/CD18 ($\alpha_X\beta_2$ ou p150,95) se retrouve en grand nombre chez les monocytes et les macrophages [150]. Ses ligands sont peu caractérisés. On sait néanmoins qu'elle se lie aussi au fibrinogène, ainsi qu'au collagène.
- CD11d/CD18 ($\alpha_D\beta_2$) a été récemment découverte [151]. Elle est exprimée à faible niveau sur les neutrophiles, monocytes, éosinophiles et lymphocytes.

Les intégrines β_2 jouent un rôle crucial dans les phénomènes d'adhésion cellulaire requise pour plusieurs fonctions leucocytaires. Le syndrome de déficience d'adhésion leucocytaire ou LAD (pour *Leukocyte Adhesion Deficiency*) est la preuve de l'importance de ces récepteurs [152-154]. Cette pathologie découle d'une déficience

dans l'adhésion de leucocytes aux tissus, due à une mutation sur CD18, menant entre autres à des infections bactériennes chroniques. On sait également que ces intégrines sont surexprimées chez les patients souffrant d'arthrite rhumatoïde, et de la maladie de Crohn [155].

De nombreuses industries pharmaceutiques se sont donc lancées dans des projets de recherche conséquents dans ce domaine [156]. Les premiers résultats concrets de ces investigations sont le développement de l'anticorps anti-CD11a hu1124 en phase clinique II pour le traitement du psoriasis et d'asthme allergique [157]. Malheureusement, le développement d'inhibiteurs puissants et sélectifs a tardé à être correctement exploité ou dévoilé, et au moment où nous avons débuté ce travail, peu de résultats avaient été publiés.

La recherche d'antagonistes β_2 : revue de la littérature

La recherche d'inhibiteurs des β_2 comprend aussi bien les antagonistes directs qui nous préoccupent dans le cadre de ce travail, mais aussi les petites molécules qui agissent de manière indirecte en modulant l'état d'activation de ces intégrines, ainsi qu'une troisième classe qui englobe les inhibiteurs d'expression des ligands des intégrines β_2 [158].

Cette section présente l'historique de la recherche d'antagonistes des β_2 , depuis les premières découvertes somme toutes assez récentes, jusqu'aux derniers développements publiés.

En 1999, le groupe de Kelly chez Boehringer Ingelheim développe le premier inhibiteur efficace découvert par *high-throughput screening*³ : le BIRT 377, membre de la famille des hydantoïnes [159, 160]. Il est apparu que son interaction avec LFA-1 fige ce dernier dans une conformation de basse affinité [161].

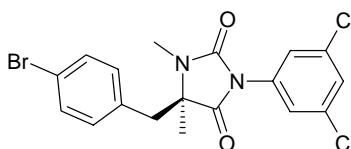


Figure 2.20 : BIRT 377 (IC_{50} ICAM-LFA-1= 26 nM).

³ Criblage à haut débit (HTS) : tri rapide de molécules candidats-médicaments en fonction de leur action sur les cibles que constituent, par exemple, les protéines. L'essai est fait simultanément sur un grand nombre de cibles, de significations très diverses, pour identifier parmi toutes ces molécules celles qui sont pourvues des propriétés biologiques les plus intéressantes. Cette technique repose sur une miniaturisation et une robotisation avancée des appareils.

Les excellents résultats obtenus sur des modèles animaux d'inflammation [162], ainsi qu'en étude préclinique ont motivé la recherche de procédés de synthèse rapides et efficaces de cette tête de série [163]. D'autres groupes se sont également attelés par la suite au design *de novo* d'antagonistes basés sur une structure bicyclique [5] hydantoïne, mais sans jamais réussir à améliorer le résultat de BIRT 377 [164].

Un métabolite fongique a également été étudié simultanément ; la lovastatine, qui reconnaît également la même région de LFA-1 [165]. Aucune étude de relation structure-activité n'a été publiée à ce sujet actuellement, bien qu'une série de brevets décrive des dérivés où la lactone est remplacée [166].

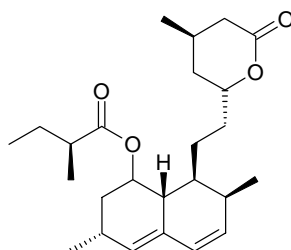


Figure 2.21 : La lovastatine ($IC_{50} = 2,4 \mu M$).

Novartis Pharma s'est intéressé de plus près à la famille des statines, inhibiteurs compétitifs du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA). L'HMGCoA réductase catalyse l'étape clé de régulation de la synthèse du cholestérol dans le foie et d'autres tissus. Les statines sont donc couramment utilisées pour leur propriété de réduction du taux de cholestérol dans les maladies cardiovasculaires. Il s'est avéré, d'après un nombre croissant d'études *in vitro* et *in vivo* qui allaient dans le même sens, que ces statines ont des effets anti-inflammatoires, qui ne sont pas liées à leur activité hypocholestérolémiant [167]. En effet, Weitz-Schmidt *et al.* ont découvert que ces propriétés anti-inflammatoires étaient liées à la reconnaissance du site de fixation de ICAM-1 sur LFA-1. LFA 703 a été développé suite à cette découverte, d'affinité supérieure pour LFA-1 ($IC_{50} < 28 \text{ nM}$) mais inférieure pour l'HMG-CoA ($IC_{50} > 100 \mu M$).

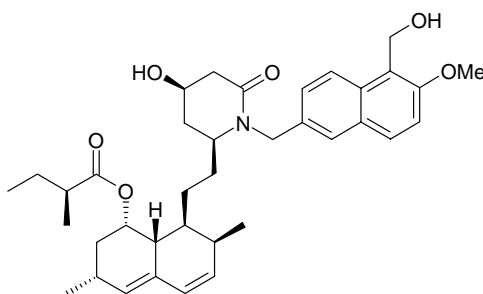


Figure 2.22 : LFA 703 de Novartis.

Abott s'est penché sur des dérivés para-arylthio cinnamides, et en 2000, c'est l'A-286982 qui fait son apparition avec un IC_{50} de 44 nM, optimisé à partir d'un *hit* à 1,7 μ M [168]. Il souffre néanmoins d'une faible biodisponibilité par voie orale [169].

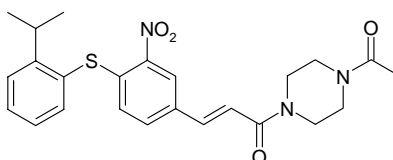


Figure 2.23 : A-286982 (IC_{50} = 44 nM).

Partant de ce dérivé, le développement a continué pour aboutir à des dérivés de seconde génération offrant de bien meilleures affinités, en améliorant également la solubilité aqueuse, par l'introduction d'un acide carboxylique terminal tout en modifiant légèrement le motif pipérazine [170]. Diverses études de QSAR⁴ ont été menées sur ces dérivés dans le but de rationaliser l'activité de cette famille de dérivés [171].

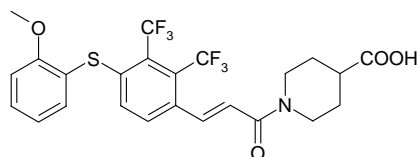


Figure 2.24 : Meilleur *hit* d'Abott avec un IC_{50} de 0.1 nM.

Plus récemment, Wang *et al.* ont rapporté une nouvelle modification de leur série par le remplacement isostérique de la partie trans-cinnamide par des trans-cyclopropylamides d'une part et par des hétérocycles aminés substitués d'autre part. Cette stratégie découle de l'observation de la dégradation rapide de cette série dans des tests *in vivo*. Les têtes de séries sont représentées sur la figure 2.25 avec des IC_{50} respectifs de 5 et 20 nM [172, 173].

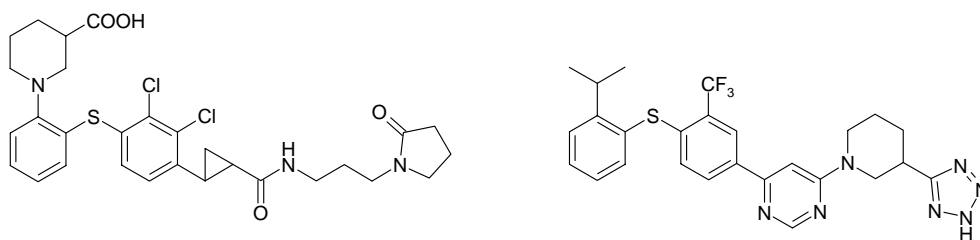


Figure 2.25 : Les plus puissants et récents antagonistes d'Abbott.

⁴ QSAR : consiste en l'établissement de relations mathématiques (corrélations) liant l'activité biologique d'une série homogène de dérivés chimiques à des paramètres physico-chimiques caractéristiques des molécules testées (descripteurs quantifiables comme la lipophilie, l'électronégativité, la charge, la surface accessible,...). L'objectif final est de comprendre dans un premier temps les forces gouvernant l'activité d'une série de dérivés afin de proposer un outil prédictif pour des molécules (en principe plus actives) équipées de substituants non encore testés et donc d'orienter de manière efficace les synthèses futures.

En 2003, Novartis publie la mise au point d'une librairie de 90 molécules de type 1, 4-diazépane-2-one en tant que *scaffold* de base [174]. Le hit le plus intéressant a un IC_{50} de 70 nM.

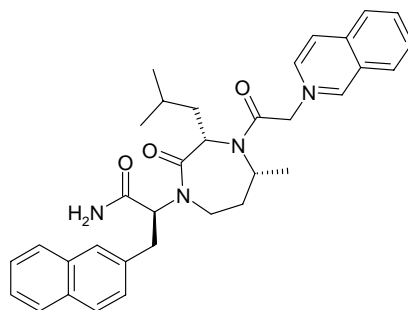


Figure 2.26 : Hit de Novartis en 2003.

En 2005, la recherche découlant de cette première investigation a mené à la découverte de meilleurs inhibiteurs atteignant un IC_{50} de 24 nM [175]. Il s'agit d'une nouvelle classe d'antagonistes basés sur le *template* de 1,4-diazépane-2,5-diones. La dernière publication en date rapporte la co-cristallisation d'un dérivé modèle avec LFA-1.

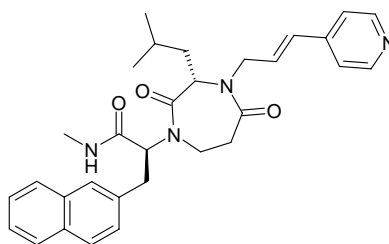


Figure 2.27 : L'analogue 4-pyridyléthylène, membre de la famille des 1,4-diazépane-2,5-diones, $IC_{50} = 24$ nM.

La grande majorité des antagonistes des intégrines β_2 visent LFA-1. Les seuls rares exemples d'inhibiteurs de Mac-1, sont également efficaces vis-à-vis de LFA-1. La seule littérature disponible sur ces exemples provient de multiples brevets déposés depuis 1999 par Hofmann-La Roche, Genentech, ... Chacun de ces brevets revendique bien évidemment de nombreux composés aux structures assez variées [176, 177].

Ces dernières années, quelques études ont également été publiées sur l'identification précise de régions liantes des ligands naturels des intégrines β_2 . Ces premiers résultats sont encourageants, mais encore trop vagues pour la plupart (peptides de 4 à 20 acides aminés) [149, 178].

En 2001, Gahmberg et son équipe découvrent via la mise en œuvre de bibliothèques "phage display"⁵ CX7C et CX9C, une nouvelle séquence antagoniste peptidique : LLG – C4 (Leucine-Leucine-Glycine) [179], capable de reconnaître LFA-1, Mac-1 et $\alpha\beta_2$. D'autre part, ils soulignèrent également la présence récurrente de cette séquence tripeptidique au sein de diverses protéines intervenant dans les phénomènes d'adhésion cellulaire. Le tableau 2.4 reprend certaines d'entre elles.

Tableau 2.4 : Présence de la séquence active LLG dans les protéines de la matrice extracellulaire.

Protéines d'adhésion cellulaire	séquences
ICAM-1	CDQPKLLGIETPL
Facteur de von Willebrand, domaine A2	TVGPGLLG VSTLG
Facteur de von Willebrand, domaine D3	GRYIILLGKALSV
Collagène de type I, α_2	PGPQLLGAPGIL
Collagène de type I, α_4	PGPPGLLGRPGEA

Deux années plus tard, cette même équipe découvre par la même méthode la séquence active de l'intégrine $\alpha_M\beta_2$. Il s'agit cette fois d'un térapeptide : le DDGW [180]. Ce groupe investit actuellement les possibilités de tirer profit de ces découvertes dans le cadre du traitement des maladies inflammatoires.

Les progrès conséquents dont a été témoin la chimie médicinale ces dernières années dans le domaine de la découverte d'antagonistes LFA-1 sont impressionnants.

⁵ Phage display : La méthodologie du phage display, c'est à dire la présentation de peptides à la surface de phages filamenteux, est devenue un très puissant outil de synthèse combinatoire et de sélection des peptides. Cette technique a été mise au point pour la première fois par Georges Smith en 1985, mais il a fallu attendre quelques années pour comprendre l'importance de ce puissant outil de sélection. Les phages filamenteux sont utilisés pour présenter à leur surface des molécules telles que des peptides aléatoires, des fragments d'anticorps ou d'autres protéines. Les phages recombinants sont ensuite sélectionnés pour leur capacité de liaison à une cible. Les banques de peptides exposés sur phage peuvent être sélectionnées sur différentes cibles: anticorps monoclonaux pour caractériser rapidement de nouveaux épitopes, récepteurs pour identifier de nouveaux ligands, ou enzymes pour caractériser de nouveaux substrats. Les banques combinatoires de fragments d'anticorps sont sélectionnés sur des antigènes purifiés pour isoler des fragments d'anticorps avec de nouvelles spécificités. Après de nombreux lavages, les phages fixés sont élués puis isolés et amplifiés par infection de bactéries. Les phages amplifiés sont sélectionnés à nouveau sur la même cible. Après 3 ou 4 tours de sélection-amplification, les phages sélectionnés sont analysés et testés pour l'activité recherchée. Des pressions de sélection différentes peuvent être introduites à chaque tour ainsi qu'une diversité additionnelle par mutagenèse. Cette stratégie fondée sur la sélection est nettement plus puissante qu'une stratégie de criblage classique qui nécessite de nombreuses manipulations. Il est en effet possible de cribler 10^6 à 10^{10} molécules recombinantes différentes dans un volume réduit de quelques microlitres. De plus, l'association de la protéine exposée en surface (phénotype) avec son ADN codé par le phage (génotype) permet d'accéder rapidement aux séquences des molécules sélectionnées car l'ADN est directement isolé avec la protéine pour laquelle il code. Cette méthode est très efficace puisqu'il est possible de sélectionner un phage dont la fréquence était de $1/10^8$ dans la banque originale. Le nombre croissant de publications apparues ces dernières années indique que la technologie du phage display représente un outil performant pour de très nombreuses applications.

Certains dérivés décrits dans ces dernières pages sont actuellement en phase préclinique ou clinique, et devraient mener d'ici quelques années à la mise sur le marché de nouveaux médicaments originaux de par leur cible.

La recherche de ligands encore plus efficaces continue toujours. Face à une concurrence grandissante, les chercheurs essaient d'optimiser leur travail en y intégrant une série de technologies de pointe telles que la chimie combinatoire, la synthèse parallèle ⁶, le criblage à haut débit, et la modélisation moléculaire. Comme nous avons pu le voir tout au long de ce chapitre, le chemin à parcourir depuis la séquence active jusqu'au médicament est long et itératif. D'autant plus qu'une affinité exceptionnelle ne suffit pas à faire d'une molécule un médicament puisqu'il faut également tenir compte d'un ensemble de propriétés reprises sous le sigle A.D.M.E.T. (absorption, distribution, métabolisme, excrétion, toxicité).

⁶ Synthèse parallèle : Stratégie qui repose sur la synthèse simultanée de quelques molécules dans des compartiments séparés à partir de blocs moléculaires et de réactifs homologues.

F. Références

1. Hynes, R.O., *Cell adhesion : old and new questions*. trends in Cell Biology, 1999. **9**(12): p. M33-M37.
2. Ruoslahti, E. and B. Obrink, *Common Principles in Cell Adhesion*. Experimental Cell Research, 1996. **227**(1): p. 1-11.
3. Petruzzelli, L., M. Takami, and D. Humes, *Structure and Function of Cell Adhesion Molecules*. The American Journal of Medicine, 1999. **106**: p. 467-476.
4. Bevilacqua, M., E. Butcher, B. Furie, B. Furie, M. Gallatin, M. Gimbrone, J. Harlan, K. Kishimoto, L. Lasky, and R. McEver, *Selectins : A family of adhesion receptors*. Cell, 1991. **67**(2): p. 233.
5. Bevilacqua, M.P. and R.M. Nelson, *Selectins*. The Journal Of Clinical Investigation, 1993. **91**(2): p. 379-387.
6. Mousa, S.A. and D. Cheresh, *Recent Advances in Cell Adhesion Molecules and Extracellular Matrix Proteins: Potential Clinical Implications*. Drug Discovery Today, 1997. **2**(5): p. 187-199.
7. Hynes, R.O., *Integrins: A family of cell surface receptors*. Cell, 1987. **48**(4): p. 549-554.
8. Previtali, S.C., M.L. Feltri, J.J. Archelos, A. Quattrini, L. Wrabetz, and H.-P. Hartung, *Role of integrins in the peripheral nervous system*. Progress in Neurobiology, 2001. **64**(1): p. 35-49.
9. Moiseeva, E.P., *Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions*. Cardiovascular Research, 2001. **52**(3): p. 372-386.
10. Meredith Jr, J.E. and M.A. Schwartz, *Integrins, adhesion and apoptosis*. trends in Cell Biology, 1997. **7**(4): p. 146-150.
11. Clark, E.A. and J.S. Brugge, *Integrins and Signal Transduction Pathways: The Road Taken*. Science, 1995. **268**: p. 233-238.
12. Darribere, T., M. Skalski, H. Cousin, A. Gaultier, C. Montmory, and D. Alfandari, *Integrins: Regulators of embryogenesis*. Biology of the Cell, 2000. **92**(1): p. 5-25.
13. Giancotti, F.G. and E. Ruoslahti, *Integrin Signaling*. Science, 1999. **285**: p. 1028-1032.
14. Schwartz, M.A., *Integrin signaling revisited*. trends in Cell Biology, 2001. **11**(12): p. 466-470.
15. Tamkun, J.W., D.W. DeSimone, D. Fonda, R.S. Patel, C. Buck, A.F. Horwitz, and R.O. Hynes, *Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin*. Cell, 1986. **46**(2): p. 271-282.
16. Bergelson, J.M. and M.E. Hemler, *Do integrins use a "MIDAS touch" to grasp an Asp*. Current Biology, 1995. **5**(6): p. 615-617.
17. Lee, J.-O., P. Rieu, M.A. Arnaout, and R. Liddington, *Crystal structure of the A domain from the a subunit of integrin CR3 (CD11 b/CD18)*. Cell, 1995. **80**(4): p. 631-638.

18. Green, L.J., A.P. Mould, and M.J. Humphries, *The integrin [beta] subunit*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1998. **30**(2): p. 179-184.
19. Hynes, R.O., *Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
20. De Fougerolles, A. and T.A. Springer, *Ideas crystallized on immunoglobulin superfamily-integrin interactions*. Chemistry & Biology, 1995. **2**(10): p. 639-643.
21. Schwartz, M.A., D.E. Ingber, M. Lawrence, T.A. Springer, and C. Lechene, *Multiple integrins share the ability to induce elevation of intracellular pH*. Experimental Cell Research, 1991. **195**(2): p. 533-535.
22. Travis, M.A., J.D. Humphries, and M.J. Humphries, *An unraveling tale of how integrins are activated from within*. Trends in Pharmacological Sciences, 2003. **24**(4): p. 192-197.
23. Hughes, P.E. and M. Pfaff, *Integrin Affinity Modulation*. trends in Cell Biology, 1998. **8**: p. 359-364.
24. Schlaepfer, D.D. and T. Hunter, *Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs?* trends in Cell Biology, 1998. **8**(4): p. 151-157.
25. Aplin, A.E., *Cell adhesion molecule regulation of nucleocytoplasmic trafficking*. FEBS Letters, 2003. **534**(1-3): p. 11-14.
26. Aplin, A.E., A.K. Howe, and R.L. Juliano, *Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth*. Current Opinion in Cell Biology, 1999. **11**: p. 737-744.
27. Fagerholm, S.C., T.J. Hilden, and C.G. Gahmberg, *P marks the spot: site-specific integrin phosphorylation regulates molecular interactions*. Trends in Biochemical Sciences, 2004. **29**(9): p. 504-512.
28. Chodniewicz, D. and R.L. Klemke, *Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2004. **1692**(2-3): p. 63-76.
29. Wozniak, M.A., K. Modzelewska, L. Kwong, and P.J. Keely, *Focal adhesion regulation of cell behavior*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2004. **1692**(2-3): p. 103-119.
30. Brunton, V.G., I.R.J. MacPherson, and M.C. Frame, *Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2004. **1692**(2-3): p. 121-144.
31. Carragher, N.O. and M.C. Frame, *Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion*. trends in Cell Biology, 2004. **14**(5): p. 241-249.
32. DeMali, K.A., K. Wennerberg, and K. Burridge, *Integrin signaling to the actin cytoskeleton*. Current Opinion in Cell Biology, 2003. **15**(5): p. 572-582.
33. Critchley, D.R., *Focal adhesions - the cytoskeletal connection*. Current Opinion in Cell Biology, 2000. **12**(1): p. 133-139.
34. Stipp, C.S., T.V. Kolesnikova, and M.E. Hemler, *Functional domains in tetraspanin proteins*. Trends in Biochemical Sciences, 2003. **28**(2): p. 106-112.

35. Hemler, M.E., *Integrin associated proteins*. Current Opinion in Cell Biology, 1998. **10**(5): p. 578-585.
36. Kim, M., C.V. Carman, and T.A. Springer, *Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins*. Science, 2003. **301**(5640): p. 1720-5.
37. Sanchez-Mateos, P., C. Cabanas, and F. Sanchez-Madrid, *Regulation of integrin function*. Seminars in Cancer Biology, 1996. **7**(3): p. 99-109.
38. Bazzoni, G. and M.E. Hemler, *Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized?* Trends in Biochemical Sciences, 1998. **23**(1): p. 30-34.
39. Carman, C.V. and T.A. Springer, *Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized?* Current Opinion in Cell Biology, 2003. **15**(5): p. 547-556.
40. Diamond, M.S. and T.A. Springer, *The dynamic regulation of integrin adhesiveness*. Current Biology, 1994. **4**(6): p. 506-517.
41. Laplantine, E., P. Maurer, L. Vallar, J. Eble, M. Paulsson, P. Bruckner, N. Kieffer, and M. Aumailley, *The integrin [beta]1 subunit cytoplasmic tail forms oligomers: a potential role in [beta]1 integrin clustering*. Biology of the Cell, 2002. **94**(6): p. 375-387.
42. Dalton, S.L., E. Scharf, R. Briesewitz, E.E. Marcantonio, and R.K. Assoian, *Unexpected crosstalk between integrins*. trends in Cell Biology, 1995. **6**: p. 134.
43. Mould, A.P. and M.J. Humphries, *Regulation of integrin function through conformational complexity: not simply a knee-jerk reaction?* Current Opinion in Cell Biology, 2004. **16**(5): p. 544-551.
44. Frisch, S.M. and E. Ruoslahti, *Integrins and anoikis*. Current Opinion in Cell Biology, 1997. **9**(5): p. 701-706.
45. Heino, J., *The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions*. Matrix Biology, 2000. **19**(4): p. 319-323.
46. Chan, B.M.C., P.D. Kassner, J.A. Schiro, H.R. Byers, T.S. Kupper, and M.E. Hemler, *Distinct cellular functions mediated by different VLA integrin [alpha] subunit cytoplasmic domains*. Cell, 1992. **68**(6): p. 1051-1060.
47. Jones, E.Y., *Three-dimensional structure of cell adhesion molecules*. Current Opinion in Cell Biology, 1996. **8**(5): p. 602-608.
48. Ruoslahti, E. and M.D. Pierschbacher, *Arg-Gly-Asp: A versatile cell recognition signal*. Cell, 1986. **44**(4): p. 517-518.
49. Ruoslahti, E. and M.D. Pierschbacher, *New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins*. Science, 1987. **238**: p. 491-497.
50. Humphries, M.J., *Integrin cell adhesion receptors and the concept of agonism*. Trends in Pharmacological Sciences, 2000. **21**(1): p. 29-32.
51. Komoriya, A., L.J. Greens, M. Mervic, S.S. Yamada, K.M. Yamada, and M.J. Humphries, *The Minimal Essential Sequence for a Major Cell Type-specific Adhesion Site (CS1) within the Alternatively Spliced Type III Connecting Segment Domain of Fibronectin Is Leucine-Aspartic Acid-Valine*. J. Biol. Chem., 1991. **266**(23): p. 15075-15079.

52. Heavner, G.A., *Active sequences in cell adhesion molecules: targets for therapeutic intervention*. Drug Discovery Today, 1996. **1**(7): p. 295-304.
53. Yamada, K., *Adhesive recognition sequences*. J. Biol. Chem., 1991. **266**(20): p. 12809-12812.
54. Gottschalk, K.-E. and H. Kessler, *The structures of integrins and integrin-ligand complexes: implications for drug design and signal transduction*. Angewandte Chemie (International Ed. In English), 2002. **41**(20): p. 3767-3774.
55. Zimmerman, C.N., *Peptide and peptidomimetics inhibitors of VLA-4*. Exp. Opin. Ther. Patents, 1999. **9**(2): p. 129-133.
56. Henricks, P.A.J. and F.P. Nijkamp, *Pharmacological modulation of cell adhesion molecules*. European Journal of Pharmacology, 1998. **344**: p. 1-13.
57. Xiong, J.-P., T. Stehle, R.G. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout, *Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha V beta 3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand*. Science, 2002. **296**(5565): p. 151-155.
58. Humphries, M.J., P.A. McEwan, S.J. Barton, P.A. Buckley, J. Bella, and A. Paul Mould, *Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble*. Trends in Biochemical Sciences, 2003. **28**(6): p. 313-320.
59. Xiong, J.-P., T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D.L. Scott, A. Joachimiak, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout, *Crystal structure of the extracellular segment of integrin AVB3*. Science, 2001. **294**(5541): p. 339-345.
60. Xiong, J.-P., T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S.L. Goodman, and M.A. Arnaout, *Crystal structure of the extracellular segment of integrin V3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand*. Science, 2002. **296**(5565): p. 151-155.
61. Gadek, T.R. and R.S. McDowell, *Discovery of small molecule leads in a biotechnology datastream*. Drug Discovery Today, 2003. **8**(12): p. 545-550.
62. Lohof, E., E. Planker, C. Mang, F. Burkhart, M.A. Dechantsreiter, R. Haubner, H.-J. Wester, M. Schwaiger, G. Hölzemann, S.L. Goodman, and H. Kessler, *Carbohydrate Derivatives for Use in Drug Design: Cyclic α -Selective RGD Peptides*. Angewandte Chemie International Edition, 2000. **39**(15): p. 2761-2764.
63. Ojima, I., S. Chakravarty, and Q. Dong, *Antithrombotic Agents: From RGD to Peptide Mimetics*. Bioorg. Med. Chem., 1995. **3**(4): p. 337-360.
64. Varner, J.A. and D.A. Cheresh, *Integrins and cancer*. Current Opinion in Cell Biology, 1996. **8**(5): p. 724-730.
65. Miller, W.H., R.M. Keenan, R.N. Willette, and M.W. Lark, *Identification and In Vivo Efficacy of Small-Molecule Antagonists of Integrin alphaVbeta3 (the vitronectin receptor)*. Drug Discovery Today, 2000(9): p. 397-408.
66. Kerr, J.S., A.M. Slee, and S.A. Mousa, *Small Molecule alphaV Integrin Antagonists: Novel Anticancer Agents*. Expert Opin. Invest. Drugs, 2000. **9**(6): p. 1271-79.
67. Duggan, M.E. and J.H. Hutchinson, *Ligands to the integrin receptor [alpha](v)[beta]3*. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2000. **10**(9): p. 1367-1383.

68. Tucker, G.C., *Inhibitors of integrins*. Current Opinion in Pharmacology, 2002. 2(4): p. 394-402.
69. Curley, G.P., H. Blum, and M.J. Humphries, *Integrin Antagonists*. Cell. Mol. Life Sci., 1999. 56: p. 427-441.
70. Sandborn, W.J. and T.A. Yednock, *Novel approaches to treating inflammatory bowel disease: targeting alpha-4 integrin*. The American Journal of Gastroenterology, 2003. 98(11): p. 2372-2382.
71. Lin, K.-C., H.S. Ateeq, S.H. Hsiung, L.T. Chong, C.N. Zimmerman, A. Castro, W.-C. Lee, C.E. Hammond, S. Kalkunte, L.-L. Chen, R.B. Pepinsky, D.R. Leone, A.G. Sprague, W.M. Abraham, A. Gill, R.R. Lobb, and S.P. Adams, *Selective, Tight-Binding Inhibitors of Integrin $\alpha 4\beta 1$ That Inhibit Allergic Airway Responses*. J. Med. Chem., 1999. 42: p. 920-934.
72. Gahmberg, C.G., *Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules*. Curr. Opin. Cell Biol., 1997. 9(5): p. 643-650.
73. Gahmberg, C.G., L. Valmu, L. Tian, P. Kotovuori, S. Fagerholm, A. Kotovuori, C. Kantor, and T. Hilden, *Leukocyte adhesion - a fundamental process in leukocyte physiology*. Braz. J. Med. Biol. Res., 1999. 32(5): p. 511-517.
74. Gahmberg, C.G., L. Valmu, A. Kotovuori, P. Kotovuori, T.J. Hilden, S. Fagerholm, C. Kantor, T. Nurminen, E. Ihanus, and L. Tian, *Leukocyte Adhesion-an Integrated Molecular Process at the Leukocyte Plasma Membrane*. Bioscience Reports, 1999. 19(4): p. 273-281.
75. Kubes, P. and P. A.Ward, *Leukocyte Recruitment and the Acute Inflammatory Response*. Brain Pathology, 2000. 10: p. 127-135.
76. Jones, D.A., C.W. Smith, and L.V. McIntire, *Leucocyte adhesion under flow conditions: principles important in tissue engineering*. Biomaterials, 1996. 17(3): p. 337-347.
77. Stewart, M., M. Thiel, and N. Hogg, *Leukocyte integrins*. Current Opinion in Cell Biology, 1995. 7: p. 690-696.
78. Whittard, J.D. and S.K. Akiyama, *Activation of [beta]1 Integrins Induces Cell-Cell Adhesion*. Experimental Cell Research, 2001. 263(1): p. 65-76.
79. Guan, J.-L. and R.O. Hynes, *Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor [alpha]4[beta]1*. Cell, 1990. 60(1): p. 53-61.
80. Bochner, B.S., F.W. Luscinskas, M.A. Gimbrone, W. Newman, S.A. Sterbinsky, C.P. DerseAnthony, D. Klunk, and R.P. Schleimer, *Adhesion of Human Basophils, Eosinophils, and Neutrophils to Interleukin 1- Activated Human Vascular Endothelial Cells: Contributions of Endothelial Cell Adhesion Molecules*. J. Exp. Med., 1991. 6(173): p. 1553-1556.
81. Johnston, B. and P. Kubes, *The [alpha]4-integrin: an alternative pathway for neutrophil recruitment?* Immunology Today, 1999. 20(12): p. 545-550.
82. Reinhardt, P.H., J.F. Elliott, and P. Kubes, *Neutrophils Can Adhere Via $\alpha 4\beta 1$ -Integrin Under Flow Condition*. Blood, 1997. 89(10): p. 3837-3846.

83. Chen, L.L., A. Whitty, R.R. Lobb, S.P. Adams, and R.B. Pepinsky, *Multiple Activation States of Integrins $\alpha 4\beta 1$ Detected through Their Different Affinities for a Small Molecule Ligand*. J. Biol. Chem, 1999. **274**(19): p. 13167-13175.
84. Ruegg, C., O. Dormond, and A. Mariotti, *Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2004. **1654**(1): p. 51-67.
85. Shih, P.T., M.-L. Brennan, D.K. Vora, M.C. Territo, D. Strahl, M.J. Elices, A.J. Lusis, and J.A. Berliner, *Blocking Very Late Antigen-4 Integrin Decreases Leukocyte Entry and Fatty Streak Formation in Mice Fed an Atherogenic Diet*. Circ. Res., 1999. **84**(3): p. 345-351.
86. Berlin, C., E.L. Berg, M.J. Briskin, D.P. Andrew, P.J. Kilshaw, B. Holzmann, I.L. Weissman, A. Hamann, and E.C. Butcher, *[α 4 β 7] integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1*. Cell, 1993. **74**(1): p. 185-195.
87. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-314.
88. Kent, S.J., S.J. Karlik, C. Cannon, D.K. Hines, T.A. Yednock, L.C. Fritz, and H.C. Horner, *A monoclonal antibody to [α 4] integrin suppresses and reverses active experimental allergic encephalomyelitis*. Journal of Neuroimmunology, 1995. **58**(1): p. 1-10.
89. Wang, Q., Y. Wang, D.M. Hyde, P.J. Gotwals, R.R. Lobb, S.T. Ryan, and S.N. Giri, *Effect of antibody against integrin [α 4] on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice*. Biochemical Pharmacology, 2000. **60**(12): p. 1949-1958.
90. L'anticorps recombinant humanisé AN100226 connu sous les noms commerciaux de Antegren ou Natalizumab TYSABRI® est dirigé contre la chaîne $\alpha 4$ de ces deux intégrines. Les tests ont prouvé son pouvoir inhibiteur de l'adhésion des leucocytes à VCAM-1 et MadCAM-1. L'absence d'interaction observée entre ces couples récepteurs-ligands entraîne une prévention de la transmigration des leucocytes vers les tissus inflammés. L'anticorps développé en partenariat par les laboratoires Biogen et Elan Pharmaceuticals, a été approuvé par la FDA en novembre 2004 pour le traitement de la sclérose en plaques, de l'arthrite rhumatoïde et de la maladie de Crohn [90]. La décision des autorités européennes était attendue dans le courant de 2005. Or, la FDA émit un rapport le 28 février 2005 faisant état d'un cas fatal et de l'apparition de cas de leucoencéphalopathies multifocales progressives chez les patients traités depuis plus de deux ans au Tysabri. Aucun lien direct n'a pour le moment été démontré entre le traitement et l'apparition de ces cas isolés, et le dossier reste momentanément en suspens.
91. Tilley, J.W. and A. Sidduri, *VLA-4 Antagonists*. Drugs of the Future, 2001. **26**(10): p. 985-998.
92. Adams, S.P. and R.R. Lobb, *Inhibitors of Integrin $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4)*. Ann. Rep. Med. Chem., 1999. **34**: p. 179-188.

93. Vanderslice, P., K. Ren, J.K. Revelle, D.C. Kim, D. Scott, R.J. Bjercke, E.T.H. Yeh, P.J. Beck, and T.P. Kogan, *A Cyclic Hexapeptide Is a Potent Antagonist of $\alpha 4\beta 1$ Integrins*. *J. Immunol.*, 1997. **158**: p. 1710-1718.
94. Boer, J., D. Gottschling, A. Schuster, B. Holzmann, and H. Kessler, *Design, Synthesis, and Biological Evaluation of $\alpha 4\beta 1$ Integrin Antagonists Based on β -D-Mannose as Rigid Scaffold*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001. **40**(20): p. 3870-3873.
95. Chen, L., J.W. Tilley, R.W. Guthrie, F. Mennona, T.-N. Huang, G. Kaplan, R. Trilles, D. Miklowski, N. Huby, V. Schwinge, B. Wolitzky, and K. Rowan, *N-Benzylpyroglutamyl-L-phenylalanine Derivatives as VCAM/VLA-4 Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000. **10**: p. 729-733.
96. Chen, L., J.W. Tilley, T.-N. Huang, D. Miklowski, R. Trilles, R.W. Guthrie, K. Luk, A. Hanglow, K. Rowan, V. Schwinge, and B. Wolitzky, *N-Acyl Phenylalanine Analogues as Potent Small Molecule VLA-4 Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000. **10**: p. 725-727.
97. Chen, L., J.W. Tilley, R.V. Trilles, W. Yun, D. Fry, C. Cook, K. Rowan, V. Schwinge, and R. Campbell, *N-Acyl-L-phenylalanine Derivatives as Potent VLA-4 Antagonists that Mimic a Cyclic Peptide Conformation*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002. **12**: p. 137-140.
98. Sidduri, A., P. Lou, R. Campbell, K. Rowan, and J.W. Tilley, *Synthesis of constrained L-phenylalanine derivatives incorporating a benzopinone or an azepinone ring as VCAM/VLA-4 antagonists*. *Tet. Lett.*, 2001. **42**: p. 8757-8760.
99. Sidduri, A., J.W. Tilley, K. Hull, J.P. Lou, G. Kaplan, A. Sheffron, L. Chen, R. Campbell, R. Guthrie, T.-N. Huang, N. Huby, K. Rowan, V. Schwinge, and L.M. Renzetti, *N-Cycloalkanoyl-L-phenylalanine Derivatives as VCAM/VLA-4 Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002. **12**: p. 2475-2478.
100. Sidduri, A., J.W. Tilley, J.P. Lou, L. Chen, G. Kaplan, F. Mennona, R. Campbell, R. Guthrie, T.-N. Huang, K. Rowan, V. Schwinge, and L. Renzetti, *N-Aroyl-L-Phenylalanine Derivatives as VCAM/VLA-4 Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002. **12**: p. 2479-2482.
101. Archibald, S.C., J.C. Head, J.M. Linsley, J.R. Porter, M.K. Robinson, A. Shock, and G.J. WarreLOW, *Discovery and Evaluation of Potent, Cysteine-based $\alpha 4\beta 1$ Integrin Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000. **10**: p. 993-995.
102. Porter, J.R., S.C. Archibald, J.A. Brown, K. Childs, D. Critchley, J.C. Head, B. Hutchinson, T.A.H. Parton, M.K. Robinson, A. Shock, G.J. WarreLOW, and A. Zomaya, *Discovery and Evaluation of N-(triazin-1,3,5-yl) Phenylalanine Derivatives as VLA-4 Integrin Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002. **12**: p. 1591-1594.
103. Porter, J.R., S.C. Archibald, J.A. Brown, K. Childs, D. Critchley, J.C. Head, B. Hutchinson, T.A.H. Parton, M.K. Robinson, A. Shock, G.J. WarreLOW, and A. Zomaya, *N-(Pyrimidin-4-yl) and N-(Pyridin-2-yl) Phenylalanine Derivatives as VLA-4 Integrin Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002. **12**: p. 1595-1598.
104. Porter, J.R., S.C. Archibald, J.A. Brown, K. Childs, D. Critchley, J.C. Head, T.A.H. Parton, M.K. Robinson, A. Shock, R.J. Taylor, and G.J. WarreLOW,

- Dehydrophenylalanine Derivatives as VLA-4 Integrin Antagonists*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2003. **13**: p. 805-808.
105. Sircar, I., K.S. Gudmundsson, R. Martin, J. Liang, S. Nomura, H. Jayakumar, B.R. Teegarden, D.M. Nowlin, P.M. Cardarelli, J.R. Mah, S. Connell, R.C. Griffith, and E. Lazarides, *Synthesis and SAR of N-Benzoyl-L-Biphenylalanine Derivatives: Discovery of TR-14035, A Dual $\alpha4\beta7/\alpha4\beta1$ Integrin Antagonist*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2002. **10**: p. 2051-2066.
 106. Gutteridge, C.E., S.E.d. Laszlo, T.M. Kamenecka, E. McCauley, G.V. Riper, R.A. Mumford, U. Kidambi, L.A. Egger, S. Tong, and W.K. Hagmann, *N-(3-Phenylsulfonyl-3-piperidinoyl)-phenylalanine Derivatives as Potent, Selective VLA-4 Antagonists*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2003. **13**: p. 885-890.
 107. deLaszlo, S.E., B. Li, E. McCauley, G.V. Riper, and W.K. Hagmann, *Identification of Unique VLA-4 Antagonists from a Combinatorial Library*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2002. **12**: p. 685-688.
 108. Singh, J., H.v. Vlijmen, Y. Liao, W.-C. Lee, M. Cornebise, M. Harris, I. Shu, A. Gill, J.H. Cuervo, W.M. Abraham, and S.P. Adams, *Identification of Potent and Novel $\alpha4\beta1$ Antagonists Using in Silico Screening*. J. Med. Chem., 2002. **45**: p. 2988-2993.
 109. Nowlin, D.M., F. Gorcsan, M. Moscinski, S.-L. Chiang, T.J. Lobl, and P.M. Cardarelli, *A Novel Cyclic Pentapeptide Inhibits $\alpha4\beta1$ and $\alpha5\beta1$ Integrin-mediated Cell Adhesion*. J. Biol. Chem., 1993. **268**: p. 20352-20359.
 110. Lobl, T.J., S.-L. Chiang, and P.M. Cardarelli, *Cyclic Cell Adhesion Modulation Compounds*, in WO9200995. 1992: US.
 111. Swaroop, D.A., *Peptide inhibitors of fibronectine*, in WO9702289. 1997: GB.
 112. Fotouhi, N., P. Joshi, D. Fry, C. Cook, J.W. Tilley, G. Kaplan, A. Hanglow, K. Rowan, V. Schwinge, and B. Wolintzky, *The Design and Synthesis of Potent Cyclic Peptide VCAM-VLA-4 Antagonists Incorporating an Achiral Asp-Pro Mimetic*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2000. **10**: p. 1171-1173.
 113. Fotouhi, N., P. Joshi, J.W. Tilley, K. Rowan, V. Schwinge, and B. Wolintzky, *Cyclic Thioether Peptide Mimetics as VCAM-VLA-4 Antagonists*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2000. **10**: p. 1167-1169.
 114. Tilley, J., G. Kaplan, N. Fotouhi, B. Wolintzky, and K. Rowan, *Carbacyclic Peptide Mimetics as VCAM-VLA-4 Antagonists*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 2000. **10**: p. 1163-1165.
 115. Ho, W.-B. and C. Broka, *Synthesis of a Peptidomimetic Tricyclic Terahydrobenzo[*ij*]quinoline as a VLA-4 Antagonist*. J. Org. Chem., 2000. **65**: p. 6743-6748.
 116. Jackson, D.Y., C. Quan, D.R. Artis, T. Rawson, B.Blackburn, M. Struble, G. Fitzgerald, K. Chan, S. Mullins, J.P. Burnier, W.J. Fairbrother, K. Clark, M. Berisini, H. Chui, M. Renz, S. Jones, and S. Fong, *Potent $\alpha4\beta1$ Peptide Antagonists as potential Anti-Inflammatory Agents*. J. Med. Chem., 1997. **40**: p. 3359-3368.

117. Boer, J., D. Gottschling, A. Schuster, B. Holzmann, and H. Kessler, *Design and Synthesis of Potent and Selective $\alpha4\beta7$ Integrin Antagonists*. *J. Med. Chem.*, 2001. **44**: p. 2586-2592.
118. Wattanasin, S., B. Weidman, D. Roche, S. Myers, A. Xing, Q. Guo, M. Sabio, P.v. Matt, R. Hugo, S. Maida, P. Lake, and M. Weetall, *Design and Synthesis of Potent and Selective Inhibitors of Integrin VLA-4*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001. **11**: p. 2955-2958.
119. Duplantier, A.J., G.E. Beckius, R.J. Chambers, L.S. Chupak, T.H. Jenkinson, A.S. Klein, K.G. Kraus, E.M. Kudlacz, M.W. McKechney, M. Pettersson, C.A. Whitney, and A.J. Milici, *Isoxazolyl, Oxazolyl, and Thiazolylpropionic Acid Derivatives as Potent $\alpha4\beta1$ Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001. **11**: p. 2593-2596.
120. Astles, P.C., N.V. Harris, and A.D. Morley, *Diamine Containing VLA-4 Antagonists*. *Bioorg. Med Chem.*, 2001. **9**: p. 2195-2202.
121. WO9952898, T.B.C., *Tertiary amide ureido derivatives VLA-4 antagonists*. *Exp. Opin. Ther. Patents*, 2000. **10**(3): p. 361-364.
122. Tilley, J.W., G. Kaplan, K. Rowan, V. Schwinge, and B. Wolitzky, *Imide and Lactam Derivatives of N-Benzylpyroglutamyl-L-phenylalanine as VCAM/VLA-4 Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001. **11**: p. 1-4.
123. Hagmann, W.K., P.L. Durette, T. Lanza, N.J. Kevin, S.E.d. Laszlo, I.E. Kopka, D. Young, P.A. Magriotis, B. Li, L.S. Lin, G. Yang, T. Kamenecka, L.L. Chang, J. Wilson, M. MacCoss, S.G. Mills, G.V. Riper, E. McCauley, L.A. Egger, U. Kidambi, K. Lyons, S. Vincent, R. Stearn, A. Colletti, J. Teffera, S. Tong, J. Fenyk-Melody, K. Owens, D. Levorse, P. Kim, J.A. Schmidt, and R.A. Mumford, *The Discovery of Sulfonylated Dipeptides as Potent VLA-4 Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001. **11**: p. 2709-2713.
124. Doherty, G.A., T. Kamenecka, E. McCauley, G.V. Riper, R.A. Mumford, S. Tong, and W.K. Hagmann, *N-Aryl 2,6-Dimethoxybiphenylalanine Analogues as VLA-4 Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002. **12**: p. 729-731.
125. Doherty, G.A., G.X. Yang, E. Borges, S. Tong, E.D. McCauley, K.M. Treonz, G. Van Riper, S. Pacholok, Q. Si, and G.C. Koo, *N-Isonicotinoyl(-)-4-aminophenylalanine derivatives as tight binding VLA-4 antagonists*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2003. **13**(11): p. 1891-1895.
126. Yang, G.X., L.L. Chang, Q. Truong, G.A. Doherty, P.A. Magriotis, S.E.d. Laszlo, B. Li, M. MacCoss, U. Kidambi, L.A. Egger, E. McCauley, G.V. Riper, R.A. Mumford, J.A. Schmidt, and W.K. Hagmann, *N-Tetrahydrofuroyl(-)-L-Phenylalanine Derivatives as Potent VLA-4 Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002. **12**: p. 1497-1500.
127. Lin, L.L., J. T. Lanza, E. McCauley, G.V. Ripper, U. Kidambi, J. Cao, L.A. Egger, R.A. Mumford, J.A. Schmidt, M. MacCoss, and W.K. Hagmann, *Specific and Dual Antagonists of $\alpha4\beta1$ and $\alpha4\beta7$ Integrins*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002. **12**: p. 133-136.

128. Li, B., S.E.d. Laszlo, T.M. Kamenecka, I.E. Kopka, P.L. Durette, J. T. Lanza, M. MacCoss, S. Tong, R.A. Mumford, E.D. McCauley, G.V. Riper, J.A. Schmidt, and W.K. Hagmann, *N-(Arylacetyl)-biphenylalanines as Potent VLA-4 Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002. **12**: p. 2141-2144.
129. Kamenecka, T.M., J. T. Lanza, S.E.d. Laszlo, B. Li, E.D. McCauley, G.V. Riper, L.A. Egger, U. Kidambi, R.A. Mumford, S. Tong, M. MacCoss, J.A. Schmidt, and W.K. Hagmann, *N-Aryl-propyl-dipeptides as Potent Antagonists of VLA-4*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002. **12**: p. 2205-2208.
130. Lin, L.S., I.E. Kopka, R.A. Mumford, P.A. Magriotis, J. T. Lanza, P.L. Durette, T. Kamenecka, D.N. Young, S.E.d. Laszlo, E. McCauley, G.V. Riper, U. Kidambi, L.A. Egger, X. Tong, K. Lyons, S. Vincent, R. Stearns, A. Colletti, Y. Teffera, J. Fenyk-Melody, J.A. Schmidt, M. MacCoss, and W.K. Hagmann, *The Discovery of Acylated β -Amino Acids as Potent and Orally Bioavailable VLA-4 Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002. **12**: p. 611-614.
131. Doherty, G.A., G.X. Yang, E. Borges, L.L. Chang, M. MacCoss, S. Tong, U. Kidambi, L.A. Egger, E. McCauley, G.V. Riper, R.A. Mumford, J.A. Schmidt, and W.K. Hagmann, *Substituted Tetrahydrofuroyl-1-phenylalanine Derivatives as Potent and Specific VLA-4 Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002. **12**: p. 1501-1505.
132. Kopka, I.E., L.S. Lin, R.A. Mumford, J. T. Lanza, P.A. Magriotis, D. Young, S.E.d. Laszlo, M. MacCoss, S.G. Mills, G.V. Riper, E. McCauley, K. Lyons, S. Vincent, L.A. Egger, U. Kidambi, R. Stearns, A. Colletti, Y. Teffera, S. Tong, K. Owens, D. Levorse, J.A. Schmidt, and W.K. Hagmann, *Substituted 3-Amino Biaryl Propionic Acids as Potent VLA-4 Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002. **12**: p. 2415-2418.
133. Lin, L.L., T.J. Lanza, L.A. Castonguay, T. Kamenecka, E. McCauley, G.V. Riper, L.A. Egger, R.A. Mumford, X. Tong, M. MacCoss, J.A. Schmidt, and W.K. Hagmann, *Bioisosteric replacement of anilide with benzoxazole: potent and orally bioavailable antagonists of VLA-4*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004. **14**: p. 2575-2577.
134. Tong, X.S., J. Wang, S. Zheng, and J.V. Pivnichny, *High-throughput pharmacokinetics screen of VLA-4 antagonists by LC/MS/MS coupled with automated solid-phase extraction sample preparation*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004. **35**: p. 867-877.
135. Kopka, I.E., D.N. Young, L.S. Lin, R.A. Mumford, P.A. Magriotis, M. MacCoss, S.G. Mills, G.V. Riper, E. McCauley, U. Kidambi, J.A. Schmidt, K. Lyons, R. Stearns, S. Vincent, A. Colletti, Z. Wang, S. Tong, J. Wang, S. Zheng, K. Owens, D. Levorse, and W.K. Hagmann, *Substituted N-(3,5-Dichlorobenzenesulfonyl)-L-prolyl-phenylalanine Analogues as Potent VLA-4 Antagonists*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002. **12**: p. 637-640.
136. Archibald, S.A., J.C. Head, N. Gozzard, D.W. Howat, T.A.H. Parton, J.R. Porter, M.K. Robinson, A. Shock, G.J. Warrelow, and W.M. Abraham,

- Discovery and Evaluation of Potent, Tyrosine-based $\alpha 4\beta 1$ Integrin Antagonists.* Bioorg. Med. Chem.Lett., 2000. **10**: p. 997-999.
137. Porter, J.R., S.C. Archibald, K. Childs, D. Critchley, J.C. Head, J.M. Linsley, T.A.H. Parton, M.K. Robinson, A. Shock, R.J. Taylor, G.J. WarreLOW, R.P. Alexander, and B. Langham, *Squaric Acid Derivatives as VLA-4 Integrin Antagonists.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 2002. **12**: p. 1051-1054.
138. Castanedo, G.M., F.C. Sailes, N.J.P. Dubree, J.B. Nicholas, L. Caris, K. Clark, S.M. Keating, M.H. Beresini, H. Chiu, S. Fong, J.C. Marsters, D.Y. Jackson, and D.P. Sutherlin, *Solid-Phase Synthesis of Dual $\alpha 4\beta 1/\alpha 4\beta 7$ Integrin Antagonists: Two Scaffolds with Overlapping Pharmacophores.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 2002. **12**: p. 2913-2917.
139. Dyatkin, A.B., W.J. Hoekstra, W.A. Kinney, M. Kontoyianni, R.J. Santulli, E.S. Kimball, M.C. Fisher, S.M. Prouty, W.M. Abraham, P. Andrade-Gordon, D.J. Hlasta, W. He, P.J. Hornby, B.P. damiano, and B.E. Maryanoff, *Aza-bicyclic amino acid sulfonamides as $\alpha 4 \beta 1/\alpha 4 \beta 7$ integrin antagonists.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 2004. **14**: p. 591-596.
140. Chiba, J., N. Machigana, T. Takashi, A. Ejima, G. Takayama, M. Yokoyama, A. Nakayama, J.J. Baldwin, E. McDonald, K.W. Saionz, R. Swanson, Z. Hussain, and A. Wong, *Identified a morpholinyl-4-piperidinylacetic acid derivative as a potent oral active VLA-4 antagonist.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 2005. **15**: p. 41-45.
141. Hoshina, Y., S. Ikegami, A. Okuyama, H. Fukui, K. Inoguchi, T. Maruyama, K. Fujimoto, Y. Matsumura, A. Aoyama, T. Harada, H. Tanaka, and T. Nakamura, *2,3-Diphenylpropionic acids as potent VLA-4 antagonists.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 2005. **15**: p. 217-220.
142. Yong, K. and A. Khwaja, *Leucocyte cellular adhesion molecules.* Blood Reviews, 1990. **4**(4): p. 211-225.
143. Harris, E.S., T.M. McIntyre, S.M. Prescott, and G.A. Zimmerman, *The Leukocyte Integrins.* J. Biol. Chem., 2000. **275**(31): p. 23409-23412.
144. Gahmberg, C.G., L. Valmu, S. Fagerholm, P. Kotovuori, E. Ihanus, L. Tian, and T. Pessa-Morikawa, *Leukocyte integrins and inflammation.* Cell Mol. Life Sci., 1998. **54**(6): p. 549-555.
145. Seth, R., R. Salcedo, M. Patarroyo, and M.W. Makgoba, *ICAM-2 peptides mediate lymphocyte adhesion by binding to CD11a/CD18 and CD49d/CD29 integrins.* FEBS Letters, 1991. **282**(1): p. 193-196.
146. Staunton, D.E., M.L. Dustin, and T.A. Springer, *Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1.* Nature, 1989. **339**: p. 61-4.
147. Vugmeyster, Y., T. Kikuchi, M.A. Lowes, F. Chamian, M. Kagen, P. Gilleaudeau, E. Lee, K. Howell, S. Bodary, W. Dummer, and J.G. Krueger, *Efalizumab (anti-CD11a)-induced increase in peripheral blood leukocytes in psoriasis patients is preferentially mediated by altered trafficking of memory CD8+ T cells into lesional skin.* Clinical Immunology, 2004. **113**(1): p. 38-46.
148. Walzog, B., D. Schuppan, C. Heimpel, A. Hafezi-Moghadam, P. Gaehtgens, and K. Ley, *The Leukocyte Integrin Mac-1 (CD11b/CD18) Contributes to Binding of*

- Human Granulocytes to Collagen*. Experimental Cell Research, 1995. **218**(1): p. 28-38.
149. Ugarova, T.P., V.K. Lishko, N.P. Podolnikova, N. Okumura, S.M. Merkulov, V.P. Yakubenko, V.C. Yee, S.T. Lord, and T.A. Haas, *Sequence gamma377-395(P2), but not gamma190-202(P1), Is the Binding Site for the alphaMI-Domain of Integrin alphaM beta2 in the gammaC-Domain of Fibrinogen*. Biochemistry, 2003. **42**: p. 9365-9373.
 150. Springer, T.A., L.J. Miller, and D. C. Anderson, *p150,95, the third member of the Mac-1, LFA-1 human leukocyte adhesion glycoprotein family*. J. Immunol., 1986. **136**: p. 230-245.
 151. Van der Vieren, M., H. Le Trong, C.L. Wood, P.F. Moore, T.S. John, D.E. Staunton, and W.M. Gallatin, *A novel leukointegrin, [alpha]d[beta]2, binds preferentially to ICAM-3*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 683-690.
 152. Michishita, M., V. Videm, and M. Amin Arnaout, *A novel divalent cation-binding site in the alpha domain of the [beta]2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding*. Cell, 1993. **72**(6): p. 857-867.
 153. Anderson, D.C. and T.A. Springer, *Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins*. Annual Review Of Medicine, 1987. **38**: p. 175-194.
 154. Hogg, N. and P.A. Bates, *Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes*. Matrix Biology, 2000. **19**(3): p. 211-222.
 155. Bernstein, C.N., M. Sargent, and W.M. Gallatin, *[beta]2 Integrin/ICAM Expression in Crohn's Disease*. Clinical Immunology and Immunopathology, 1998. **86**(2): p. 147-160.
 156. Nakakura, E.K., R.A. Shorthouse, B. Zheng, S.M. McCabe, P.M. Jardieu, and R.E. Morris, *Long-term survival of solid organ allografts by brief anti-lymphocyte function-associated antigen-1 monoclonal antibody monotherapy*. Transplantation, 1996. **62**(5): p. 547-552.
 157. Gauvreau, G.M., A.B. Becker, L.-P. Boulet, J. Chakir, R.B. Fick, W.L. Greene, K.J. Killian, P.M. O'Byrne, J.K. Reid, and D.W. Cockcroft, *The effects of an anti-CD11a mAb, efalizumab, on allergen-induced airway responses and airway inflammation in subjects with atopic asthma*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2003. **112**(2): p. 331-338.
 158. Giblin, P.A. and T.A. Kelly, *Antagonists of beta2 Integrin-Mediated Cell Adhesion*. Ann. Rep. Med. Chem., 2001. **36**(chapter 18, section 4): p. 181-190.
 159. Kelly, T.A., D.D. Jeanfavre, D.W. McNeil, J. J. R. Woska, P.L. Reilly, E.A. Mainolfi, K.M. Kishimoto, G.H. Nabozny, R. Zinter, B.-J. Bormann, and R. Rothlein, *Cutting Edge: A small Molecule Antagonist of LFA-1-Mediated Cell Adhesion*. The Journal of Immunology, 1999: p. 5173-5177.
 160. Frutos, R.P., S. Stehle, L. Nummy, and N. Yee, *An improved synthesis of N-aryl-hydantoin LFA-1 antagonists via the enantiospecific alkylation of an isobutyraldehyde-derived imidazolinone template*. Tetrahedron: Asymmetry, 2001. **12**: p. 101-104.

161. Woska, J.R., Jr., D.-t. Shih, V.R. Taqueti, N. Hogg, T.A. Kelly, and T.K. Kishimoto, *A small-molecule antagonist of LFA-1 blocks a conformational change important for LFA-1 function*. *J Leukoc Biol*, 2001. **70**(2): p. 329-334.
162. Winquist, R.J., S. Desai, S. Fogal, N.A. Haynes, G.H. Nabozny, P.L. Reilly, D. Souza, and M. Panzenbeck, *The role of leukocyte function-associated antigen-1 in animal models of inflammation*. *European Journal of Pharmacology*, 2001. **429**(1-3): p. 297-302.
163. Yee, N.K., L.J. Nummy, R.P. Frutos, J.J. Song, E. Napolitano, D.P. Byrne, P.-J. Jones, and V. Farina, *Practical synthesis of a cell adhesion inhibitor by self-regeneration of stereocenters*. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003. **14**(22): p. 3495-3501.
164. Potin, D., M. Launay, E. Nicolai, M. Fabreguette, P. Malabre, F. Caussade, D. Besse, S. Skala, D.K. Stetsko, and G. Todderud, *De novo design, synthesis, and in vitro activity of LFA-1 antagonists based on a bicyclic[5.5]hydantoin scaffold*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005. **15**(4): p. 1161-1164.
165. Kallen, J., K. Welzenbach, P. Ramage, D. Geyl, R. Kriwacki, G. Legge, S. Cottens, G. Weitz-Schmidt, and U. Hommel, *Structural basis for LFA-1 inhibition upon lovastatin binding to the CD11a I-domain*. *Journal of Molecular Biology*, 1999. **292**(1): p. 1-9.
166. BAUER, W., S. COTTENS, D. GEYL, G. WEITZ-SCHMIDT, J. KALLEN, and U. HOMMEL, *LYMPHOCYTE FUNCTION ANTIGEN-1 ANTAGONISTS*, in WO9911258. 1999, Novartis.
167. Weitz-Schmidt, G., *Statins as anti-inflammatory agents*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2002. **23**(10): p. 482-487.
168. Liu, G., J.T. Link, Z. Pei, E.B. Reilly, S. Leitza, B. Nguyen, K.C. Marsh, G.F. Okasinski, T.W.v. Geldern, M. Ormes, K. Fowler, and M. Gallatin, *Discovery of novel p-arylthio cinnamides as antagonists of leukocyte function-associated antigen-1/intracellular adhesion molecule-1 interaction. 1. Identification of an additional binding pocket based on an anilino diaryl sulfide lead*. *J Med Chem.*, 2000. **43**(21): p. 4025-40.
169. Liu, G., J.R. Ruth, E.T. Olejniczak, R. Mendoza, P. DeVries, S. Leitza, E.B. Reilly, G.F. Okasinski, S.W. Fesik, and T.W.v. Geldern, *Novel p-Arylthio Cinnamides as Antagonists of LFA-1/ICAM-1 Interaction. 2. Mechanism of Inhibition and Structure-Based Improvement of Pharmaceutical Properties*. *J. Med. Chem.*, 2001. **44**: p. 1202-1210.
170. Win, M., E.B. Reilly, G. Liu, J.R. Huth, H.-S. Jae, J. Freeman, Z. Pei, Z. Xin, J. Lynch, J. Kester, T.W.v. Geldern, S. Leitza, P. DeVries, R. Dickinson, D. Mussatto, and G.F. Okasinski, *Novel p-Arylthio Cinnamides as Antagonists of LFA-1/ICAM-1 Interaction. 4. SAR of Substituents on the Benzene Ring of the Cinnamide*. *J. Med. Chem.*, 2001. **44**: p. 4393-4403.
171. Debnath, B., S. Samanta, K. Roy, and T. Jha, *QSAR Study on some p-Arylthio Cinnamides as Antagonists of Biochemical ICAM-1/LFA-1 Interaction and ICAM-*

- 1/Y-8 Cell Adhesion in Relation to Anti-inflammatory Activity. *Bioorg. Med. Chem.*, 2003. **11**: p. 1615-1619.
172. Link, J.T., B. Sorensen, G. Liu, Z. Pei, E.B. Reilly, S. Leitza, and G. Okasinski, *Discovery and SAR of diarylsulfide cyclopropylamide LFA-1/ICAM-1 interaction antagonists*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2001. **11**(8): p. 973-976.
173. Wang, G.T., S. Wang, R. Gentles, T. Sowin, S. Leitza, E.B. Reilly, and T.W. von Geldern, *Amino-substituted heterocycles as isosteres of trans-cinnamides: design and synthesis of heterocyclic biaryl sulfides as potent antagonists of LFA-1/ICAM-1 binding*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005. **15**(1): p. 195-201.
174. Wattanasin, S., R. Albert, C. Ehrhardt, D. Roche, M. Sabio, U. Hommel, K. Welzenbach, and G. Weitz-Schmidt, *1, 4-Diazepane-2-ones as Novel Inhibitors of LFA-1*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003. **13**: p. 499-502.
175. Wattanasin, S., J. Kallen, S. Myers, Q. Guo, M. Sabio, C. Ehrhardt, R. Albert, U. Hommel, G. Weckbecker, K. Welzenbach, and G. Weitz-Schmidt, *1,4-Diazepane-2,5-diones as novel inhibitors of LFA-1*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005. **15**(4): p. 1217-1220.
176. Burdick, J.D., *Antagonists for treatment of CD11/CD18 adhesion receptor mediated disorders*, in WO9949856. 1999: US.
177. Fotouhi, N., *Dehydroaminoacids*, in WO0158853. 2001: CH.
178. Schober, J.M., L.F. Lau, T.P. Ugarova, and S.C.-T. Lam, *Identification of a Novel Integrin alphaM beta2 Binding Site in CCN1 (CYR61), a Matricellular Protein Expressed in Healing Wounds and Atherosclerotic Lesions*. *J. Biol. Chem.*, 2003. **278**(28): p. 25808-25815.
179. Koivunen, E., T.-M. Ranta, A. Annala, S. Taube, A. Uppala, M. Jokinen, G.v. Willigen, E. Ihanus, and C.G. Gahmberg, *Inhibition of β 2 Integrin-mediated Leukocyte Cell adhesion by Leucine-Leucine-Glycine Motif-containing Peptides*. *J. Cell. Biol.*, 2001(153): p. 905-915.
180. Stefanidakis, M., M. Björklund, E. Ihanus, and C.G. Gahmberg, *Identification of a Negatively Charged Peptide Motif within the Catalytic Domain of Progelatinases That Mediates Binding to Leukocyte beta 2 Integrins*. *J. Biol. Chem.*, 2003. **278**(36): p. 34674-34684.

