



**HAL**  
open science

# Conception, synthèse et évaluation de composés interagissant avec la dégradation des protéines pour le traitement de maladies neurodégénératives

Marion Gay

► **To cite this version:**

Marion Gay. Conception, synthèse et évaluation de composés interagissant avec la dégradation des protéines pour le traitement de maladies neurodégénératives. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S056 . tel-03278032

**HAL Id: tel-03278032**

**<https://theses.hal.science/tel-03278032>**

Submitted on 5 Jul 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LILLE – DROIT ET SANTE  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

THESE

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE**  
*Spécialité : Science du médicament*

Présentée et soutenue à huis clos  
le 24 Septembre 2015

par

**Marion GAY**  
*Ingénieur E.N.S.I.A.C.E.T*

**CONCEPTION, SYNTHÈSE ET EVALUATION DE  
COMPOSES INTERAGISSANT AVEC LA  
DEGRADATION DES PROTEINES POUR LE  
TRAITEMENT DE MALADIES  
NEURODEGENERATIVES**

**CONFIDENTIEL**

Membres du Jury

Directeur de thèse : **P. Carato**, Professeur, Université de Poitiers  
Co-directeur de thèse : **P. Melnyk**, Professeur, Université de Lille 2  
Rapporteurs : **S. Ongeri**, Professeur, Université de Paris Sud  
**L. Maillard**, Maître de conférences HDR, Université de Montpellier  
Examineurs : **S. Routier**, Professeur, Université d'Orléans  
**F. Fabis**, Professeur, Université de Caen  
**N. Sergeant**, Directeur de recherche, UMR-S1172

# **Note de confidentialité**

Le présent manuscrit est classé confidentiel. Par conséquent, sa diffusion est limitée aux membres du jury de thèse et sa consultation est soumise à l'autorisation du Pr. Patricia Melnyk (UMR-S1172, équipe Onco et Neurochimie).

# Remerciements

Mes remerciements vont dans un premier temps au **Professeur Patricia Melnyk**, directrice du laboratoire « Onco et Neurochimie », et ma co-directrice de thèse, qui m'a offert l'opportunité de réaliser ces travaux au sein de son équipe. Sa confiance, son soutien et ses conseils m'ont été indispensables pour le bon déroulement de ce travail de thèse. Je remercie également le **Professeur Pascal Carato**, mon directeur de thèse, pour sa présence, son encadrement et son écoute. Je vous remercie de votre confiance qui m'a permis d'avoir une certaine autonomie dans mes travaux.

Je souhaite remercier mes rapporteurs le **Professeur Sandrine Onger** et le **Docteur Ludovic Maillard** et mes examinateurs le **Professeur Sylvain Routier**, le **Professeur Frédéric Fabis** et le **Docteur Nicolas Sergeant** d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. Je vous exprime ma sincère gratitude pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce manuscrit et l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

Ce projet multidisciplinaire a nécessité l'implication de plusieurs laboratoires de recherches et je tiens à présenter mes sincères remerciements à chacun d'entre eux.

J'exprime mes profonds remerciements au **Docteur Nicolas Sergeant** et aux membres de son équipe qui ont participé activement à ce projet, **Sabiha Eddarkaoui** et **Céline Becquart**. Grâce à leur travail, la protéine p97/VCP a pu être produite et tous les composés présentés dans cette thèse ont été testés.

De même, j'adresse mes remerciements au **Professeur Nathalie Azaroual** et à **Pierre Larzillière**, qui m'ont aidé et accompagné dans le développement du test de RMN-STD. Merci infiniment du temps que vous m'avez consacré, de votre patience et de votre aide.

Mes remerciements vont ensuite à toute l'équipe du CUMA dirigée par le **Professeur Jean-François Goossens**, et particulièrement à **Céline Lenglard** qui m'a formé à l'extraction de cerveaux et au **Docteur Mostafa Kouach** qui m'a initié à la LC-MRM. Votre disponibilité, votre implication et votre soutien lorsque le RPEL nous donnait du fil à retordre m'ont beaucoup touché.

J'adresse également mes remerciements à **Amélie Barczyk** de l'ICPAL qui a réalisé les tests de cytotoxicité des composés.

Merci aux modélisateurs pour leur travail : le **Docteur Amaury Farce** et le **Docteur Nicolas Renault**. Merci du temps que vous m'avez consacré afin de m'expliquer votre travail et de me former à l'utilisation du pharmacophore.

Je remercie également la société **AlzProtect** qui a réalisé les tests d'affinité.

Merci aux membres de l'équipe d'interactions moléculaires de la plate-forme d'Imagerie Moléculaire et Cellulaire **Pierre-Marie Danze** et **Anne-Sophie Drucbert** et au **Docteur Catherine Foulon** du laboratoire de chimie analytique pour leur travail en SPR et en thermophorèse.

Je remercie bien sûr les membres de l'équipe « Onco et Neurochimie » impliqués dans le projet : **Noémie Deguine** et **Paul-Emmanuel Larchanché** qui ont participé à la synthèse de composés, **Mathilde Coevoet** qui réalise depuis mars les tests cellulaires et produit la protéine p97/VCP et le **Docteur Jamal El Bakali** qui a récemment hérité de ce beau projet. Un merci aussi aux stagiaires écossais qui ont travaillé avec moi : **Aisté Skorupskaite** et **Adam Devis**. C'était un plaisir de vous encadrer et de pouvoir pratiquer l'anglais avec vous.

Je tiens à exprimer mes remerciements aux différents laboratoires de la faculté de pharmacie grâce à qui j'ai pu réaliser les analyses de mes composés ou certaines de mes réactions. Un grand merci à **Vincent Ultré** et aux membres du Laboratoire d'Application de Résonance Magnétique Nucléaire (LARMN). Je remercie également le laboratoire de Drugs and Molecules for Living Systems et notamment **Catherine Piveteau** pour m'avoir formé à l'utilisation de la LC-MS. Merci à **Frédérique Klupsch** de l'ICPAL qui m'a permis d'utiliser le système d'hydrogénation catalytique.

Lors de ma troisième année de thèse, j'ai eu l'opportunité de réaliser du monitorat. Je remercie ainsi mon tuteur pédagogique le **Professeur Stéphanie Delbaere** de m'avoir donné cette chance. Je remercie également le **Docteur Jérôme Berthet** avec qui j'ai participé au TP de Sciences analytiques de deuxième année de pharmacie et le **Docteur Laurence Agouridas** avec qui j'ai participé aux TP de chimie générale de première année de DEUST.

Je tiens maintenant à remercier du fond du cœur les membres du laboratoire de « Onco et Neurochimie », ma seconde famille. **Laurence**, « la super maman », tu as été ma voix de la sagesse, toujours de bons conseils (chimiques ou non), sachant me rassurer et m'encourager dans les moments de doute. Je serais prête à te dédier une usine de M&M's si je le pouvais. **Valeria**, je te remercie de ton soutien irremplaçable durant ces trois années de thèse. Nos moments musicaux sont inoubliables. Je remercie ensuite ma miss trucs et astuces, **Floriane**. Je te remercie de ton soutien et de ta compréhension lors de mes petits moments d'égaré dans le bureau. Un grand merci à ma basque préférée, **Elodie**. C'était un honneur d'être ta béquille émotionnelle. Entendre ton accent chantant est un plaisir et me rappelle mon pays. Merci également à **Polo**, le Chabal de la chimie, **Fabrice**, l'italiano, **Philippe** grâce à qui je parle couramment Ch'ti, **Jamal** qui sait toujours me ramener à la réalité et **Christophe**, le Lucky Luke du labo qui synthétise les produits plus vite que son ombre. Je remercie également les hommes du fond du couloir dont l'univers reste encore obscur à mes yeux : **Nicolas**, **Amaury** et **Xavier**. Merci également aux deux secrétaires de choc avec qui j'ai eu la chance de travailler : **tata Cocole** et sa réserve intarissable de bonbons et **Ayano** qui a subi mes commandes toujours urgentes.

Je tiens également à remercier les personnes de Chimie T1 pour leurs précieux conseils lors des différentes réunions et pour les bons moments que nous avons échangés : le **Professeur Pascal Berthelot**, le **Docteur Nicolas Lebègue**, le **Docteur Saïd Yous**, le **Docteur Julien Leclercq**, le **Docteur Aurélien Tourteau**, **Romain Duroux** et **Nathalie Flouquet**.

Je souhaite remercier mes amis chimistes, qui même loin, restent dans mon cœur : **Sarah**, ma belle américaine, **Aurélien** mon pseudo-british préféré, **Clément** qui est toujours content, ma poitevine **Florence** et mon collègue A7ien **Jonathan**. Toutes vos attentions, l'intérêt que vous avez porté à mon travail et votre soutien au cours de ces trois ans m'ont beaucoup touché.

Je tiens à remercier du plus profond de mon cœur **mes parents** et ma **grand-mère** qui m'ont soutenu tout au long de mon parcours et qui ont toujours cru en moi. Voir la fierté dans vos yeux est la plus belle de mes récompenses. Je remercie également **mon frère**, **ma sœur**, et **leurs conjoints** qui m'ont toujours encouragé. Je veux également remercier mes quatre petits rayons de soleil, dont le sourire suffit à balayer tous mes soucis : **Louise**, **Faustine**, **Mathis** et **Alexandre**. Je remercie également **ma belle famille** pour son soutien. Je suis bien consciente que pour vous tous le monde de la chimie reste obscur et je vous remercie d'essayer de le comprendre.

Je souhaite bien évidemment remercier mon partenaire de vie, **Aurélien**. Tu m'as toujours soutenu durant mon parcours du DUT jusqu'à la thèse. Je te remercie infiniment de m'avoir suivi dans cette aventure lilloise et d'avoir laissé famille, amis et travail. Tu as toujours été là pour moi aussi bien dans les bons que

dans les mauvais moments. Une nouvelle page de notre histoire va s'ouvrir et je suis sûre qu'elle nous réserve de belles choses.

Finalement, mes derniers remerciements sont pour vous **Maria**. Vous m'avez accueilli comme votre fille et m'avait toujours encouragé. Vous resterez pour moi un modèle de force et de courage. L'opportunité de connaître une aussi belle personne que vous ne se présente qu'une fois dans une vie, et je suis heureuse et fière d'avoir eu cette chance.

*« Le succès, c'est se promener d'échecs en échecs tout en restant motivé. »*

***Winston Churchill***

*A Maria*

# Publications et communications

Ce travail a donné lieu aux brevet, publication et communications suivants :

## Brevet :

Novel 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine derivative and its use, P. Melnyk, N. LeFur, **M. Gay**, N. Sergeant, L. Buée, Brevet européen déposé le 16 mars 2015 sous le n° EP 15305384.8.

## Publication :

*Multi-target drugs prevents neurofibrillary degeneration, amyloid deposition and improves cognitive functions in animal models of Alzheimer's disease*, N. Sergeant, V. Vingtdeux, **M. Gay**, S. Eddarkaoui, N. Lefur, C. Laurent, R. Caillierez, H. Obriot, P.-E. Larchanché, A. Farce, P. Carato, P. Dallemagne, V. Buée-Scherrer, D. Blum, M. Hamdane, L. Buée, P. Melnyk, Nat. Chem. Biol. (soumis le 15 juillet 2015)

## Communication orale :

*Design, synthesis and evaluation of compounds interacting with protein degradation for the treatment of neurodegenerative diseases*, 6<sup>th</sup> PhD student day JPArc, Lille, 28 janvier 2015. Prix de la meilleure communication orale de doctorant de troisième année.

## Communications par affiches :

**M. Gay**, P. Dallemagne, N. Sergeant, P. Carato, P. Melnyk. *New multi-action hybrid compounds interacting with Acetylcholinesterase for the treatment of neurodegenerative diseases*, 15<sup>ème</sup> Rencontres de Chimie Organique et Biologique (RECOB), Aussois, 23-27 mars 2014.

**M. Gay**, P. Dallemagne, N. Sergeant, P. Carato, P. Melnyk. *Nouveaux composés mixtes multi-actions interagissant avec l'Acétylcholinestérase pour le traitement de maladies neurodégénératives*, Journée Scientifique du PRIM, Lille, 26 juin 2014.

**M. Gay**, P. Dallemagne, N. Sergeant, P. Carato, P. Melnyk. *Design, synthesis and evaluation of compounds interacting with protein degradation for the treatment of neurodegenerative diseases*, Journée André Verbert, Colloque annuel des doctorants, Lille, 11 septembre 2014.

**M. Gay**, N. LeFur, S. Eddarkaoui, V. Vingtdeux, P.-E. Larchanché, P. Carato, A. Farce, P. Dallemagne, N. Sergeant, P. Melnyk. *New multitarget inhibitors of the acetylcholinesterase for the treatment of Alzheimer disease*, AD/PD 2015, Nice, 18-22 mars 2015.

**M. Gay**, N. LeFur, S. Eddarkaoui, V. Vingtdeux, P.-E. Larchanché, P. Carato, A. Farce, P. Dallemagne, N. Sergeant, P. Melnyk. *New multitarget compounds interacting with Acetylcholinesterase for the treatment of Alzheimer's disease*, XXII<sup>e</sup> Journées AECCPCM, Nancy, 11-12 juin 2015.



# Sommaire

<b>NOTE DE CONFIDENTIALITE</b>	<b>1</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>2</b>
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b>	<b>6</b>
<b>SOMMAIRE</b>	<b>7</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>10</b>
<b>TABLE DES SCHEMAS</b>	<b>14</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b>	<b>15</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>18</b>
<b>CHAPITRE 1 : LA MALADIE D'ALZHEIMER</b>	<b>20</b>
<b>A. La maladie d'Alzheimer, une maladie neurodégénérative</b>	<b>21</b>
<b>B. Historique</b>	<b>22</b>
<b>C. Aspects cliniques</b>	<b>23</b>
1. Les stades de la maladie	23
2. Le diagnostic	24
3. Prévalence	24
<b>D. Physiopathologie</b>	<b>25</b>
1. Les plaques amyloïdes	25
2. Les lésions neurofibrillaires	26
3. Lien entre Tau et A $\beta$	28
4. Déficit synaptique	29
5. Dysfonctionnement mitochondrial	29
6. Neuroinflammation	30
<b>E. Traitements</b>	<b>31</b>
1. Les traitements médicamenteux	31
2. Les traitements non médicamenteux	33
3. Nouvelles approches thérapeutiques	33
<b>CHAPITRE 2 : GENESE DU PROJET</b>	<b>45</b>
<b>A. Les antipaludiques comme source de molécules lysosomotropiques</b>	<b>46</b>
<b>B. Des antipaludiques aux anti-Alzheimer</b>	<b>47</b>
1. Développement des MSBD	48
2. Développement des PMAD	48
<b>C. Résultats biologiques des familles MSBD et PMAD</b>	<b>49</b>
1. Relations structure-activité des MSBD	50
2. Relations structure-activité des PMAD	50
<b>D. Un composé en développement clinique, l'AZP2006</b>	<b>51</b>
<b>E. Identification de la cible</b>	<b>53</b>
1. Chromatographie d'affinité suivie d'une compétition d'affinité streptavidine-biotine	54
2. Photomarquage	55
3. Tests cellulaires préliminaires	57

<b>CHAPITRE 3 : LA PROTEINE P97/VCP</b>	<b>58</b>
<b>A. Structure</b>	<b>59</b>
<b>B. p97/VCP, protéine aux fonctions variées</b>	<b>61</b>
1. p97/VCP et le système Ubiquitine/Proteasome (UPS)	63
2. p97/VCP et l'ERAD	63
3. p97/VCP et la dégradation lysosomale	64
<b>C. Maladies liées à p97/VCP</b>	<b>65</b>
1. Les maladies neurodégénératives	65
2. Les cancers	67
<b>D. Ligands de p97/VCP</b>	<b>67</b>
<b>CHAPITRE 4 : VALIDATION DE LA CIBLE</b>	<b>70</b>
<b>A. Les différentes techniques envisageables</b>	<b>71</b>
1. Test d'affinité sur plaques de Nickel	71
2. Test FRET	71
3. RMN	72
4. Résonance plasmonique de surface	72
5. Thermophorèse à micro-échelle	73
6. Calorimétrie de titration isotherme	74
<b>B. Développement d'un test FRET</b>	<b>75</b>
1. Principe	75
<b>C. RMN-STD</b>	<b>81</b>
1. Principe	81
2. Essais réalisés	81
<b>CHAPITRE 5 : CONCEPTION, SYNTHÈSE ET EVALUATION DE LIGANDS</b>	<b>86</b>
<b>A. Conception guidée par modélisation moléculaire</b>	<b>87</b>
1. Structure-based (Pr P. Chavatte)	87
2. Ligand-based (collab. Pr P. Chavatte)	90
<b>B. Validation du modèle pharmacophorique – Tests in vitro</b>	<b>92</b>
1. Affinité pour p97/VCP (AlzProtect)	93
2. Tests cellulaires (Dr. N. Sergeant)	93
3. Etude de l'interaction CB1-p97/VCP par RMN-STD	94
<b>C. Synthèse de ligands</b>	<b>95</b>
1. Synthèse de la famille D <sub>1</sub>	96
2. Synthèse de la famille D <sub>2</sub>	107
3. Evaluation biologique des familles D <sub>1</sub> et D <sub>2</sub>	114
4. Synthèse de la famille E <sub>1</sub>	119
5. Synthèse de la famille E <sub>2</sub>	122
6. Evaluation biologique des familles E <sub>1</sub> et E <sub>2</sub>	126
<b>CHAPITRE 6 : CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE COMPOSÉS MIXTES MSBD-IACHE</b>	<b>129</b>
<b>A. Rationnel des composés mixtes</b>	<b>130</b>
<b>B. Synthèse des composés mixtes</b>	<b>131</b>
<b>C. Evaluation in vitro des composés mixtes</b>	<b>134</b>
1. Action sur l'acétylcholinestérase (Pr. Dallemagne, CERMN de Caen (EA4258))	134

2.	Cytotoxicité (Dr N. Sergeant)	135
3.	Autophagie (Dr N. Sergeant)	135
4.	Effet sur le métabolisme de l'APP (Dr N. Sergeant)	136
5.	Action sur Tau (Dr N. Sergeant)	138
6.	Evaluation par RMN-STD	138
<b>D.</b>	<b>Evaluation in vivo du RPEL (Dr N. Sergeant)</b>	<b>140</b>
<b>E.</b>	<b>Dosage du RPEL dans le cerveau des souris traitées</b>	<b>142</b>
1.	Principe du dosage : LC-MRM	142
2.	Synthèse du RPEL deutéré	143
3.	Etude de fragmentation du RPEL et du RPEL-d <sub>14</sub> (collab. CUMA)	146
4.	Essais préliminaires pour le dosage par LC-MRM (CUMA)	148
5.	Développement d'une gamme de dosage (collab. CUMA)	149
	<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>151</b>
	<b>ET PERSPECTIVES</b>	<b>151</b>
	<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	<b>156</b>
<b>A.</b>	<b>Chemical synthesis</b>	<b>157</b>
1.	Material and instrumentation	157
2.	General procedure	158
3.	Synthesis of biotinylated probes	160
4.	Synthesis of D <sub>1</sub> family	166
5.	Synthesis of D <sub>2</sub> family	187
6.	Synthesis of E <sub>1</sub> family	198
7.	Synthesis of E <sub>2</sub> family	211
8.	Synthesis of multitarget compounds	225
<b>B.</b>	<b>Biological evaluation</b>	<b>233</b>
1.	Cell Culture and Treatment	233
2.	Cytotoxicity assay	233
3.	Western Blot Analysis	233
4.	Secreted A $\beta$ <sub>1-38</sub> , A $\beta$ <sub>1-40</sub> , A $\beta$ <sub>1-42</sub> , and sAPP $\alpha$ Quantification	234
5.	STD NMR experiments	234
<b>C.</b>	<b>LC-MRM</b>	<b>234</b>
1.	Brain extraction	234
2.	Analysis	234
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>236</b>

# Table des figures

Figure 1. Modèle du mauvais repliement et fibrilisation de protéines.....	22
Figure 2. Photographie d'Auguste D. de 1902. ....	23
Figure 3. DNF d'Auguste D., dessiné par A. Alzheimer.....	23
Figure 4. Métabolisme de l'APP. ....	25
Figure 5. Développement des plaques amyloïdes dans le cerveau. ....	26
Figure 6. Stabilisation des microtubules par une protéine Tau normale et désintégration d'un microtubule due à une hyper et anormale phosphorylation de Tau. ....	27
Figure 7. Développement de la DNF dans le cerveau. ....	27
Figure 8. A $\beta$ et Tau : trois modèles d'interactions possibles.....	28
Figure 9. Mécanisme du dysfonctionnement mitochondrial dans la MA. ....	30
Figure 10. Processus de neuroinflammation.....	31
Figure 11. La Tacrine ( <i>Cognex</i> ®), premier inhibiteur d'acétylcholinestérase.....	32
Figure 12. IACHe commercialisés. ....	32
Figure 13. Huperzine A. ....	32
Figure 14. La mémantine ( <i>Ebixa</i> ®), antagoniste des récepteurs NMDA. ....	32
Figure 15. GLN-1062 ( <i>Memogain</i> ®).....	33
Figure 16. Fluorure de méthylsulfonyl. ....	33
Figure 17. Talsaclidine, agoniste M1. ....	34
Figure 18. Ispronidine, agoniste $\alpha_4\beta_2$ . ....	34
Figure 19. Les différentes stratégies thérapeutiques contre la tauopathie. ....	34
Figure 20. Le valproate de sodium et le tideglusib, inhibiteurs de GSK3.....	35
Figure 21. La paclitaxel, stabilisateur de microtubules. ....	35
Figure 22. Le bleu de méthylène.....	36
Figure 23. Leuco-méthylthionium. ....	36
Figure 24. La curcumine, inhibiteur de HSP90. ....	36
Figure 25. Les différentes stratégies thérapeutiques contre A $\beta$ . ....	37
Figure 26. Composés agissant sur les sécrétases. ....	38
Figure 27. Le tramiprosate, antiagrégant d'A $\beta$ . ....	38
Figure 28. Vitamine E, un antioxydant. ....	39
Figure 29. Composés visant les mitochondries. ....	39
Figure 30. Exemples d'inhibiteurs mixtes AChE et antiagrégation du peptide A $\beta$ .....	41
Figure 31. Exemples d'inhibiteurs mixtes de l'AChE et de la $\beta$ -sécrétase. ....	42
Figure 32. Exemples d'inhibiteurs mixtes de l'AChE et des MAO. ....	43
Figure 33. Exemples d'IACHe à activité antioxydante. ....	44
Figure 34. Donécopride.....	44
Figure 35. Action de dérivés de la chloroquine sur le métabolisme de l'APP. ....	47
Figure 36. Sécrétion du peptide A $\beta_{42}$ à 5 $\mu$ m après 6 et 24 heures. ....	47
Figure 37. Schéma de développement des MSBD et des PMAD. ....	48
Figure 38. Structure générale des MSBD. ....	48
Figure 39. Structure générale des PMAD. ....	48
Figure 40. Influence des composés sur la sécrétion des fragments C terminaux. ....	49
Figure 41. Influence des composés sur la sécrétion d'A $\beta_{40}$ . ....	49

Figure 42. Structure générale des MSBD et RSA.....	50
Figure 43. Les deux composés les plus actifs de la famille MSBD.....	50
Figure 44. Structure générale des PMAD et RSA.....	50
Figure 45. Les trois composés les plus actifs de la famille PMAD.....	51
Figure 46. Action de l'APZ2006 sur le métabolisme de l'APP.....	52
Figure 47. Effets bénéfiques des MSBD sur des souris Thy-Tau22.....	53
Figure 48. Coloration immunohistochimique de Tau hyperphosphorylée à l'AT8 et histogramme du nombre de neurones dans l'hippocampe.....	53
Figure 49. Trois sites de substitutions envisageables.....	54
Figure 50. Structure des trois sondes envisagées.....	54
Figure 51. Schéma de principe de la chromatographie d'affinité.....	54
Figure 52. MSBD greffée sur résine de sépharose et MSBD biotinylée.....	55
Figure 53. Mécanisme du photomarquage.....	55
Figure 54. Structure du dérivé de l'AZP3012 photoactivable.....	56
Figure 55. Schéma de principe du photomarquage.....	56
Figure 56. Etude de l'action conjointe de p97/VCP et des MSBD sur la sécrétion du peptide A $\beta$ .....	57
Figure 57. Co-localisation de l'APP et de p97/VCP.....	57
Figure 58. Structure de p97/VCP.....	59
Figure 59. Structure d'un monomère de p97/VCP.....	60
Figure 60. Conservation interespèce de p97/VCP.....	61
Figure 61. Fonctions cellulaires de p97/VCP.....	62
Figure 62. Modèle général de l'intervention de p97/VCP dans l'ubiquitination.....	63
Figure 63. Mode d'extraction des protéines mal repliées de la lumière du RE par p97/VCP.....	64
Figure 64. Représentation des mutations de p97/VCP impliquées dans l'IBMPFD.....	66
Figure 65. DBeQ (inhibiteur de référence).....	68
Figure 66. Eeyarestatin I.....	68
Figure 67. 2-Anilino-4-aryl-1,3-thiazole.....	68
Figure 68. Alkylsulfanyl-1,2,4-triazoles.....	68
Figure 69. Composé 2-(cyclohexylmethylamino)pyrimidine.....	69
Figure 70. Sorafenib.....	69
Figure 71. Rapamycine.....	69
Figure 72. Structure générale de la famille KUSs.....	69
Figure 73. Schéma de principe du test d'affinité.....	71
Figure 74. Schéma de principe du FRET.....	72
Figure 75. Schéma de principe de la SPR.....	72
Figure 76. Schéma de principe de la thermophorèse.....	73
Figure 77. Schéma de suivi de la fluorescence en fonction de la concentration du ligand.....	73
Figure 78. Schéma de principe de l'ITC.....	74
Figure 79. Principe de fonctionnement du test FRET.....	75
Figure 80. Structure des deux nouvelles sondes.....	76
Figure 81. Linker biotinylé Biotin-dPEG(4)-OSu.....	77
Figure 82. Détermination du K <sub>D</sub> de la sonde 4.....	79
Figure 83. Détermination du K <sub>D</sub> de la sonde 6.....	79
Figure 84. Test de compétition avec l'AZP2006 préincubé à une concentration de sonde de 0,56 $\mu$ M.....	79
Figure 85. Test de compétition avec l'AZP2006 préincubé à une concentration de sonde de 3 $\mu$ M.....	80
Figure 86. Test de compétition avec l'AZP2006 préincubé à une concentration de sonde de 1,5 $\mu$ M.....	80

Figure 87. Test de compétition avec l'AZP2006 sans préincubation à une concentration de sonde de 1,5 $\mu$ M. .	80
Figure 88. Schéma d'une expérience de RMN-STD.....	81
Figure 89. Structures du TCEP.....	82
Figure 90. Spectre STD de l'AZP2006. ....	83
Figure 91. Structure de l'analogue non hydrolysable de l'ATP, sel de lithium hydraté d'adénosine 5'-( $\beta,\gamma$ -imido)triphosphate. ....	83
Figure 92. Zoom de la partie aromatique du spectre de RMN-STD de l'AZP2006. ....	83
Figure 93. Spectre STD de la sonde biotinyllée. ....	84
Figure 94. Compétition entre la sonde biotinyllée et l'AZP2006. ....	84
Figure 95. Spectres de RMN-STD des sondes 4 et 6.....	85
Figure 96. Composés utilisés pour l'étude structure-based. ....	87
Figure 97. Sites de fixation potentiels des composés à l'entrée du site à ATP/ADP du domaine D1. ....	88
Figure 98. Deux modes de liaison potentiels. ....	88
Figure 99. Mode de liaison 1. ....	89
Figure 100. Mode de liaison 2. ....	89
Figure 101. Zoom de la partie aromatique du spectre STD de la protéine tronquée avec l'AZP2006. ....	90
Figure 102. Zoom de la partie aromatique du spectre de RMN-STD de p97/VCP mutée avec l'AZP2006 .....	90
Figure 103. Structures des composés SA1107, AZP7015 et du pharmacophore commun.....	91
Figure 104. Procédé de screening virtuel d'une base de données de produits commerciaux. ....	91
Figure 105. Structure des neuf composés commandés (ChemBridge). ....	92
Figure 106. Pourcentage de diminution du signal par rapport à TH1-102.....	93
Figure 107. Influence des composés sur la sécrétion des peptides $A\beta_{38}$ , $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ . ....	94
Figure 108. Zoom de la partie aromatique du spectre de RMN-STD du composé CB1. ....	95
Figure 109. Sept familles identifiées. ....	95
Figure 110. Structure générale de la famille envisagée et modulations.....	96
Figure 111. Superposition d'un représentant de la famille D <sub>1</sub> (37) avec le pharmacophore ( $R_1 = R_2 = R_3 =$ pipéridine et $n = m = 1$ ). ....	96
Figure 112. Structure envisagée du produit secondaire. ....	100
Figure 113. Superposition du composé 68 sur le pharmacophore. ....	107
Figure 114. Produits <i>O</i> -substitué 70 et <i>N,N</i> -substitué 75. ....	110
Figure 115. Spectre RMN du mélange de <i>O</i> et <i>N,N</i> substitution.....	111
Figure 116. Spectre du composé <i>O</i> -substitué 70. ....	111
Figure 117. Spectre du composé <i>N,N</i> -substitué 75.....	112
Figure 118. Superposition de 80 et 81 sur le pharmacophore.....	116
Figure 119. Effet des composés 48, 57, 58, 72-74 sur la formation du fragment CTF $\alpha$ . ....	116
Figure 120. Effet des composés 48, 57, 58, 72-74 sur la formation du fragment AICD. ....	116
Figure 121. Spectres de RMN-STD du composé 74.....	117
Figure 122. Structure de la famille E1. ....	119
Figure 123. Superposition des composés de la famille E <sub>1</sub> réduits sur le pharmacophore. ....	119
Figure 124. Superposition des composés de la famille E <sub>1</sub> non réduits sur le pharmacophore. ....	119
Figure 125. Structure des produits secondaires formés durant la synthèse. ....	122
Figure 126. Structure générale de la famille E <sub>2</sub> . ....	122
Figure 127. Superposition des composés de la famille E <sub>2</sub> réduits sur le pharmacophore. ....	123
Figure 128. Superposition des composés de la famille E <sub>2</sub> non réduits sur le pharmacophore. ....	123
Figure 129. Rationnel des composés mixtes. ....	130
Figure 130. Positionnement des composés RPEL et MAG dans la poche de l'AChE. ....	131

Figure 131. Etude de toxicité des composés RPEL et MAG.....	135
Figure 132. Action du composé RPEL sur l'accumulation de Beclin 1 et p62.....	135
Figure 133. Processus de l'autophagie médiée par LC3.....	136
Figure 134. Action du composé RPEL sur l'accumulation de LC3-I et LC3-II .....	136
Figure 135. Influence des composés RPEL et MAG sur la sécrétion des CTF $\alpha$ et de l'AICD. ....	137
Figure 136. Influence des composés RPEL et MAG sur la sécrétion du peptide A $\beta$ .....	137
Figure 137. Effet du RPEL sur l'expression de BACE1.....	137
Figure 138. Effet des composés RPEL et MAG sur le clivage de l'APP-CTFs en AICD. ....	138
Figure 139. Effet des composés RPEL et MAG sur le clivage de $\Delta$ ENotch en NICD.....	138
Figure 140. Effet des composés RPEL et MAG sur l'expression et la phosphorylation de Tau. ....	138
Figure 141. Spectre de RMN-STD du composé RPEL.....	139
Figure 142. Spectre de RMN-STD du composé MAG. ....	139
Figure 143. Principe du test du labyrinthe en Y et résultats. ....	140
Figure 144. Analyse stéréologique dans l'hippocampe et le cortex des souris APP/PS1 traitées. ....	141
Figure 145. Effet du composé RPEL sur l'expression de l'APP et la formation du peptide A $\beta$ .....	141
Figure 146. Résultats des souris naïves et Thy-Tau22 suite au test de la piscine de Morris.....	142
Figure 147. Schéma de principe de la LC-MRM. ....	143
Figure 148. Structures du composé RPEL et de son analogue RPEL-d <sub>2</sub> .....	143
Figure 149. Structures du composé RPEL et de ses analogues RPEL-d <sub>7</sub> et RPEL-d <sub>14</sub> . ....	144
Figure 150. Etude de fragmentation du RPEL et du RPEL-d <sub>14</sub> . ....	147
Figure 151. Détermination structurale des différents fragments. ....	148
Figure 152. Gamme de dilution du RPEL dans des tubes en verre. ....	149
Figure 153. Gamme de dilution du RPEL dans des tubes en polypropylène.....	149
Figure 154. Droite d'étalonnage du RPEL avec l'étalon interne d <sub>14</sub> . ....	150
Figure 155. Comparaison d'une gamme de dilution dans le méthanol (points bleus) à une gamme de dilution dans les cerveaux (points blancs).....	150
Figure 156. Rappel de la structure de l'AZP2006. ....	152
Figure 157. Structure des composés ChemBridge intéressants.....	153
Figure 158. Structure du meilleur composé de chaque groupe de famille.....	153
Figure 159. Rappel des structures des composés RPEL et MAG. ....	154
Figure 160. Nouveaux composés de la famille D <sub>2</sub> envisagés.....	155

# Table des schémas

Schéma 1. Schéma de synthèse de la sonde 4. ....	77
Schéma 2. Synthèse de la sonde 5. ....	78
Schéma 3. Synthèse de la sonde 6. ....	78
Schéma 4. Rétrosynthèse de la famille D <sub>1</sub> . ....	97
Schéma 5. Synthèse du composé 31. ....	98
Schéma 6. Mécanisme de la réaction de Clauson-Kaas. ....	98
Schéma 7. Synthèse de 37. ....	99
Schéma 8. Voie de synthèse alternative 1. ....	101
Schéma 9. Mécanisme de la réaction de Mitsunobu. ....	102
Schéma 10. Voie de synthèse 3. ....	103
Schéma 11. Mécanisme de la réaction de Sandmeyer. ....	103
Schéma 12. Cycle catalytique du couplage de Buchwald. ....	104
Schéma 13. Voie de synthèse des analogues R <sub>1</sub> = diméthylamine. ....	105
Schéma 14. Formation des ammoniums quaternaires 61 et 62. ....	106
Schéma 15. Rétrosynthèse de la famille D <sub>2</sub> . ....	107
Schéma 16. Synthèse de 68 selon la voie 1. ....	108
Schéma 17. Cycle catalytique du couplage de Suzuki. ....	109
Schéma 18. Schéma de synthèse de la voie 2. ....	110
Schéma 19. Schéma de synthèse des isomères de position. ....	114
Schéma 20. Rétrosynthèse de la famille E <sub>1</sub> . ....	120
Schéma 21. Synthèse de la famille E <sub>1</sub> . ....	120
Schéma 22. Schéma de synthèse des produits réduits 99-102. ....	122
Schéma 23. Rétrosynthèse de l'obtention des composés de la famille E <sub>2</sub> . ....	123
Schéma 24. Synthèse de la 1-[(2-nitrophényl)méthyl]pipéridine 106. ....	124
Schéma 25. Synthèse des 2-(amine-1-ylméthyl)anilines. ....	124
Schéma 26. Synthèse des composés amides 116-120. ....	125
Schéma 27. Schéma de synthèse des composés 129 à 132. ....	126
Schéma 28. Rétrosynthèse des composés mixtes. ....	132
Schéma 29. Synthèse du précurseur tacrine. ....	132
Schéma 30. Mécanisme de formation de la 9-chloro-1,2,3,4-tétrahydroacridine. ....	133
Schéma 31. Synthèse du précurseur rivastigmine. ....	133
Schéma 32. Synthèse des composés mixtes RPEL et MAG. ....	134
Schéma 33. Nouvelle rétrosynthèse pour l'obtention du composé RPEL. ....	144
Schéma 34. Nouvelle voie de synthèse du composé RPEL. ....	145
Schéma 35. Rétrosynthèse pour l'obtention de l'isobutyraldéhyde d <sub>7</sub> . ....	145
Schéma 36. Synthèse du composé RPEL-d <sub>14</sub> . ....	146



# Table des tableaux

Tableau 1. Principales maladies neurodégénératives et leurs protéines pathogènes.....	21
Tableau 2. Récapitulatif de la conservation interspèce de p97/VCP selon les domaines.....	61
Tableau 3. Cofacteurs de p97/VCP et fonctions associées. ....	62
Tableau 4. Récapitulatif des essais de substitution du chlore pour l'obtention de 42. ....	104
Tableau 5. Comparatif des deux voies de synthèse. ....	105
Tableau 6. Essais de réduction du groupement nitro. ....	106
Tableau 7. Essais de substitution du dérivé phénolique 69 afin de synthétiser le composé 70. ....	112
Tableau 8. Essais de couplage de Suzuki afin de synthétiser le composé 71. ....	113
Tableau 9. Récapitulatif de l'évaluation biologique des composés. ....	115
Tableau 10. Récapitulatif des propriétés ADME. ....	118
Tableau 11. Réactions de Suzuki pour mener au composé 84 puis 85. ....	121
Tableau 12. Essais d'obtention du composé 106. ....	124
Tableau 13. Récapitulatif de l'évaluation biologique des composés des familles E <sub>1</sub> et E <sub>2</sub> . ....	127
Tableau 14. Récapitulatif de l'estimation des propriétés ADME. ....	128
Tableau 15. Récapitulatif des résultats d'inhibition de l'ACHÉ. ....	134
Tableau 16. Optimisation de la réaction de Buchwald afin d'obtenir 139. ....	145

# Abréviations

**AC** – Allocortex  
**ACh** – Acétylcholine  
**AChE** – Acétylcholinestérase  
**ACN** – Acétonitrile  
**AICD** – Amyloid precursor protein Intracellular C-terminal Domain  
**AMPA** –  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate  
**AMS** – Atrophie multisystématisée  
**APP** – Amyloid peptid precursor  
**BACE1** –  $\beta$ -sécrétase  
**BINAP** – 2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphtyle  
**BN** – Tronc cérébrale  
**br s / t** – Broad singulet / triplet  
**BuChE** – Butylcholinestérase  
**CB** – Cervelet  
**CCM / TLC** – Chromatographie sur couche mince / Thin layer chromatography  
**CDC48** – Cell-division-cycle 48  
**CoQ10** – CoenzymeQ10  
**CTE** – Chaîne de transport des électrons  
**CTF** – C-terminal fragments  
**d** – Doublet  
**DCE** – Dichloroéthane  
**DCL** – Démence à corps de Lewy  
**DCM** – Dichlorométhane  
**DEAD** – Azodicarboxylate de diéthyle  
**DLFT** – Dégénérescence lobaire fronto-temporale  
**DMF** – Diméthylformamide  
**DMSO** – Diméthylsulfoxyde  
**DNF** – Dégénérescence neurofibrillaire  
**EDC** – 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide  
**eEF1G** – Eukaryotic elongation factor 1 gamma  
**ENT** – Cortex entorhinal  
**ERAD** – Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation  
**ERO** – Espèces réactives de l'oxygène  
**ESI** – Electrospray ionization  
**ETC** – Encéphalopathie traumatique chronique  
**FDA** – Food and drug administration  
**FRET** – Fluorescence resonance energy transfert  
**GSK3** – Glycogen synthase kinase 3  
**GSS** – Gerstmann-Sträussler-Scheinker  
**HOBt** – Hydroxybenzotriazole

**HSP90** – Heat Shock Protein 90  
**IACHe** – Inhibiteur d'acétylcholinestérase  
**IBMPFD** – Inclusion body myopathy with paget disease and frontotemporal dementia  
**IC<sub>50</sub>** – Concentration d'inhibition à 50 %  
**IL-1** – Interleukine-1  
**ITC** – Isothermal titration calorimetry  
**LC** – Locus caeruleus  
**LC-MRM** – Liquid chromatography – Multiple reaction monitoring  
**LC-MS** – Liquid chromatography – Mass spectrometry  
**Litt.** – Littérature  
**m** – Multiplet  
**M** – Massif  
**MA** – Maladie d'Alzheimer  
**MAO A/B** – Monoamine oxydase A/B  
**MCJ** – Maladie de Creutzfeldt-Jakob  
**MH** – Maladie de Huntington  
**MND** – Maladie neurodégénérative  
**MP** – Maladie de Parkinson  
**MST** – Microscale thermophoresis  
**NC** – Néocortex  
**NMDA** – *N*-méthyl-*D*-aspartate  
**PA** – Plaques Amyloïdes  
**Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub>** – tris(dibenzylidèneacétone)dipalladium  
**polyQ** – poly-glutamine  
**q** – Quadruplet  
**UBX** – Ubiquitin regulatory X  
**RE** – Réticulum endoplasmique  
**Rf** – Rapport frontal  
**RSA** – Relations Structure-Activité  
**s** – Singulet  
**sAPP** – Soluble amyloid peptid precursor  
**SLA** – Sclérose latérale amyotrophique  
**SNC** – Système nerveux central  
**SPR** – Surface plasmon resonance  
**SRH** – Seconde région d'homologie  
**STD** – Saturation-transfer difference  
**t** – Triplet  
**TER94** – Transcriptional endoplasmic reticulum ATPase 94  
**TH** – Thalamus  
**THF** – Tétrahydrofurane  
**UPS** – Ubiquitin proteasome system  
**VAT** – VCP-like ATPase  
**VCP** – Valosin containing protein  
**δ (ppm)** – Déplacement chimique exprimé en partie par million

# Introduction générale

Les maladies neurodégénératives affectent de manière progressive le fonctionnement du système nerveux central. Elles engendrent une détérioration du fonctionnement des cellules nerveuses, conduisant ainsi à la mort neuronale. Cet événement a pour conséquence une altération progressive et souvent irréversible des fonctions nerveuses, telles que la motricité, le langage, la mémoire, la perception ou d'autres fonctions cognitives. Le nombre de personnes touchées par ces maladies est sans cesse en augmentation, corrélé avec l'augmentation de l'espérance de vie et à l'évolution de la pyramide des âges conduisant à une augmentation de la proportion de sujets âgés. La maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson sont les maladies neurodégénératives les plus connues et touchant le plus de malades dans le monde. Bien que les maladies neurodégénératives présentent des symptômes variés, elles sont notamment caractérisées par un mécanisme physiopathologique commun : l'accumulation de protéines mal repliées ou mal formées.

La maladie d'Alzheimer touche actuellement plus de 35 millions de malades dans le monde et ce chiffre risque de doubler d'ici 2030. C'est une maladie de progression lente et longtemps asymptomatique qui affecte les capacités cognitives et comportementales et qui combine deux processus physiopathologiques : la formation des plaques amyloïdes, appelée pathologie amyloïde et la dégénérescence neurofibrillaire, appelée pathologie Tau. Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif pour la maladie d'Alzheimer mais seulement des traitements ciblant les symptômes de la maladie. La complexité des événements physiologiques conduisant à la maladie a engendré l'échec de traitements ne ciblant qu'une pathologie et des traitements multi cibles sont actuellement en étude.

Une collaboration entre les laboratoires du Pr. Patricia Melnyk et du Dr. Luc Buée a conduit à l'identification d'une famille de molécules capables de diminuer la sécrétion des peptides A $\beta$ , d'augmenter la quantité des fragments carboxy-terminaux de l'APP et de modifier de façon positive le catabolisme de la protéine Tau. Ces composés ont donc montré une action multiple sur les deux lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer : les dépôts amyloïdes et la pathologie Tau. L'un d'eux, l'AZP2006 vient d'achever avec succès la phase 1 des essais cliniques. La conception de sondes chimiques dérivées de ces composés et la mise en œuvre de techniques de chromatographie d'affinité et de photocouplage ont permis de mettre en évidence la protéine p97/VCP (Valosin Containing Protein). Parmi les nombreux rôles biologiques de cette protéine, son implication dans la dégradation des protéines mal formées et mal repliées a clairement été mise en évidence. Cette fonction biologique pourrait être corrélée à son implication dans les MND et présente p97/VCP comme une nouvelle cible innovante pour le traitement de ces maladies.

Ainsi, il existe un grand intérêt à continuer de concevoir des ligands potentiels de p97/VCP afin de développer de nouvelles familles thérapeutiques pour le traitement des maladies neurodégénératives. De plus, la mise en évidence et la quantification de l'interaction entre les ligands et la protéine nécessite d'être approfondi. Ce projet de thèse s'inscrit dans ce contexte et porte sur la conception, la synthèse et l'évaluation de composés interagissant avec la dégradation des protéines pour le traitement des maladies neurodégénératives.

Après une introduction de la maladie d'Alzheimer, l'historique du projet sera présenté ainsi que les généralités sur la protéine p97/VCP. Une étude menée afin de valider l'interaction entre p97/VCP et les ligands potentiels sera décrite suivi de la conception, la synthèse et l'évaluation de ligands potentiels. Des composés mixtes possédant une action multi cibles seront également présentés.

# **CHAPITRE 1 :**

## **La maladie d'Alzheimer**

## A. La maladie d'Alzheimer, une maladie neurodégénérative

Les maladies neurodégénératives (MND) sont un ensemble de pathologies qui engendrent un dysfonctionnement au sein du tissu nerveux. Elles conduisent à la mort neuronale et à la destruction du système nerveux. La majorité des malades touchés sont âgés de plus de 65 ans bien que certaines de ces maladies se déclarent dans l'enfance ou le jeune âge. Ces maladies peuvent conduire à la démence comme dans la maladie d'Alzheimer (MA) ou la dégénérescence lobaire fronto-temporale (DLFT), à des troubles moteurs comme dans la maladie de Parkinson (MP) ou la sclérose latérale amyotrophique (SLA), ou combiner les deux comme dans la maladie de Huntington (MH) ou la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ). La plupart de ces pathologies sont sporadiques, elles apparaissent de manière isolée, bien que certaines puissent être héréditaires.

Les recherches au cours des vingt dernières années ont montré que de nombreuses maladies neurodégénératives, bien que paraissant de prime abord différentes (telles que la MA, la MP ou la MCJ), présentent un mécanisme pathologique commun : l'agrégation et le dépôt de protéines mal repliées conduisant à une amyloïdose du système nerveux central (SNC).

**Tableau 1. Principales maladies neurodégénératives et leurs protéines pathogènes.**<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>

Protéines pathogènes	Maladies associées	Dépôts
$\alpha$ -synucléine	MP, DCL, AMS	Corps de Lewy
$\beta$ -amyloïde	MA	Plaques amyloïdes
Tau	MA, tau-DLFT, ETC	Inclusions neuronales et gliales
Huntingtine mutante	MH	Inclusions nucléaires et cytoplasmiques
Superoxyde dismutase mutante	SLA	Corps de Bonina, Sphéroïdes axonaux
Protéine prion	Kuru, MCJ, GSS	Plaques de prion

MP : maladie de Parkinson, DCL : démence à corps de Lewy, AMS : atrophie multisystématisée, MA : maladie d'Alzheimer, DLFT : dégénérescence lobaire fronto-temporale, ETC : encéphalopathie traumatique chronique, MH : maladie de Huntington, SLA : sclérose latérale amyotrophique, MCJ : maladie de Creutzfeldt-Jakob, GSS : Gerstmann-Sträussler-Scheinker.

Selon ce processus, des protéines très solubles sont progressivement converties en polymères insolubles et filamenteux avec une structure caractéristique de feuillets pliés  $\beta$  entrecroisés qui s'accumulent, en fonction de la protéine et de la maladie, en dépôts amyloïdes fibrillaires, dans le cytosol, dans le noyau des cellules cérébrales affectées ou dans l'espace extracellulaire (Figure 1).<sup>1</sup>

<sup>1</sup> M. S. Forman *et al.*, *Nat. Med.*, **2004**, 10, 1055-1063

<sup>2</sup> J. P. Taylor *et al.*, *Science*, **2002**, 296, 1991-1995

<sup>3</sup> B. S. Shastry, *Neurochem. Int.*, **2003**, 43, 1-7

<sup>4</sup> C. A. Ross *et al.*, *Nat. Med.*, **2004**, 10, S10-S17

<sup>5</sup> J. Brettschneider *et al.*, *Nat. Rev. Neurosci.*, **2015**, 16, 109-120

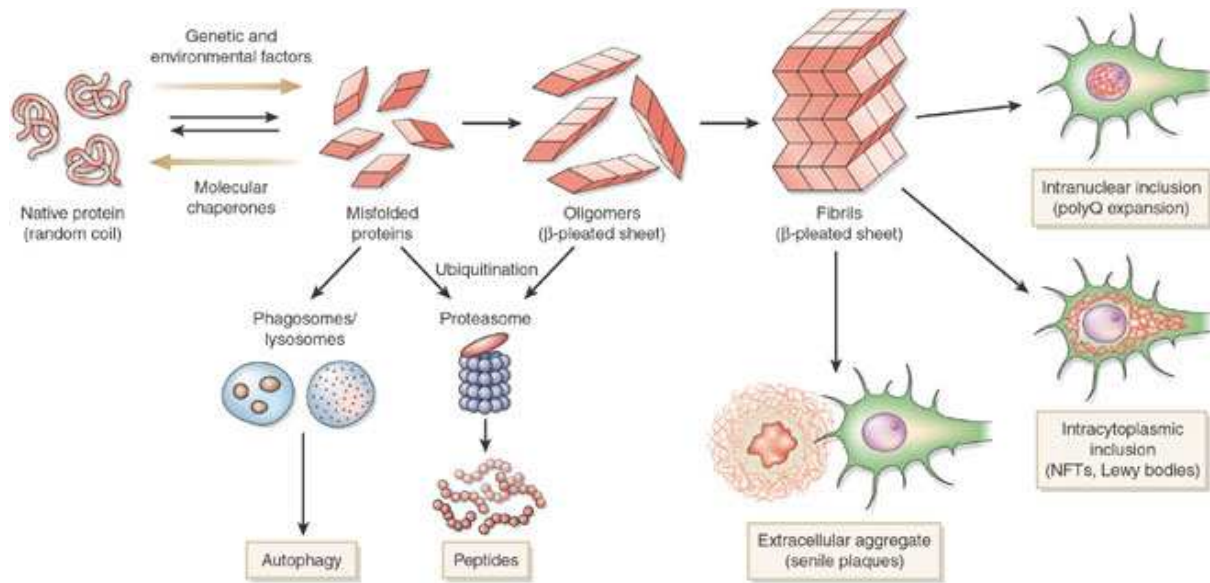


Figure 1. Modèle du mauvais repliement et fibrilisation de protéines.<sup>1</sup>

Les cellules ont développé des mesures de contrôle de qualité des protéines sophistiquées afin de se protéger de l'accumulation des protéines mal repliées ou agrégées. Par exemple, des chaperones favorisent le bon repliement des protéines et préviennent l'agrégation des protéines non natives. Les protéines mal repliées sont dégradées par le système ubiquitine protéasome (UPS), mais également par le système phagosome-lysosome. Les mutations constatées sur le gène codant pour les protéines à l'origine de MND conduisent à la formation de protéines mutantes qui se fibrillent de manière accélérée en comparaison aux protéines natives.<sup>1,2</sup>

Malgré l'expression systémique d'un grand nombre de protéines amyloïdogéniques associées à des maladies neurodégénératives, l'amyloïdose n'apparaît que dans le SNC. *In vivo*, ces changements se développent insidieusement durant la vie d'une personne, les symptômes cliniques n'apparaissant qu'en milieu ou fin de vie.<sup>1,2</sup>

Les travaux présentés dans ce manuscrit ciblent plus particulièrement la MA, qui est la première cause de démence dans le monde. Cette maladie neurodégénérative entraîne, au fur et à mesure de la disparition des neurones, une altération des facultés cognitives tels que la mémoire, le langage ou encore le raisonnement.

## B. Historique

La MA a été décrite pour la première fois par le Dr. Alois Alzheimer. Lors d'une conférence en 1906, il expose le cas d'une patiente, Auguste D., admise à l'hôpital de Francfort pour des troubles psychiatriques (Figure 2). Alzheimer détaille de multiples symptômes tels qu'une mémoire et une compréhension réduites, une aphasie, une désorientation, une conduite imprévisible, de la paranoïa, des hallucinations auditives et des troubles psychosociaux marqués. Suite au décès de la patiente, l'étude de son cerveau a mis à jour la présence de plaques amyloïdes (PA) et une dégénérescence neurofibrillaire (DNF) (Figure 3). C'est en 1910 que Kraepelin parle de cette démence sénile sous le nom de maladie d'Alzheimer.<sup>6</sup>

<sup>6</sup> K. Maurer *et al.*, *The Lancet*, 1997, 349, 1546-1549





Figure 2. Photographie d'Auguste D. de 1902.<sup>6</sup>



Figure 3. DNF d'Auguste D., dessiné par A. Alzheimer.<sup>6</sup>

## C. Aspects cliniques

### 1. Les stades de la maladie

L'évolution de la maladie peut se décrire selon quatre stades marquant l'évolution des troubles cognitifs et du comportement.<sup>7, 8</sup>

- **Pré-démence**

Les premiers symptômes sont généralement non détectés car mis sur le compte de l'âge et du stress. Ils débutent par des pertes de mémoire, notamment pour les faits récents, l'oubli de mots familiers ou de la localisation d'objets d'usage quotidien.<sup>9, 10</sup> A ce stade, la démence ne peut être diagnostiquée.

- **Phase initiale**

En phase initiale, la famille, les amis ou les collègues commencent à distinguer des difficultés. Les problèmes de mémoire et d'apprentissage croissants conduisent à un diagnostic définitif. La maladie n'affecte pas de manière équivalente les différentes mémoires. La mémoire ancienne, la mémoire sémantique ou la mémoire implicite sont moins affectées que la mémoire récente et à court terme.<sup>9</sup>

Ainsi, le malade a des difficultés à trouver les bons mots ou noms et à se remémorer le nom de personnes rencontrées récemment. Il a une gêne pour accomplir des tâches en société ou au travail, il perd ou place à un mauvais endroit des objets familiers ou encore a du mal à s'organiser ou à gérer un planning.<sup>9</sup>

- **Phase modérée**

Lorsque les symptômes commencent à entraver l'indépendance du patient, cette phase est dite modérée. Le sujet est alors incapable d'accomplir les tâches quotidiennes de la vie. La communication devient alors complexe, les problèmes de mémoire du vocabulaire entraînent une paraphasie. La mémoire à long terme qui était jusqu'alors peu touchée le devient. Le malade a de plus en plus de difficultés à reconnaître les membres de sa famille proche, il semble « vivre dans le passé ».<sup>9, 10</sup>

<sup>7</sup> Alzheimer - Comprendre la maladie. <http://www.francealzheimer.org/comprendre-la-maladie> (28/05/2015)

<sup>8</sup> Alzheimer's and dementia. [http://www.alz.org/alzheimers\\_disease\\_1973.asp](http://www.alz.org/alzheimers_disease_1973.asp) (28/05/2015)

<sup>9</sup> H. Förstl et al., *Eur. Arch. Psyc. Clin. N.*, **1999**, 249, 288-290

<sup>10</sup> O. Almkvist, *Acta Neurol. Scand.*, **1996**, 94, 63-71

Les changements de comportement deviennent de plus en plus marqués comme le vagabondage, l'irritabilité ou encore l'humeur inconstante qui peuvent conduire à des pleurs, la survenue d'agressions non préméditées ou la résistance aux soins.<sup>10</sup> Le patient entre dans une phase d'anosognosie, il n'a plus conscience de sa maladie.

- **Phase avancée**

Lorsque le patient arrive à ce stade de la maladie, il est totalement dépendant de sa famille et du personnel soignant. Le langage se résume à des phrases simples ou seulement des mots, ou éventuellement un mutisme total. La masse musculaire et la mobilité se détériorent au point de rester alité. La maladie elle-même ne conduit pas au décès du malade, mais des facteurs extérieurs (comme une pneumonie) y mènent.<sup>9</sup>

## 2. Le diagnostic

Le diagnostic de la maladie est une étape essentielle. En effet, même s'il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement, le diagnostic précoce permet de mettre en place rapidement un plan d'aide adapté et un encadrement efficace.<sup>7,8</sup>

Le diagnostic de la maladie débute par un rendez-vous chez le médecin traitant. Après une évaluation globale de l'état du patient, il va l'orienter vers un spécialiste (neurologue ou psychiatre).

Le diagnostic définitif ne peut se faire que post-mortem, après étude du cerveau des patients.<sup>11</sup> Cependant différents examens permettent de conforter l'hypothèse de la maladie : un bilan neuropsychologique pour évaluer les troubles cognitifs du patient, un examen d'imagerie cérébrale (IRM ou scanner) permet de mettre en évidence l'atrophie de certaines zones du cerveau, un examen neurologique pour mettre en évidence de potentiels troubles neurologiques et un bilan médical global pour s'assurer que le patient ne souffre pas d'autres troubles qui pourraient induire des symptômes proches de ceux de la MA.<sup>12</sup>

## 3. Prévalence

En France, 850 000 personnes sont atteintes par la maladie. Des études prévoient qu'en 2020 1,28 millions de personnes seront atteintes, ce qui représentera un français sur quatre de plus de 65 ans. D'ici 2040, environ 2,15 millions de français devraient être touchés. La maladie concerne actuellement 3 millions de personnes dans le pays, en comptant les malades, les familles et le personnel soignant. Un malade sur deux ignore qu'il est atteint de la maladie.<sup>7</sup>

En ce qui concerne les données mondiales, en 2010, 35,56 millions de personnes étaient atteintes de la MA, ce qui représentait 4,7 % des personnes de plus de 60 ans. En 2030, le nombre de personnes atteintes devrait doubler par rapport aux chiffres de 2010, pour atteindre 65,69 millions de malade et tripler pour 2050, représentant 115,38 millions de personnes atteintes. En 20 ans, l'Europe devrait voir son nombre de malades augmenter de 40 % et l'Amérique de 89 %. La plus grande augmentation des cas de la maladie devrait être observée dans les zones émergentes telles que l'Asie et l'Afrique, où les cas de MA devraient croître d'environ 110 %.<sup>13</sup>

---

<sup>11</sup> H. Braak *et al.*, *Neurobiol. Aging*, **1997**, 18, 351-357

<sup>12</sup> R. Cacabelos, *Acta Neurol. Scand.*, **1996**, 94, 72-84

<sup>13</sup> *World Alzheimer Report 2009*; **2009**.

## D. Physiopathologie

La MA est due au développement de deux types de lésions au niveau du SNC : les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et les plaques amyloïdes (PA).

### 1. Les plaques amyloïdes

La protéine précurseur de l'amyloïde (Amyloid Precursor Protein, APP) est une protéine transmembranaire de 695 à 770 acides aminés codée par un seul gène situé sur le bras long du chromosome 21.<sup>14</sup> Cette protéine, très présente dans le système nerveux central, est retrouvée notamment à l'extrémité des synapses. Ses fonctions au sein du système nerveux ne sont pas encore bien connues. Toutefois, il a été établi qu'elle intervenait dans la croissance et la survie des cellules neuronales, ainsi que dans la plasticité neuronale et la réparation des synapses après lésions.<sup>15</sup>

L'APP peut être clivée selon deux voies différentes grâce à l'intervention de sécrétases : la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique (Figure 4).<sup>15, 16</sup>

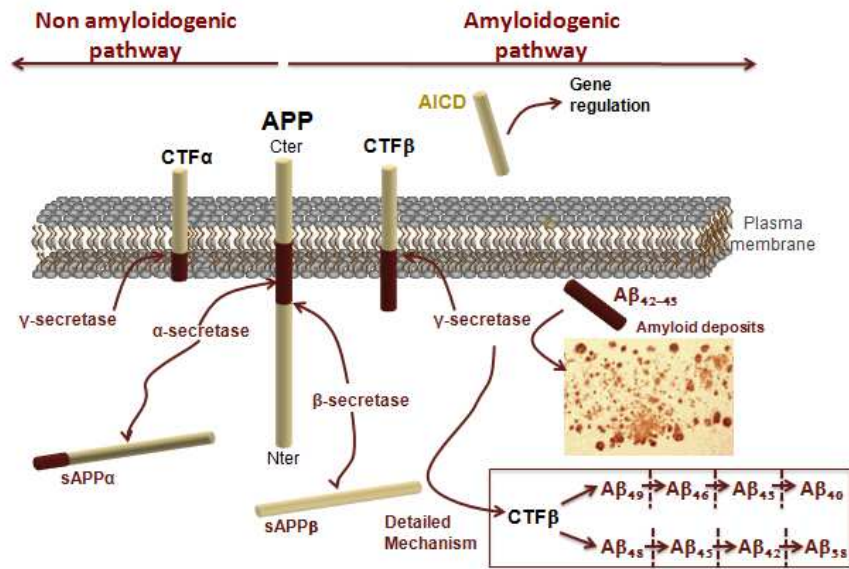


Figure 4. Métabolisme de l'APP. Adapté de 15

La voie non-amyloïdogénique consiste en une succession de coupures réalisées par la  $\alpha$ -sécrétase puis la  $\gamma$ -sécrétase. Ce clivage produit un peptide aux propriétés neurotrophiques, le sAPP $\alpha$ , dont le récepteur est encore méconnu. La seconde voie de clivage est responsable de la libération du peptide A $\beta$  qui compose principalement les PA. En effet, sous l'action de la  $\beta$ -sécrétase (BACE1) à une certaine distance de la membrane extracellulaire, puis sous l'action de la  $\gamma$ -sécrétase au niveau du domaine transmembranaire, un peptide soluble constitué de 38 à 43 acides aminés est libéré dans le domaine extracellulaire.<sup>17, 18, 19</sup> Il existe deux formes prédominantes de ce peptide correspondant à des résidus de 40 acides aminés (A $\beta$ <sub>40</sub>) ou de 42 acides aminés (A $\beta$ <sub>42</sub>). La forme A $\beta$ <sub>40</sub> représente une proportion importante (supérieure à 90 %) de l'A $\beta$  total produit par les cellules, alors que la forme A $\beta$ <sub>42</sub> ne représente qu'une

<sup>14</sup> D. Goldgaber et al., *Science*, **1987**, 235, 877-880

<sup>15</sup> V. Vingtdeux et al., *Front. Physiol.*, **2012**, 3, 1-16

<sup>16</sup> H. W. Querfurth et al., *New Engl. J. Med.*, **2010**, 362, 329-344

<sup>17</sup> S. S. Sisodia et al., *FASEB J.*, **1995**, 9, 366-70

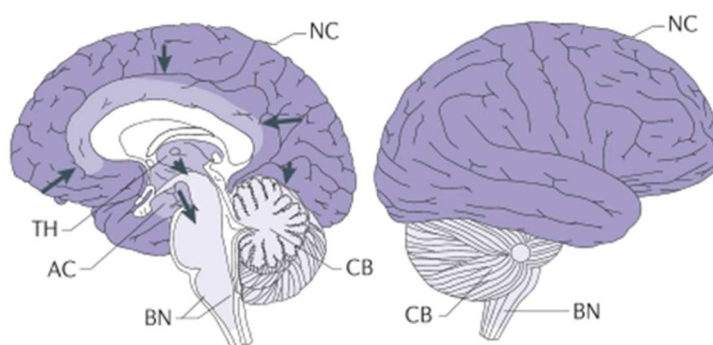
<sup>18</sup> F. Checler et al., *Med. Sci.*, **2002**, 18, 117-124

<sup>19</sup> D. Burdick et al., *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 546-554

fraction mineure (moins de 5 %). Chez des patients atteints de la MA, des mutations de l'APP au niveau du site de clivage de la  $\gamma$ -sécrétase affectent la spécificité de clivage  $A\beta$  40/42, favorisant ainsi la sécrétion du peptide  $A\beta_{42}$ .<sup>20</sup> Or, ce « long peptide » possède plus de propension à s'agréger que la forme  $A\beta_{40}$ .<sup>21</sup> Des essais sur un modèle murin doublement transgénique (APP transgénique et sécrétant le peptide  $A\beta_{43}$  de manière élevé) ont également montré que le peptide  $A\beta_{43}$ , précurseur du peptide  $A\beta_{40}$ , avait une tendance à s'accumuler et une toxicité plus élevée que le peptide  $A\beta_{42}$ .<sup>22</sup>

Ainsi, les formes longues du peptide  $A\beta$  seraient à l'origine de la formation des oligomères, fibrilles et PA. En effet, lorsque ces peptides sont produits en trop grande quantité, ils vont avoir tendance à se polymériser en oligomères solubles, puis en fibrilles insolubles qui s'agrègent entre elles et constituent les PA entre les neurones.<sup>20</sup>

Les PA sont observées en premier lieu dans le néocortex (NC), elles sont ensuite détectées dans le thalamus (TH) et l'allocortex (AC), le diencéphale et dans les noyaux gris centraux (dans une direction caudale), dans le tronc cérébral (BN), et occasionnellement dans le cervelet (CB) (Figure 5).<sup>11</sup> Leur propagation se fait donc des parties externes du cerveau vers l'intérieur.<sup>5, 23</sup>



**Figure 5. Développement des plaques amyloïdes dans le cerveau.<sup>5</sup>**

(la pathologie est en premier détectée dans les aires les plus sombres et se propage dans les zones s'éclaircissant)

## 2. Les lésions neurofibrillaires

Les enchevêtrements neurofibrillaires sont des inclusions filamenteuses dans les neurones pyramidaux et sont présents dans la MA et dans d'autres MND nommées tauopathies. Le nombre de ces amas est un marqueur de la sévérité de la MA. Ils sont majoritairement composés de protéines Tau hyper et anormalement phosphorylées et agrégées.<sup>16, 24</sup>

Sous sa forme physiologique, la protéine Tau est une protéine soluble dans les axones, qui permet l'assemblage et la stabilité des microtubules et des vésicules de transport (Figure 6) qui interviennent dans l'acheminement de nutriments et d'autres éléments essentiels à la survie des neurones.<sup>16, 24</sup>

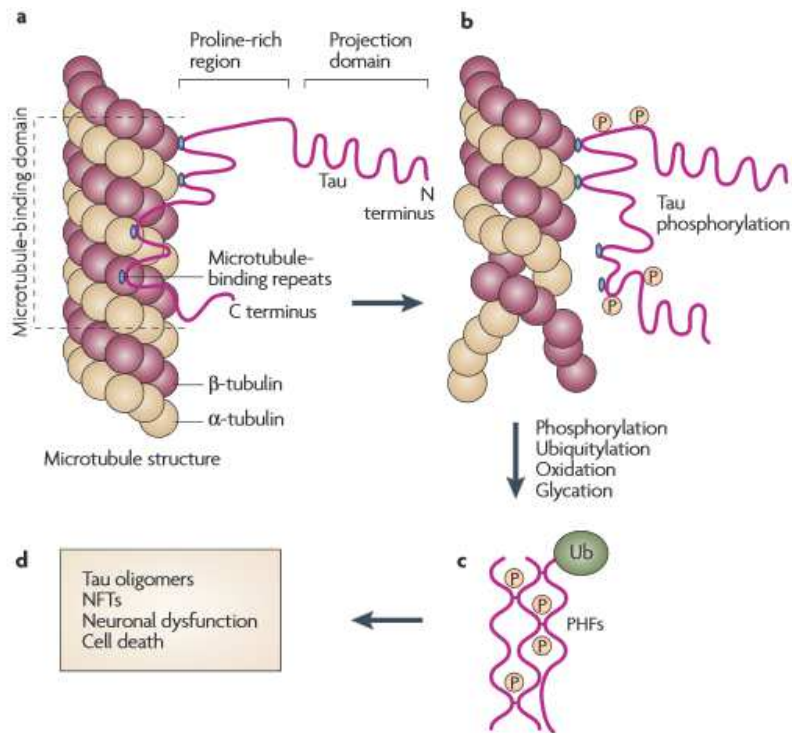
<sup>20</sup> S. Gandy, *J. Clin. Invest.*, **2005**, 115, 1121-1129

<sup>21</sup> E. Karran *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2011**, 10, 698-712

<sup>22</sup> T. Saito *et al.*, *Nat. Neurosci.*, **2011**, 14, 1023-1032

<sup>23</sup> M. Jucker *et al.*, *Ann. Neurol.*, **2011**, 70, 532-540

<sup>24</sup> M. P. Mazanetz *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2007**, 6, 464-479

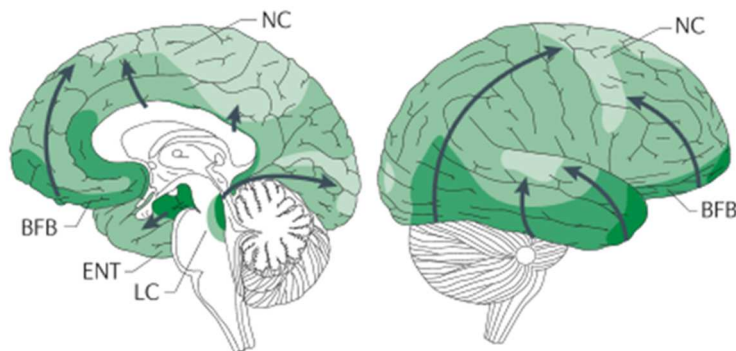


**Figure 6. Stabilisation des microtubules par une protéine Tau normale et désintégration d'un microtubule due à une hyper et anormale phosphorylation de Tau.<sup>24</sup>**

(a) Le protéine Tau normale permet le maintien des microtubules ; (b) La phosphorylation de Tau conduit à une diminution de son affinité pour les microtubule, induisant leur déstabilisation ; (c) La protéine Tau hyper et anormalement phosphorylée s'accumule sous forme de filaments hélicoïdaux pairs (PHFs) ; Ces filaments conduisent à la formation d'oligomères et d'agrégats insolubles de protéine Tau appelés dégénérescence neurofibrillaire (DNF).

La protéine Tau hyperphosphorylée insoluble, perd son affinité pour les microtubules et forme des agrégats. Dans des tissus cérébraux d'un patient atteint de la MA, la protéine contient trois à quatre fois plus de groupements phosphates que chez une personne saine. Ce phénomène peut être attribué soit à l'activité accrue des kinases assurant la phosphorylation, soit à la diminution de celle des phosphatases, qui ont l'effet inverse.<sup>25</sup>

En contraste avec les PA, les dépôts de protéines Tau sont d'abord observés à l'intérieur du cerveau et se propagent vers l'extérieur (Figure 7).<sup>11</sup> Les agrégats se développent en premier dans le locus cœruleus (LC), puis dans le cortex transentorhinal et entorhinal (ENT) et arrivent dans l'hippocampe et dans le néocortex.<sup>5, 23</sup>



**Figure 7. Développement de la DNF dans le cerveau. <sup>5</sup>**

(la pathologie est en premier détectée dans les aires les plus sombres et se propage dans les zones s'éclaircissant)

<sup>25</sup> J.-Z. Wang et al., *Prog. Neurobiol.*, **2008**, 85, 148-175

### 3. Lien entre Tau et A $\beta$

Les PA et la DNF ont largement été étudiées séparément pour leur toxicité dans la MA. De récentes études ont montré leur possible interaction et synergie d'action dans la maladie.<sup>26</sup>

D'après l'hypothèse de la cascade amyloïde, la formation du peptide A $\beta$  est l'événement critique conduisant à la MA. La fréquence élevée de déclenchement de la maladie chez des personnes atteintes de trisomie 21 et portant ainsi trois allèles du gène codant de l'APP tend à le conforter.<sup>21, 27</sup> Cependant, la place de Tau dans cette cascade amyloïde reste à déterminer. Différents tests *in vitro* et *in vivo* suggèrent qu'il existe trois modes d'interactions possibles.

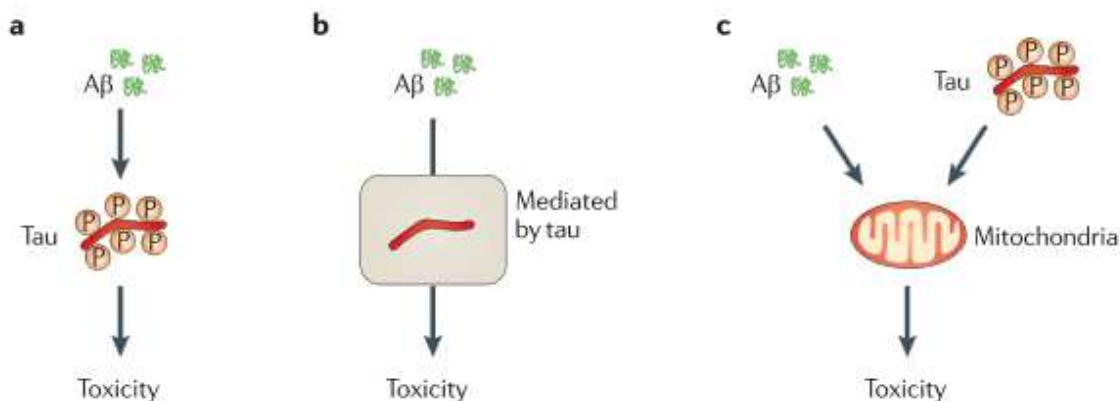


Figure 8. A $\beta$  et Tau : trois modèles d'interactions possibles.<sup>26</sup>

- **A $\beta$  induit la tauopathie**

Cette hypothèse suggère que le peptide A $\beta$  induit la tauopathie en causant l'hyperphosphorylation de tau, qui en retour induit une toxicité dans les neurones (Figure 8, a). La formation de peptides A $\beta$  chez des souris transgéniques surexprimant l'APP conduit à l'hyperphosphorylation de Tau, alors qu'il n'y a pas d'induction de la pathologie amyloïde chez des souris transgéniques mimant la tauopathie.<sup>28</sup> Des souris issues d'un croisement entre des souris surexprimant l'APP et des souris mimant la tauopathie présentent une tauopathie exacerbée alors que les PA ne le sont pas. Ces résultats tendent à prouver que la formation de la dégénérescence neurofibrillaire est induite par le peptide A $\beta$ .

- **Tau induit la toxicité de A $\beta$**

Dans ce cas, la protéine Tau module la toxicité de A $\beta$ , ainsi la toxicité du peptide est dépendante de la présence de Tau (Figure 8, b). Des études ont montré que des neurones où le gène codant pour Tau a été invalidé sont protégés de la mort cellulaire induite par le peptide A $\beta$ .<sup>29, 30</sup> Ces résultats ont été reproduits de manière indépendante dans deux études *in vivo* usant différentes souches de souris transgéniques surexprimant l'APP et déficientes en Tau.<sup>30, 31</sup>

<sup>26</sup> L. M. Ittner *et al.*, *Nat. Rev. Neurosci.*, **2011**, 12, 67-72

<sup>27</sup> J. L. Cummings, *New Engl. J. Med.*, **2004**, 351, 56-67

<sup>28</sup> J. Gotz *et al.*, *Mol. Psy.*, **2004**, 9, 664-683

<sup>29</sup> M. Rapoport *et al.*, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 6364-6369

<sup>30</sup> E. D. Roberson *et al.*, *Science*, **2007**, 316, 750-754

<sup>31</sup> L. M. Ittner *et al.*, *Cell*, **2010**, 142, 387-397

- **Toxicité synergique de Tau et A $\beta$**

Selon cette hypothèse, A $\beta$  et Tau ciblent des processus cellulaires ou des organelles de manière synergique en potentialisant ainsi leur toxicité mutuelle (Figure 8, c). A $\beta$  et Tau altèrent la respiration mitochondriale chez des souris triplement transgéniques qui montrent à la fois des signes de tauopathie et de PA.<sup>16, 32</sup> Tau altère préférentiellement le complexe I de la chaîne respiratoire alors que le peptide A $\beta$  bloque le complexe IV, ce qui conduit à l'aggravation des troubles mitochondriaux chez les souris combinant tauopathie et PA, en comparaison aux souris surexprimant seulement Tau ou l'APP.<sup>32</sup>

#### 4. Déficit synaptique

La perte des synapses peut être une explication au déclin cognitif constaté dans la MA. Une concentration élevée en oligomères A $\beta$  peut supprimer la transmission synaptique basale. Le peptide A $\beta$  facilite l'endocytose des récepteurs du *N*-méthyl-*D*-aspartate (NMDA) et de l' $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate (AMPA) réduisant la transmission glutamatergique.<sup>33, 34</sup> Il altère également le signalement des récepteurs à l'acétylcholine (ACh) et la libération de l'acétylcholine dans la fente présynaptique.<sup>16, 35</sup>

Un déficit en de nombreux neurotransmetteurs est constaté au fur et à mesure de l'évolution de la maladie (tels que le GABA, la sérotonine ou la sématostatine). Cependant les premiers symptômes semblent corrélés avec le dysfonctionnement des synapses cholinergiques et glutamatergiques.<sup>36</sup>

#### 5. Dysfonctionnement mitochondrial

Le peptide A $\beta$  est un puissant poison mitochondrial, affectant spécialement la fente synaptique. Dans la MA, le peptide A $\beta$  inhibe des enzymes clés dans le cerveau et dans des mitochondries isolées. La cytochrome c oxydase est spécialement touchée.<sup>37</sup> Par conséquent, le transport des électrons, la production d'ATP, la consommation d'oxygène et la membrane mitochondriale sont altérés.<sup>16</sup>

L'augmentation de la formation des radicaux superoxydes mitochondriaux (O $_2^{\cdot-}$ , H $_2$ O $_2$ ,  $\cdot$ OH), active la  $\beta$ -sécrétase, induisant le clivage de l'APP (Figure 9).<sup>38</sup> Le peptide A $\beta$  formé entre dans les mitochondries, présentes essentiellement dans les synapses, induit la formation des radicaux libres, causant des dommages oxydatifs et inhibe l'ATP cellulaire. La diminution de la production d'ATP peut causer la défaillance de la neurotransmission.<sup>39</sup>

<sup>32</sup> V. Rhein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, 106, 20057-20062

<sup>33</sup> E. M. Snyder *et al.*, *Nat. Neurosci.*, **2005**, 8, 1051-1058

<sup>34</sup> H. Hsieh *et al.*, *Neuron*, **2006**, 52, 831-843

<sup>35</sup> S. Kar *et al.*, *J. Psychiatry Neurosci.*, **2004**, 29, 427-441

<sup>36</sup> D. J. Selkoe, *Science*, **2002**, 298, 789-791

<sup>37</sup> R. Castellani *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, **2002**, 70, 357-360

<sup>38</sup> M. T. Lin *et al.*, *Nature*, **2006**, 443, 787-795

<sup>39</sup> P. H. Reddy *et al.*, *Trends Mol. Med.*, **2008**, 14, 45-53

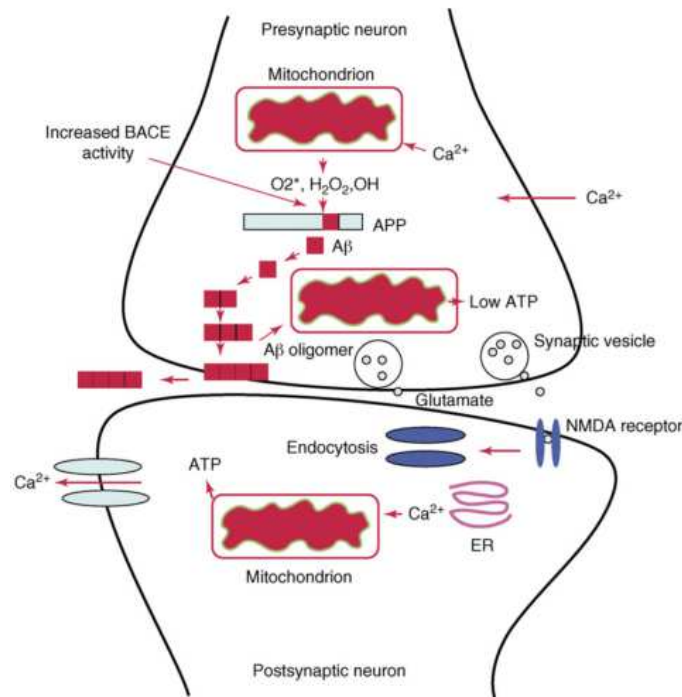


Figure 9. Mécanisme du dysfonctionnement mitochondrial dans la MA.<sup>39</sup>

Ainsi, l'augmentation de la formation des radicaux superoxydes mitochondriaux et la conversion en peroxyde d'hydrogène induit un stress oxydatif, la libération de cytochrome c et l'apoptose.<sup>16</sup>

## 6. Neuroinflammation

En addition à la toxicité intrinsèque des dépôts amyloïdes, le peptide Aβ peut promouvoir la neurodégénération par des mécanismes parallèles incluant l'activation des cellules microgliales et des astrocytes.<sup>40</sup> L'induction d'une réponse inflammatoire par la microglie engendre la libération de médiateurs inflammatoires variés incluant un grand éventail de cytokines neurotoxiques, des espèces réactives de l'oxygène, des excitotoxines et des protéases pouvant endommager les neurones voisins.<sup>41</sup> La cytokine pro-inflammatoire interleukine-1 (IL-1) notamment, peut provoquer l'augmentation de la synthèse de l'APP et du peptide Aβ engendrant un cercle vicieux selon lequel les dépôts amyloïdes stimulent encore plus la formation de cytokines en activant la microglie, conduisant à une production encore plus élevée de peptide APP et de son fragment Aβ (Figure 10).<sup>41</sup>

<sup>40</sup> F. L. Heppner *et al.*, *Nat. Rev. Neurosci.*, **2015**, 16, 358-372

<sup>41</sup> P. Eikelenboom *et al.*, *Glia*, **2002**, 40, 232-239



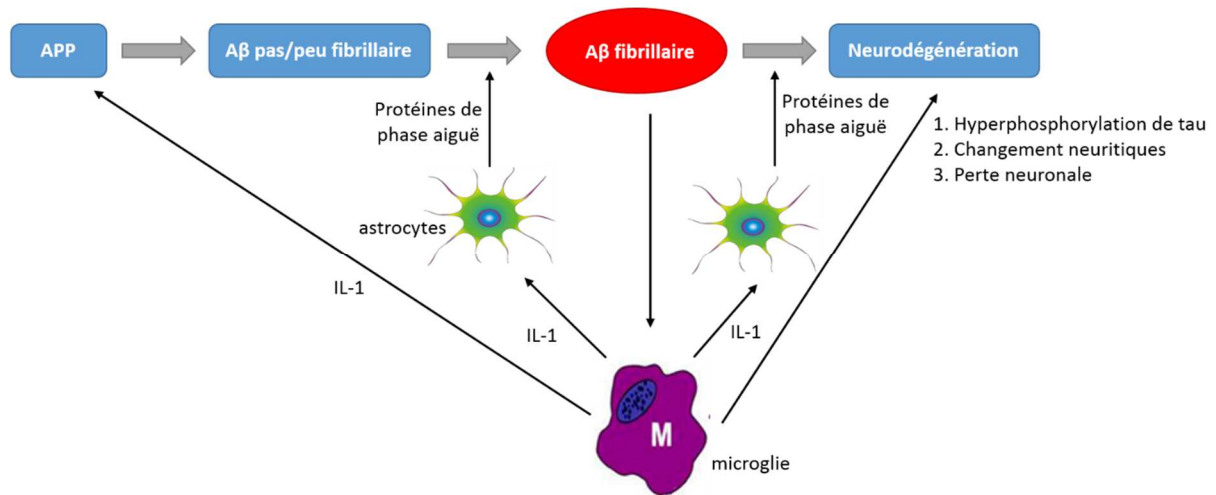


Figure 10. Processus de neuroinflammation. <sup>Adapté de 41</sup>

Une fois activées, les cellules microgliales peuvent également recruter des astrocytes qui augmentent activement la réponse inflammatoire des dépôts amyloïdes extracellulaires.<sup>42</sup> Cette composante neuroinflammatoire dans la MA est notamment caractérisée par une réponse locale aiguë médiée par les cytokines, l'activation du système du complément et l'induction des systèmes enzymatiques inflammatoires comme l'oxyde nitrique synthase (iNOS) et la cyclooxygénase-2 (COX-2).<sup>43, 44</sup>

## E. Traitements

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif de la maladie. Les traitements proposés aux malades n'empêchent en aucun cas la dégénérescence et la mort neuronale. Ils permettent cependant le ralentissement de la progression des symptômes cognitifs de la maladie.

### 1. Les traitements médicamenteux

Quatre médicaments sont actuellement sur le marché. La majorité d'entre eux empêche la dégradation des neurotransmetteurs essentiels au transport neuronal des informations.

#### • Inhibiteurs d'acétylcholinestérase

Les inhibiteurs d'acétylcholinestérase (IACHÉ) bloquent la dégradation de l'acétylcholine, augmentant sa quantité dans la fente synaptique. Ils sont approuvés pour le traitement de la maladie du stade initial à modéré. Quatre représentants de cette famille sont disponibles : la tacrine, le donépézil, la rivastigmine et la galantamine.<sup>27</sup>

La tacrine (Figure 11), est le premier représentant de cette famille à avoir été développé. Elle a été retirée du marché européen en 2004 et américain en 2012 à cause de sa toxicité pour le foie chez 40 % des patients traités.

<sup>42</sup> M. T. Heneka et al., *Lancet Neurol.*, **2015**, 14, 388-405

<sup>43</sup> M. Heneka et al., *J. Neural Transm.*, **2010**, 117, 919-947

<sup>44</sup> K. Hensley, *J. Alzheimers Dis.*, **2010**, 21, 1-14

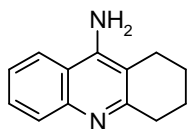


Figure 11. La Tacrine (Cognex®), premier inhibiteur d'acétylcholinestérase.

La seconde génération d'IChE semble moins toxique et leur durée d'action permet des dosages plus pratiques (Figure 12).<sup>45, 46, 47</sup> Parmi ces composés peuvent être distingués les inhibiteurs réversibles tels que le donépézil et la galantimine, et les irréversibles comme la rivastigmine.<sup>48</sup>

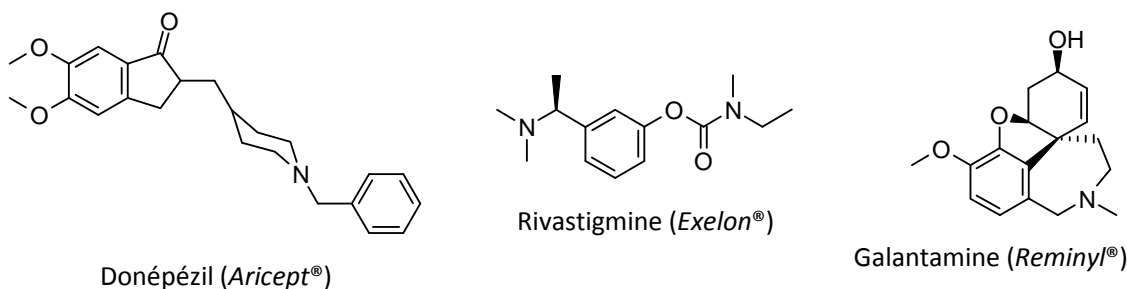


Figure 12. IChE commercialisés.

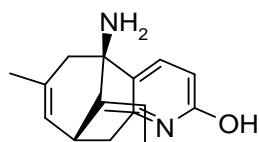


Figure 13. Huperzine A.

L'huperzine A (Figure 13) est un alcaloïde naturel extrait d'une plante chinoise, la *Huperzia serrata*. Cette plante est utilisée depuis des centaines d'années en médecine chinoise pour le traitement de la démence sénile.<sup>49</sup>

Ce composé est un IChE commercialisé en Chine.<sup>50</sup> En comparaison aux autres IChE commerciaux, il possède une durée d'action plus longue, une meilleure biodisponibilité et des effets secondaires moindres.

• **Antagoniste des récepteurs NMDA : la mémantine**

La mémantine (Figure 14), un antagoniste des récepteurs NMDA du glutamate, a été approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 2003 pour le traitement de la MA de modérée à avancée. Elle permet de moduler l'affinité des récepteurs NMDA envers le glutamate, molécule responsable d'une excitation toxique du système nerveux. Ainsi, elle contribue au ralentissement des pertes de fonctions cognitives voire une amélioration chez certains patients. La mémantine est par ailleurs bien tolérée par les malades.<sup>51</sup>

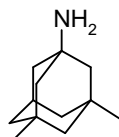


Figure 14. La mémantine (Ebixa®), antagoniste des récepteurs NMDA.

<sup>45</sup> S. L. Rogers et al., *Eur. Neuropsychopharm.*, **2000**, 10, 195-203

<sup>46</sup> J. Marcusson et al., *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, **2003**, 17 S3, S86-S91

<sup>47</sup> M. Rösler et al., *Brit. Med. J.*, **1999**, 318, 633-640

<sup>48</sup> M. Racchi et al., *Pharmacol. Res.*, **2004**, 50, 441-451

<sup>49</sup> A. Zangara, *Pharmacol. Biochem. Be.*, **2003**, 75, 675-686

<sup>50</sup> Y. Ashani et al., *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **1992**, 184, 719-726

<sup>51</sup> C. G. Parsons et al., *Neuropharmacology*, **1999**, 38, 735-767

## 2. Les traitements non médicamenteux

Ce type d'intervention vise à préserver les capacités intactes du patient et à améliorer sa qualité de vie.

En fonction de l'évolution de la maladie et des besoins du malade, différents types d'intervention peuvent être mis en œuvre comme des ateliers artistiques impliquant par exemple de la peinture ou de la sculpture, des ateliers corporels mettant en œuvre de la médecine douce ou des ateliers cognitifs.<sup>7</sup>

Pour le traitement des symptômes neuropsychiatriques, de nombreuses interventions non pharmacologiques ont été étudiées en maisons médicalisées. Elles impliquent l'écoute de la musique,<sup>52</sup> le visionnage de vidéos des membres de la famille, des enregistrements audio de la voix des personnels de soin, de la marche et des exercices légers, de la stimulation sensorielle ou encore de la relaxation.<sup>8</sup>

## 3. Nouvelles approches thérapeutiques

De nombreux mécanismes sont impliqués dans la pathologie d'Alzheimer. Ainsi, les approches thérapeutiques sont multiples.<sup>53</sup>

- **Modulation de la neurotransmission**

La MA est caractérisée par une perte précoce des neurones cholinergiques, conduisant à un déclin de la transmission cholinergique, qui peut être améliorée par les IChE ou par modulation des récepteurs muscariniques et nicotiques à l'acétylcholine.

De nouveaux IChE ont été développés. Le Memogain® (Figure 15) est une prodrogue de la galantamine disponible pour des injections intranasales. Le composé a montré une excellente efficacité, ralentissant le dépôt des plaques,<sup>54</sup> et une bonne capacité à passer la BHE dans les études animales.<sup>55, 56, 57</sup> Le fluorure de méthylsulfonyl (Figure 16) est un IChE irréversible dont le potentiel anti-Alzheimer a été reporté pour la première fois en 1999.<sup>58</sup> Des études précliniques montrant ses effets bénéfiques sur la cognition ont ravivé l'intérêt pour la molécule. Les résultats des essais cliniques de phase I sont très prometteurs.<sup>59</sup>

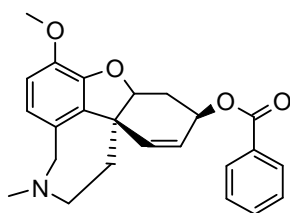


Figure 15. GLN-1062 (*Memogain*®).



Figure 16. Fluorure de méthylsulfonyl.

Le développement d'agonistes des récepteurs muscariniques est restreint par la difficulté d'obtenir des composés aux effets secondaires limités.<sup>60</sup> Le talsaclidine (Figure 17) par exemple est un agoniste des

<sup>52</sup> T. R. Lord *et al.*, *Percept. Motor Skill*, **1993**, 76, 451-455

<sup>53</sup> R. Anand *et al.*, *Neuropharmacology*, **2014**, 76, 27-50

<sup>54</sup> S. Bhattacharya *et al.*, *J. Alzheimers Dis.*, **2015**, 46, DOI: 10.3233/JAD-142421

<sup>55</sup> A. Maelicke *et al.*, *J. Mol. Neurosci.*, **2010**, 40, 135-137

<sup>56</sup> A. C. Baakman *et al.*, *Alzheimers Dement.*, **2014**, 10, P449-P450

<sup>57</sup> S. Bhattacharya *et al.*, *Neural Regeneration Research*, **2015**, 10, 43-45

<sup>58</sup> D. E. Moss *et al.*, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, **1999**, 13, 20-25

<sup>59</sup> D. E. Moss *et al.*, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **2013**, 75, 1231-1239

<sup>60</sup> F. Mangialasche *et al.*, *Lancet Neurol.*, **2010**, 9, 702-716

récepteurs M1 qui diminue la production de peptide Aβ chez les patients atteints de la MA.<sup>61</sup> Cependant ce composé possède certains des effets secondaires des récepteurs cholinergiques comme une augmentation de la salivation. Le composé a été évalué en phase 2 en 2014 (NCT02249403).

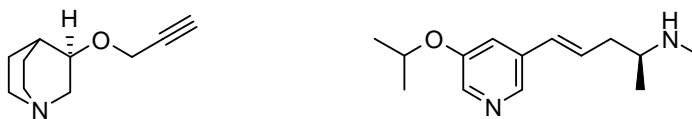


Figure 17. Talsaclidine, agoniste M1. Figure 18. Ispronidine, agoniste α4β2.

L'augmentation de la transmission cholinergique peut aussi se faire *via* les récepteurs nicotiques. L'ispronidine (AZD-3480) (Figure 18) est un agoniste sélectif du récepteur α4β2. Il a montré des effets positifs sur la cognition chez des sujets sains et chez les personnes présentant des problèmes de mémoire.<sup>62, 63, 64</sup> Le composé a engendré une augmentation de la cognition chez des patients atteints de la MA.<sup>65</sup> En 2014, il était en phase 2 de développement (NCT01466088).

• **Thérapeutique Tau**

Différentes stratégies peuvent être envisagées pour lutter contre la tauopathie, comme des inhibiteurs de kinases, des stabilisateurs de microtubules, la dégradation de Tau hyperphosphorylée ou l'immunisation (Figure 19).

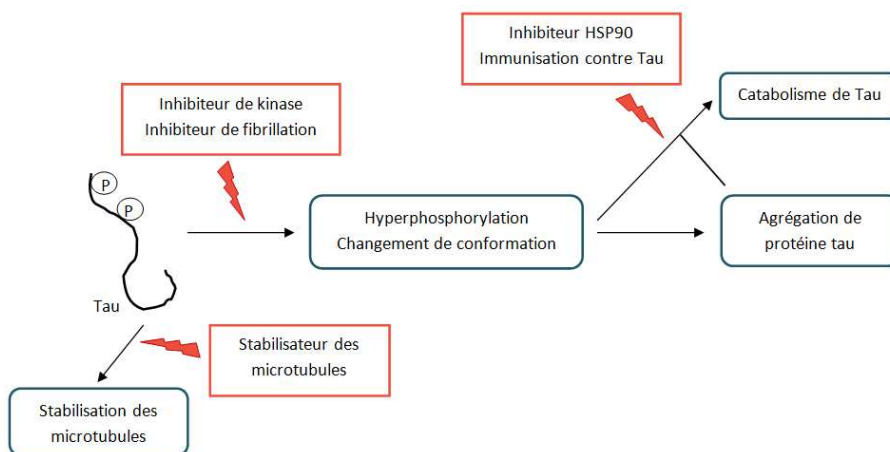


Figure 19. Les différentes stratégies thérapeutiques contre la tauopathie. <sup>Adapté de 66</sup>

L'hyperphosphorylation de Tau est un évènement clé dans la MA, induisant une déstabilisation des microtubules. La glycogen synthase kinase 3 (GSK3) est la première enzyme impliquée dans l'hyperphosphorylation de Tau.<sup>53</sup> Le lithium<sup>67</sup> et le valproate de sodium<sup>68</sup> (Figure 20) ont une action inhibitrice sur la GSK3 et ont montré une réduction de la tauopathie chez des souris transgéniques. Le tideglusib (Figure 20), un inhibiteur irréversible de la GSK3β,<sup>69</sup> est actuellement étudié pour ses effets sur la

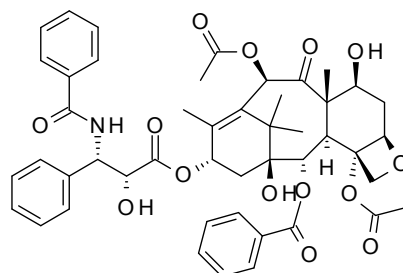
<sup>61</sup> C. Hock et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2000**, 920, 285-291  
<sup>62</sup> G. C. Dunbar et al., *J. Psychopharmacol.*, **2007**, 21, 171-178  
<sup>63</sup> J. Braudeau et al., *J. Psychopharmacol.*, **2011**, 25, 1030-1042  
<sup>64</sup> A. S. Potter et al., *Biol. Psychiat.*, **2014**, 75, 207-214  
<sup>65</sup> G. C. Dunbar et al., *J. Psychopharmacol.*, **2011**, 25, 1020-1029  
<sup>66</sup> D. Barten et al., *Mol Neurobiol*, **2008**, 37, 171-186  
<sup>67</sup> T. Engel et al., *J. Neurochem.*, **2006**, 99, 1445-1455  
<sup>68</sup> G. Chen et al., *J. Neurochem.*, **1999**, 72, 1327-1330  
<sup>69</sup> T. del Ser et al., *J. Alzheimers Dis.*, **2013**, 33, 205-15

MA. Une première étude sur les patients atteints d'un stade initial à modéré de la maladie à différentes doses a montré une amélioration de la cognition. Le composé a achevé la phase II des essais cliniques en 2012 (NCT01350362). Il s'est avéré non toxique, bien toléré, mais n'a pas montré de réelle efficacité clinique sur des patients atteints en phase initiale ou modéré de la maladie.<sup>70</sup>



**Figure 20. Le valproate de sodium et le tideglusib, inhibiteurs de GSK<sub>3</sub>.**

Différents composés ayant pour action de stabiliser les microtubules sont actuellement en développement. L'administration de paclitaxel (Figure 21) à des souris transgéniques mimant la tauopathie a conduit à l'amélioration du transport axonal, une augmentation de la densité des microtubules et des fonctions motrices.<sup>71</sup> Le paclitaxel prévient totalement l'affaiblissement des synapses induit par Tau.<sup>72</sup> Cependant, étant donnée l'activité anticancéreuse cytotoxique du composé, son utilisation sur des cellules non malignes pose des questions de sécurité. D'autres stabilisateurs de microtubules (comme l'épothilone D, et deux neuropeptides : le NAP (NAPVSIPQ) ou le D-SAL (SALLRSIPA)) sont en phase de développement clinique.<sup>53</sup>



**Figure 21. La paclitaxel, stabilisateur de microtubules.**

Un composé empêchant l'accumulation de Tau hyperphosphorylée peut être très utile pour le traitement de la MA. Le colorant bleu de méthylène (Figure 22) possède une grande palette d'effets pharmacologiques dont celle d'empêcher l'interaction entre les protéines Tau hyperphosphorylées.<sup>73</sup> De plus, le bleu de méthylène (un IACHe<sup>74</sup>) inhibe l'agrégation de peptide A $\beta$ , améliore le transport des électrons, diminue le stress oxydatif, prévient les dommages des mitochondries<sup>75</sup> et régule l'autophagie.<sup>73</sup> Le composé a montré des effets de stabilisation de la maladie sur 50 semaines lors d'essais chez l'homme.<sup>76</sup> Ces résultats encourageants ont conduit au développement d'une nouvelle génération de la molécule, nommée leuco-méthylthioninium (Figure 23). Cette nouvelle génération a montré une meilleure

<sup>70</sup> E. Tolosa *et al.*, *Movement Disord.*, **2014**, 29, 470-478

<sup>71</sup> B. Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, 227-231

<sup>72</sup> H. Erez *et al.*, *Front. Cell. Neurosci.*, **2014**, 8, 34

<sup>73</sup> E. E. Congdon *et al.*, *Autophagy*, **2012**, 8, 609-622

<sup>74</sup> M. Pfaffendorf *et al.*, *Brit. J. Pharmacol.*, **1997**, 122, 95-98

<sup>75</sup> H. Atamna *et al.*, *FASEB J.*, **2008**, 22, 703-712

<sup>76</sup> C. M. Wischik *et al.*, *Alzheimers Dement.*, **2008**, 4, T167

biodisponibilité et une meilleure tolérance.<sup>77</sup> Le composé est entré en phase clinique III en 2012 afin de prouver son efficacité clinique.

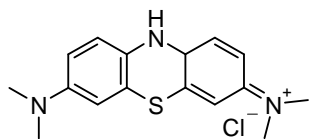


Figure 22. Le bleu de méthylène.

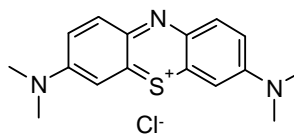


Figure 23. Leuco-méthylthioninium.

Une autre stratégie est d'augmenter la dégradation des amas de Tau hyperphosphorylée en diminuant ainsi leur toxicité. La heat shock protein 90 (HSP90), une chaperonne impliquée dans la dégradation des protéines dénaturées, semble jouer un rôle en empêchant la dégradation de Tau.<sup>78</sup> La curcumine (Figure 24) a une grande palette d'actions dont l'inhibition d'HSP90.<sup>79</sup> Des traitements à la curcumine allègent la tauopathie chez des souris transgéniques mimant la pathologie en supprimant la formation des amas.<sup>80</sup> Divers inhibiteurs d'HSP90 sont disponibles,<sup>81</sup> comme le ridicicol et ses dérivés la geldanamycine et la tanespimycine mais ces composés présentent une faible biodisponibilité.<sup>82</sup> Certains d'entre eux sont actuellement en essais cliniques en tant qu'anticancéreux.<sup>53</sup>

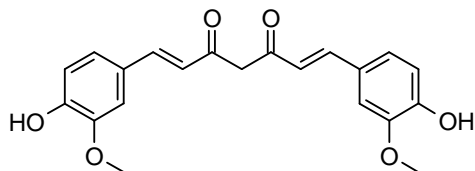


Figure 24. La curcumine, inhibiteur de HSP90.

Des essais d'immunisation active de la protéine Tau sur deux modèles de souris transgéniques ont montré une forte diminution de la tauopathie sans effets secondaires.<sup>83</sup> Des essais d'immunisation passive avec des anticorps monoclonaux contre la protéine Tau hyperphosphorylée ont également montré de bons résultats sur des souris mimant la tauopathie.<sup>84, 85</sup> Des essais de vaccination sont en cours chez l'homme : deux essais d'immunisation actives et onze essais d'immunisation passive.<sup>86</sup> Les résultats futurs permettront de juger de la validité du concept.

### • Thérapie antiamyloïde

Pour lutter contre les PA les différentes stratégies envisagées sont l'inhibition ou la modulation des sécrétases, des inhibiteurs d'agrégations du peptide, le développement d'anticorps anti-A $\beta$  ou des inducteurs du catabolisme du peptide (Figure 25).<sup>21</sup>

<sup>77</sup> L. Ghezzi et al., *Drug Des. Dev. Ther.*, **2013**, 7, 1471-1479

<sup>78</sup> C. A. Dickey et al., *J. Clin. Invest.*, **2007**, 117, 648-658

<sup>79</sup> C. Giommarelli et al., *Cell. Mol. Life Sci.*, **2010**, 67, 995-1004

<sup>80</sup> Q.-L. Ma et al., *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288, 4056-4065

<sup>81</sup> H. Zhao et al., *Adv. Pharmacol.*, **2012**, 64, 1-25

<sup>82</sup> L. J. Blair et al., *Alzheimers Res. Ther.*, **2013**, 5, 41

<sup>83</sup> M. Boimel et al., *Exp. Neurol.*, **2010**, 224, 472-485

<sup>84</sup> X. Chai et al., *J. Biol. Chem.*, **2011**, 286, 34457-34467

<sup>85</sup> A. Boutajangout et al., *J. Neurochem.*, **2011**, 118, 658-667

<sup>86</sup> J. T. Pedersen et al., *Trends Mol. Med.*, **2015**, 21, 394-402

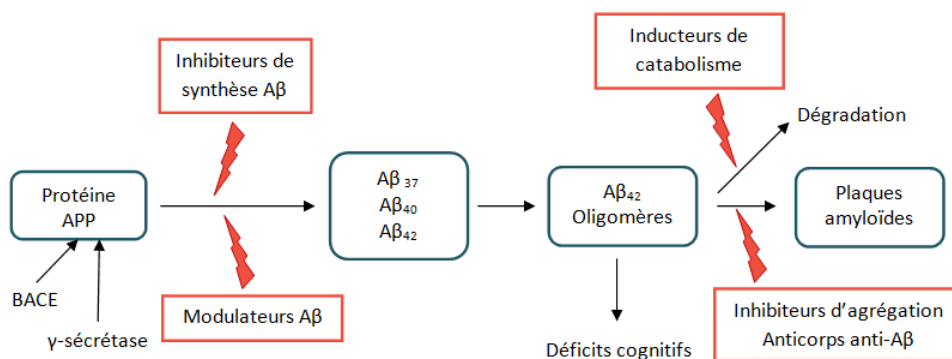


Figure 25. Les différentes stratégies thérapeutiques contre Aβ. Adapté de 66

Le peptide Aβ est issu de la métabolisation de l'APP. Dans les conditions physiologiques, l'α-sécrétase est la principale enzyme agissant sur le peptide, suivie de la γ-sécrétase. Le métabolisme de l'APP suit la voie amyloïdogénique lorsque le peptide subit une coupure par la β-sécrétase au lieu de l'α-sécrétase. Potentialiser l'activité de l'α-sécrétase conduirait à la formation de fragments non toxiques de l'APP et une inhibition de la β et de la γ-sécrétase diminuerait la voie amyloïdogénique. De récentes études ont montré que l'épigallocatechin-gallate (Figure 26), un polyphénol présent dans le thé vert augmente l'activité de l'α-sécrétase et favorise donc la voie non-amyloïdogénique.<sup>87</sup> Ce composé réduirait également *in vitro* l'agrégation de Tau.<sup>88</sup> Il présente aussi une activité anti-inflammatoire. Des essais cliniques de phase III sont actuellement en cours (NCT00951834).

La γ-sécrétase intervient sur différents substrats dans l'organisme et non seulement sur l'APP. Un de ces substrats est la protéine Notch qui régule la prolifération, le développement, la différenciation, la croissance, la communication et la survie cellulaire. Deux classes de composés ciblant la γ-sécrétase existent : les inhibiteurs et les modulateurs de l'enzyme. Les inhibiteurs bloquent totalement l'enzyme et affectent son action sur d'autres protéines (comme Notch) alors que les modulateurs ont une action limitée sur Notch. Que ce soit l'une ou l'autre des classes, les résultats obtenus lors des phases cliniques avec les composés développés tels que le tarenflurbil ou le semagacestat (Figure 26) se sont révélés très décevants.<sup>89, 90</sup> Des composés ciblant la β-sécrétase ont également été développés. Certains d'entre eux sont entrés dans les premières phases de développement clinique comme le composé LY2886721 (Figure 26) qui est en phase II.<sup>91</sup> Cependant ce dernier a provoqué des problèmes hépatiques chez les patients traités et a donc été stoppé récemment.<sup>92</sup>

<sup>87</sup> A. Smith *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **2010**, 389, 207-212

<sup>88</sup> H. J. Wobst *et al.*, *FEBS Let.*, **2015**, 589, 77-83

<sup>89</sup> B. P. Imbimbo, *J. Alzheimers Dis.*, **2009**, 17, 757-760

<sup>90</sup> B. P. Imbimbo *et al.*, *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2011**, 20, 325-341

<sup>91</sup> P. C. May *et al.*, *J. Neurosci.*, **2015**, 35, 1199-1210

<sup>92</sup> D. K. Lahiri *et al.*, *Alzheimers Dement.*, **2014**, 10, S411-S419

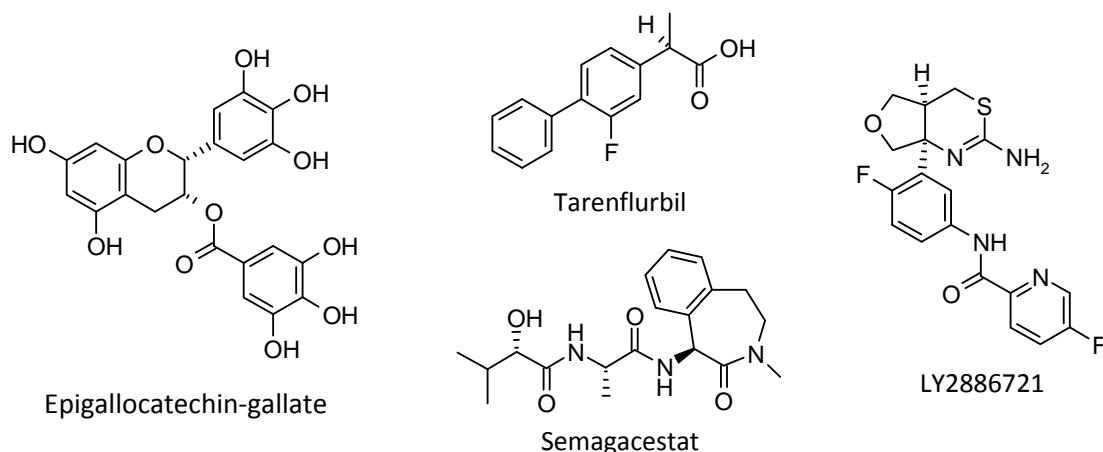


Figure 26. Composés agissant sur les secrétases.

Le tramiprosate (Figure 27) est un glycosaminoglycane mimétique qui se lie au monomère A $\beta$  et évite son agrégation. Le composé a montré des résultats encourageants en phase II.<sup>93</sup> Les tests de phase III ont conduit à des observations très intéressantes. Les premiers résultats de l'étude n'ont pas montré de bénéfice significatif lié au traitement. Cependant, une seconde analyse des données a suggéré de probables modifications bénéfiques du médicament sur la maladie.<sup>94</sup> L'administration du composé a conduit à des améliorations cognitives spécifiques dans divers aspects de la mémoire et du langage.<sup>95</sup> Les IRMs des patients traités ont montré une diminution de l'atrophie de l'hippocampe.<sup>96</sup> Bien que les effets du tramiprosate sur le peptide A $\beta$  apparaissent bénéfiques, son action sur le métabolisme de Tau reste obscure. Une étude a montré que le composé conduisait à une agrégation inattendue de Tau.<sup>97</sup> D'autres composés empêchant l'agrégation d'A $\beta$  sont en essais cliniques.<sup>53</sup>

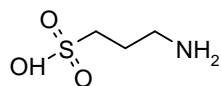


Figure 27. Le tramiprosate, antiagrégant d'A $\beta$ .

Des essais d'immunothérapies tendent à promouvoir l'élimination du peptide A $\beta$ . Des essais cliniques de vaccination ont été débutés suite à la constatation que l'immunisation avec le peptide A $\beta$  réduit les signes pathologiques de la MA chez des souris transgéniques qui possèdent des mutations sur le gène codant pour l'APP. Suite au développement d'encéphalite chez 6 % des patients, cet essai a été interrompu.<sup>98</sup> De nouvelles générations de vaccin ont été conçues. Les résultats obtenus jusqu'à présent sont très prometteurs et ne présentent pas d'effets secondaires. Quatre anticorps monoclonaux anti-A $\beta$  ont été développés à ce jour. Le bapineuzumab a montré des résultats décevants en phase III et a été stoppé.<sup>99</sup> Il en est de même pour le solanezumab,<sup>100</sup> le gantenerumab<sup>101</sup> et le crenezumab.<sup>102</sup>

<sup>93</sup> P. S. Aisen et al., *Arch. Med. Sci.*, **2011**, 7, 102-111

<sup>94</sup> C. Caltagirone et al., *Aging Clin. Exp. Res.*, **2012**, 24, 580-587

<sup>95</sup> D. Saumier et al., *J. Nutr. Health Aging*, **2009**, 13, 808-812

<sup>96</sup> S. Gauthier et al., *J. Nutr. Health Aging*, **2009**, 13, 550-557

<sup>97</sup> I. Santa-Maria et al., *Mol. Neurodegener.*, **2007**, 2, 17

<sup>98</sup> J. M. Orgogozo et al., *Neurology*, **2003**, 61, 46-54

<sup>99</sup> R. Sperling et al., *Lancet Neurol.*, **2012**, 11, 241-249

<sup>100</sup> B. P. Imbimbo et al., *Expert Rev. Clin. Immunol.*, **2012**, 8, 135-149

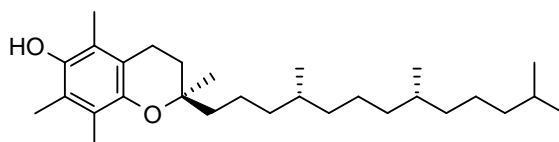
<sup>101</sup> B. Bohrmann et al., *J. Alzheimers Dis.*, **2012**, 28, 49-69

<sup>102</sup> H. Jindal et al., *Hum. Vaccin. Immunother.*, **2014**, 10, 2741-2743



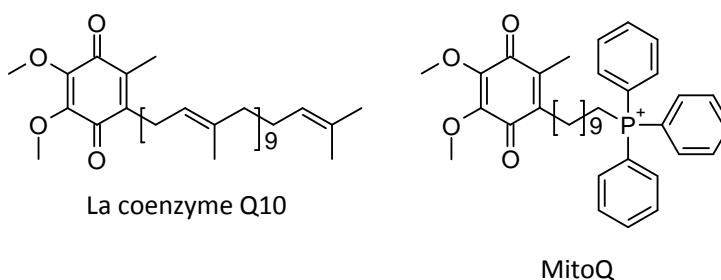
- **Autres voies envisagées**

Le stress oxydatif est un processus pathologique crucial dans la MA. Il devient donc nécessaire de le réduire dans les cellules. Les preuves de la protection offerte par les antioxydants tels que les vitamines, les composés synthétiques et photochimiques sont contradictoires. L'administration de vitamine E (Figure 28) à un modèle de souris transgénique à un stade précoce réduit la peroxydation des lipides et la formation de plaques mais des tests complémentaires sur l'homme n'ont pas montré de bénéfices suffisants.<sup>103</sup> La combinaison de la vitamine E et du donépézil n'a pas montré de bénéfice additionnel chez des patients atteints de la MA.<sup>104</sup> Des tests de phase III viennent de se terminer pour une association vitamine E/mémantine<sup>105</sup> et sont en cours pour l'association vitamine E/sélénium (NCT00040378).



**Figure 28. Vitamine E, un antioxydant.**

D'autres thérapeutiques développées sont spécifiques aux mitochondries. La coenzyme Q10 (CoQ10) est une protéine transportant les électrons du complexe I au complexe II dans la chaîne de transport des électrons (CTE). Des compléments en CoQ10 (Figure 29) ont des effets neuroprotecteurs potentiels comme la suppression des espèces réactives de l'oxygène (ERO), la minimisation des lésions provoquées par les ERO et la stabilisation des fonctions mitochondriales.<sup>106</sup> Les effets de la CoQ10 en tests précliniques se sont avérés encourageants mais les résultats sur l'homme que ce soit en monothérapie ou en association se sont révélés très décevants. Un autre composé prometteur pour le traitement visant les mitochondries est un dérivé de la CoQ10, le MitoQ (Figure 29).<sup>107</sup> Ce composé s'accumule sélectivement dans ces organelles et est perpétuellement recyclé par les enzymes mitochondriales. Il peut fonctionner même en l'absence de CTE ce qui en fait un puissant antioxydant.<sup>108</sup>



**Figure 29. Composés visant les mitochondries.**

Le cerveau des patients atteint de MA révèle des preuves microscopiques d'inflammation. Des essais cliniques avec des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens (le flubiprofen par exemple) n'ont pas montré de résultats significatifs.<sup>109</sup>

<sup>103</sup> N. Farina *et al.*, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2012**, 11,

<sup>104</sup> R. C. Petersen *et al.*, *New Engl. J. Med.*, **2005**, 352, 2379-2388

<sup>105</sup> M. W. Dysken *et al.*, *Alzheimers Dement.*, **2013**, 10, 36-44

<sup>106</sup> J. Lee *et al.*, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2009**, 61, 1316-1323

<sup>107</sup> G. F. Kelso *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 4588-4596

<sup>108</sup> M. J. McManus *et al.*, *J. Neurosci.*, **2011**, 31, 15703-15715

<sup>109</sup> J. C. Breitner *et al.*, *Alzheimers Dement.*, **2011**, 7, 402-411

- **Développement de composés mixtes**

Il est de plus en plus évident que l'utilisation d'un composé visant une cible particulière peut ne pas être suffisant pour soigner des maladies complexes qui sont polyétiologiques, comme les maladies neurodégénératives et notamment la MA. Ainsi, l'emploi de plusieurs composés contre plusieurs cibles a été suggéré comme un bon moyen de traiter ces maladies. Des essais cliniques combinent actuellement plusieurs candidats médicaments.<sup>110, 111</sup>

Une approche alternative est basée sur l'utilisation d'une seule entité chimique capable d'agir sur plusieurs cibles identifiées pour une maladie. Cette approche implique la synthèse de composés hybrides, conçus en incorporant deux entités pharmacophoriques. L'utilisation d'un seul composé multiactions à la place d'un cocktail de molécules permet de réduire les interactions médicamenteuses et de simplifier les études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, la synthèse, la formulation, les essais cliniques et le dosage.<sup>110</sup>

De nombreux composés ont été développés, suivant plusieurs combinaisons.

- \* **Action d'inhibition de l'ACHé et antiagrégation du peptide A $\beta$**

Il a été montré que l'ACHé se colocalise avec les plaques neuritiques de peptide A $\beta$ , qui peut favoriser la formation des fibrilles. De plus, il semblerait que l'ACHé joue un rôle de chaperonne en induisant une transition conformationnelle du peptide A $\beta$ , conduisant à l'agrégation et à la formation des fibrilles, notamment *via* un site périphérique de l'enzyme.<sup>112, 113</sup> Ainsi les composés pouvant interagir à la fois avec le site catalytique de l'enzyme et le site périphérique, nommé inhibiteurs à double site de liaison, sont de potentiels inhibiteurs de l'ACHé et de l'agrégation du peptide A $\beta$ . Le donépézil a notamment montré une capacité à interagir avec les deux sites de l'enzyme et les études ont montré qu'il induisait une diminution de l'agrégation des plaques de peptide A $\beta$ .<sup>110</sup>

Parmi les composés développés, des dérivés de la tacrine (**1**, Figure 30) ont été synthétisés.<sup>114</sup> Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque la tacrine est intacte. Des dérivés du donépézil ont également été conçus, comme le composé **2**. Il s'avère que ce n'est pas un inhibiteur sélectif de l'ACHé mais il présente une bonne capacité d'inhibition de l'agrégation du peptide A $\beta$ .<sup>115</sup> Le composé **3** un dérivé benzotriazinone est un inhibiteur modéré non sélectif de l'ACHé et possède également une propriété antiagrégante qui peut s'expliquer par sa capacité à perturber les interactions entre feuillets  $\beta$ .<sup>116</sup> Le diarylimidazole **4** sélectif de la BuChE présente une bonne capacité d'inhibition de la formation de fibrilles d'A $\beta$ .<sup>117</sup> L'isaindigotone présente des similarités structurales avec la tacrine. Le composé **5**, dérivé de celle-ci est un IACHé sélective qui possède également une forte capacité d'inhibition de l'agrégation du peptide A $\beta$ .<sup>118</sup> La chelerythrine (composé **6**) a été identifié en tant qu'ICHé suite à un screening de 502 produits naturels. Le composé a montré une capacité modéré d'inhibition des ChE et a montré une capacité à inhiber la formation des

<sup>110</sup> D. Muñoz-Torrero, *Curr. Med. Chem.*, **2008**, 15, 2433-2455

<sup>111</sup> A. Anighoro *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 7874-7887

<sup>112</sup> G. V. De Ferrari *et al.*, *Biochemistry*, **2001**, 40, 10447-10457

<sup>113</sup> T. M. Rees *et al.*, *Drugs Today*, **2003**, 39, 75-83

<sup>114</sup> H. Tang *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, 46, 4970-4979

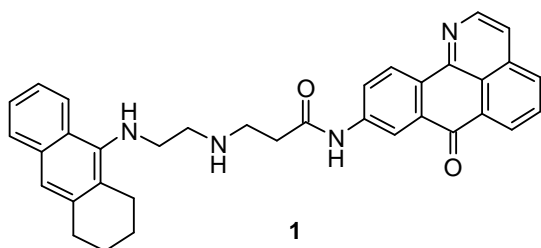
<sup>115</sup> E. Özturan Özer *et al.*, *Bioorg. Med. Chem Lett.*, **2013**, 23, 440-443

<sup>116</sup> M. Catto *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 58, 84-97

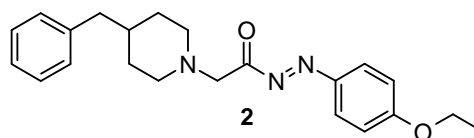
<sup>117</sup> N. Guzior *et al.*, *Curr. Med. Chem.*, **2015**, 22, 373-404

<sup>118</sup> J.-W. Yan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 2527-2534

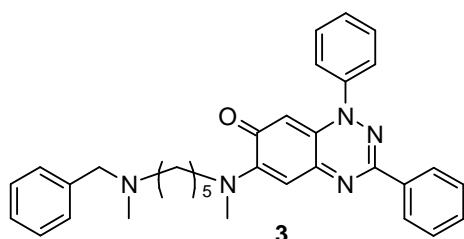
agrégats de peptide A $\beta$ .<sup>119</sup> Des dérivés de chalcones ou de coumarines ont également été développés et présentent des capacités d'inhibition des ChE et de l'agrégation du peptide A $\beta_{42}$  de l'ordre du micromolaire.<sup>120</sup>



IC<sub>50</sub> EeAChE = 3,4 nM  
 IC<sub>50</sub> EqBuChE = 110 nM  
 Inh. agr. A $\beta_{42}$  auto-ind. = 79,9 % à 10  $\mu$ M  
 Inh. agr. A $\beta_{40}$  AChE-ind. = 83,3 % à 100  $\mu$ M



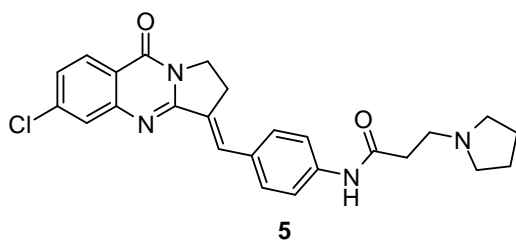
IC<sub>50</sub> hAChE = 53,1  $\mu$ M  
 IC<sub>50</sub> EqBuChE = 67,3  $\mu$ M  
 Inh. agr. A $\beta_{40}$  auto-ind. = 80 % à 100  $\mu$ M



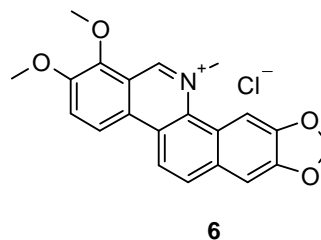
IC<sub>50</sub> EeAChE = 1,5  $\mu$ M  
 IC<sub>50</sub> EqBuChE = 1,9  $\mu$ M  
 IC<sub>50</sub> A $\beta_{40}$  = 1,4  $\mu$ M



IC<sub>50</sub> EqBuChE = 0,10  $\mu$ M  
 IC<sub>50</sub> hBuChE = 1,11  $\mu$ M  
 IC<sub>50</sub> A $\beta_{40}$  = 5,8  $\mu$ M



IC<sub>50</sub> EeAChE = 41 nM  
 IC<sub>50</sub> EqBuChE = 3,82  $\mu$ M  
 Inh. agr. A $\beta_{40}$  auto-ind. = 62,3 % à 10  $\mu$ M



IC<sub>50</sub> hAChE = 1,54  $\mu$ M  
 IC<sub>50</sub> hBuChE = 10,34  $\mu$ M  
 IC<sub>50</sub> A $\beta_{40}$  auto-ind. = 4,20  $\mu$ M  
 Inh. agr. A $\beta_{40}$  AChE-ind. = 65 % à 10  $\mu$ M

**Figure 30. Exemples d'inhibiteurs mixtes AChE et antiagrégation du peptide A $\beta$ .**

EeAChE : acétylcholinestérase d'*Electrophorus electricus*, EqBuChE : butylcholinestérase de sérum équin, hAChE : acétylcholinestérase humaine, hBuChE : butylcholinestérase humaine, Inh. agr. A $\beta_{40/42}$  auto-ind. : inhibition de l'agrégation du peptide A $\beta_{40/42}$  auto-induite, Inh. agr. A $\beta_{40/42}$  AChE-ind. : inhibition de l'agrégation du peptide A $\beta_{40/42}$  induite par l'AChE.

\* **Inhibiteurs mixtes de l'AChE et de la  $\beta$ -sécrétase**

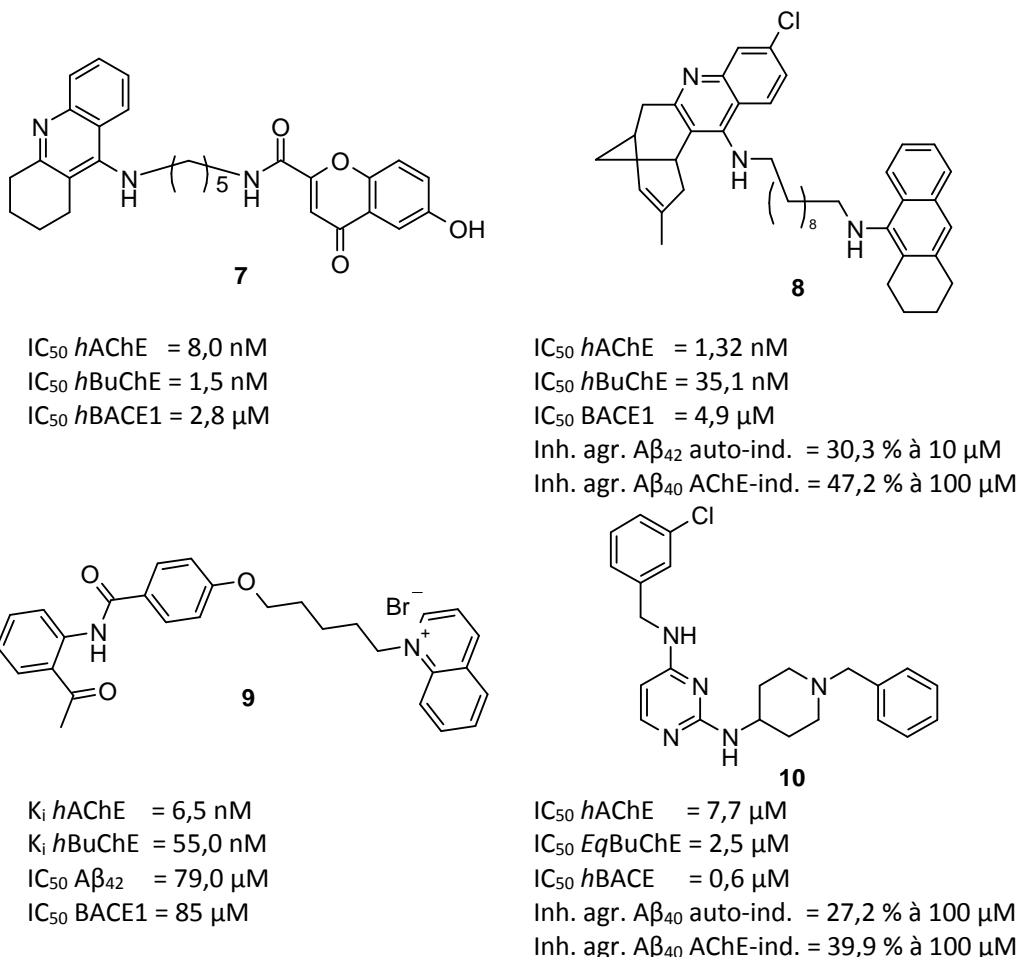
Des composés mixtes entre la tacrine et la chromone, comme le composé **7** (Figure 31), ont montré une action à la fois sur l'inhibition des ChE et de BACE1.<sup>121</sup> Une famille de composés mixtes entre la tacrine et l'huprine (composé **8**) a montré une bonne capacité d'inhibition des ChE, une bonne capacité d'inhibition

<sup>119</sup> G. Brunhofer et al., *Bioorgan. Med. Chem.*, **2012**, 20, 6669-6679

<sup>120</sup> S. Bag et al., *Bioorg. Med. Chem Lett.*, **2013**, 23, 2614-2618

<sup>121</sup> M. I. Fernández-Bachiller et al., *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 1303-1317

de BACE1 et également une bonne capacité d'inhibition de l'agrégation du peptide A $\beta$ .<sup>122</sup> Des composés de la famille des benzamides comme le composé **9** ont montré une action de l'ordre du nanomolaire pour l'inhibition des ChE et une capacité de l'ordre du micromolaire pour l'inhibition de l'agrégation du peptide A $\beta$  et de la BACE1.<sup>123</sup> Une famille de pyrimidine contenant la partie 1-benzylpiperidin-4-amine du donépézil a été synthétisée et le meilleur représentant correspond au composé **10**. Ce composé présente une capacité d'inhibition des ChE de l'ordre du micromolaire, une capacité d'inhibition du peptide A $\beta$  et un potentiel d'inhibition de BACE1.<sup>124</sup>



**Figure 31. Exemples d'inhibiteurs mixtes de l'AChE et de la  $\beta$ -sécrétase.**

EqBuChE : butylcholinestérase de sérum équin, hAChE : acétylcholinestérase humaine, hBuChE : butylcholinestérase humaine, hBACE1 :  $\beta$ -sécrétase humaine, Inh. agr. A $\beta$ <sub>40/42</sub> auto-ind. : inhibition de l'agrégation du peptide A $\beta$ <sub>40/42</sub> auto-induite, Inh. agr. A $\beta$ <sub>40/42</sub> AChE-ind. : inhibition de l'agrégation du peptide A $\beta$ <sub>40/42</sub> induite par l'AChE.

\* **Inhibiteurs mixtes de l'AChE et de la MAO**

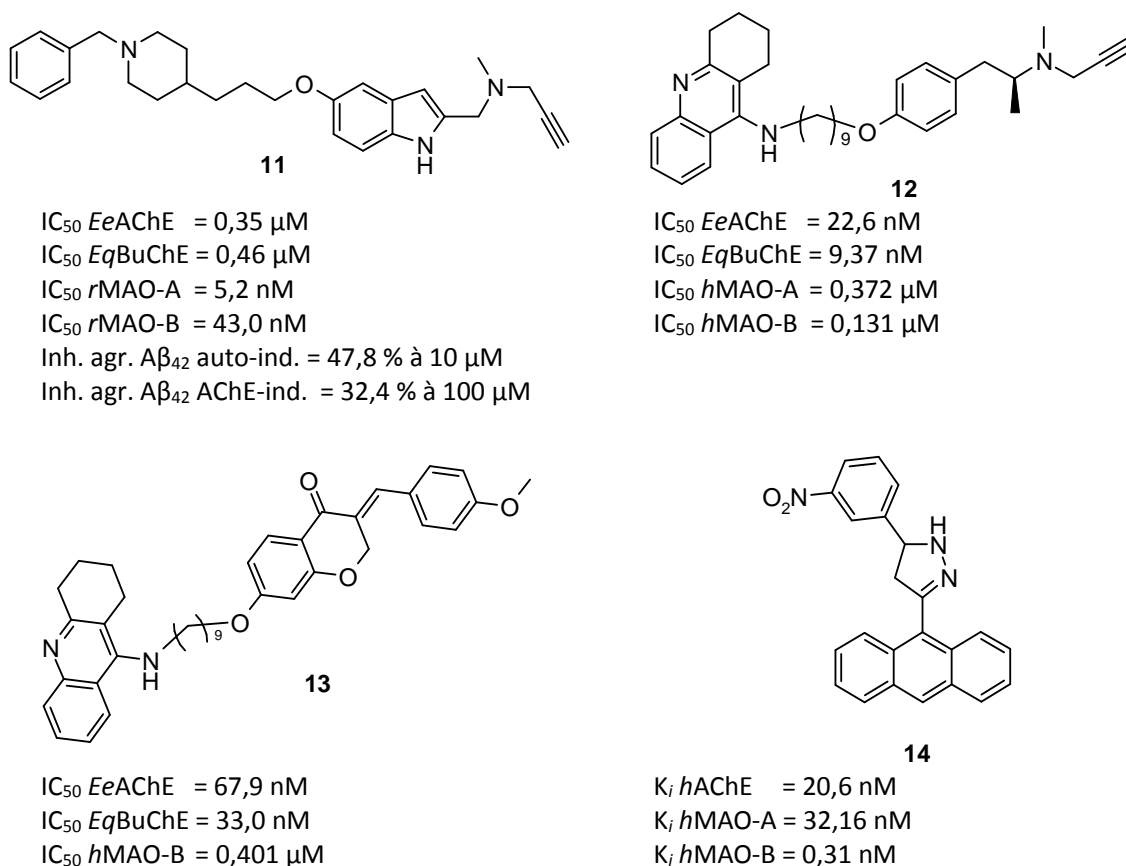
Le potentiel thérapeutique des inhibiteurs de monoamine oxydase (IMAO) dans le traitement de la MA est suggéré par leurs propriétés neuroprotectives par leurs effets sur la transmission monoaminergique. Les effets neuroprotecteurs d'IMAO peuvent résulter de l'augmentation de la neurotransmission et également de la réduction de la formation de composés neurotoxiques.<sup>117</sup>

<sup>122</sup> C. Galdeano et al., *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 661-669

<sup>123</sup> D.-Y. Peng et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 6739-6750

<sup>124</sup> T. Mohamed et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, 22, 4707-4712

Des composés dérivés du donépézil ont été développés. Le meilleur représentant de cette catégorie (composé **11**, Figure 32) présente une très bonne capacité d'inhibition des MAO de l'ordre du nanomolaire, une capacité d'inhibition des ChE de l'ordre submicromolaire et également une capacité d'inhibition de l'agrégation du peptide Aβ.<sup>125</sup> Des hybrides entre la tacrine et la sélégiline, un IMAO bien connu, ont été synthétisés. Le composé **12**, présente une capacité d'inhibition des ChE de l'ordre du nanomolaire et une capacité d'inhibition des MAO de l'ordre du submicromolaire.<sup>126</sup> Les homoflavones sont connues pour leur capacité d'inhibition de la MAO-B. Des mixtes entre tacrine et homoflavone ont été synthétisés. Le meilleur des composés, **13**, présente une capacité d'inhibition des ChE de l'ordre du nanomolaire et une inhibition sélective de la MAO-B de l'ordre du submicromolaire.<sup>127</sup> Des dérivés de pyrazoline ont également été synthétisés, le composé **14** par exemple inhibe de manière sélective l'AChE et à une capacité d'inhibition des MAO de l'ordre du nanomolaire.<sup>128</sup>



**Figure 32. Exemples d'inhibiteurs mixtes de l'AChE et des MAO.**

EeAChE : acétylcholinestérase d'*Electrophorus electricus*, EqBuChE : butylcholinestérase de sérum équin, hAChE : acétylcholinestérase humaine, hBuChE : butylcholinestérase humaine, hMAO-A/B : monoamine oxydase A/B humaine, rMAO-A/B : monoamine oxydase A/B de cerveau de rat, Inh. agr. Aβ<sub>40/42</sub> auto-ind. : inhibition de l'agrégation du peptide Aβ<sub>40/42</sub> auto-induite, Inh. agr. Aβ<sub>40/42</sub> AChE-ind. : inhibition de l'agrégation du peptide Aβ<sub>40/42</sub> induite par l'AChE.

\* **IACHe avec une activité antioxydante**

De plus en plus d'évidences suggèrent que les radicaux libres peuvent être impliqués dans la MA, le cerveau des patients étant exposé au stress oxydatif durant le développement de la maladie.<sup>117</sup>

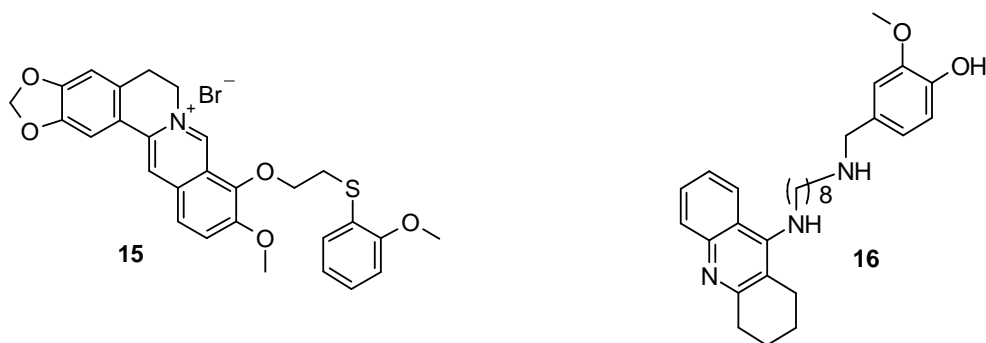
<sup>125</sup> I. Bolea et al., *J. Med. Chem.*, **2011**, 54, 8251-8270

<sup>126</sup> C. Lu et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, 62, 745-753

<sup>127</sup> Y. Sun et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, 21, 7406-7417

<sup>128</sup> N. Mishra et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, 21, 1969-1973

Des dérivés de la berbérine, un composé connu pour son activité d'inhibition de l'AChE et ses améliorations cognitives, ont été synthétisés. Le composé **15** (Figure 33) conduit à une inhibition de l'AChE de l'ordre du subnanomolaire et une bonne capacité antioxydante. De plus, ce composé permet d'inhiber la formation du peptide A $\beta$ .<sup>129</sup> Pour cette famille de composés mixtes, la tacrine a également été utilisée. Le composé **16** présente une capacité d'inhibition des ChE de l'ordre du nanomolaire, une bonne action antioxydante et également une inhibition de l'agrégation du peptide A $\beta$ .<sup>130</sup> Parmi les multiples composés développés peuvent également être cités des dérivés de l'ésbélène (un antioxydant),<sup>131</sup> des dérivés indoliques,<sup>132</sup> ou de coumarine.<sup>133</sup>



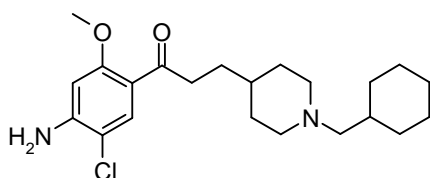
IC<sub>50</sub> EeAChE = 0,15  $\mu$ M  
 IC<sub>50</sub> EqBuChE = 1,09  $\mu$ M  
 Inh. agr. A $\beta$ <sub>42</sub> auto-ind. = 76,8 % à 20  $\mu$ M  
 ORAC = 1,94 éq. Trolox

IC<sub>50</sub> EeAChE = 4,55 nM  
 IC<sub>50</sub> EqBuChE = 3,41 nM  
 Inh. agr. A $\beta$ <sub>42</sub> auto-ind. = 71 % à 20  $\mu$ M  
 ORAC = 1,9 éq. Trolox

**Figure 33. Exemples d'IChE à activité antioxydante.**

EeAChE : acétylcholinestérase d'*Electrophorus electricus*, EqBuChE : butylcholinestérase de sérum équin, Inh. agr. A $\beta$ <sub>40/42</sub> auto-ind. : inhibition de l'agrégation du peptide A $\beta$ <sub>40/42</sub> auto-induite, ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity.

\* **IChE avec une activité sérotoninergique**



IC<sub>50</sub> hAChE = 16 nM  
 K<sub>i</sub> h5-HT<sub>4e</sub>R = 8,5 nM

**Figure 34. Donécopride.**

hAChE : acétylcholinestérase humaine,  
 h5-HT<sub>4e</sub>R : récepteur h5-HT<sub>4e</sub> humain.

Le donécopride est un agoniste du récepteur 5-HT<sub>4</sub> (impliqué dans les performances de la mémoire) et présente également une capacité d'inhibition de l'AChE de l'ordre du nanomolaire. Des tests *in vivo* ont montré que l'administration du composé conduit à une amélioration cognitive des souris traitées.<sup>134</sup>

<sup>129</sup> T. Su *et al.*, *Bioorgan. Med. Chem.*, **2013**, 21, 5830-5840

<sup>130</sup> W. Luo *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, 46, 2609-2616

<sup>131</sup> Z. Luo *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2013**, 56, 9089-9099

<sup>132</sup> I. Yanovsky *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 10700-10715

<sup>133</sup> L. Fang *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, 24, 40-43

<sup>134</sup> C. Lecoutey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2014**, 111, E3825-E3830

# **CHAPITRE 2 :**

## **Genèse du projet**

Depuis plusieurs années, les laboratoires du Pr. Patricia Melnyk et des Drs. Luc Buée et Nicolas Sergeant (UMR-S1172) collaborent pour le développement de molécules anti-Alzheimer. Suivant le métabolisme de la protéine APP décrit précédemment (Figure 4, page 25), une des stratégies anti-Alzheimer prometteuses consisterait à développer des molécules capables d'augmenter les quantités de fragments neurotrophiques et neuroprotecteurs (CTF $\alpha$ , sAPP $\alpha$  et AICD), diminuer les quantités de peptides A $\beta$  longs en favorisant la voie non amyloïdogénique et reproduire des taux physiologiques en A $\beta$  courts. Ces fragments sont dégradés dans les lysosomes.<sup>135, 136, 137</sup> Des agents lysosomotropiques sont donc susceptibles d'intervenir sur la dégradation de ces fragments bénéfiques en perturbant le fonctionnement de ces organites acides.<sup>138, 139, 140</sup>

### **A. Les antipaludiques comme source de molécules lysosomotropiques**

La chloroquine, un antipaludique développé durant la seconde guerre mondiale, s'accumule dans la vacuole digestive du parasite *Plasmodium falciparum*,<sup>141</sup> inhibe la polymérisation de l'hémozoïne<sup>142</sup> et provoque la mort du parasite en raison de la toxicité de l'hème. Son activité lysosomotropique a été décrite.<sup>143</sup> Dans le but d'explorer cette voie, une palette de 200 antipaludiques dérivés de la chloroquine et développés par l'équipe du Pr. Patricia Melnyk,<sup>144, 145, 146, 147, 148, 149</sup> ont été testés sur un modèle cellulaire SY5Y-APPwt sur-exprimant d'une manière stable l'APP<sub>695</sub> humain non muté (équipe des Drs. Luc Buée et Nicolas Sergeant).

Pour ce test, les cellules ont été incubées avec le composé à tester à différentes concentrations. Elles ont ensuite été lysées et centrifugées. Le surnageant a été prélevé et la production de CTFs et d'AICD a été analysée par western blot.

Ce test a permis d'identifier des composés « hit » qui conduisent à une augmentation des fragments CTF $\alpha$  et AICD, sans augmenter les fragments CTF $\beta$ . La Figure 35 présente certains des résultats, avec cinq composés actifs. Seul le composé STB01/83 s'est avéré inactif et présente le même profil que le contrôle.

<sup>135</sup> T. Golde et al., *Science*, **1992**, 255, 728-730

<sup>136</sup> V. Vingtdeux et al., *Neurobiol. Dis.*, **2007**, 25, 686-696

<sup>137</sup> L. De Kimpe et al., *AGE*, **2013**, 35, 673-687

<sup>138</sup> G. Schrader-Fischer et al., *Brain Res.*, **1996**, 716, 91-100

<sup>139</sup> M. V. Kanazirska et al., *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2012**, 13, 2761-2767

<sup>140</sup> A. Nogalska et al., *Neurobiol. Dis.*, **2014**, 65, 93-101

<sup>141</sup> M. Aikawa, *Am. J. Pathol.*, **1972**, 67, 277-284

<sup>142</sup> D. J. Sullivan et al., *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 31103-31107

<sup>143</sup> V. Vingtdeux et al., *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 18197-18205

<sup>144</sup> P. Melnyk et al., *Bioorg. Med. Chem Lett.*, **2006**, 16, 31-35

<sup>145</sup> R. Klingenstein et al., *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 5300-5308

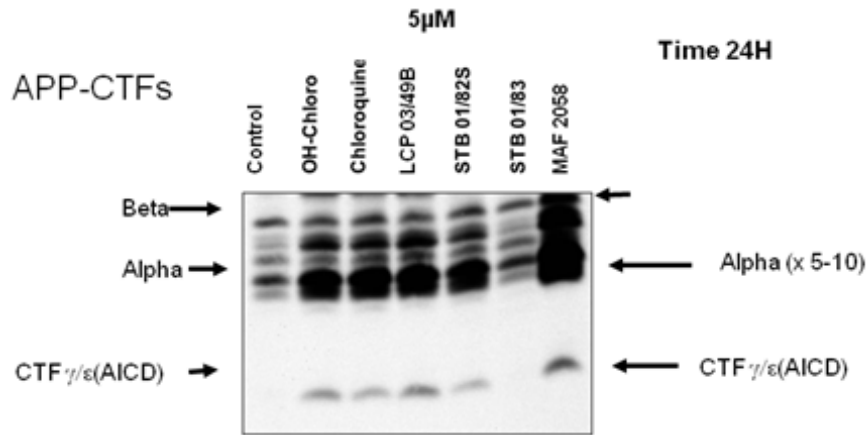
<sup>146</sup> A. Ryckebusch et al., *Bioorg. Med. Chem Lett.*, **2005**, 15, 297-302

<sup>147</sup> R. Deprez-Poulain et al., *Comb. Chem. High. T. Scr.*, **2005**, 8, 39-48

<sup>148</sup> S. Delarue-Cochin et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, 43, 252-260

<sup>149</sup> E. Păunescu et al., *ChemMedChem*, **2009**, 4, 549-561



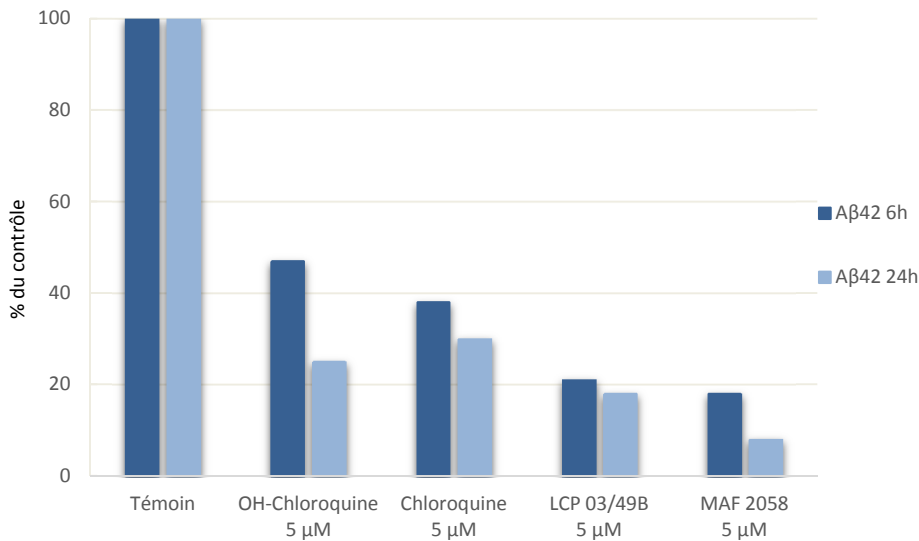


**Figure 35. Action de dérivés de la chloroquine sur le métabolisme de l'APP.**

Une étude plus approfondie sur la sécrétion d' $A\beta_{40}$  et  $A\beta_{42}$  a été réalisée.

Pour ce test les cellules ont été incubées avec le composé à tester à différentes concentrations. Le surnageant a été prélevé, puis la quantification des peptides  $A\beta_{40}$  et  $A\beta_{42}$  a été réalisée par un test Elisa suivie d'une révélation par anticorps spécifiques.

Les quatre composés les plus actifs de la Figure 35 entraînent une diminution du peptide  $A\beta_{42}$  (Figure 36). Des résultats similaires ont été obtenus pour le peptide  $A\beta_{40}$ .



**Figure 36. Sécrétion du peptide  $A\beta_{42}$  à 5  $\mu$ m après 6 et 24 heures.**

La chloroquine s'avère toxique, notamment en engendrant *in vivo*, une accumulation d'espèce pathologique de la protéine Tau dans le cerveau et les muscles.<sup>150</sup> Ces nouvelles molécules, avec un profil d'activité comparable mais plus efficace, peuvent donc présenter un intérêt majeur pour le traitement de la MA.

### **B. Des antipaludiques aux anti-Alzheimer**

Suite aux résultats obtenus avec les antipaludiques, les laboratoires du Pr. Patricia Melnyk et du Dr. Luc Buée ont développé des molécules qui réduisent la production et/ou la sécrétion des peptides  $A\beta$ ,

<sup>150</sup> F. Oyama et al., *Neurosci. Res.*, **1998**, 31, 1-8

augmentent la quantité des fragments bénéfiques C-terminaux de l'APP : CTF<sub>α</sub> et AICD mais aussi sAPP<sub>α</sub>, fragment neurotrophique de l'APP.<sup>151, 152</sup> Ces composés ne présentent pas de toxicité contrairement à la chloroquine. Une première famille, MSBD, a été développée à partir de la chloroquine, et la seconde, PMAD, à partir de l'amodiaquine (Figure 37). Initialement basée sur des antipaludiques, la structure chimique des familles MSBD et PMAD est maintenant différente.

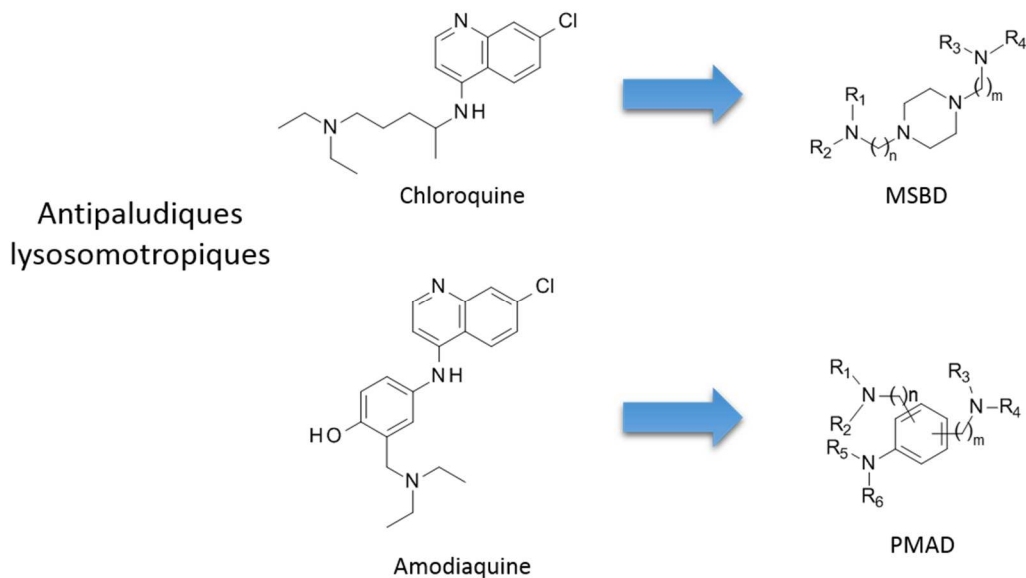


Figure 37. Schéma de développement des MSBD et des PMAD.

## 1. Développement des MSBD

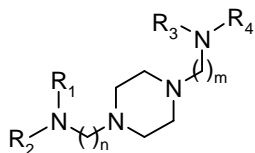


Figure 38. Structure générale des MSBD.

La première famille a été développée suite à des pharmacomodulations réalisées à partir de la chloroquine. Cette famille, nommée MSBD (Figure 38), a été brevetée en 2006.<sup>153</sup> Elle est composée d'un noyau central basique : la pipérazine et de deux chaînes alkyles portant deux amines basiques substituées par différents groupements.

## 2. Développement des PMAD

Une seconde famille de composés a été développée à partir de l'amodiaquine, un autre antipaludique ayant un mode d'action similaire à celui de la chloroquine. Cette famille nommée PMAD (Figure 39) a également été brevetée.<sup>154</sup> Elle est composée d'un aromatique central portant trois amines différemment substituées.

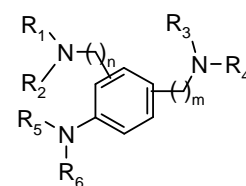


Figure 39. Structure générale des PMAD.

<sup>151</sup> V. Vingtdeux *et al.*, *Neurobiol. Dis.*, **2005**, 20, 625-637

<sup>152</sup> P. Melnyk *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.*, **2015**, 6, 559-569

<sup>153</sup> N. Sergeant *et al.*, WO/2006/051489, **2006**.

<sup>154</sup> A. Delacourte *et al.*, US/2012/0283256, **2012**.

### C. Résultats biologiques des familles MSBD et PMAD

Les composés synthétisés ont été testés sur le modèle cellulaire SY5Y-APPwt. Les composés MSBD et PMAD engendrent bien une augmentation des bons fragments du métabolisme de l'APP (CTF $\alpha$  et AICD) et diminuent la sécrétion du mauvais fragment CTF $\beta$  (Figure 40) et du peptide A $\beta$  (Figure 41).

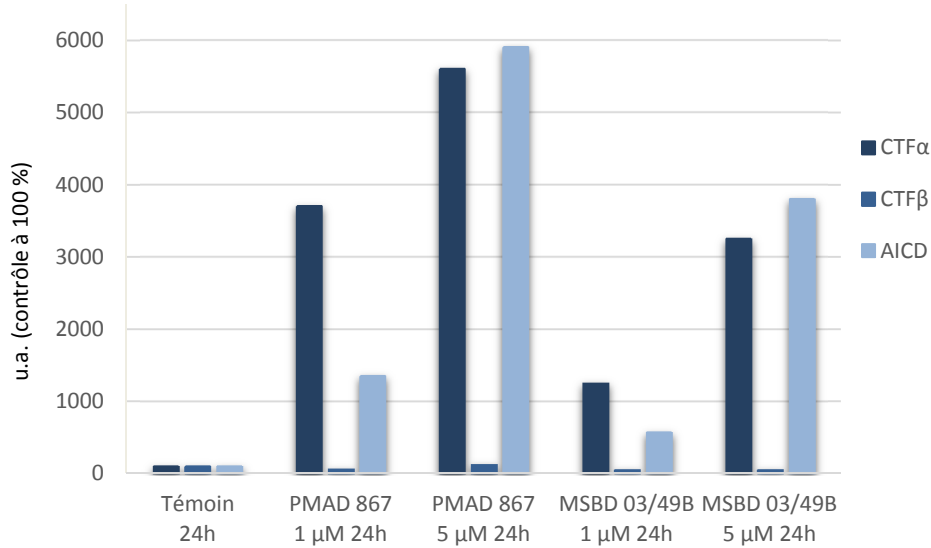


Figure 40. Influence des composés sur la sécrétion des fragments C terminaux.

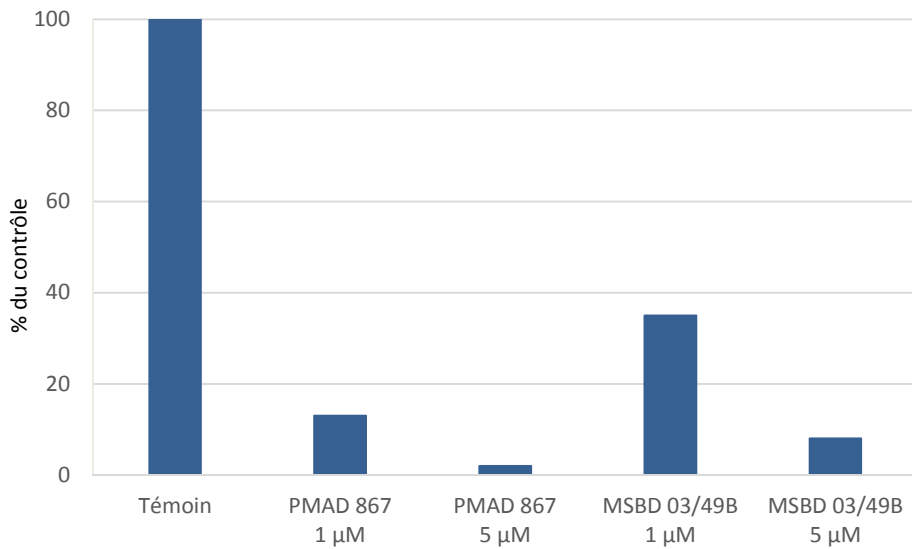
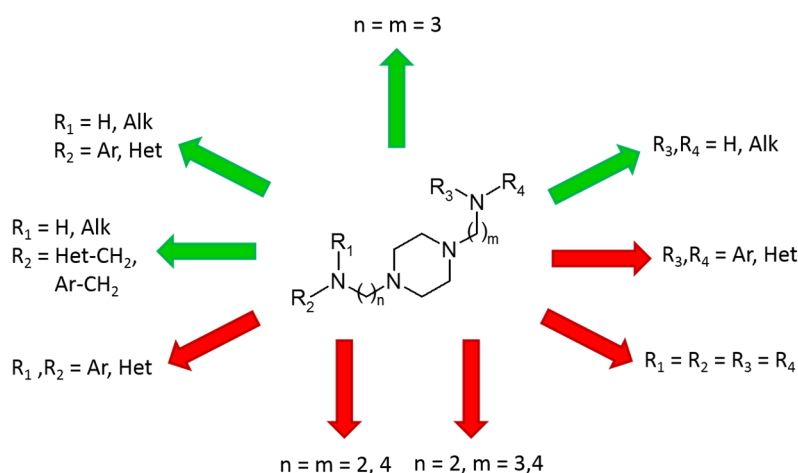


Figure 41. Influence des composés sur la sécrétion d'A $\beta$ <sub>40</sub>.

Ces résultats ont permis de déterminer les relations structure-activité (RSA) des deux familles.

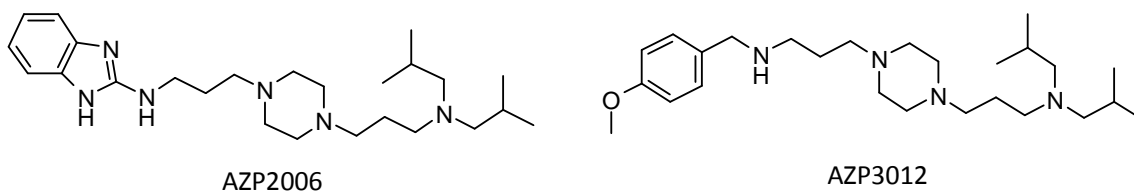
## 1. Relations structure-activité des MSBD



**Figure 42. Structure générale des MSBD et RSA.**

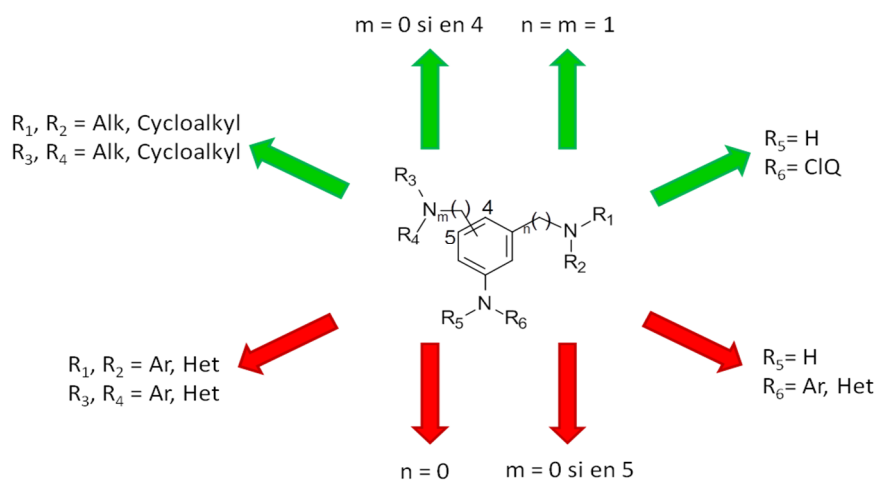
(Les flèches vertes représentent les substitutions favorables et les flèches rouges les substitutions défavorables)

Les nombreux représentants de la famille synthétisés ont permis la détermination des RSA (Figure 42). Ainsi, les meilleurs composés possèdent une longueur de chaîne  $n$  et  $m$  de trois carbones. Les deux fonctions aminées ne doivent pas être fonctionnalisées de manière équivalente.  $R_1$  doit correspondre à un hydrogène ou une chaîne alkyle alors que  $R_2$  doit être un groupement aryle ou un hétérocycle séparé ou non de l'azote par un  $\text{CH}_2$ .  $R_3$  et  $R_4$  doivent au contraire être équivalents et correspondre à une chaîne alkyle linéaire ou cyclique. Les deux composés les plus actifs sont représentés Figure 43.



**Figure 43. Les deux composés les plus actifs de la famille MSBD.**

## 2. Relations structure-activité des PMAD



**Figure 44. Structure générale des PMAD et RSA.**

(Les flèches vertes représentent les substitutions favorables et les flèches rouges les substitutions défavorables)

Les RSA pour la famille PMAD ont également pu être déterminées (Figure 44). Les composés les plus actifs de la famille possèdent une longueur de chaîne n et m de un carbone ou une valeur de m de zéro si la chaîne est en position 4. Une valeur de n ou de m (chaîne en position 5) équivalente à zéro s'avère défavorable. Les groupements R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> et R<sub>4</sub> doivent correspondre à une chaîne alkyle ou un cycloalkyle. Un aromatique ou un hétérocycle en ces positions conduit à une baisse d'activité. Finalement R<sub>5</sub> doit correspondre à un hydrogène et R<sub>6</sub> à une chloroquinoline (ClQ). Le remplacement de cet hétérocycle par un aromatique ou un autre hétérocycle conduit à une diminution de l'activité. Ainsi, les composés les plus actifs correspondent aux structures suivantes (Figure 45) :

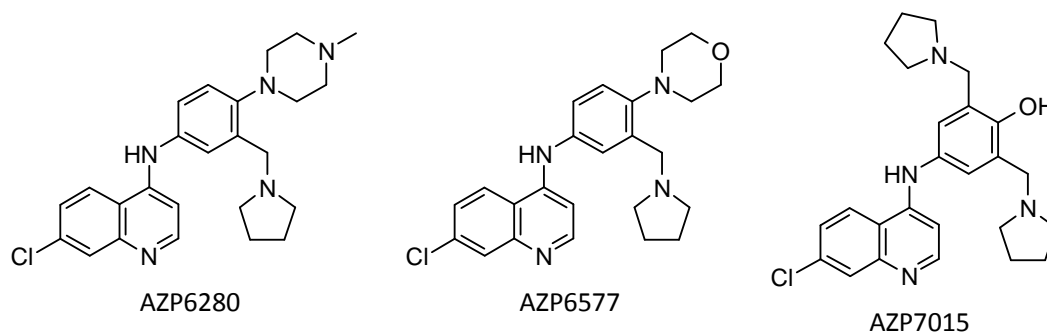


Figure 45. Les trois composés les plus actifs de la famille PMAD.

#### ***D. Un composé en développement clinique, l'AZP2006***

En ce qui concerne la famille MSBD, un des composés, l'AZP2006, s'est démarqué du lot par ses très bons résultats biologiques. Testé *in vitro*, ce composé engendre une diminution des « mauvais » fragments du métabolisme de l'APP ( $A\beta_{40}$  et  $CTF\beta$ ) et une augmentation des quantités de fragments neurotrophiques et neuroprotecteurs ( $sAPP\alpha$  et  $CTF\alpha$ ) (Figure 46).

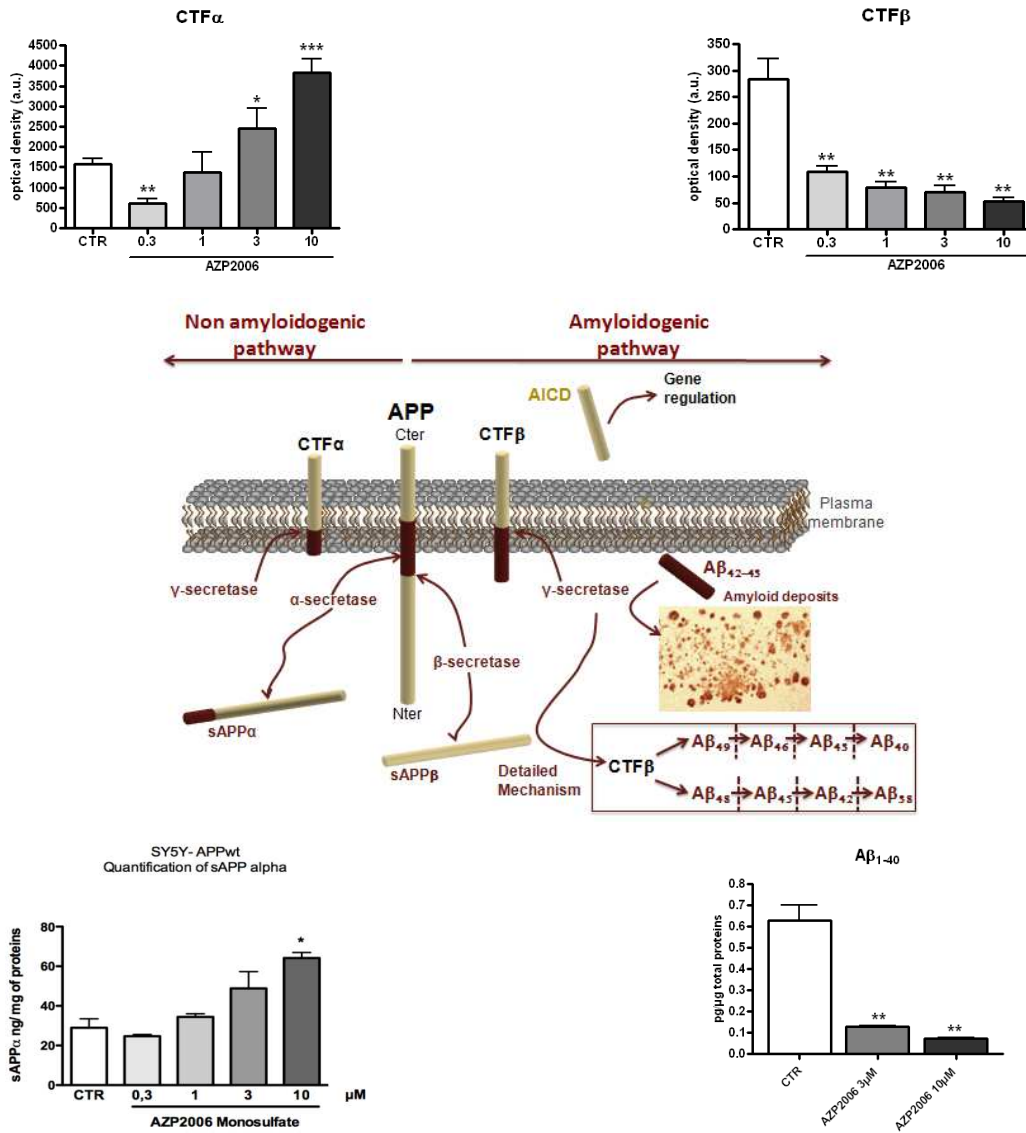


Figure 46. Action de l'APZ2006 sur le métabolisme de l'APP.

Les résultats obtenus *in vitro* ont également été validés *in vivo* chez la souris et le rat.

De plus, des tests comportementaux réalisés sur des souris ayant reçu une injection de peptide A $\beta$ <sub>25-35</sub>, induisant un modèle de la maladie, puis traitées avec l'AZP2006 à différentes doses (0,5 ; 1 et 3 mg/kg) ont montré une prévention des défaillances cognitives induites par le peptide.

Ces bénéfices cognitifs ont également été obtenus sur des modèles animaux de la tauopathie (Figure 47). Des souris naïves et des souris transgéniques Thy-Tau22 mimant la tauopathie ont été traitées pendant quatre mois avec 3 mg/kg de MSBD par jour. A l'issue des quatre mois de traitement, leur mémoire spatiale a été évaluée grâce au test de la piscine de Morris.<sup>155</sup> Les histogrammes représentent le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible (T) *versus* les trois autres quadrants. Les images des trajectoires des souris sont montrées au-dessus des histogrammes. Les souris traitées passent autant de temps dans le quadrant T que les souris naïves. Les souris transgéniques Thy-Tau22 non traitées passent autant de temps dans le quadrant T que dans les autres quadrants.

<sup>155</sup> R. Morris, *J. Neurosci. Meth.*, **1984**, 11, 47-60

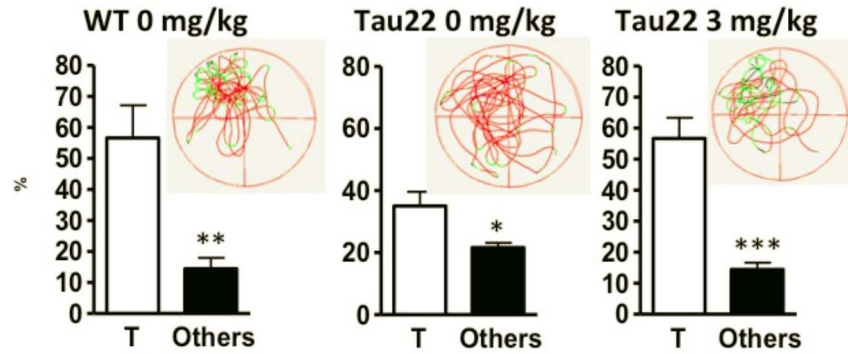


Figure 47. Effets bénéfiques des MSBD sur des souris Thy-Tau22.

Il a également été constaté qu'une souris traitée comporte moins de protéine Tau hyperphosphorylée dans les neurones en dégénérescence qu'une souris non traitée (Figure 48). Cette dernière possède également plus de neurones dans l'hippocampe qu'une souris non traitée.



Figure 48. Coloration immunohistochimique de Tau hyperphosphorylée à l'AT8 et histogramme du nombre de neurones dans l'hippocampe.

L'AZP2006 a achevé la phase préclinique réglementaire en 2014 avec succès et termine sa phase clinique I au cours de l'été 2015. Des recherches bibliographiques révèlent que cette molécule semble être la seule à cibler positivement les deux lésions de la maladie : amyloïdopathie et tauopathie.

Ainsi, l'identification de la cible biologique des MSBD et la détermination de l'interaction fonctionnelle des MSBD avec la cible restaient à déterminer.

### E. Identification de la cible

L'identification de la cible a été envisagée selon deux techniques : la chromatographie d'affinité suivie d'une compétition utilisant l'affinité streptavidine-biotine et le photomarquage.<sup>156</sup>

Afin de réaliser ces tests, des sondes dérivées des MSBD ont été synthétisées. Pour mettre en œuvre les deux techniques, ces sondes doivent être substituées soit par une résine de sépharose activée, soit par un groupe de reconnaissance (comme la biotine), soit par un groupe photoactivable (une benzophénone<sup>157</sup>). Trois sites de substitution sont envisageables (Figure 49). Les sondes ont été réalisées à partir de l'AZP3012, car ce composé est plus facilement fonctionnalisable que l'AZP2006.

<sup>156</sup> B. J. Leslie *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, 1347-1360

<sup>157</sup> G. Dorman *et al.*, *Biochemistry*, **1994**, 33, 5661-5673

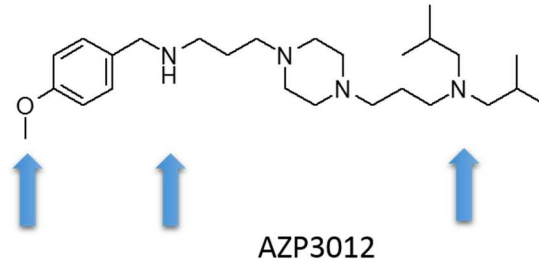


Figure 49. Trois sites de substitutions envisageables.

Cette substitution ne doit pas interférer dans le mode d'action et le mode de liaison du composé avec la cible. Ainsi, trois composés similaires ont été synthétisés, possédant une substitution par un linker  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH Boc}$  aux trois endroits (Figure 50).

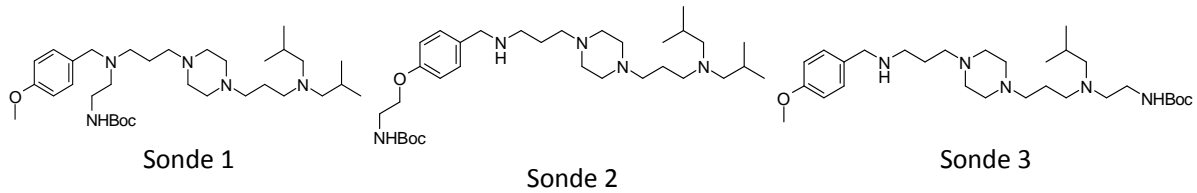


Figure 50. Structure des trois sondes envisagées.

Des tests cellulaires sur des cellules SY5Y-APPwt ont montré que seule la substitution d'une chaîne alkyle par le linker (sonde 3) n'avait pas d'influence sur l'action du composé envers la modulation du métabolisme de l'APP. Les différents groupements fonctionnels ont été introduits sur cette position.

### 1. Chromatographie d'affinité suivie d'une compétition d'affinité streptavidine-biotine

Pour identifier la cible des MSBD par cette technique, un composé greffé sur résine de sépharose a été incubé avec un lysat protéique issu de cellules SY5Y-APP (Figure 51). L'interaction cible/substrat a eu lieu. Une compétition entre le MSBD fixé sur la résine et le MSBD biotinylé a été mise en œuvre, engendrant la migration de la cible sur le composé biotinylé. Ce composé a alors été capturé par des billes de streptavidine, grâce à la forte affinité de cette dernière avec la biotine. Après élution, les protéines capturées ont été isolées.

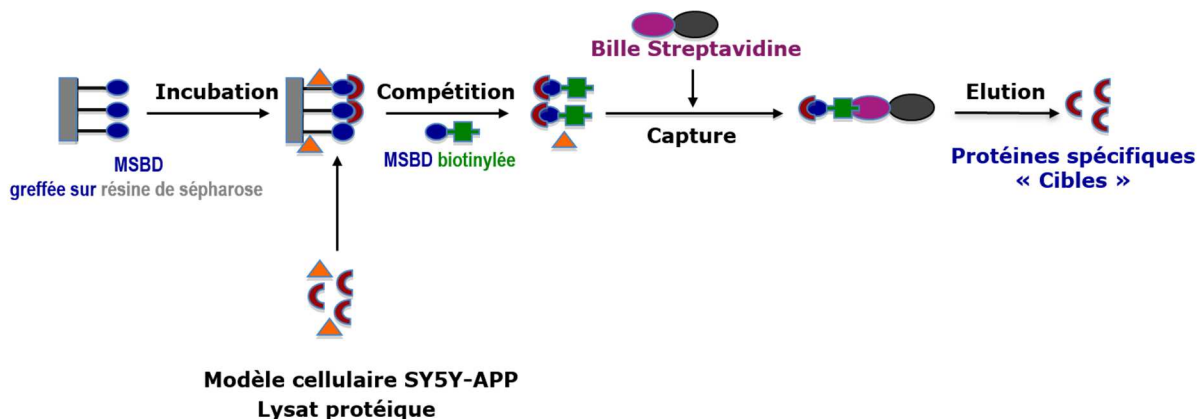


Figure 51. Schéma de principe de la chromatographie d'affinité.

Cette technique a nécessité la synthèse de l'AZP3012 greffé sur une résine sépharose-NH et du même composé biotinylé (Figure 52).



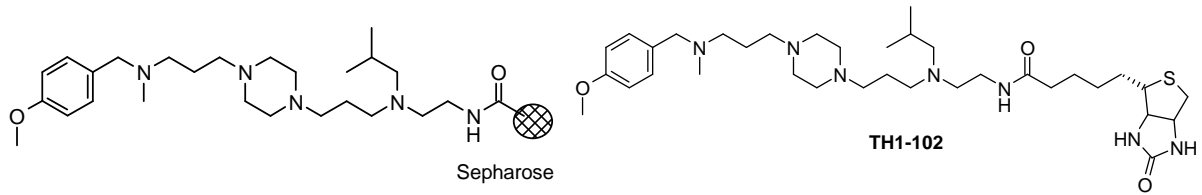


Figure 52. MSBD greffée sur résine de sépharose et MSBD biotinylée.

Les protéines isolées ont ensuite été séparées par électrophorèse et identifiées par spectrométrie de masse Maldi-Tof.<sup>158</sup>

## 2. Photomarquage

La technique du photomarquage est basée sur la formation d'une liaison covalente *via* un mécanisme photochimique (Figure 53).

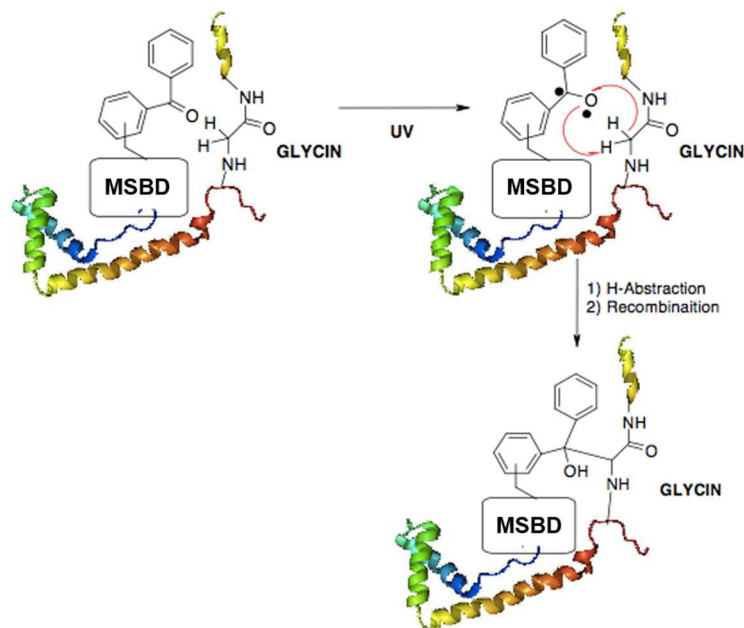


Figure 53. Mécanisme du photomarquage.

La mise en œuvre de cette technique a nécessité la synthèse d'un dérivé de l'AZP3012 photoactivable, substitué par une benzophénone (Figure 54).<sup>159</sup>

<sup>158</sup> P. Chaurand *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, **1999**, 10, 91-103

<sup>159</sup> G. Dormán *et al.*, *Trends Biotechnol.*, **2000**, 18, 64-77

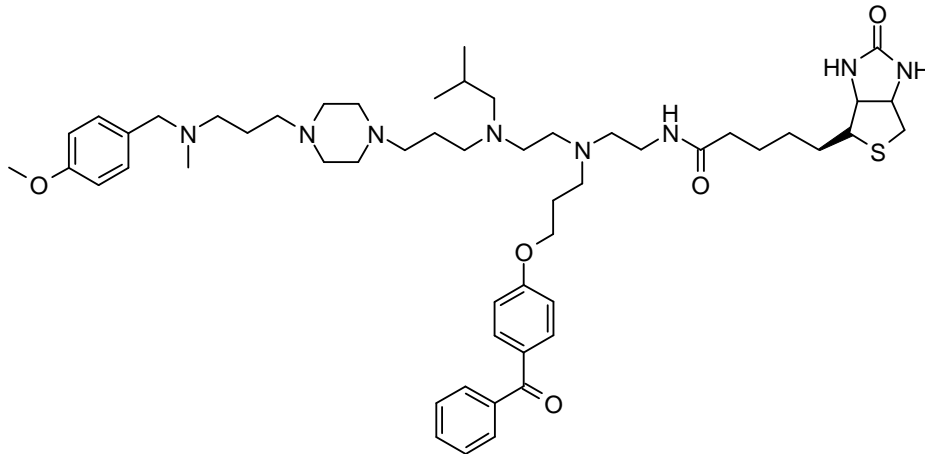


Figure 54. Structure du dérivé de l’AZP3012 photoactivable.

Ce composé est incubé avec un lysat protéique issu de cellule SY5Y-APP. Il se forme ensuite un complexe entre la protéine et le composé MSBD photoactivable. Le mélange est irradié sous UV pour former la liaison covalente dans le complexe. La formation de cette liaison n’est possible que si le ligand est à courte distance de la protéine. Ce dernier est alors capturé grâce à des billes de streptavidine. Après élution, les protéines capturées ont été séparées par SDS-PAGE et identifiées par Maldi-Tof (Figure 55).<sup>158</sup>

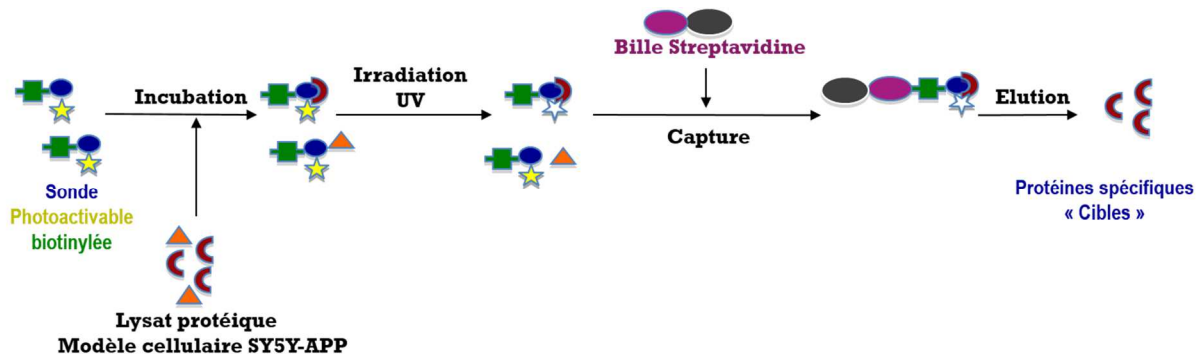


Figure 55. Schéma de principe du photomarquage.

Trois protéines communes aux deux méthodes ont été identifiées : p97/VCP, HSP90 et eEF1G.

Un test par western blot utilisant différents anticorps a été utilisé pour confirmer l’identification des protéines réalisée par la spectrométrie de masse.

p97/VCP appartient à la famille des AAA+ ATPase. Cette protéine a de nombreuses implications dans la vie cellulaire comme la dégradation des protéines associée au réticulum endoplasmique (RE) (ERAD), la régulation du cycle cellulaire ou l’autophagie.<sup>160</sup> HSP90 est une Heat-shock protein, intervenant dans la dégradation des protéines, l’autophagie, ou encore la dégradation par le protéasome.<sup>161</sup> La formation d’un complexe entre HSP90 et p97/VCP a été décrit.<sup>162</sup> L’eEF1G (Eukaryotic elongation factor 1 gamma) est une protéine encodée par le gène *eEF1G*. Ce gène encode une sous-unité du complexe d’allongement facteur-1. Des modifications post-transcriptionnelles ou translationnelles de protéines telles que eEF1G induisent une différenciation neuronale déficiente.

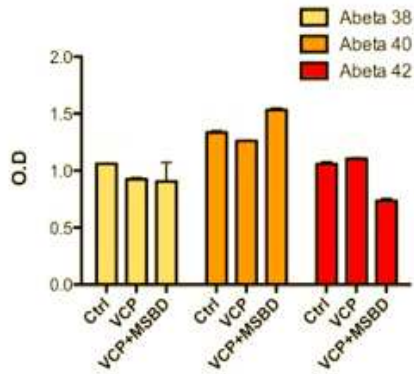
<sup>160</sup> H. Meyer et al., *J. Cell Sci.*, **2014**, 127, 3877–3883

<sup>161</sup> J. C. Young et al., *J. Cell Biol.*, **2001**, 154, 267-273

<sup>162</sup> T. Prince et al., *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **2005**, 331, 1331-1337

Pour la suite des travaux, le laboratoire a fait le choix de travailler sur p97/VCP, une protéine impliquée dans différents procédés de dégradation de protéines et dont le lien avec les maladies neurodégénératives a récemment été démontré.<sup>163, 164</sup> De plus son action est liée à l'homéostasie protéique, hypothèse à la base du projet. Pour conforter le choix de cette cible, différents tests cellulaires ont été réalisés.

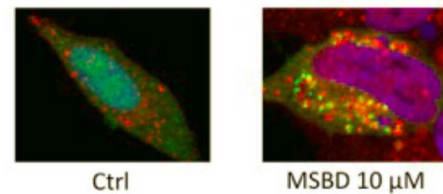
### 3. Tests cellulaires préliminaires



**Figure 56. Etude de l'action conjointe de p97/VCP et des MSBD sur la sécrétion du peptide Aβ.**

Dans un premier temps, p97/VCP a été transfectée dans des cellules SY5Y-APPwt. Puis les cellules ont été traitées ou non avec 10 μM d'AZP2006. Il peut être noté que p97/VCP seule ne modifie pas la sécrétion de peptide Aβ mais que l'action conjointe de p97/VCP et des MSBD permet de diminuer la sécrétion d'Aβ<sub>42</sub> (Figure 56).

Des cellules SY5Y ont à nouveau été transfectées avec p97/VCP et un APP marqué. Sur le contrôle (Figure 57), l'APP apparaît en rouge et p97/VCP est visible dans tous les compartiments de la cellule. Après traitement avec un composé de la famille MSBD, les tâches rouges d'APP sont plus intenses et p97/VCP est co-localisée avec les vacuoles d'APP, ce qui suggère une délocalisation vésiculaire partielle de p97/VCP.



**Figure 57. Co-localisation de l'APP et de p97/VCP.**

Ces résultats préliminaires de validation de p97/VCP en tant que cible biologique de l'AZP2006 sont encourageants mais nécessitent d'être confirmés par l'utilisation de techniques complémentaires. Ce travail a constitué une part importante de cette thèse et sera présenté chapitre 4.

<sup>163</sup> A. Kakizuka, *Biochem. Soc. T.*, **2008**, 36, 105-108

<sup>164</sup> P. J. Dolan *et al.*, *FEBS Lett.*, **2011**, 585, 3424-3429

# **CHAPITRE 3 :**

## **La protéine p97/VCP**

En 1985, un peptide issu d'intestin de porc a été isolé et séquencé. Ce peptide nommé valosine a montré une activité sur le système digestif du chien, régulant les sécrétions pancréatiques et les mouvements gastrointestinaux. Constituée de 25 acides aminés, la séquence correspond à l'enchaînement suivant : VQYPVEHPDKFLKFGMTPSKGVLFY.<sup>165</sup>

Deux ans plus tard, la Vasolin-Containing Protein, connue sous l'abréviation p97/VCP a été identifiée pour la première fois par Koller et Brownstein.<sup>166</sup> Constituée de 806 acides aminés, la séquence de la valosine est identifiée entre les acides aminés 493 et 517 d'où son nom de protéine contenant la valosine. Bien que le rôle de cette protéine abondante soit méconnu à l'époque, il est maintenant évident qu'elle intervient dans de nombreux événements cellulaires, associés à des cofacteurs variés. Ceci explique qu'elle représente 1 % des protéines du cytosol<sup>167</sup> et qu'elle soit exprimée de manière ubiquitaire dans tous les tissus et le cerveau.<sup>168</sup>

L'équivalent de p97/VCP peut être retrouvé dans diverses espèces à cellules eucaryotes. En 1982, CDC48 (cell-division-cycle) est identifiée chez la levure<sup>169</sup> et quelques années plus tard TER94 (transcriptional endoplasmic reticulum ATPase 94) chez la drosophile ou VAT (VCP-like ATPase) chez les archaebactéries.

### A. Structure

La protéine complète est constituée de 806 acides aminés, représentant un poids moléculaire calculé de 89 322 Da. Le gène codant pour celle-ci est localisé sur le chromosome 9.<sup>170</sup> p97/VCP appartient à la famille des AAA de type II (ATPasés associées à diverses activités cellulaires ayant deux sites de liaison de l'ATP). C'est un hexamère dont chaque protomère est composé d'un domaine N-terminal flexible<sup>171</sup> (1-187), de deux domaines ATPasiques, D1 (209-460) et D2 (481-761) et d'un domaine C-terminal (762-806). Il existe ainsi deux domaines de liaison entre N-D1 et D1-D2.<sup>172</sup>

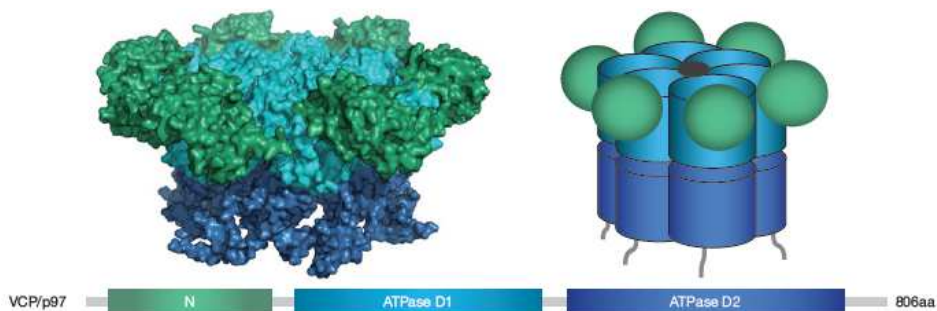


Figure 58. Structure de p97/VCP.<sup>173</sup>

L'étude de la structure cristalline de p97/VCP murin par Huyton<sup>174</sup> a montré que l'hexamère présente une structure en forme de champignon d'un diamètre d'environ 160 Å, d'une hauteur proche de

<sup>165</sup> W. E. Schmidt *et al.*, *FEBS Lett.*, **1985**, 191, 264-268

<sup>166</sup> K. J. Koller *et al.*, *Nature*, **1987**, 325, 542-545

<sup>167</sup> K. Yamanaka *et al.*, *BBA-Mol. Cell Res.*, **2012**, 1823, 130-137

<sup>168</sup> M. Hirabayashi *et al.*, *Cell Death Differ.*, **2001**, 8, 977-984

<sup>169</sup> D. Moir *et al.*, *Genetics*, **1982**, 100, 547-563

<sup>170</sup> J. Hoyle *et al.*, *Mamm. Genome*, **1997**, 8, 778-780

<sup>171</sup> H. Niwa *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2012**, 287, 8561-8570

<sup>172</sup> B. DeLaBarre *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2003**, 10, 856-863

<sup>173</sup> H. Meyer *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, **2012**, 14, 117-123

<sup>174</sup> T. Huyton *et al.*, *J. Struct. Biol.*, **2003**, 144, 337-348

80 Å et un trou central de 10 Å. Les domaines N et D1 forment le cercle le plus évasé alors que le domaine D2 forme la couche la plus étroite comme représenté Figure 58.

Le domaine N est responsable de la liaison des cofacteurs nécessaires pour l'activité et de l'ubiquitine. Il a été montré que les deux domaines ATPasiques ne sont pas catalytiquement équivalents. En effet, D2 présente l'activité ATPasique majeure à température ambiante alors que D1 est impliqué dans la régulation de l'activité ATPasique induite par une élévation de température. Ce dernier semble cependant avoir un rôle essentiellement structural en facilitant l'assemblage de l'hexamère.<sup>175</sup> La liaison de l'ATP et son hydrolyse conduit à des changements dans la conformation de l'hexamère, ce qui est cohérent avec son rôle en tant que chaperonne dans le désassemblage des complexes de protéines et son implication dans l'extraction de protéines ubiquitinées du RE décrit dans la partie suivante.<sup>176, 177</sup>

En ce qui concerne les deux poches de liaison de l'ATP, elles sont constituées de six éléments : le motif Walker A, le motif Walker B, les sensors 1 et 2, la seconde région d'homologie (SRH) et les boucles du pore (Figure 59). Cette composition est caractéristique de toutes les AAA ATPases et les différencie des autres ATPases. Les motifs Walker A et B sont respectivement responsables de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP.<sup>178</sup> Le sensor 1 interagit avec le Walker B et le  $\gamma$ -phosphate de l'ATP. Le sensor 2 est essentiel pour l'hydrolyse de l'ATP et sa liaison. Le domaine SRH, quant à lui, contient des doigts d'arginine intervenant dans la communication entre les protomères. Finalement, les boucles du pore sont impliquées dans la liaison du substrat et sa transformation.<sup>179</sup>

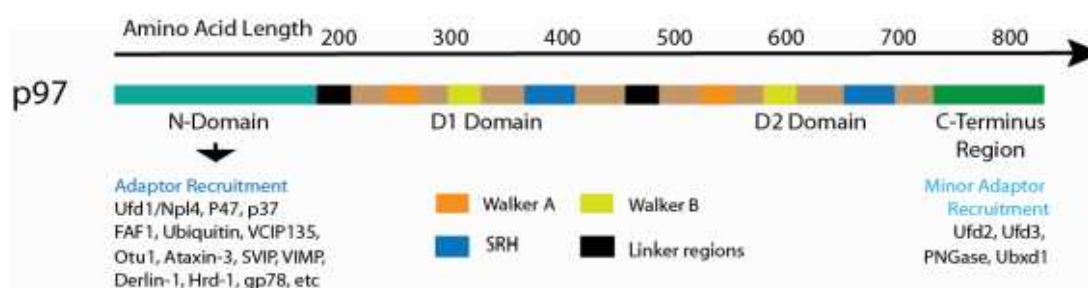


Figure 59. Structure d'un monomère de p97/VCP.<sup>180</sup>

p97/VCP est présente chez tous les êtres vivants et une étude de la conservation de ses acides aminés a été réalisée (programme ClustalW, Figure 60). Quatre espèces ont été étudiées : l'Homme, la souris, la drosophile et la levure. Les p97/VCP humaine et murine sont parfaitement identiques (100 % d'homologie). Ceci permet de valider l'utilisation du modèle murin pour les tests *in vivo*. Globalement, il est observé une identité de 62 % de la protéine entre ces quatre espèces et une homologie de 80 % (Tableau 2). Ainsi, p97/VCP est très bien conservée de manière interspèce. Ceci peut se justifier par son rôle prépondérant dans la vie cellulaire.

<sup>175</sup> Q. Wang *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, 300, 253-260

<sup>176</sup> N. W. Bays *et al.*, *Curr. Biol.*, **2002**, 12, R366-R371

<sup>177</sup> I. Rouiller *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2002**, 9, 950-957

<sup>178</sup> X. Zhang *et al.*, *Mol. Cell*, **2000**, 6, 1473-1484

<sup>179</sup> J. P. Erzberger *et al.*, *Annu. Rev. Biophys. Biomol.*, **2006**, 35, 93-114

<sup>180</sup> C. W. Sheng. Protein-protein interactions that mediate the role of AAA-ATPase p97/VCP/Cdc48 in protein aggregation and degradation. Nanyang Technological University, **2013**.



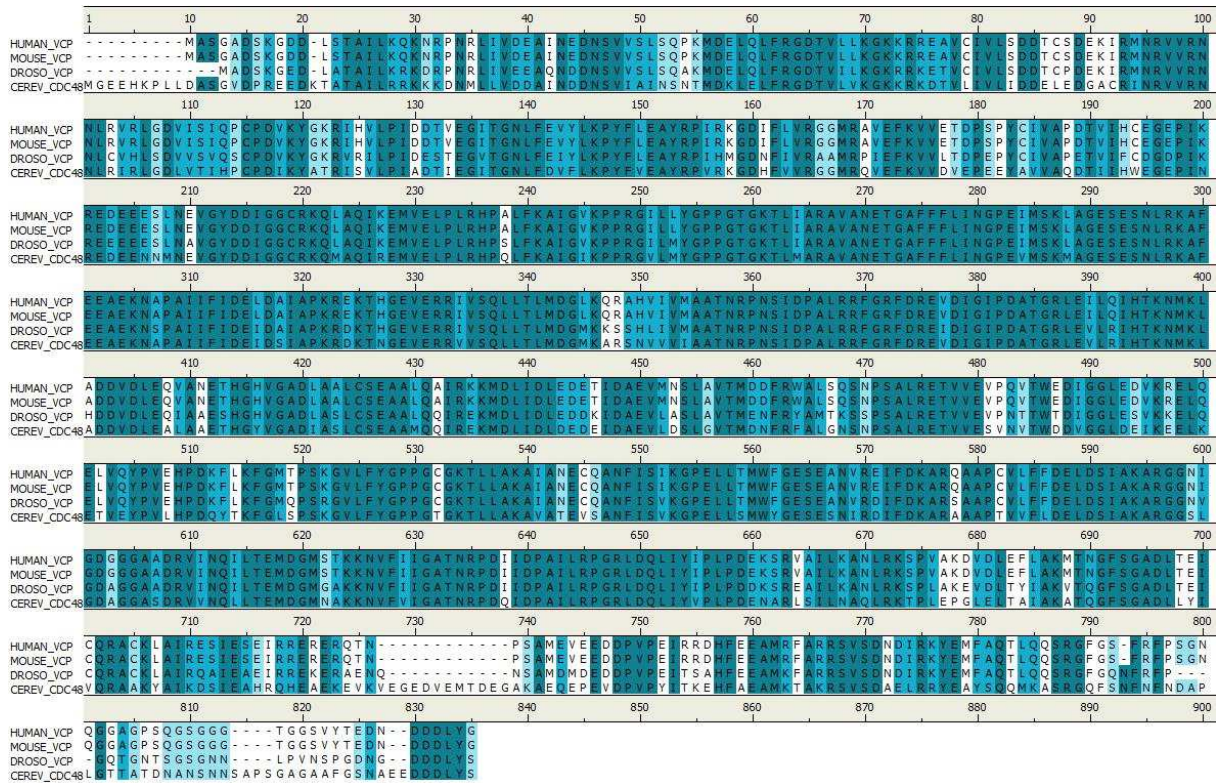


Figure 60. Conservation interspèce de p97/VCP.

Les domaines les mieux conservés interspèces sont ceux impliqués dans la liaison de l'ATP (D<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> et D<sub>2</sub>). Le domaine N et la région charnière entre le domaine N-terminal et le domaine D<sub>1</sub> sont relativement bien conservés. Ces régions sont impliquées dans la liaison des divers cofacteurs de la protéine et une forte variation interspèce pouvait être attendue. Finalement, le domaine C-term est le moins bien conservé.

Tableau 2. Récapitulatif de la conservation interspèce de p97/VCP selon les domaines.

Domaine	N-ter (1-187)	N-D <sub>1</sub> (188-209)	D <sub>1</sub>	D <sub>1</sub> -D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	C-ter	Global
Identité	47 %	73 %	80 %	73 %	62 %	21 %	62 %
Homologie	72 %	91 %	95 %	82 %	79 %	29 %	80 %

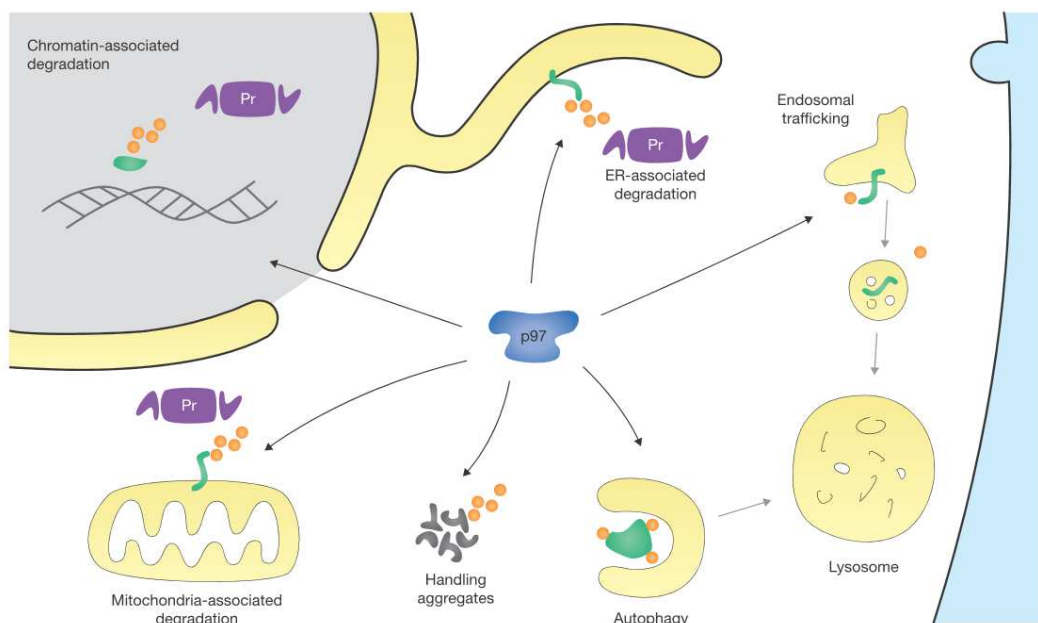
### B. p97/VCP, protéine aux fonctions variées

Le mode de fonctionnement de p97/VCP est de convertir l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP afin de remodeler structurellement ou de déplier des protéines cibles. C'est une protéine essentielle ayant de nombreux rôles dans divers procédés biologiques (Figure 61) comme dans l'ERAD, la fusion de la membrane, le contrôle transcriptionnel, l'autophagie ou encore le tri endosomal et la régulation de la dégradation des protéines de la membrane externe mitochondriale.<sup>160, 181, 182, 183</sup>

<sup>181</sup> Q. Wang *et al.*, *J. Struct. Biol.*, **2004**, 146, 44-57

<sup>182</sup> N. Vij, *J. Cell. Mol. Med.*, **2008**, 12, 2511-2518

<sup>183</sup> P. G. Woodman, *J. Cell Sci.*, **2003**, 116, 4283-4290



**Figure 61. Fonctions cellulaires de p97/VCP.<sup>173</sup>**

La diversité de fonctions de p97/VCP est associée à différentes protéines partenaires ou cofacteurs. Il apparaît alors un système hiérarchique où est créé un noyau central composé de p97/VCP et de cofacteurs mutuels et exclusifs majeurs comme l'hétérodimère Ufd1-Npl4, p47 ou UBXD1. Chaque noyau ainsi formé agit selon plusieurs voies en s'associant avec d'autres ensembles de protéines accessoires qui déterminent la localisation et fournissent de nouvelles activités enzymatiques (Tableau 3).<sup>167, 173, 184, 185</sup>

**Tableau 3. Cofacteurs de p97/VCP et fonctions associées.**

Cofacteurs	Fonctions cellulaires
<b>Ufd1/Npl4</b>	ERAD/Dégradation des protéines <sup>183</sup>
<b>p47, p37</b>	Fusion de la membrane, maturation des autophagosomes <sup>186, 187</sup>
<b>UBXD1</b>	ERAD <sup>188</sup>
<b>VCIP135</b>	Avec le complexe p97-p47 pour la fusion de la membrane ou le transport <sup>189</sup>
<b>Otu1/Yod1</b>	Dégradation des protéines <sup>173</sup>
<b>Ataxin-3</b>	Régulation de l'ERAD <sup>190</sup>
<b>SVIP, Clathrin</b>	Autophagie, transport membranaire
<b>VIMP, Derlin 1</b>	ERAD
<b>Hrd1, gp78</b>	ERAD <sup>191, 192</sup>
<b>BRCA1, TB-RBP, WRN</b>	Réparation de l'ADN <sup>193</sup>
<b>HDAC6</b>	Autophagie
<b>Ase1, Cdc5</b>	Mitose

<sup>184</sup> P. Hänzelmann *et al.*, *Structure*, **2011**, 19, 833-843

<sup>185</sup> W. S. Chia *et al.*, *PLoS One*, **2012**, 7, e50490

<sup>186</sup> K. Uchiyama *et al.*, *J. Cell Biol.*, **2003**, 161, 1067-79

<sup>187</sup> K. Uchiyama *et al.*, *Dev. Cell*, **2006**, 11, 803-816

<sup>188</sup> M. Nagahama *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **2009**, 382, 303-308

<sup>189</sup> K. Uchiyama *et al.*, *J. Cell Biol.*, **2002**, 159, 855-866

<sup>190</sup> W.-L. Tsou *et al.*, *Neurobiol. Dis.*, **2015**, 82, 12-21

<sup>191</sup> X. Zhong *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 45676-45684

<sup>192</sup> B. N. Lilley *et al.*, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, 14296-14301

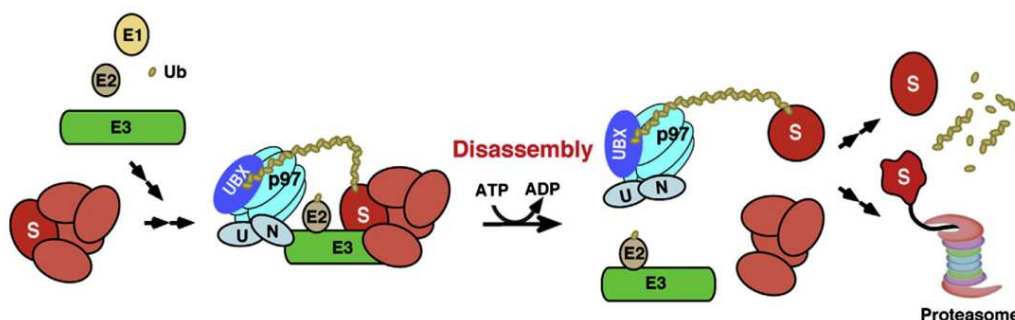
<sup>193</sup> M. Meerang *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, **2011**, 13, 1376-1382



## 1. p97/VCP et le système Ubiquitine/Proteasome (UPS)

De nombreuses études relient p97/VCP au procédé dépendant de l'UPS dans lequel des complexes de p97/VCP se lient à des protéines ubiquitinées et catalysent leur remodelage structural pour faciliter les étapes suivantes.<sup>194</sup> Le complexe p97/VCP-Ufd1-Npl4 permet de faciliter l'extraction des protéines de complexes ou de la surface cellulaire, pour faciliter leur dégradation par le protéasome. Dans la dégradation associée au protéasome, ce complexe extrait les substrats polyubiquitinés de la membrane au cytosol pour les amener au protéasome.<sup>194, 195</sup> p97/VCP peut également assister le protéasome en dépliant un sous-ensemble de substrats pour faciliter leur dégradation.<sup>196</sup> L'activité ATP-dépendante de remodelage de substrat est illustrée par l'accumulation cellulaire de conjugués d'ubiquitines après inhibition de l'activité ATPasique de p97/VCP soit par des mutations d'acides aminés essentiels soit par des petites molécules.<sup>173, 197</sup>

Une seconde fonction de p97/VCP est de coordonner l'ubiquitination et les étapes en aval (Figure 62).<sup>167</sup> La protéine lie différentes ubiquitine-ligases E3 directement ou *via* le cofacteur UBXD7/UbX5.<sup>173</sup> Inversement, p97/VCP peut se lier à diverses enzymes de déubiquitination (comme VCIP135, Otu1, Yod1 ou l'ataxin-3).<sup>173, 198, 199</sup> Bien que ces enzymes soient supposées enlever l'ubiquitine pour permettre le recyclage du substrat, elles peuvent également agir en tant que régulateur positif de la dégradation des protéines, en raccourcissant ou enlevant des fragments, afin que la chaîne ubiquitine soit appropriée pour la reconnaissance au protéasome et les étapes de dégradation.<sup>173</sup>



**Figure 62. Modèle général de l'intervention de p97/VCP dans l'ubiquitination.**<sup>167</sup>

Le substrat (S) est sélectivement ubiquitiné. p97/VCP est ensuite recrutée et grâce à l'hydrolyse de l'ATP, le substrat ubiquitiné sera désassemblé du complexe et finalement dégradé par le protéasome. Dans certains cas, après l'extraction du complexe, le substrat ubiquitiné sera déubiquitiné. E1 : enzyme d'activation de l'ubiquitine, E2 : enzyme de conjugaison de l'ubiquitine, E3 : ubiquitine-ligase, U : Ufd1, N : Npl4.

## 2. p97/VCP et l'ERAD

p97/VCP protège les cellules contre les effets toxiques de protéines mal reliées ou endommagées. Elle est donc essentielle à l'homéostasie cellulaire, notamment dans des conditions de stress. p97/VCP a un rôle clé dans l'ERAD.<sup>194</sup> La dégradation à la fois dans la lumière du RE et des protéines membranaires nécessite p97/VCP, dont l'interaction avec les substrats du RE est essentielle pour leur acheminement au protéasome (Figure 63). L'inactivation de p97/VCP provoque l'accumulation des protéines non ou mal

<sup>194</sup> A. Stolz *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, **2011**, 36, 515-523

<sup>195</sup> M. Rape *et al.*, *Cell*, **2001**, 107, 667-677

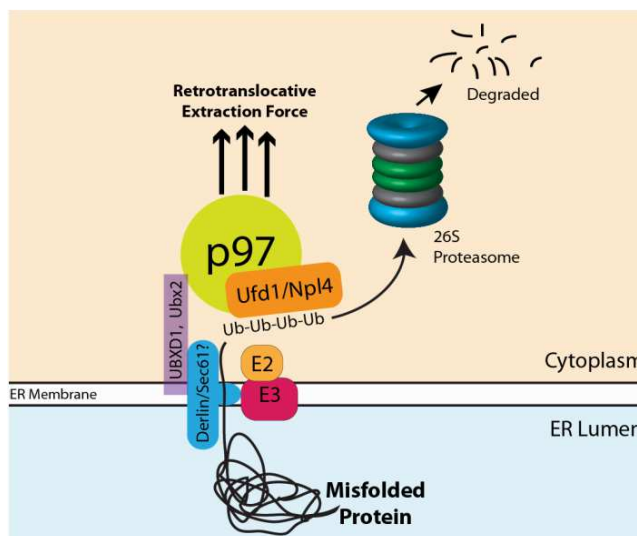
<sup>196</sup> A. Beskow *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **2009**, 394, 732-746

<sup>197</sup> Q. Wang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, 7445-7454

<sup>198</sup> Q. Wang *et al.*, *J. Cell Biol.*, **2006**, 174, 963-971

<sup>199</sup> R. Ernst *et al.*, *Mol. Cell*, **2009**, 36, 28-38

repliées, qui peuvent conduire à l'apoptose induit par un stress du RE.<sup>173</sup> p97/VCP protège des effets toxiques d'espèces protéiques qui ont tendance à s'agréger, incluant celles contenant de longues portions de poly-glutamine (polyQ).<sup>200</sup> p97/VCP peut aider au désassemblage des agrégats et ainsi faciliter la dégradation *via* le protéasome. Le lien peut aussi être indirect, car les agrégats polyQ induisent la réponse des protéines non repliées dans le RE, alors que le stress du RE aggrave les agrégats polyQ.<sup>201</sup>



**Figure 63. Mode d'extraction des protéines mal repliées de la lumière du RE par p97/VCP.<sup>180</sup>**

Dans l'ERAD, les protéines mal repliées sont reconnues et ciblées grâce à l'ubiquitination pour la rétrotranslocation, suivi par leur dégradation par le protéasome 26S. p97/VCP-Ufd1/Npl4 est nécessaire pour la rétrotranslocation des protéines.

Bien que la mitochondrie possède une machinerie unique pour éliminer les protéines mal repliées et les protéines non désirées, les protéines localisées du côté cytosolique de la membrane mitochondriale sont sujettes à l'ubiquitination et à la dégradation protéasomale. Similairement à l'ERAD, p97/VCP lie les protéines membranaires ubiquitinées et les transporte au cytosol pour leur dégradation.<sup>202</sup> Chez la levure, ce processus est régulé par le cofacteur VMS1 qui se lie à Cdc48 et forme un complexe avec Npl4.<sup>203</sup> De nombreux essais suggèrent que p97/VCP est centrale dans le contrôle de la qualité des protéines au niveau de la membrane extérieure de la mitochondrie et suggèrent également que la dégradation médiée par p97/VCP peut avoir un rôle régulateur dans la fusion de la membrane mitochondriale.<sup>173</sup>

### 3. p97/VCP et la dégradation lysosomale

Bien que le rôle clé de p97/VCP dans la dégradation protéasomale d'un grand nombre de protéines clientes ait été établi depuis longtemps, de récentes découvertes la lient maintenant à l'autre système de dégradation cellulaire majeure, le lysosome. p97/VCP intervient dans les deux portes d'entrée du lysosome contrôlées par l'ubiquitine : l'autophagie<sup>204</sup> et le tri endosomal. En général, l'autophagie est médiée par les membranes spécifiques qui englobent les composants cytoplasmiques et fusionnent avec le lysosome pour la dégradation.<sup>205</sup> Un élément important de ce procédé est la lipodation du modificateur similaire à

<sup>200</sup> T. Kobayashi *et al.*, *Genes Cells*, **2007**, 12, 889-901

<sup>201</sup> M. L. Duennwald *et al.*, *Gene Dev*, **2008**, 22, 3308-3319

<sup>202</sup> Y. Ye *et al.*, *Nature*, **2001**, 414, 652-656

<sup>203</sup> J.-M. Heo *et al.*, *Mol. Cell*, **2010**, 40, 465-480

<sup>204</sup> J.-S. Ju *et al.*, *Autophagy*, **2010**, 6, 283-285

<sup>205</sup> Z. Xie *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, **2007**, 9, 1102-1109

l'ubiquitine : LC3/Atg8, qui décore la membrane autophagosomale. Des cofacteurs comme p62 ou NBR1 lient ensuite LC3 à des structures cibles marquées par l'ubiquitine pour recruter la membrane autophagosome et provoquer l'engloutissement. Les premières évidences de l'implication de p97/VCP dans l'autophagie viennent d'études de l'IBMPFD (syndrome de myopathie à inclusions associée à la maladie de Paget et à une démence fronto-temporale), une maladie associée à des mutations non-sens de p97/VCP.<sup>206</sup> Dans le tissu des muscles de patients affectés, la présence de vacuoles enrichies en LC3 qui représentent des autophagosomes aberrants est constatée. Les mêmes résultats ont été obtenus *in vitro* en utilisant des mutants de p97/VCP.<sup>207, 208</sup>

L'autre porte d'entrée principale dans le lysosome est le tri des protéines membranaires du compartiment endocytaire. p97/VCP est associée aux étapes précoces de ce procédé, car elle se lie à la protéine enrobante endocytaire, la clathrine, et au facteur de tri endosomal EEA1. L'inhibition de p97/VCP affecte l'oligomérisation de EEA1 suggérant qu'elle remodèle structurellement les oligomères de EEA1 pour réguler la taille des endosomes et le tri.<sup>209</sup>

Comme l'autophagie, le tri endosomal est très affecté par des mutations de p97/VCP associées à l'IBMPFD, qui abrogent la liaison de p97/VCP à son cofacteur UBXD1 ainsi que caveolin-1 et altère la formation de corps vésiculaires.<sup>210</sup> Il est même possible que les défauts de l'autophagie et du tri endosomal soient connectés car un tri endosomal altéré affecte l'autophagie.<sup>173</sup>

### **C. Maladies liées à p97/VCP**

La diversité des fonctions de p97/VCP dans la cellule l'implique dans de nombreuses maladies, et plus spécifiquement celles corrélées au contrôle de la qualité des protéines. Ceci en fait une cible thérapeutique potentielle très intéressante.

#### **1. Les maladies neurodégénératives**

Comme il a été décrit précédemment, p97/VCP intervient dans de nombreux événements qui permettent le contrôle de la qualité des protéines et leur clairance. Des mutations de p97/VCP conduisant à une diminution de ses activités peuvent mener à l'accumulation de protéines mal formées ou mal repliées. Il a été montré dans le chapitre 1 qu'un mécanisme physiopathologique commun aux maladies neurodégénératives était l'accumulation de ces protéines. Il est donc évident que p97/VCP joue un rôle dans ce type de maladie.

- **L'IBMPFD**

L'IBMPFD (syndrome de myopathie à inclusions associée à la maladie de Paget et à une démence fronto-temporale), une protéinopathie rare (affectant principalement les muscles, le cerveau et les os), est associée à des mutations du gène codant pour p97/VCP.<sup>211</sup> Les différentes pathologies de cette maladie se développent à des âges différents. 90 % des patients sont affectés par la myopathie, 50 % montrent une dégénérescence caractéristique des os et 30 % développent une démence.<sup>212</sup> Le seul signe clinique de cette

<sup>206</sup> E. Tresse *et al.*, *Autophagy*, **2010**, 6, 217-227

<sup>207</sup> Y. Wang *et al.*, *PLoS One*, **2011**, 6, e24478

<sup>208</sup> S. J. Seguin *et al.*, *Cell Death Differ.*, **2014**, 21, 1838-1851

<sup>209</sup> H. N. Ramanathan *et al.*, *Cell Res.*, **2012**, 22, 346-359

<sup>210</sup> P. Kirchner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288, 7363-7372

<sup>211</sup> G. D. Watts *et al.*, *Nature genetics*, **2004**, 36, 377-81

<sup>212</sup> A. Franz *et al.*, *BBA-Mol. Cell Res.*, **2014**, 1843, 205-215

maladie dans les trois tissus est l'accumulation d'inclusions ubiquitinées et la dégénérescence des tissus, tandis que des inclusions de protéine TDP43 sont exclusivement retrouvées dans les muscles et le cerveau. Des biopsies de muscles de patients ont révélé la présence de vacuoles anormales, de corps d'inclusion cytoplasmiques et d'agrégats de p97/VCP dans des fibres musculaires.<sup>213</sup>

Plus de vingt-cinq mutations de p97/VCP ont à ce jour été identifiées chez environ 40 familles de patients atteints d'IBMPFD (Figure 64).<sup>214</sup> Ces mutations sont principalement localisées entre les domaines N et D1, impliqués dans la liaison de l'ubiquitine et dans les interactions protéine-protéine, affectant la liaison à des cofacteurs importants comme Atx3 et UBXD1.<sup>212, 215</sup> Leur étude a montré qu'elles impliquaient une augmentation de l'activité ATPasique et altéraient l'affinité des nucléotides, augmentant ainsi l'affinité pour l'ATPγS et diminuant celle de l'ADP.<sup>216, 217</sup> Ceci conduit à un déplacement du *ratio* de l'orientation du domaine N par rapport au domaine D1, dépendante du nucléotide. Cependant, le lien entre ces observations biochimiques et structurales et la maladie reste encore à éclaircir.

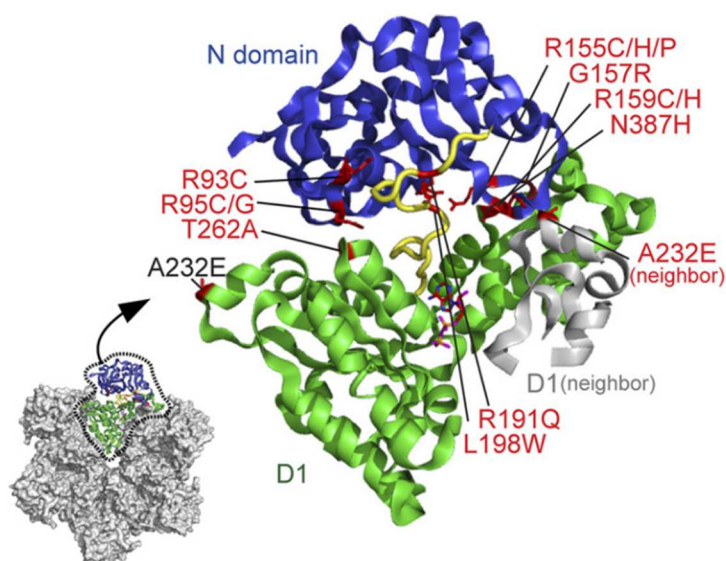


Figure 64. Représentation des mutations de p97/VCP impliquées dans l'IBMPFD.<sup>171</sup>

### • Sclérose latérale amyotrophique

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou maladie de Charcot est une maladie des neurones moteurs, caractérisée par leur perte puis par une atrophie musculaire.

Des mutations du gène codant pour p97/VCP ont également été identifiées dans 1 à 2 % des cas familiaux de SLA.<sup>218, 219</sup> p97/VCP est essentielle à la maturation des autophagosomes contenant de l'ubiquitine et la toxicité des mutants de p97/VCP est partiellement médié par son effet sur la protéine TDP43, un constituant majeur des inclusions d'ubiquitine, qui caractérisent la SLA. Ceci montre l'implication directe des défauts dans le système de dégradation des protéines lié à l'ubiquitine dans la dégénérescence des neurones moteurs.<sup>220</sup>

<sup>213</sup> V. E. Kimonis *et al.*, *BBA-Mol. Basis Dis.*, **2008**, 1782, 744-748

<sup>214</sup> J.-M. Gu *et al.*, *Bone*, **2013**, 52, 9-16

<sup>215</sup> X. Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, 112, E1705-E1714

<sup>216</sup> W. K. Tang *et al.*, *EMBO J.*, **2010**, 29, 2217-2229

<sup>217</sup> W. K. Tang *et al.*, *J. Struct. Biol.*, **2012**, 179, 83-92

<sup>218</sup> Y. Abramzon *et al.*, *Neurobiol. Aging*, **2012**, 33, 2231.e1-2231.e6

<sup>219</sup> M. Koppers *et al.*, *Neurobiol. Aging*, **2012**, 33, 837.e7-837.e13

<sup>220</sup> J. O. Johnson *et al.*, *Neuron*, **2010**, 68, 857-864

- **Maladies d'Huntington et de Machado-Joseph**

Il est bien connu que les régions polyQ conduisent à la formation d'agrégats et à des maladies telles les maladies de Huntington ou de Machado-Joseph. L'étude d'agrégats polyQ issus de cultures cellulaires a révélé leur co-localisation avec p97/VCP. De plus, les agrégats isolés de patients atteints par la maladie de Huntington ou de Machado-Joseph se sont avérés être associés avec p97/VCP. Ces études ont montré que d'une manière ou d'une autre p97/VCP a un lien direct ou indirect avec ces maladies.<sup>168</sup>

- **Maladies d'Alzheimer et autres Tauopathies**

D'autres travaux ont aussi permis de faire un lien entre p97/VCP et la tauopathie impliquée dans la MA.<sup>164</sup> Ils ont montré que les taux de p97/VCP sont réduits dans le cortex de patients atteints de la maladie. Ainsi, quand le taux de p97/VCP est réduit par l'utilisation d'un shRNA dans les neurones corticaux primaires, une augmentation significative de protéine Tau soluble hyperphosphorylée en Ser<sub>262/356</sub> a été observée.<sup>164</sup> Cependant, une diminution de concentration de Tau soluble totale a également été observée. Ceci montre que p97/VCP interagit avec un certain type de protéines Tau soluble. L'implication de p97/VCP dans la tauopathie conforte son choix en tant que cible thérapeutique pour le traitement de la MA et d'autres maladies neurodégénératives.<sup>163,221</sup>

## 2. Les cancers

Actuellement, le plus grand nombre de publications sur l'utilisation de p97/VCP comme cible thérapeutique concerne le traitement des cancers. Des taux élevés de p97/VCP sont liés à un faible pronostic dans différentes formes de cancers tels que le cancer de la prostate,<sup>222</sup> celui du poumon à grandes cellules,<sup>223, 224</sup> du pancréas,<sup>225</sup> du sein<sup>226</sup> ou encore les leucémies.<sup>227</sup> Le mécanisme impliquant p97/VCP dans la formation des tumeurs est encore mal connu. Cependant, une grande corrélation entre p97/VCP et le cancer peut être la voie de signalisation NFκB. NFκB est inhibé par IκBα jusqu'à ce qu'elle soit nécessaire pour la cellule, en tant que rétrocontrôle négatif de l'apoptose. p97/VCP est responsable du retrait de la protéine inhibitrice IκBα, qui peut être surrégulée par des facteurs de transcriptions présents dans les cellules leucémiques, impliquant une augmentation de la survie et de la prolifération des cellules.

### D. Ligands de p97/VCP

Des inhibiteurs de l'activité ATPasique de p97/VCP ont été développés principalement dans le but de stopper la machinerie de la protéine impliquée dans le cancer. Quelques exemples de structures sont donnés ci-dessous.

<sup>221</sup> F. Mori *et al.*, *Neuropathology*, **2013**, doi: 10.1111/neup.12050.,

<sup>222</sup> Y. Tsujimoto *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **2004**, 10, 3007-3012

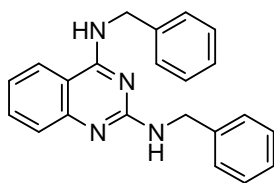
<sup>223</sup> S. Yamamoto *et al.*, *Ann. Surg. Oncol.*, **2004**, 11, 697-704

<sup>224</sup> C. W. Valle *et al.*, *PLoS One*, **2011**, 6, e29073

<sup>225</sup> S. Yamamoto *et al.*, *Ann. Surg. Oncol.*, **2004**, 11, 165-172

<sup>226</sup> M.-N. Laguë *et al.*, *PLoS One*, **2012**, 7, e42470

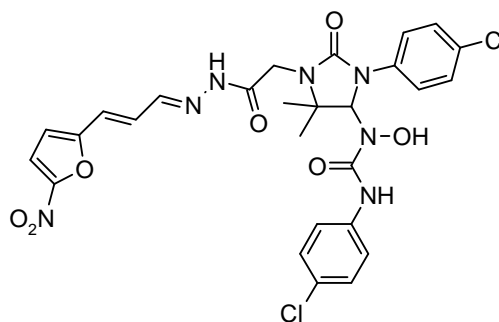
<sup>227</sup> C. Bertram *et al.*, *BMC Cell Biol.*, **2008**, 9, 12



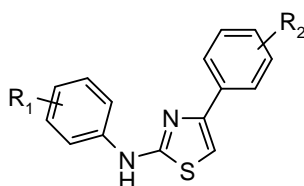
**Figure 65. DBE-Q (inhibiteur de référence).**<sup>228</sup>

Le DBE-Q ( $N^2,N^4$ -dibenzylquinazoline-2,4-diamine) (Figure 65) est connu comme un inhibiteur sélectif, puissant et réversible de p97/VCP. Cet inhibiteur entre en compétition avec l'ATP au niveau du domaine D2 de la protéine. Par cette action, le composé inhibe la croissance des cellules cancéreuses à des concentrations de l'ordre du micromolaire.<sup>228</sup> Un travail de structure-activité à partir du DBE-Q a permis à l'équipe de Chou de développer des composés actifs à 100 nM (ML240, ML241).<sup>229</sup>

L'eyarestatin 1 (Eerl) (Figure 66) est, à ce jour, le seul inhibiteur de l'ERAD connu. Ce composé semble présenter une double fonction. La partie nitrofurane est essentielle à l'inhibition de l'ERAD et à l'activité cytotoxique. Le domaine aromatique n'est pas toxique mais permet de recruter l'Eerl à la membrane du RE. p97/VCP est également une cible du composé. Le nitrofurane est essentielle pour la liaison à la protéine. Il semble que l'interaction se situe au niveau du domaine D1 de la protéine d'une manière plutôt sélective par rapport aux autres AAA. Cette liaison à p97/VCP induit une perturbation de l'homéostasie du RE et induit la mort des cellules tumorales, validant l'utilisation de p97/VCP comme une cible de choix pour le traitement du cancer.<sup>230</sup>



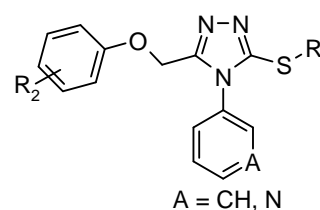
**Figure 66. Eeyarestatin I.**<sup>230</sup>



**Figure 67. 2-Anilino-4-aryl-1,3-thiazole.**<sup>231</sup>

Les composés de la famille 2-anilino-4-aryl-1,3-thiazole (Figure 67) présentent une capacité d'inhibition de p97/VCP de l'ordre du nanomolaire. Aucun mécanisme d'action ou site de liaison n'est pour l'instant proposé.<sup>231</sup>

La famille des alkylsulfanyl-1,2,4-triazole (Figure 68) est décrite comme inhibiteurs allostériques. En effet, les composés semblent se lier au niveau du linker D1-D2, ce qui bloquerait les changements conformationnels ayant lieu lors des étapes d'hydrolyse de l'ATP et conduirait à une détérioration de la machinerie moléculaire.<sup>232</sup> Cette famille présente également une activité inhibitrice de l'activité ATPasique de l'ordre du nanomolaire.



**Figure 68. Alkylsulfanyl-1,2,4-triazoles.**<sup>232, 233</sup>

<sup>228</sup> T.-F. Chou et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 4834-4839

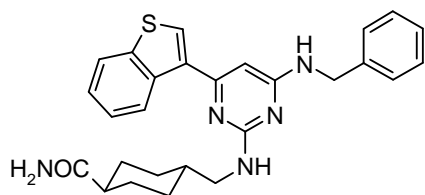
<sup>229</sup> T.-F. Chou et al., *ChemMedChem*, **2013**, 8, 297-312

<sup>230</sup> Q. Wang et al., *PLoS One*, **2010**, 5, e15479

<sup>231</sup> M. G. Bursavich et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20, 1677-1679

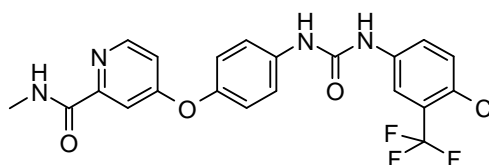
<sup>232</sup> P. Polucci et al., *J. Med. Chem.*, **2013**, 56, 437-450

<sup>233</sup> P. Magnaghi et al., *Nat. Chem. Biol.*, **2013**, 9, 548-556

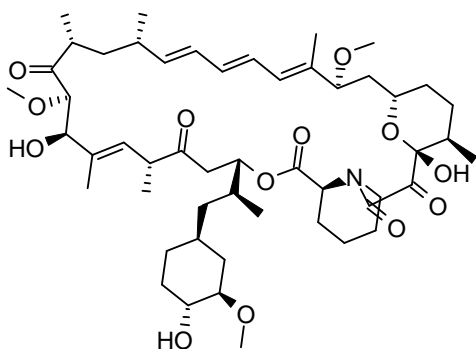


**Figure 69. Composé 2-(cyclohexylmethylamino)pyrimidine.**<sup>234</sup>

Le sorafenib est un inhibiteur multikinase utilisé pour le traitement de cancer hépatocellulaire. Les mécanismes et cibles cellulaires de ce composé restent inconnus. Une étude récente a montré que p97/VCP pourrait être la cible de ce composé.<sup>235</sup>



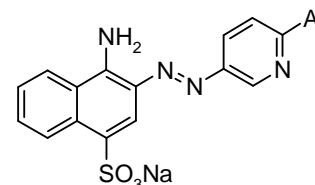
**Figure 70. Sorafenib.**<sup>235</sup>



**Figure 71. Rapamycine.**

Une étude récente a montré que la rapamycine (Figure 71), un agent modifiant l'autophagie, a montré des résultats très encourageants *in vitro* et *in vivo* sur un modèle murin mimant l'IBMPFD. Ces résultats suggèrent que les maladies liées à p97/VCP ou les protéinopathies neurodégénératives associées pourraient être traitées par des analogues du composé.<sup>236</sup>

Les composés de la famille KUSs (Figure 72) ont été développés dans le but de traiter la rétinite pigmentaire. Cette maladie est associée à un déclin de l'ATP cellulaire. Ces composés ont montré une capacité d'inhibition de l'activité ATPasique de p97/VCP sans conduire à une accumulation de protéines ubiquitinées, à un stress du RE ou à la mort cellulaire. Ceci suggère que certaines fonctions de cette protéine nécessitent la liaison de l'ATP mais pas son hydrolyse. Ces composés peuvent être appelés « modulateurs » de p97/VCP.<sup>237</sup>



**Figure 72. Structure générale de la famille KUSs.**<sup>237</sup>

<sup>234</sup> G. Cervi *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 10443-10454

<sup>235</sup> P. Yi *et al.*, *Mol. Cancer Ther.*, **2012**, 11, 2610-2620

<sup>236</sup> A. Nalbandian *et al.*, *PLoS One*, **2015**, 10, e0122888

<sup>237</sup> H. O. Ikeda *et al.*, *Sci. Rep.*, **2014**, 4,

# **CHAPITRE 4 :**

## **Validation de la cible**



Plusieurs techniques peuvent être utilisées afin de mettre en évidence l'interaction entre un composé et une protéine. Suite à une étude de faisabilité, d'accessibilité et de disponibilité du matériel, six techniques ont été présélectionnées et sont présentées ci-dessous.

## A. Les différentes techniques envisageables

### 1. Test d'affinité sur plaques de Nickel

Ce test permet de mesurer l'interaction de composés avec une protéine possédant un tag Histidine (6 résidus His) permettant l'interaction avec le support, *via* un suivi de fluorescence.

Dans des puits recouverts de nickel interagissant avec la cible p97/VCP (His-tag), sont incubés les composés (30  $\mu$ M), la sonde biotinylée (10  $\mu$ M, **TH1-102**) et de la streptavidine marquée par un fluorophore (Figure 73). Les plaques sont ensuite révélées par lecture de la fluorescence à 450 nm. Plus la sonde sera fixée à la cible, plus la fluorescence sera importante. Inversement, plus un composé entrera en compétition avec la sonde plus la fluorescence diminuera. Ainsi, plus un composé est compétitif, plus le pourcentage de diminution de la fluorescence sera élevé.

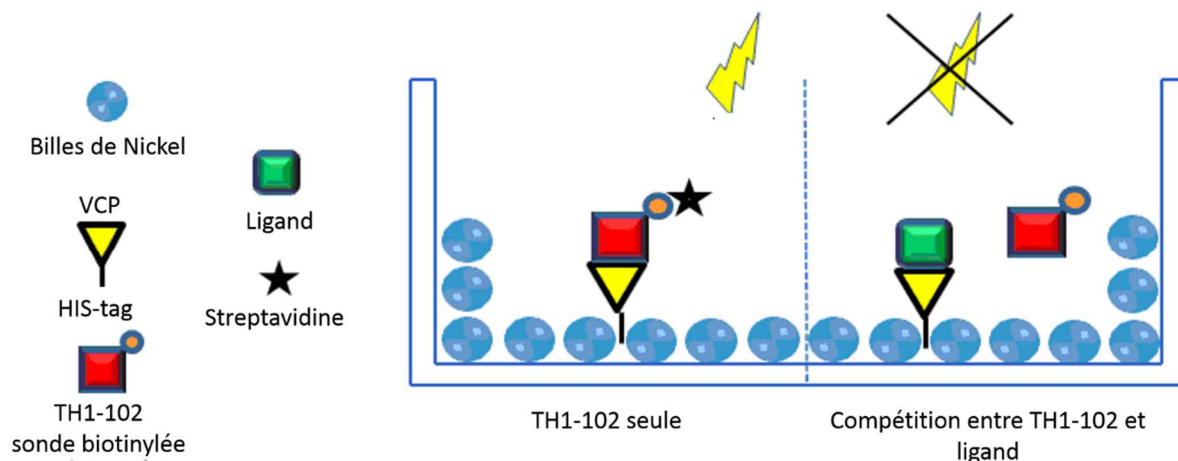


Figure 73. Schéma de principe du test d'affinité.

L'utilisation de plaques 96 puits pourrait permettre de tester rapidement de nombreuses molécules. Cependant, il est connu que les polyamines peuvent interagir avec le nickel. L'AZP2006 possédant un benzimidazole et les composés développés dans cette thèse étant polyaminés, les résultats obtenus avec ce test risquent d'être faussés. C'est pourquoi il est essentiel de développer un autre test permettant de déterminer l'interaction des composés avec la protéine.

### 2. Test FRET

Le FRET (fluorescence resonance energy transfert) est basé sur le transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes. Ce transfert est observé lorsque la molécule « donneur » d'énergie non radiative est à une distance suffisamment faible de l'entité « accepteur » (< 10 nm) (Figure 74). Le fluorochrome porté par la molécule « donneur » doit avoir une longueur d'onde d'émission correspondant à la longueur d'onde d'excitation du fluorochrome « accepteur ». Lorsque les deux molécules interagissent, les deux fluorochromes sont à une distance permettant le transfert de fluorescence et donc l'excitation de l'accepteur.<sup>238</sup>

<sup>238</sup> G. Trugnan *et al.*, *M S-Med. Sc.*, **2004**, 20, 1027-34

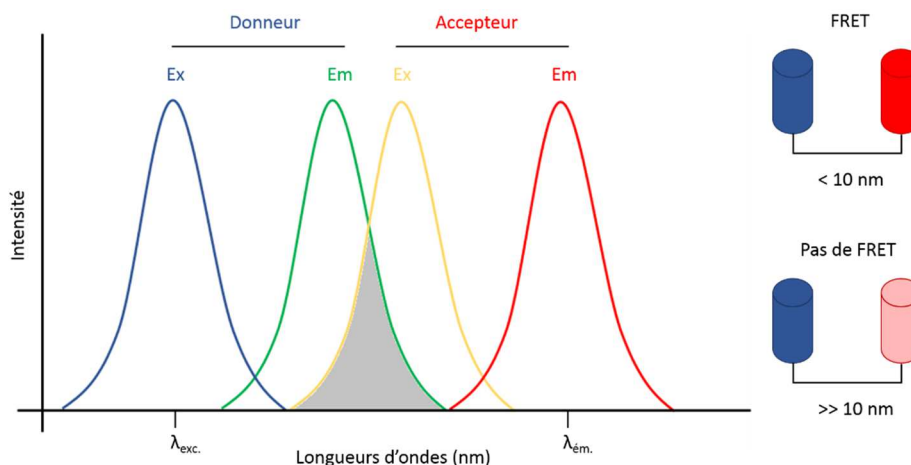


Figure 74. Schéma de principe du FRET. Adapté de 239

### 3. RMN

Des techniques de RMN permettent la mise en évidence de l'interaction d'un composé avec une protéine cible. L'étude peut être menée sur l'observation des signaux de la protéine ou du ligand.<sup>240</sup> Le suivi des changements de déplacement des protons protéiques peut conduire à l'identification du site de liaison des composés et la détermination d'un  $K_D$  mais nécessite une quantité élevée de protéine. La taille de cette dernière est également limitée (< 30 kDa) et nécessite un marquage isotopique ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ , voire  $^2\text{H}$ ). L'étude des protons du ligand ne nécessite pas de marquage, ne présente pas de limitation de taille et requière une quantité faible de protéine. Cependant des faux positifs peuvent être observés à cause de l'agrégation des composés ou de liaisons non spécifiques.<sup>241</sup> Une de ces techniques (la RMN-STD) sera présentée dans la suite de ce chapitre.

### 4. Résonance plasmonique de surface

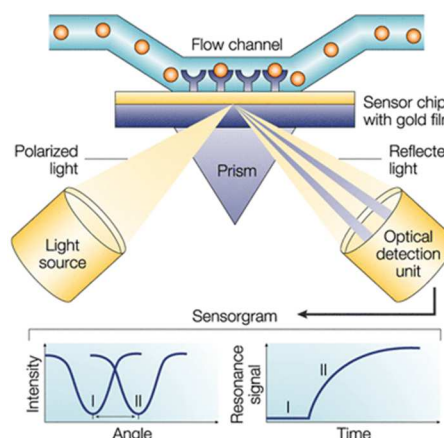


Figure 75. Schéma de principe de la SPR.<sup>242</sup>

La résonance plasmonique de surface (surface plasmon resonance, SPR) est une technique permettant de mesurer l'interaction entre un ligand et une protéine cible immobilisée à la surface d'une couche métallique (généralement de l'or).<sup>242</sup> Cette technique est basée sur la mesure de l'indice de réfraction à l'interface lorsque le ligand est mis en contact avec la protéine. L'angle de résonance varie en fonction de l'indice de réfraction et donc en fonction du nombre de molécules liées à la protéine et de la masse molaire. Lorsque le signal de résonance est tracé en fonction du temps, une constante d'association peut être déterminée ainsi que la stoechiométrie et des paramètres cinétiques dont est déduit le  $K_d$ . Cette technique peut s'appliquer à la plupart des protéines avec une faible consommation de produit et permet de réaliser des interactions directes ou par compétition. Cependant elle nécessite l'immobilisation d'un partenaire, l'agrégation de composés ou des liaisons non spécifiques peuvent conduire à des artefacts et l'optimisation de la méthode requière un certain temps.<sup>241</sup>

<sup>239</sup> J. A. Broussard et al., *Nat. Protoc.*, **2013**, 8, 265-281

<sup>240</sup> L. Fielding, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2003**, 3, 39-53

<sup>241</sup> A. Ciulli, *Method. Mol. Biol.*, **2013**, 1008, 357-388

<sup>242</sup> M. A. Cooper, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2002**, 1, 515-528

## 5. Thermophorèse à micro-échelle

La technique de thermophorèse à micro-échelle (MicroScale Thermophoresis, MST) est basée sur le mouvement des molécules en solution soumises à un gradient de température.<sup>243</sup> Ce mouvement dépend de la sphère d'hydratation, de la charge et de la taille des molécules. Le suivi est effectué par fluorescence.<sup>244</sup>

La protéine étudiée doit préalablement être marquée par des groupements fluorochromes, si elle n'est pas fluorescente. Quand la protéine est mise en présence d'un composé ne présentant pas d'affinité pour celle-ci, lorsque le capillaire contenant la solution est irradié par un laser, les molécules vont se déplacer vers les parties les plus froides du capillaire, la fluorescence détectée sera minimale (Figure 76). Quand la protéine est mise en présence d'un ligand, lorsque le capillaire est irradié par le laser, la modification de la sphère d'hydratation, de la charge et de la taille conduit au mouvement du complexe protéine-ligand à l'inverse du gradient de température. Lors d'un ajout d'une quantité croissante de ligand, le nombre de complexes protéine marquée-ligand augmente sur la trajectoire du laser. Ceci est corrélé à une augmentation de la fluorescence détectée.<sup>245</sup>

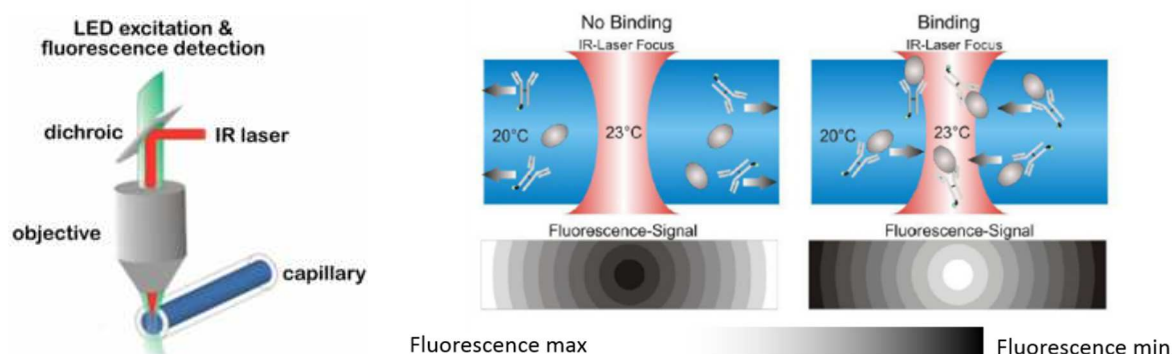


Figure 76. Schéma de principe de la thermophorèse.<sup>246</sup>

Cette étude peut être réalisée à différentes concentrations de ligands, ce qui permet de tracer l'évolution de la fluorescence normalisée mesurée à l'équilibre thermodynamique en fonction de la concentration, et ainsi calculer le  $K_D$  du ligand (Figure 77).

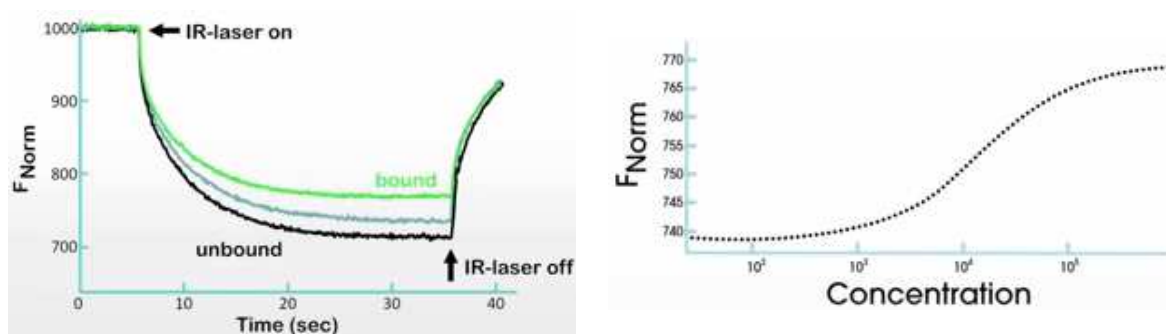


Figure 77. Schéma de suivi de la fluorescence en fonction de la concentration du ligand.<sup>246</sup>

Cette technique permet de détecter tout type d'interaction, avec une gamme d'affinité large et un faible volume d'échantillon. Mais le marquage nécessaire peut affecter la liaison ligand-protéine.<sup>241</sup>

<sup>243</sup> P. Baaske *et al.*, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2010**, 49, 2238-2241

<sup>244</sup> M. Jerabek-Willemsen *et al.*, *J. Mol. Struct.*, **2014**, 1077, 101-113

<sup>245</sup> M. Jerabek-Willemsen *et al.*, *Assay Drug Dev. Techn.*, **2011**, 9, 342-353

<sup>246</sup> MicroScale Thermophoresis (MST). <http://www.nanotemper-technologies.com/technologies/mst-technology/> (02/07/2015)

## 6. Calorimétrie de titration isotherme

La calorimétrie par titration isotherme (isothermal titration calorimetry, ITC) permet de déterminer l'affinité d'un ligand pour un récepteur et également les changements d'enthalpie ( $\Delta H$ ) et d'entropie ( $\Delta S$ ) engendrés par la liaison.<sup>247</sup> Cette technique est basée sur la mesure de chaleur libérée ou consommée accompagnant l'interaction d'un ligand et d'une protéine.

Deux cellules sont placées dans une enceinte adiabatique (Figure 78). Une première cellule utilisée comme référence est remplie de la solution tampon dans laquelle l'interaction est étudiée. La seconde cellule contient la protéine d'intérêt. Le système est équilibré à la température souhaitée puis le composé étudié est ajouté par petites quantités *via* une seringue dans la cellule de mesure. Chaque ajout engendre un échange thermique qui est calculé à partir de l'énergie nécessaire à fournir pour maintenir la température de la cellule de mesure égale à celle de la cellule de référence.<sup>248</sup>

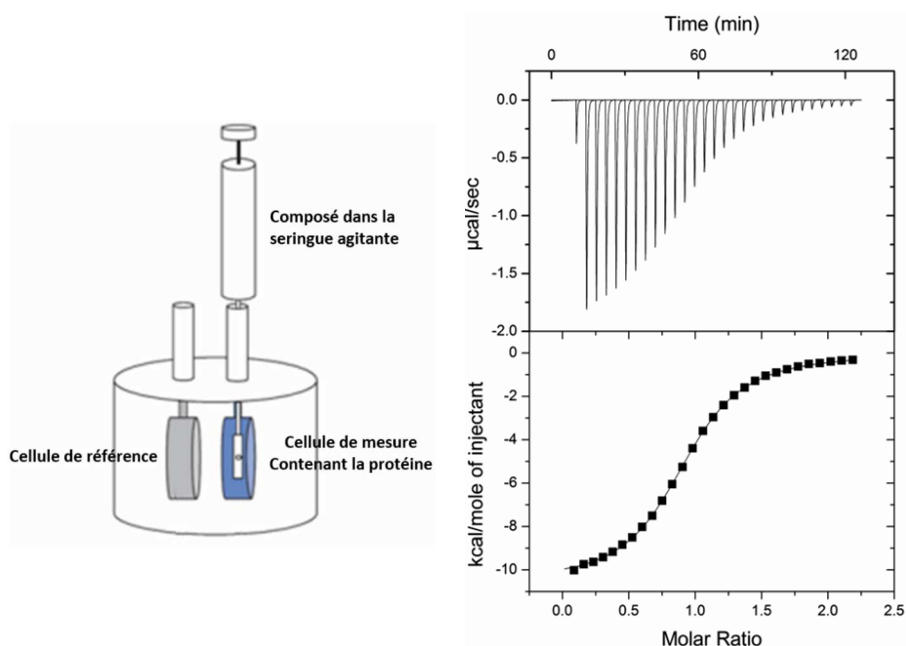


Figure 78. Schéma de principe de l'ITC.<sup>252, 241</sup>

Suite à l'intégration des pics de variation d'énergie (Figure 78), la variation d'enthalpie ( $\Delta H$ ) est obtenue en fonction du rapport molaire ligand/protéine. Ceci permet d'accéder à la constante d'association ( $K_a$ ) et à la stoechiométrie de la réaction.

Cette technique peut permettre de réaliser des interactions directes ou par compétition et est applicable à la plupart des protéines mais le débit peut être lent.<sup>241</sup>

Les techniques présentées dans cette partie sont les techniques envisagées pour déterminer l'interaction entre p97/VCP et ses ligands. D'autres techniques permettant de quantifier l'interaction ligand-récepteur existent telles que la polarisation de fluorescence, la diffraction des rayons X ou le thermal shift assay (TSA). Ces deux dernières techniques ne sont cependant pas des méthodes quantitatives.

<sup>247</sup> S. Leavitt *et al.*, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **2001**, 11, 560-566

<sup>248</sup> M. W. Freyer *et al.*, *Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions*. In *Methods in Cell Biology*, 2008

## B. Développement d'un test FRET

### 1. Principe

Pour la mise au point de ce test FRET, un anticorps anti-His est marqué avec un donneur de fluorescence  $\text{Eu}^{3+}$  (Figure 79). L'étape **a** consiste en l'introduction de p97/VCP taguée qui se fixe sur l'anticorps, suivie de la sonde biotinylée qui se place dans le site d'interaction de la protéine. L'étape **b** est amorcée par l'introduction de la streptavidine marquée par un accepteur de fluorescence (XL665). Lorsque la biotine et la streptavidine interagissent, le donneur de fluorescence active l'accepteur, ce qui conduit à une émission de fluorescence. L'introduction d'un compétiteur tel un ligand de p97/VCP induit l'étape **c**. Celui-ci entre en compétition avec la sonde biotinylée et conduit à son déplacement. Le donneur de fluorescence est éloigné de l'accepteur, d'où une diminution ou extinction de la fluorescence.

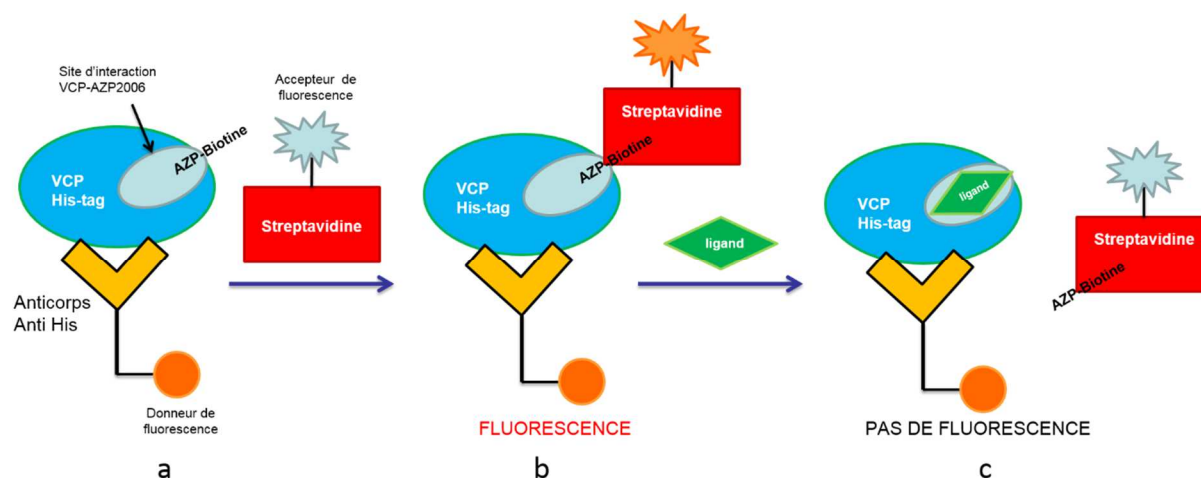


Figure 79. Principe de fonctionnement du test FRET.

- **Synthèse de sondes dérivées de l'AZP2006**

Les tests d'affinité à p97/VCP sont actuellement réalisés en utilisant la sonde biotinylée **TH1-102** (Figure 52, page 55), synthétisée à partir de la structure de l'AZP3012 et présentant un Kd de 0,67  $\mu\text{M}$ . Cependant, il est possible que l'AZP3012 puisse avoir un mode de liaison à p97/VCP différent de celui de l'AZP2006 car une étude de modélisation moléculaire détaillée dans le chapitre suivant a permis de mettre en évidence deux sites de fixation potentiels des composés. De plus, le développement du test a échoué avec cette sonde. En effet, la compétition avec AZP2006 n'a pas permis de faire diminuer la fluorescence. La synthèse d'une sonde biotinylée dérivée de l'AZP2006 pourrait permettre la mise au point de ce test.

Afin d'obtenir les meilleurs résultats, la synthèse de deux sondes a été envisagée : une sonde analogue à **TH1-102** mais possédant pour la partie aromatique le 2-benzimidazole caractéristique de l'AZP2006 (**sonde 4**, Figure 80). La seconde sonde, également basée sur la structure de l'AZP2006, possède un linker de quinze atomes dans le but d'éloigner la biotine du cœur de la molécule afin de s'affranchir d'éventuels problèmes d'encombrement stérique (**sonde 5**, Figure 80).

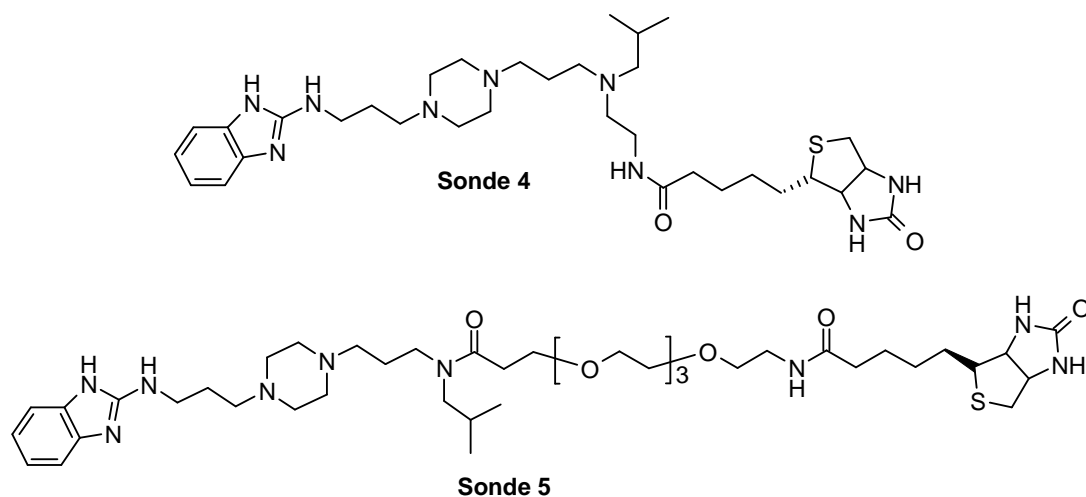


Figure 80. Structure des deux nouvelles sondes.

\* **Synthèse de la sonde 4**

La synthèse de la **sonde 4** est réalisée en sept étapes (Schéma 1). La première étape est une mono-protection par un groupement Boc de la 3-[4-(3-aminopropyl)pipérazin-1-yl]propylamine **17**.<sup>249</sup> Une substitution nucléophile sur le 2-chlorobenzimidazole permet d'introduire le 2-benzimidazole, hétérocycle caractéristique de l'AZP2006 (**19**).<sup>249</sup> L'amine est ensuite déprotégée dans du dioxane saturé en HCl<sub>g</sub> (**20**) selon un protocole mis au point précédemment au laboratoire puis une mono amination réductrice permet d'introduire la chaîne isobutyle (**21**).<sup>250</sup> Une seconde amination réductrice permet ensuite d'introduire le linker CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHBoc (**22**).<sup>251</sup> Le groupement Boc est finalement clivé dans du dioxane saturé en HCl<sub>g</sub> (**23**) puis la biotine est introduite *via* la substitution d'un ester de succinimide pour obtenir la **sonde 4** avec un rendement de 64 %.<sup>251</sup>

<sup>249</sup> A. Ryckebusch *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 3783-3787

<sup>250</sup> A. Ryckebusch *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 542-557

<sup>251</sup> P. Melnyk *et al.*, WO/2014/207241, **2014**.

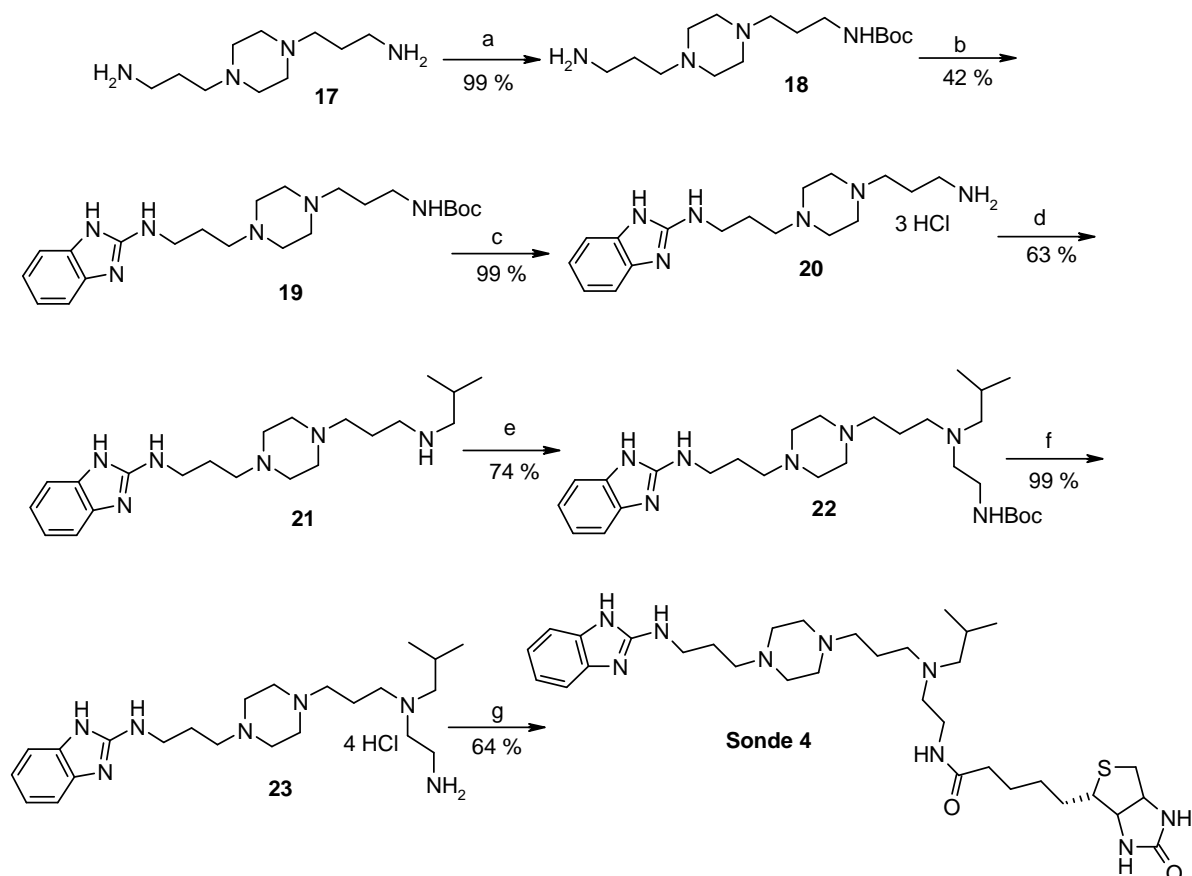


Schéma 1. Schéma de synthèse de la sonde 4.

## \* Synthèse de la sonde 5

La synthèse de la sonde 5 a nécessité l'achat de la biotine couplée avec un linker polyéthylène glycol de quinze atomes (Figure 81).

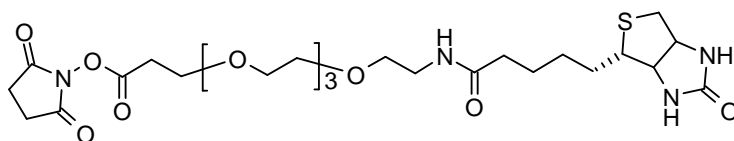
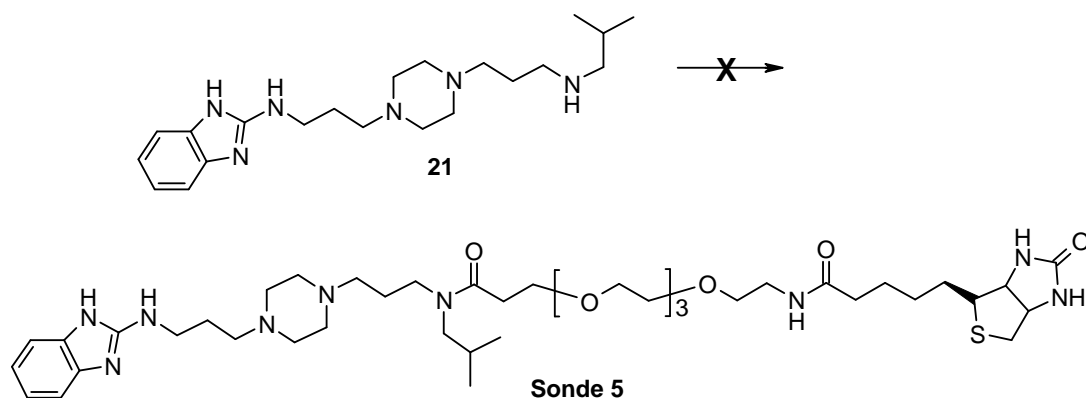


Figure 81. Linker biotinylé Biotin-dPEG(4)-OSu.

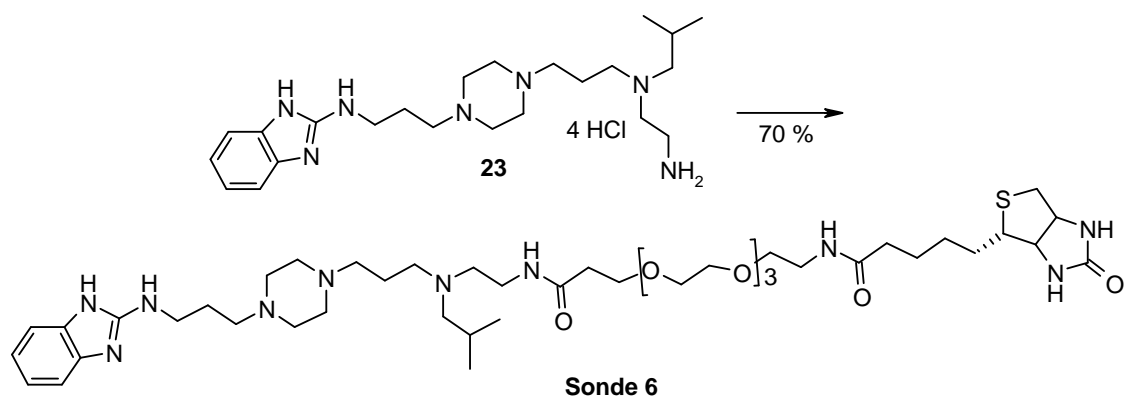
Les premières étapes de la synthèse sont similaires à la synthèse de la sonde 4, jusqu'à l'obtention du composé 21. Ce dernier est alors utilisé directement pour la substitution de l'ester de succinimide (Schéma 2).



Réactifs et conditions : Biotin-dPEG(4)-OSu (1 éq.), TEA (3 éq.), DMF ou DCM, 20°C, 18 h.

**Schéma 2. Synthèse de la sonde 5.**

Cependant, les essais menés dans le diméthylformamide ou le dichlorométhane n'ont pas été concluants, le produit n'a pas pu être obtenu et une dégradation du milieu réactionnel a été constatée. L'encombrement de l'amine secondaire pourrait en être la cause. La synthèse a alors été envisagée en réalisant l'étape d'introduction du linker biotinyle à partir du composé **23** qui ne présentait pas de problème de réactivité lors de la synthèse de la sonde 4 (Schéma 3).



Réactifs et conditions : Biotin-dPEG(4)-OSu (1,0 éq.), TEA (4,0 éq.), DCM, 20°C, 18 h.

**Schéma 3. Synthèse de la sonde 6.**

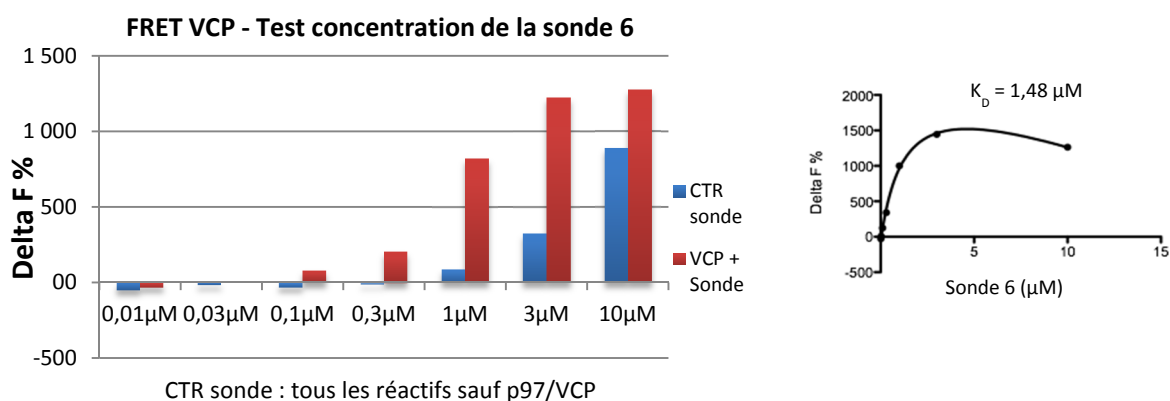
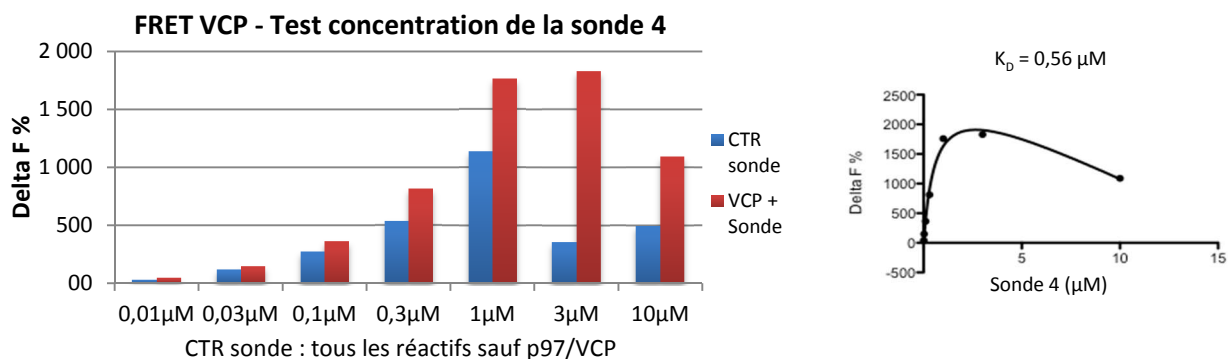
La **sonde 6** est obtenue à partir de l'amine primaire **23** avec un rendement de 70 %.

### • Evaluation des sondes (Alzprotect)

#### \* Détermination de la constante de dissociation

Dans un premier temps, l'étude de la fluorescence en fonction de la concentration des sondes a permis le calcul de la constante de dissociation ( $K_D$ ) du complexe p97/VCP-sonde. Les  $K_D$  obtenus pour les **sondes 4 et 6** ont une valeur moyenne respective de 0,56  $\mu\text{M}$  (Figure 82) et 1,48  $\mu\text{M}$  (Figure 83).

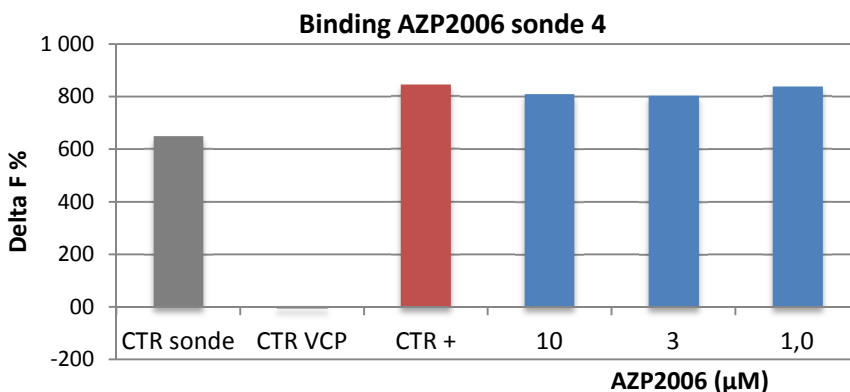




\* **Compétition avec l'AZP2006**

Des tests de compétition entre les sondes et l'AZP2006 ont ensuite été mis en œuvre. L'AZP2006 et p97/VCP sont préincubés pendant 15 minutes à 20°C, tous les réactifs sont ajoutés puis le milieu est incubé pendant une heure. La lecture de la plaque est réalisée à 615 et 665 nm.

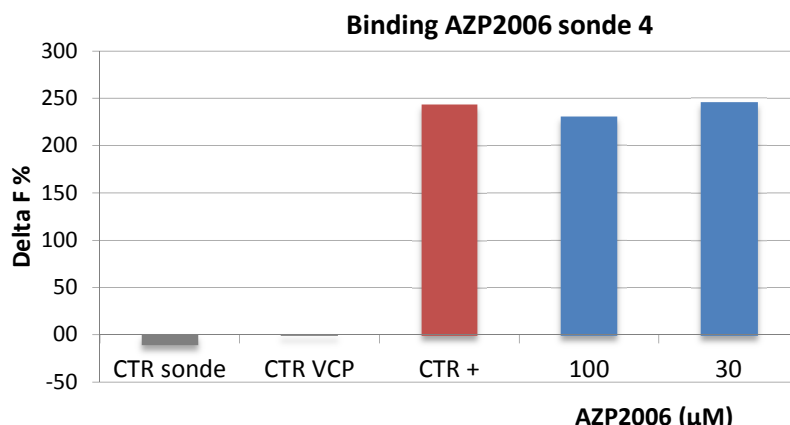
Pour une concentration de sonde égale au  $K_D$ , la fluorescence de la **sonde 4** (CTR sonde) est très élevée, ce qui rend les résultats obtenus ininterprétables (ce phénomène a également été observé lors de la détermination du  $K_D$ ) (Figure 84). Ainsi, les tests ont été réalisés à nouveau à une concentration où le CTR sonde est faible, c'est-à-dire à 3 µM.



CTR sonde = Tous les réactifs sauf VCP et AZP2006, CTR VCP = Tous les réactifs sauf sonde 4 et AZP2006, CTR + = Tous les réactifs sauf AZP2006

**Figure 84. Test de compétition avec l'AZP2006 préincubé à une concentration de sonde de 0,56 µM.**  
(CTR : contrôle)

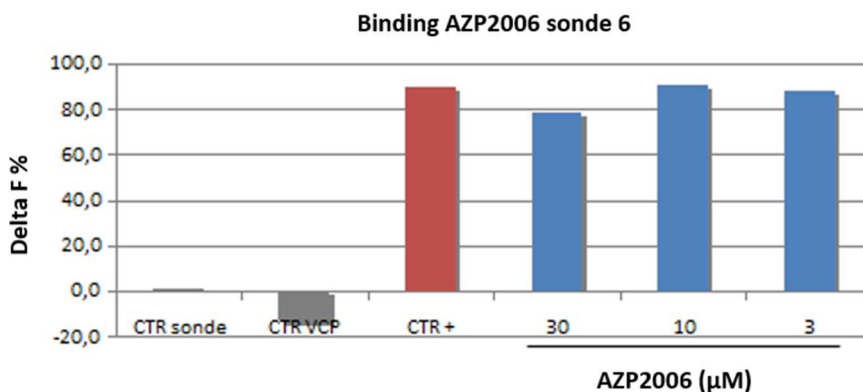
A cette nouvelle concentration, la fluorescence de la sonde (CTR sonde) est correcte mais aucune diminution de fluorescence n'est observée entre le CTR+ et la pré-incubation avec l'AZP2006 (Figure 85).



CTR sonde = Tous les réactifs sauf VCP et AZP2006, CTR VCP = Tous les réactifs sauf sonde 4 et AZP2006, CTR + = Tous les réactifs sauf AZP2006

**Figure 85. Test de compétition avec l'AZP2006 préincubé à une concentration de sonde de 3 μM.**  
(CTR : contrôle)

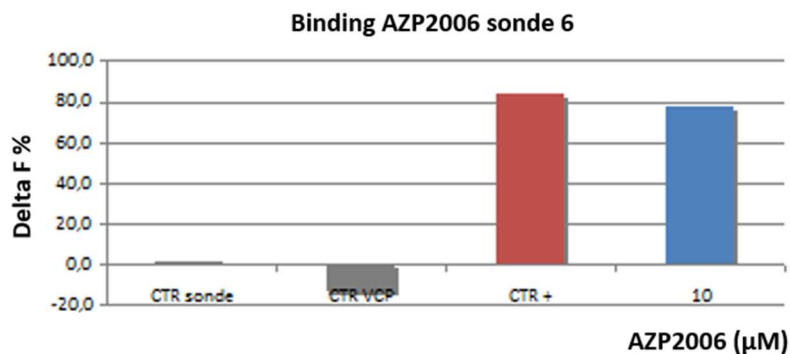
Pour la sonde 6, il n'y a pas de problème de fluorescence de la sonde à la concentration du  $K_D$ . Une diminution de la fluorescence est observée pour une concentration d'AZP2006 de 30 μM (Figure 86).



CTR sonde = Tous les réactifs sauf VCP et AZP2006, CTR VCP = Tous les réactifs sauf sonde 4 et AZP2006, CTR + = Tous les réactifs sauf AZP2006

**Figure 86. Test de compétition avec l'AZP2006 préincubé à une concentration de sonde de 1,5 μM.**  
(CTR : contrôle)

La même expérience a été réalisée mais sans préincubation de l'AZP2006 et de p97/VCP. Pour une concentration d'AZP2006 de 10 μM, une faible diminution de fluorescence est constatée (Figure 87).



CTR sonde = Tous les réactifs sauf VCP et AZP2006, CTR VCP = Tous les réactifs sauf sonde 4 et AZP2006, CTR + = Tous les réactifs sauf AZP2006

**Figure 87. Test de compétition avec l'AZP2006 sans préincubation à une concentration de sonde de 1,5 μM.**  
(CTR : contrôle)

Les deux sondes ne présentent pas les propriétés adéquates pour le développement d'un test FRET. Le  $K_D$  pourrait s'avérer trop faible, ce qui rendrait la compétition avec un autre ligand comme l'AZP2006 difficile. De plus, le protocole pourrait être amélioré en réalisant dans un premier temps une incubation de p97/VCP avec la sonde puis introduire l'AZP2006 pour réaliser une compétition. Une étude plus poussée des concentrations pourrait être menée.

## C. RMN-STD

### 1. Principe

Une étude par RMN-STD (saturation-transfer difference) a été lancée pour montrer une interaction entre l'AZP2006 et p97/VCP.

Cette technique de spectroscopie permet de détecter la liaison transitoire entre une petite molécule et un récepteur macromoléculaire. La méthode de différence de transfert de saturation est basée sur la possibilité de saturer sélectivement des protons d'un récepteur macromoléculaire. Grâce à la diffusion de spin, la saturation se propage rapidement à travers le récepteur en entier. Si la petite molécule se lie au récepteur, la saturation va également se répandre à travers celle-ci. L'intensité du signal du ligand va alors être atténuée. La soustraction du spectre (on resonance) obtenu au spectre de référence (off resonance) conduit au spectre STD (Figure 88).<sup>252, 253</sup> En pratique, les signaux de RMN  $^1\text{H}$  de la petite molécule seront observés si celle-ci se lie de manière transitoire à la protéine et aucun signal ne sera observé si elle ne se lie pas.

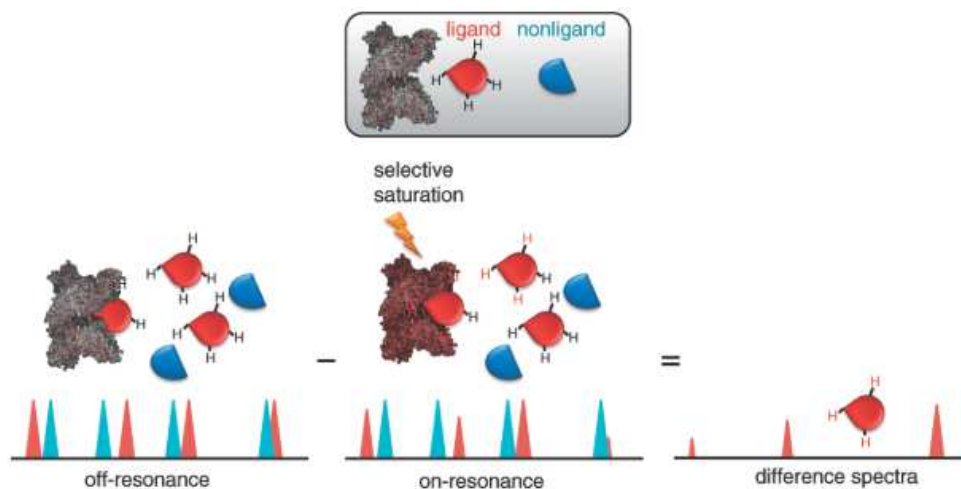


Figure 88. Schéma d'une expérience de RMN-STD.<sup>253</sup>

### 2. Essais réalisés

Des tests préliminaires réalisés par l'entreprise Kancera avaient montré une interaction entre le composé AZP2006 et la protéine p97/VCP. Le but de ce travail de thèse a été de reproduire les résultats obtenus afin de pouvoir appliquer cette technique aux autres ligands synthétisés.

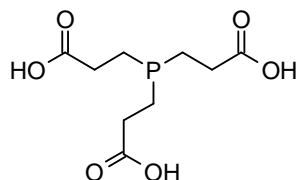
Les expériences réalisées permettent d'obtenir des informations qualitatives mais non quantitatives.

<sup>252</sup> M. Mayer *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 1784-1788

<sup>253</sup> A. Viegas *et al.*, *J. Chem. Educ.*, **2011**, 88, 990-994

- **Détails techniques**

Après une étude de divers protocoles de RMN-STD,<sup>254, 255, 256, 257</sup> il a été choisi de composer le tube RMN de la manière suivante : ligand à 200  $\mu$ M, p97/VCP à 5  $\mu$ M, TCEP à 0,5 mM (*tris*(2-carboxyethyl)phosphine, Figure 89) et le tube est complété jusqu'au volume souhaité avec un tampon PBS (phosphate buffer saline). L'agent réducteur TCEP permet d'éviter la formation de pont disulfure dans la protéine. Le tampon PBS permet de maintenir un pH proche de 7,4. Toutes les solutions sont réalisées dans le D<sub>2</sub>O afin de limiter l'intensité du pic d'eau. Seule la protéine se trouve dans le tampon non deutéré.



**Figure 89. Structures du TCEP.**

La quantité de protéine p97/VCP disponible étant très faible au début de ce travail, il fallait pouvoir réaliser le plus d'expériences possibles avec la quantité disponible. Ainsi les tubes RMN utilisés sont de 3 mm de diamètre et nécessitent une quantité totale de 200  $\mu$ L.

Avant de réaliser l'expérience de STD, une étape de présaturation du signal de l'eau (séquence Watergate) est nécessaire afin de diminuer l'intensité du pic dans le but de voir les signaux correspondants au produit testé.

Pour réaliser l'expérience STD, il est nécessaire de sélectionner deux fréquences : la fréquence on-résonance à laquelle la protéine sera irradiée et la fréquence off-résonance permettant de réaliser le spectre de référence. Pour la fréquence off-résonance, il sera toujours choisi 5500 Hz (11 ppm) car aucun proton des ligands ou de la protéine ne résonnent à cette fréquence. En ce qui concerne la fréquence on-résonance, il faut cibler un proton de la protéine sans toucher les protons du ligand. Cette fréquence est adaptée en fonction du ligand étudié.

- **Etude de la liaison AZP2006-VCP**

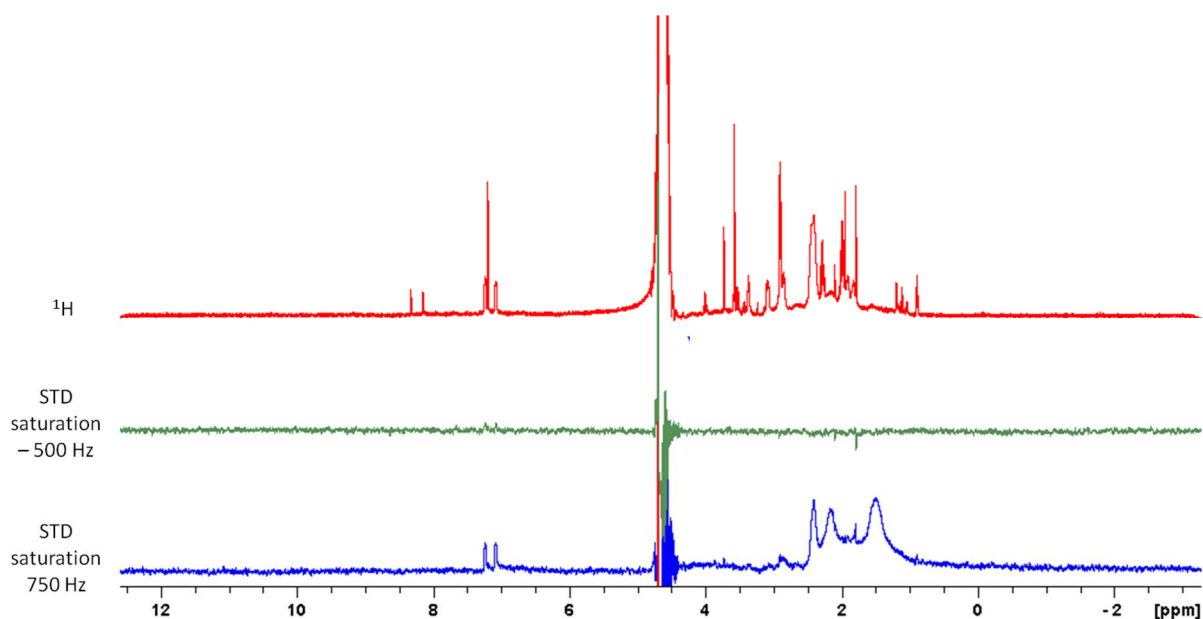
Pour l'AZP2006, 750 Hz (1,5 ppm) ont été choisis comme fréquence on-résonance. La Figure 90 présente le spectre du mélange avant analyse STD (rouge), après l'expérience de STD en irradiant à 750 Hz (1,5 ppm)(bleu) et une expérience de STD en choisissant de ne pas irradier sur la protéine à -500 Hz (- 1 ppm) (vert). Sur le spectre avant STD (rouge), les signaux correspondant aux différents composés présents dans le tube sont clairement visibles et notamment la partie aromatique de l'AZP2006. Lorsque l'expérience de RMN STD est réalisée en sélectionnant une fréquence en dehors des signaux de la protéine (vert), aucun signal n'est observé. Ceci est tout à fait cohérent, la saturation ne se transmet pas au ligand. Finalement, lorsque la fréquence choisie correspond à une fréquence de vibration des protons de la protéine (750 Hz) (bleu), les signaux aromatiques de l'AZP2006 sont clairement visibles. Ceci suggère que l'AZP2006 interagit avec p97/VCP.

<sup>254</sup> R. Gozalbes *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, 21, 1944-1951

<sup>255</sup> Y.-S. Wang *et al.*, *Magn. Reson. Chem.*, **2004**, 42, 485-489

<sup>256</sup> N. Lancelot *et al.*, *J. Pharmaceut. Biomed.*, **2014**, 93, 125-135

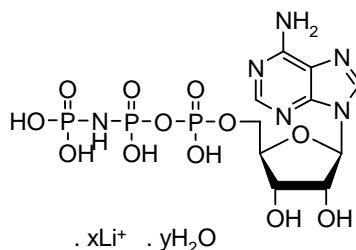
<sup>257</sup> T.-F. Chou *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **2014**, 426, 2886-2899



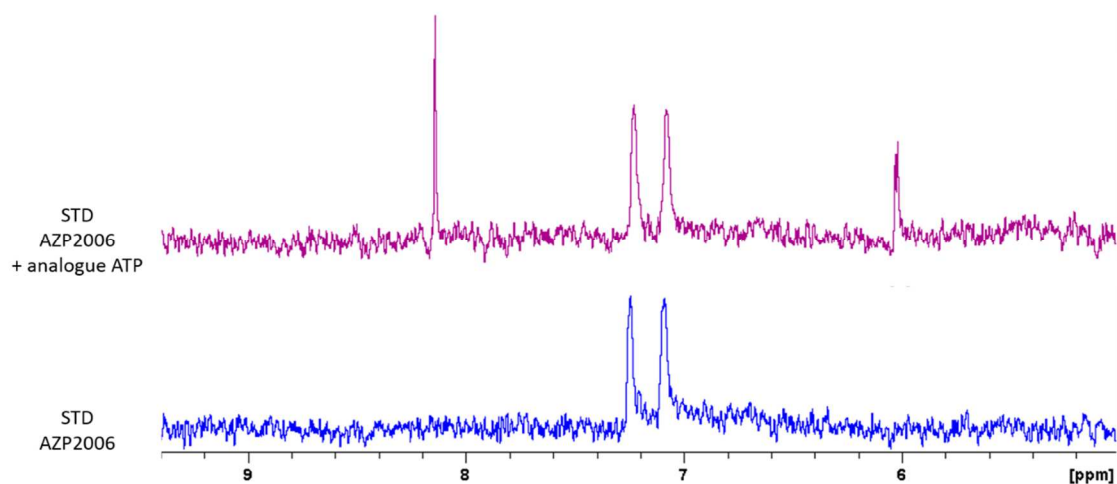
**Figure 90. Spectre STD de l'AZP2006.**

(rouge avant STD, vert STD à - 500 Hz (-1 ppm), bleu STD à 750 Hz (1,5 ppm), AZP2006 200  $\mu$ M, p97/VCP 5  $\mu$ M)

Afin de déterminer si le site d'interaction de l'AZP2006 correspond à un site de fixation de l'ATP, un analogue non hydrolysable de l'ATP, le sel de lithium hydraté d'adénosine 5'-( $\beta,\gamma$ -imido)triphosphate (Figure 91) est ajouté dans le tube à une concentration dix fois supérieure à celle de l'AZP2006. Sur le spectre STD obtenu, les signaux correspondants à la partie aromatique de l'AZP2006 sont toujours présents, et les signaux de l'analogue non hydrolysable de l'ATP sont visibles (Figure 92). Les résultats obtenus suggèrent que l'AZP2006 et l'analogue de l'ATP ont un site de liaison différent. L'AZP2006 ne jouerait donc pas sur l'activité ATPasiques de p97/VCP.



**Figure 91. Structure de l'analogue non hydrolysable de l'ATP, sel de lithium hydraté d'adénosine 5'-( $\beta,\gamma$ -imido)triphosphate.**



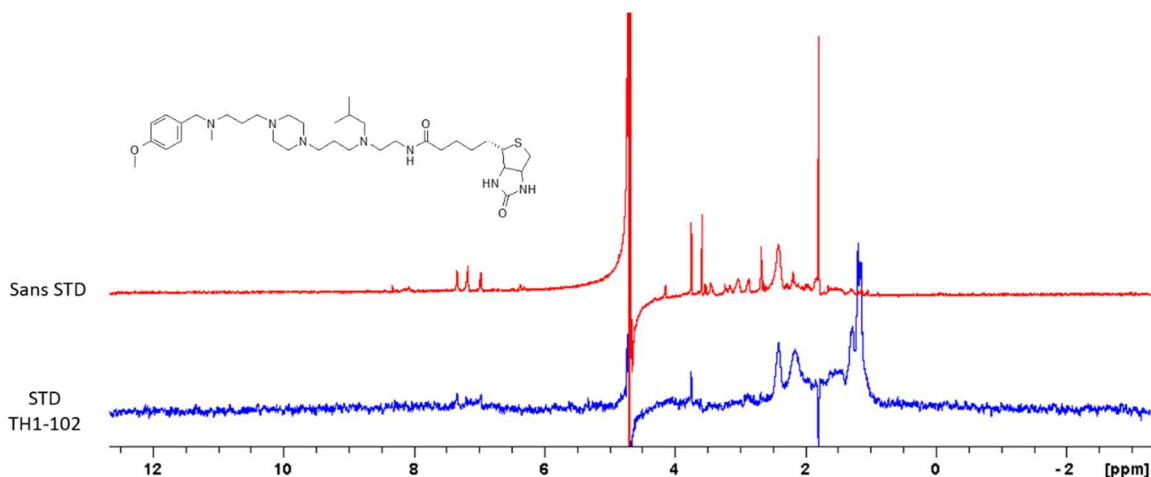
**Figure 92. Zoom de la partie aromatique du spectre de RMN-STD de l'AZP2006.**

(bleu sans analogue de l'ATP, mauve avec analogue de l'ATP, AZP2006 200  $\mu$ M, p97/VCP 5  $\mu$ M, analogue ATP 2 nM)

### • Etude de la liaison sonde TH1-102-VCP

La sonde **TH1-102** a permis d'identifier la protéine p97/VCP en tant que cible biologique des composés de la famille MSBD. Cependant, le test de FRET n'a pas permis de valider cette interaction. L'expérience de RMN-STD a pour but de montrer cette interaction afin de valider l'identification de p97/VCP grâce à l'utilisation de cette sonde. Puis, un test de compétition avec l'AZP2006 sera réalisé afin de déterminer si les deux composés interagissent dans le même site de fixation.

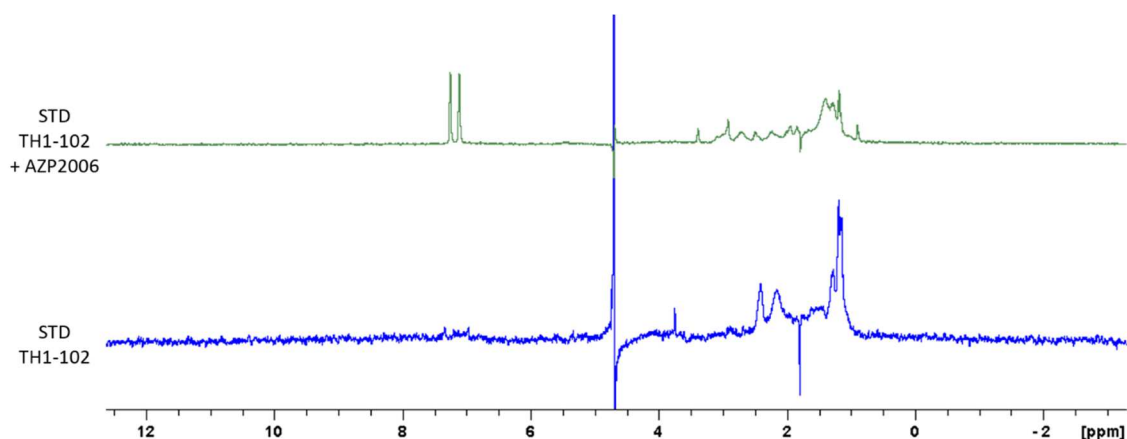
Pour réaliser l'expérience, une fréquence on-résonance de 600 Hz (1,2 ppm) a été choisie. Le spectre STD présente des signaux dans la partie aromatique, mais de faible intensité (Figure 93). Un singulet à 3,75 ppm est visible et correspond au groupement méthoxy de la molécule. Le composé interagirait donc avec la protéine, ce qui est cohérent avec l'utilisation de cette sonde pour l'identification de p97/VCP.



**Figure 93. Spectre STD de la sonde biotinyllée.**

(rouge avant STD, bleu STD à 600 Hz (1,2 ppm), **TH1-102** 200  $\mu$ M, p97/VCP 5  $\mu$ M)

Une compétition a été réalisée entre la sonde **TH1-102** et l'AZP2006 (dix fois plus concentré). Les signaux de l'AZP2006 apparaissent clairement et le singulet à 3,75 ppm disparaît (Figure 94). Ces résultats suggèrent que l'AZP2006 entre en compétition avec la sonde au niveau du même site d'interaction de la protéine.

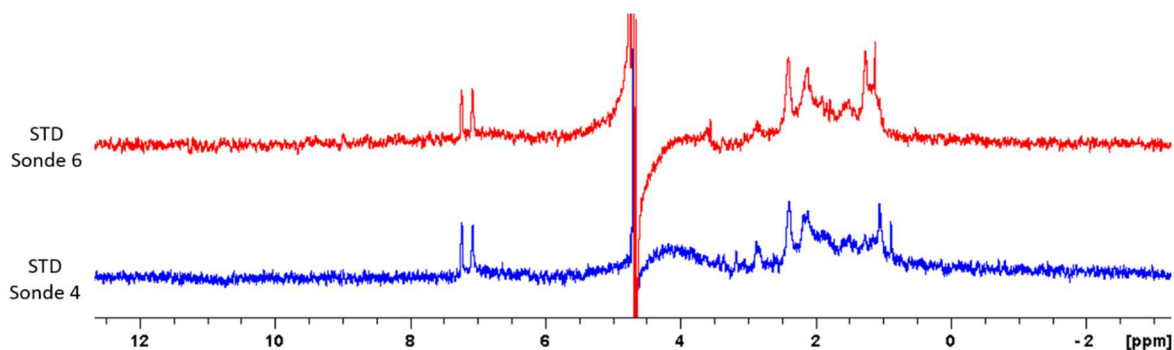


**Figure 94. Compétition entre la sonde biotinyllée et l'AZP2006.**

(bleu STD sans compétition, vert STD avec compétition, **TH1-102** 200  $\mu$ M, p97/VCP 5  $\mu$ M, AZP2006 2 nM)

- **Etude de la liaison sondes 4 et 6-VCP**

Les sondes 4 et 6 ont également été testées en RMN-STD. Les signaux aromatiques caractéristiques du benzimidazole sont clairement visibles, ce que confirme l'interaction entre ces sondes et la protéine (Figure 95).



**Figure 95. Spectres de RMN-STD des sondes 4 et 6.**  
(sonde 4 ou 6 200  $\mu$ M, p97/VCP 5  $\mu$ M)

Ces résultats préliminaires obtenus avec cette technique de RMN doivent être validés par des techniques orthogonales. Des essais de MST sont actuellement menés. L'étude de différents capillaires et de deux modes de marquage est en cours. Les travaux de SPR ne sont pour l'heure pas concluants, des essais de fixation de p97/VCP sur la surface d'or ont échoué. Une étude d'ITC devrait également débuter.

# **CHAPITRE 5 :**

## **Conception, synthèse et évaluation de ligands**



L'identification de p97/VCP en tant que cible biologique de l'AZP2006 semble se préciser. Les travaux de cette thèse ont constitué à concevoir au moyen de la modélisation moléculaire, synthétiser et évaluer de nouveaux ligands de cette protéine dont la structure doit être différente de celle des MSBD et PMAD.

### A. Conception guidée par modélisation moléculaire

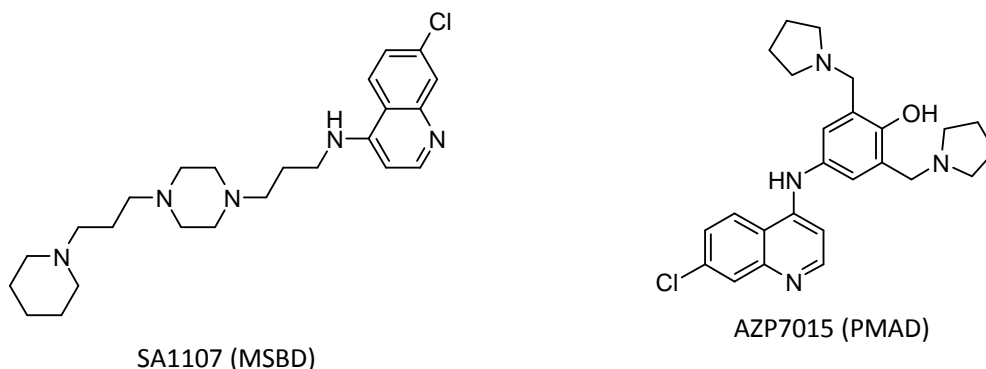
Deux stratégies ont été employées pour concevoir et identifier de nouveaux ligands potentiels de p97/VCP : une approche dite « structure-based » et une approche dite « ligand-based ».

#### 1. Structure-based (Pr P. Chavatte)

Cette approche est basée sur la structure connue de la cible moléculaire.

Parmi les dix-sept structures de p97/VCP résolues par cristallographie, neuf sont d'origine murine et huit d'origine humaine. Bien qu'aucune structure ne comprend l'intégralité de l'hexamère, les structures murines sont les plus complètes avec notamment une structure comprenant l'hexamère sans les domaines D2<sup>258</sup> et une autre avec l'intégralité des 806 résidus composant un protomère.<sup>174</sup> Les structures humaines se résument majoritairement à un complexe entre un protomère N-D1 et un cofacteur lié au domaine N-terminal.

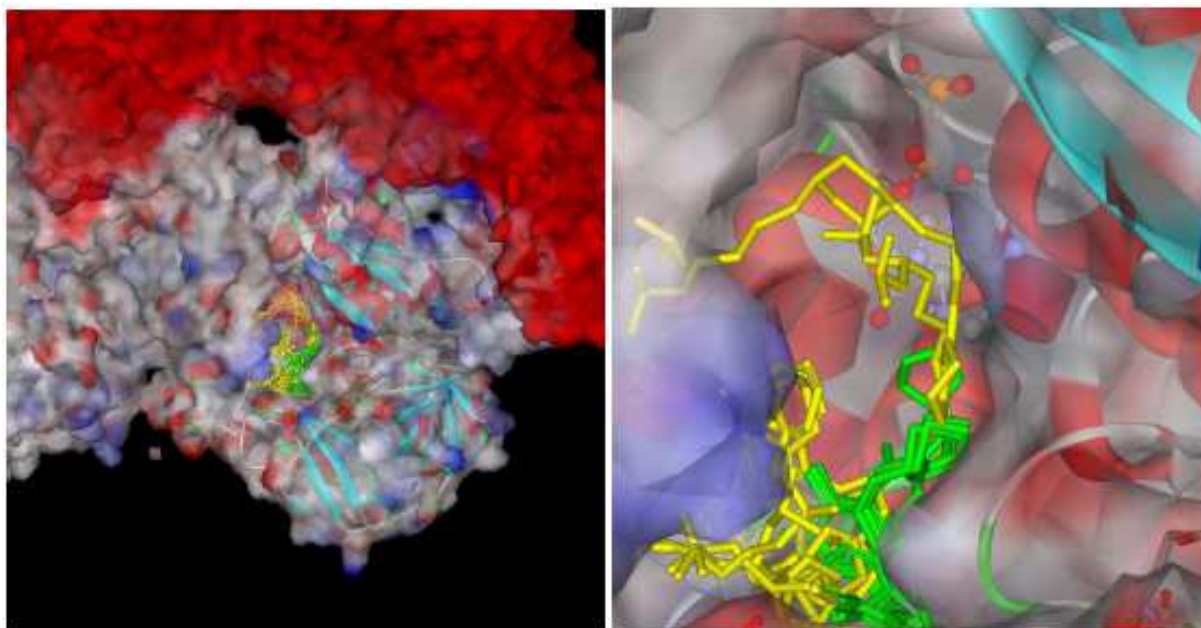
La structure de l'hexamère sans les domaines D2 (PDB 1S3S) a ainsi été utilisée pour identifier des sites de liaison potentiels dans la région critique N-D1, siège des mutations causatives des désordres neurodégénératifs.<sup>217</sup> Ceci a été réalisé en calculant la surface de Connolly, c'est-à-dire la surface de la protéine accessible à une molécule d'eau. A partir de celle-ci, trente sites de liaisons potentiels ont été mis en évidence, d'un volume allant de 800 à 3 000 Å<sup>3</sup>, suffisant pour accueillir un ligand. Les sites identifiés s'étendent soit entre la région N-terminale, la région charnière et le domaine D1, soit seulement sur la région charnière. Deux composés « lead » des familles MSBD et PMAD ont été utilisés (Figure 96).



**Figure 96. Composés utilisés pour l'étude structure-based.**

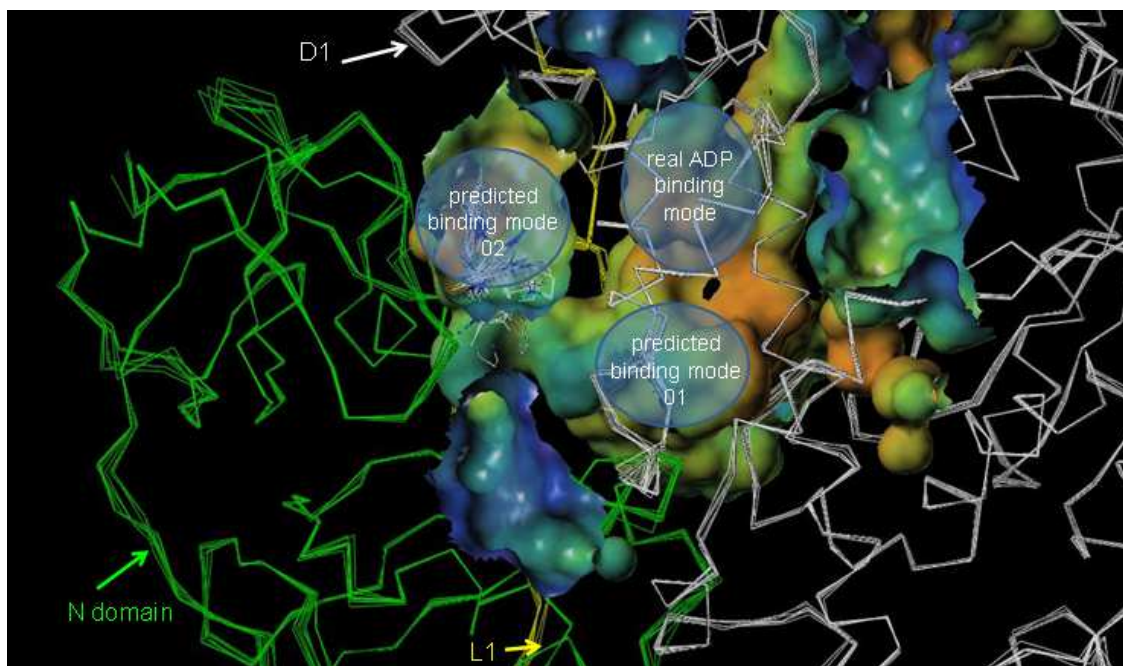
L'étude a montré que les deux ligands se fixeraient préférentiellement à l'entrée de la plus grande cavité au fond de laquelle se loge l'ATP/ADP (Figure 97).

<sup>258</sup> I. Dreveny *et al.*, *EMBO J.*, **2004**, 23, 1030-1039



**Figure 97. Sites de fixation potentiels des composés à l'entrée du site à ATP/ADP du domaine D1.**  
(jaune : MSBD, vert : PMAD)

Afin de préciser le mode de fixation de ces deux représentants chimiques, l'espace conformationnel du protomère N-D1 a été échantillonné par recuit simulé, une méthode de dynamique moléculaire qui vise à simuler des cycles courts de chauffage intensif de la protéine à 1 000 K suivis de courtes périodes de refroidissement à 300 K. Cette procédure permet de dépasser de hautes barrières énergétiques et d'identifier d'autres conformations de la protéine, notamment dans les régions variables (boucles). Deux modes de liaison potentiels ont été identifiés (Figure 98).



**Figure 98. Deux modes de liaison potentiels.**

Pour le mode de liaison 1 des interactions avec les acides aminés Asp121 et Glu162 du domaine N-terminal et Asp205 de la région charnière ont été mises en évidence (Figure 99).

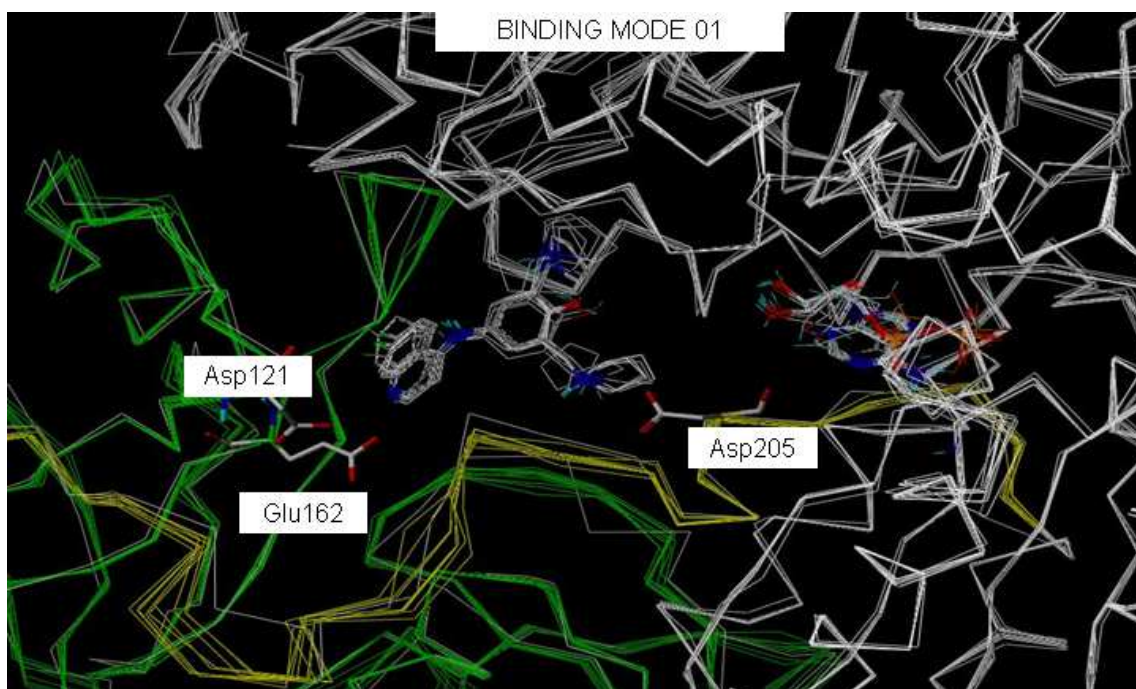


Figure 99. Mode de liaison 1.

En ce qui concerne le second mode de liaison, ce sont les interactions avec le Glu30 et le Glu34 du domaine *N*-terminal, l'Asp204 du domaine charnière et le Glu379 du domaine D1 qui ont été identifiées (Figure 100).

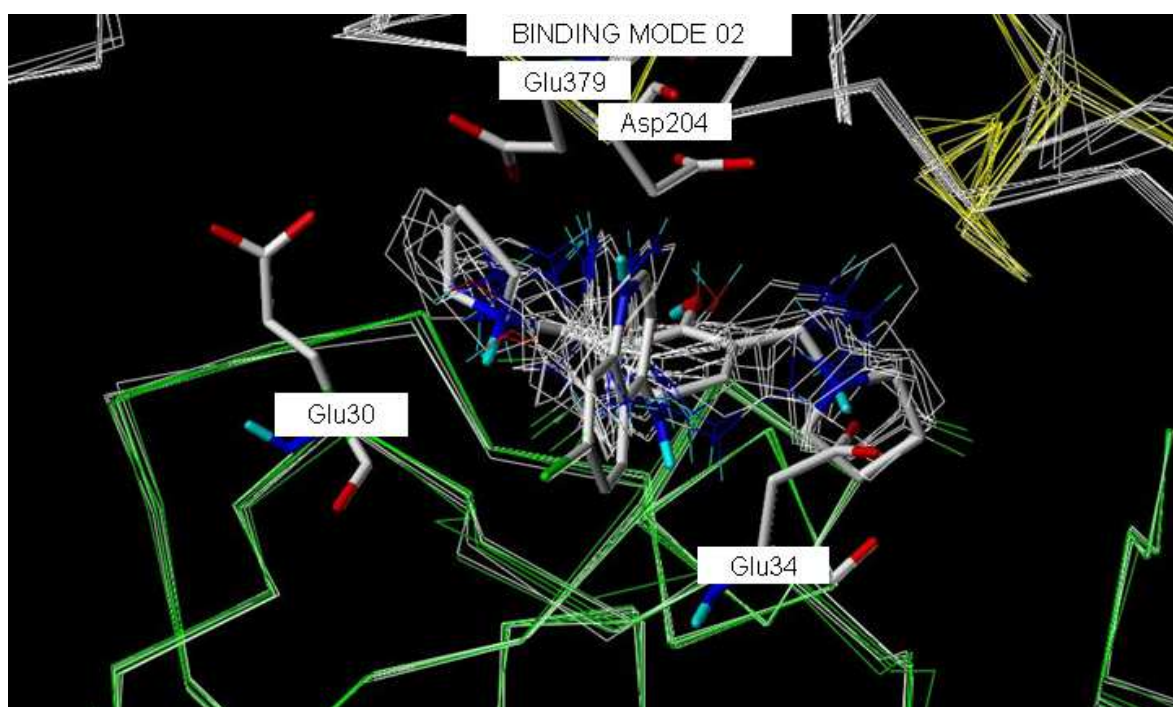


Figure 100. Mode de liaison 2.

A l'intersection de ces deux sites de liaison, au niveau de la région charnière, se trouvent deux résidus clés : l'Asp204 et l'Asp205.

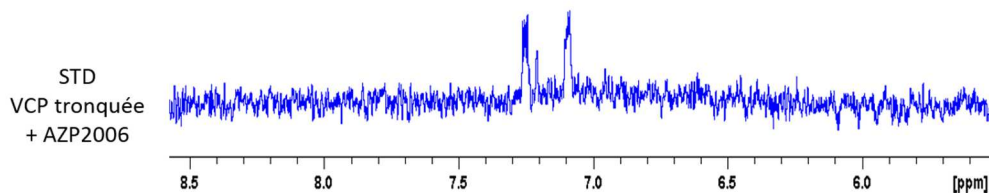
Un screening par SPR et RMN ainsi qu'un screening virtuel d'une librairie de fragments mené par le groupe de Chimenti a conduit à l'identification de trois sites de liaisons.<sup>259</sup> Deux sites situés sur le domaine

<sup>259</sup> M. S. Chimenti *et al.*, *J. Biomol. Screen.*, **2015**, 788-800



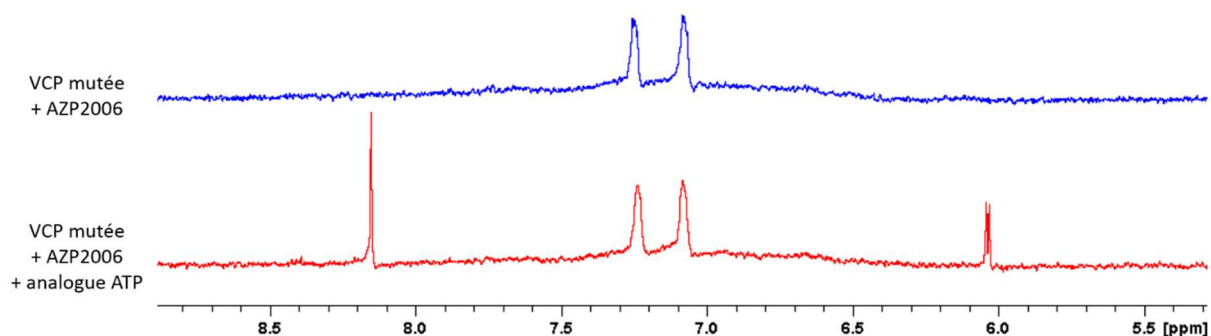
N-D1 correspondent aux deux sites identifiés par la techniques structure-based en utilisant les familles PMAD et MSBD développées au laboratoire. Le troisième site identifié par Chimenti se situe sur le domaine N de la protéine. Ce site pourrait éventuellement être un site d'arrimage de cofacteurs.

La protéine p97/VCP tronquée a été produite par le laboratoire du Dr. Nicolas Sergeant. Cette protéine est constituée des domaines N et D1 sans le domaine D2. Le spectre de RMN-STD (Figure 101) comporte les protons aromatiques de l'AZP2006, ce qui suggère que le composé interagit avec la protéine tronquée. Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse que l'AZP2006 se lie entre le domaine N et D1 de la protéine.



**Figure 101. Zoom de la partie aromatique du spectre STD de la protéine tronquée avec l'AZP2006.**  
(AZP2006 200  $\mu$ M, p97/VCP tronquée 5  $\mu$ M)

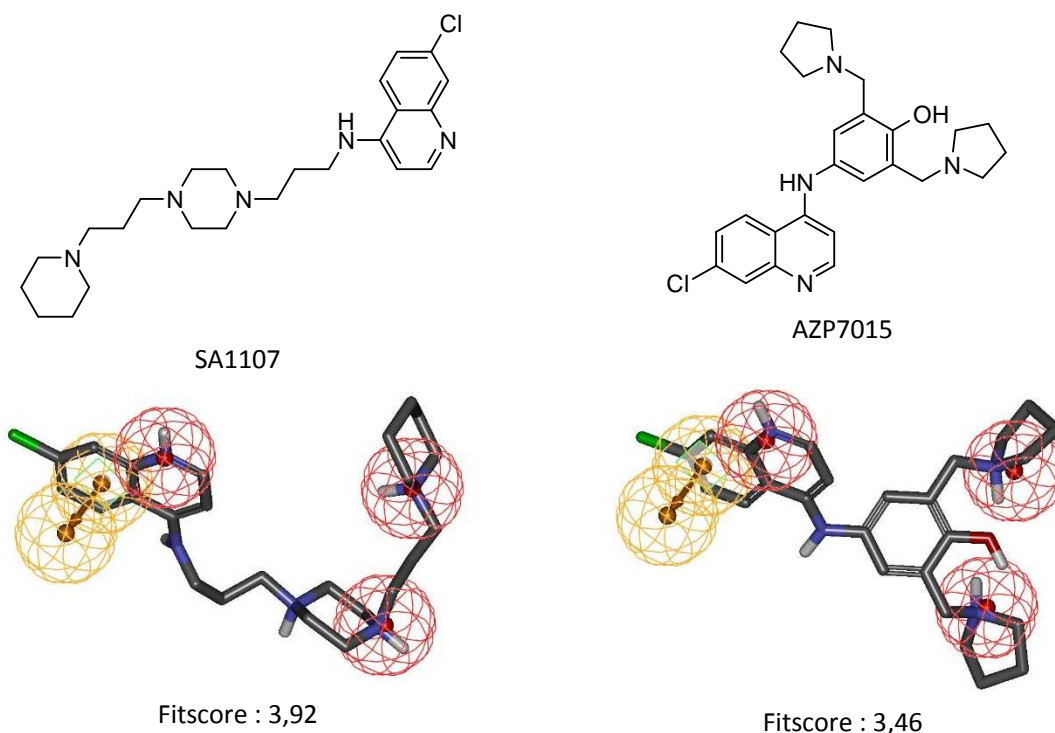
Une étude de mutagenèse dirigée sur les résidus d'acide aspartique identifiés a été également menée afin d'examiner l'influence des mutations sur l'affinité de l'AZP2006. La protéine a été produite et l'interaction AZP2006-p97/VCP mutée a été évaluée par RMN-STD. Les signaux aromatiques de l'AZP2006 sont présents sur le spectre, ce qui suggère que l'AZP2006 interagit toujours avec p97/VCP malgré les deux mutations (Figure 102). De plus, après ajout de l'analogue de l'ATP non hydrolysable, les pics de l'AZP2006 sont présents ainsi que les pics de l'analogue de l'ATP. Ceci suggère que les mutations ne modifient pas la liaison de l'ATP. Ces résultats suggèrent que les deux acides aminés Asp204 et Asp205 ne sont pas impliqués dans la liaison de l'AZP2006 à p97/VCP, ou en absence de ces deux acides aminés, la molécule continue à se lier car il existe un cluster d'acides aminés acides dans la zone d'interaction.



**Figure 102. Zoom de la partie aromatique du spectre de RMN-STD de p97/VCP mutée avec l'AZP2006**  
(bleu sans analogue de l'ATP, rouge avec analogue de l'ATP, AZP2006 200  $\mu$ M, p97/VCP mutée 5  $\mu$ M, ATP 2 nM).

## 2. Ligand-based (collab. Pr P. Chavatte)

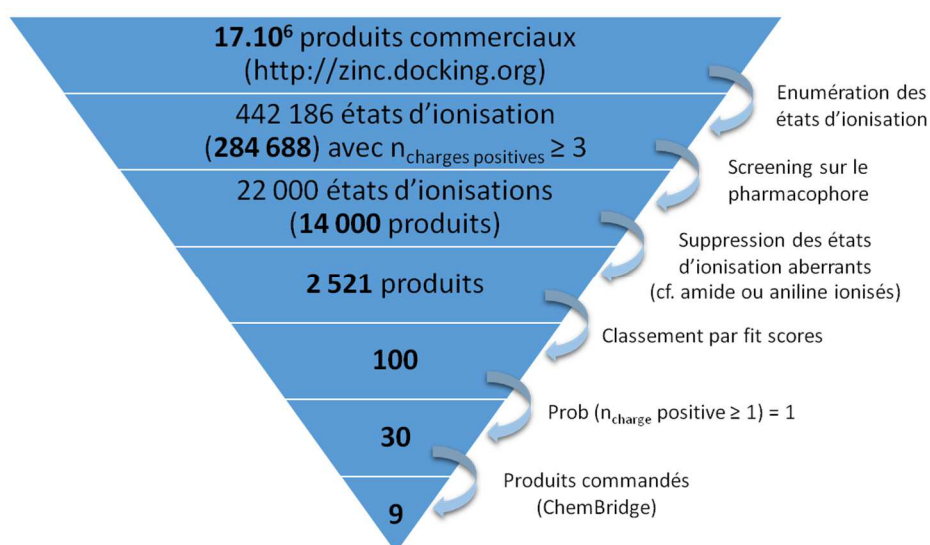
La stratégie, dite « ligand-based » a été menée sur la seule information structurale des deux séries de ligands potentiellement actifs sur p97/VCP (MSBD et PMAD). A partir du meilleur représentant *in vitro* de chacune des deux familles de composés (SA1107 et AZP7015) (Figure 103), un pharmacophore commun a pu être identifié. Ce dernier est constitué de quatre éléments pharmacophoriques : trois positions basiques protonables (en rouge) et un aromatique (en orange). Deux positions ionisables sont séparées par un linker de l'aromatique, la troisième position ionisable étant portée par ce dernier.



**Figure 103. Structures des composés SA1107, AZP7015 et du pharmacophore commun.**

Pour valider le pharmacophore, sept autres composés représentatifs des deux familles, ayant montré une activité cellulaire ou non, ont été testés sur ce dernier. Aucun faux négatif n'a été obtenu et seulement un faux positif sûrement dû à de très fortes similarités structurales entre les composés. De plus, les « fitscores » (score de superposition sur les éléments pharmacophoriques, pouvant aller jusqu'à la valeur maximale de 4, correspondant au nombre de contraintes pharmacophoriques) élevés allant de 3,46 à 3,99 ont été obtenus.

Une fois validé, le pharmacophore a été utilisé pour le criblage de bases de produits commerciaux selon le processus décrit Figure 104.



**Figure 104. Procédé de screening virtuel d'une base de données de produits commerciaux.**

La principale difficulté de cette campagne de criblage reposait principalement sur l'état d'ionisation des molécules puisque le pharmacophore comprend trois centres basiques. Dans l'optique de se donner le maximum de chances de cribler une touche potentielle, tous les états d'ionisation ont été énumérés de

façon systématique pour chaque molécule. 446 186 états d'ionisation ont été sélectionnés pour présenter au minimum trois centres basiques, un critère essentiel pour satisfaire les contraintes pharmacophoriques. C'est seulement après la requête pharmacophorique que les 22 000 états d'ionisation ont été épurés en éliminant tous ceux qui n'existent pas à  $\text{pH} = 7 \pm 2$  (amides ou anilines par exemple). Sur les 2 521 composés retenus, neuf composés ont alors été sélectionnés et commandés (Figure 105) sur des critères de diversité structurale, « fitscore », existence d'analogues structuraux et disponibilité chez un fournisseur unique.

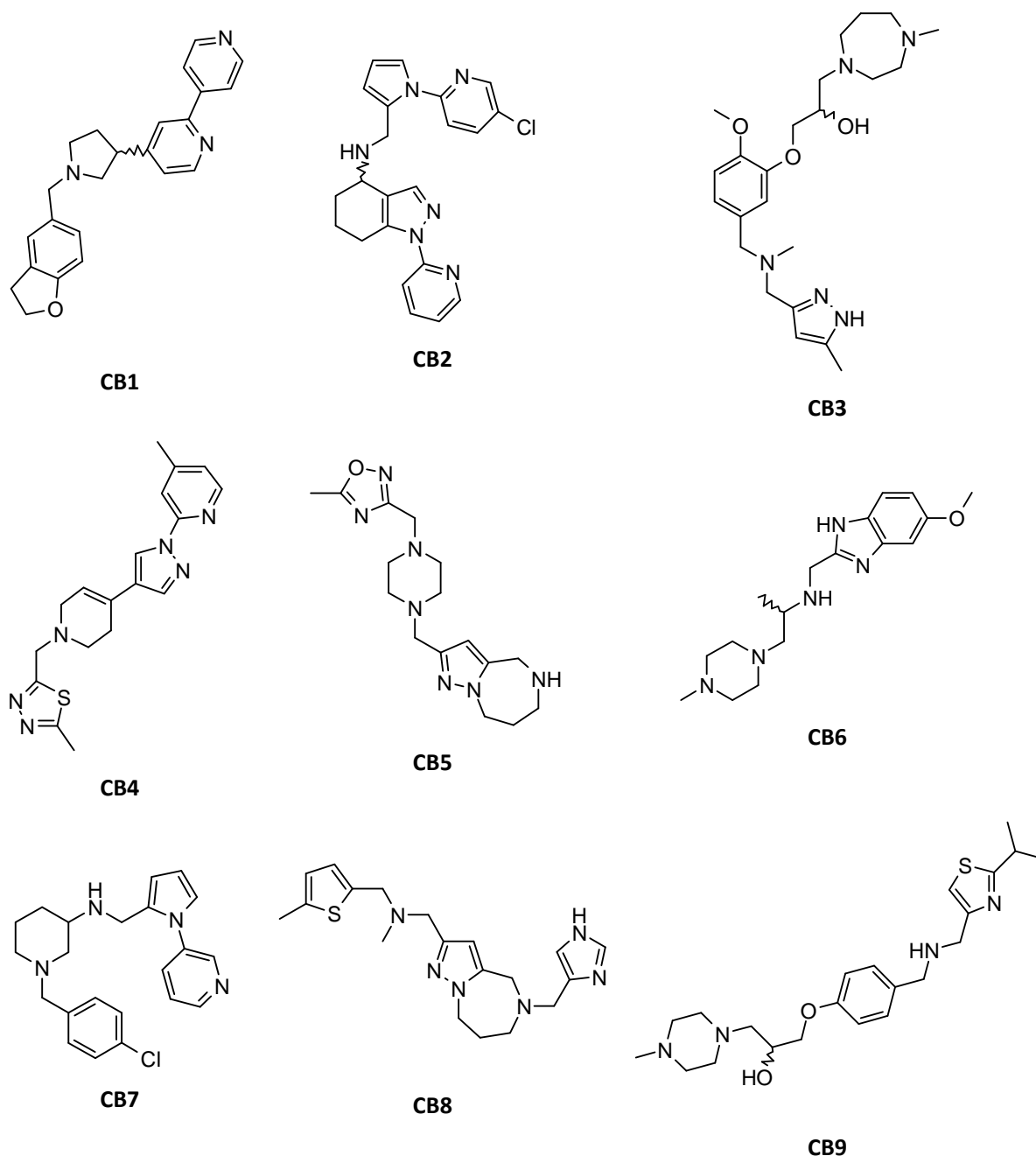


Figure 105. Structure des neuf composés commandés (ChemBridge).

### B. Validation du modèle pharmacophorique – Tests *in vitro*

Suite à un problème de commande, le composé CB3 n'a pas pu être testé.

La validation du pharmacophore a été réalisée par des tests *in vitro* des huit composés ChemBridge reçus. Dans un premier temps, un test d'affinité pour p97/VCP par le test à plaques de nickel a permis de

quantifier leur taux d'interaction pour la protéine. Par la suite, un test cellulaire a montré leurs effets sur le taux de sécrétion des peptides  $A\beta_{38}$ ,  $A\beta_{40}$  et  $A\beta_{42}$ . Finalement, un composé a été testé en RMN-STD.

### 1. Affinité pour p97/VCP (AlzProtect)

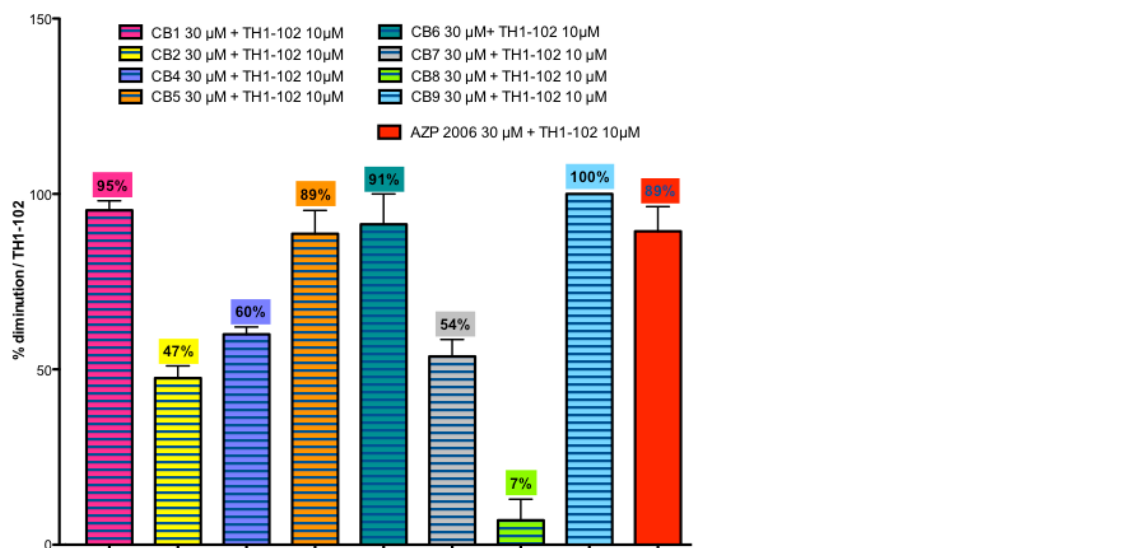


Figure 106. Pourcentage de diminution du signal par rapport à TH1-102.

Selon le test d'affinité utilisant les plaques de nickel, la Figure 106 ci-dessus représente la diminution de fluorescence induite par les composés testés. Il peut être constaté que les composés **CB1**, **CB5**, **CB6** et **CB9** diminuant respectivement la fluorescence de 95, 89, 91 et 100 % réalisent une compétition quasi-totale à totale avec la sonde. Les composés **CB2**, **CB4** et **CB7** dont le pourcentage de diminution du signal est de 47, 60 et 54 % réalisent une compétition partielle. Finalement, le composé **CB8** n'engendrant qu'une diminution de 7 % de la fluorescence entre faiblement en compétition avec la sonde **TH1-102**. Ce test préliminaire doit être reproduit et l'effet de la dose déterminé.

### 2. Tests cellulaires (Dr. N. Sergeant)

Ces composés ont ensuite été testés sur un modèle cellulaire SY5Y-APPwt sur-exprimant d'une manière stable l'APP<sub>695</sub> humain. Les cellules ont été incubées avec le composé à tester à différentes concentrations. Le surnageant a été prélevé, puis la quantification des fragments  $A\beta_{38}$ ,  $A\beta_{40}$  et  $A\beta_{42}$  a été réalisée par un test Elisa.

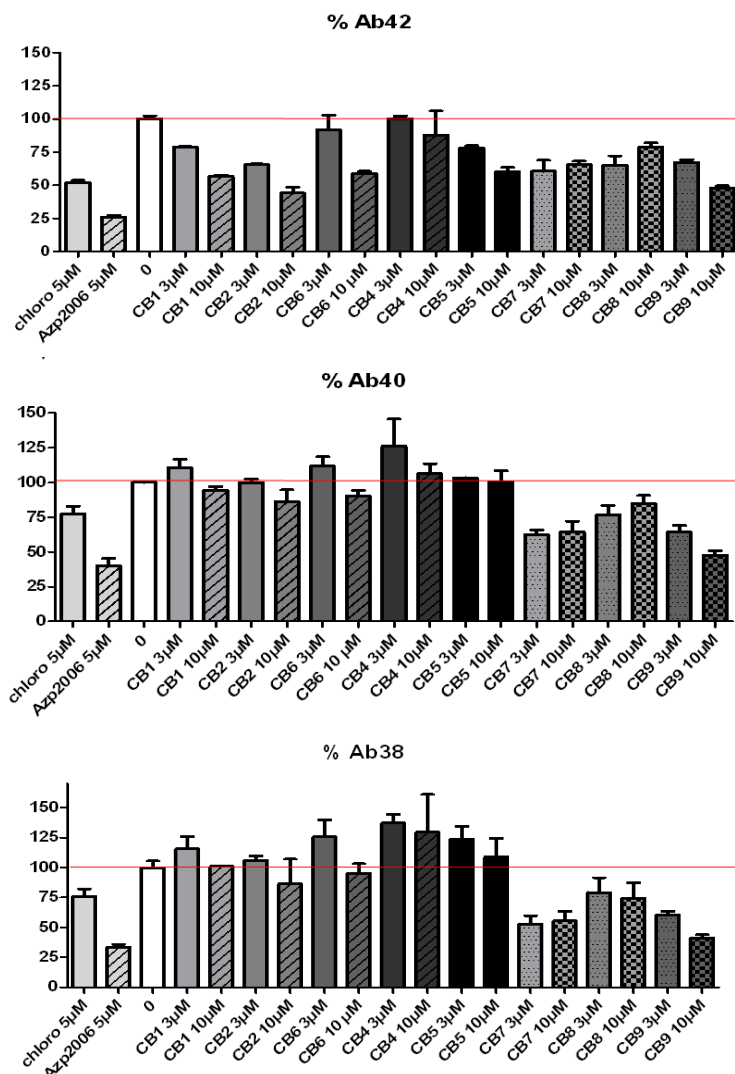


Figure 107. Influence des composés sur la sécrétion des peptides Aβ<sub>38</sub>, Aβ<sub>40</sub> et Aβ<sub>42</sub>.

L'effet des composés commandés sur le taux de sécrétion des peptides Aβ<sub>38</sub>, Aβ<sub>40</sub> et Aβ<sub>42</sub> à partir de l'APP a pu être évalué (Figure 107). Tous les composés ont montré un effet sur la diminution de la sécrétion du peptide Aβ<sub>42</sub>. Cependant, **CB2** et **CB9** se sont avérés les plus efficaces en provoquant une diminution de 60 % du taux d'Aβ<sub>42</sub> (à une concentration de 10 μM). En comparaison, les taux de diminution de ce même peptide obtenus avec la chloroquine et l'AZP2006 sont respectivement de 50 et 75 % (à une concentration de 5 μM). Concernant les peptides Aβ<sub>38</sub> et Aβ<sub>40</sub>, **CB7**, **CB8** et **CB9** conduisent à une diminution de leur sécrétion tandis que les composés **CB1**, **CB2**, **CB4**, **CB5**, **CB6** ne modifient pas ou même augmentent légèrement leur sécrétion (à des concentrations de 3 et 10 μM). A titre de comparaison, la chloroquine et l'AZP2006 diminuent la sécrétion d'Aβ<sub>38</sub> et Aβ<sub>40</sub> de 25 et 70 % (à une concentration de 5 μM). Au vu des résultats obtenus, les composés intéressants à retenir sont **CB1**, **CB2**, **CB5** et **CB6**.

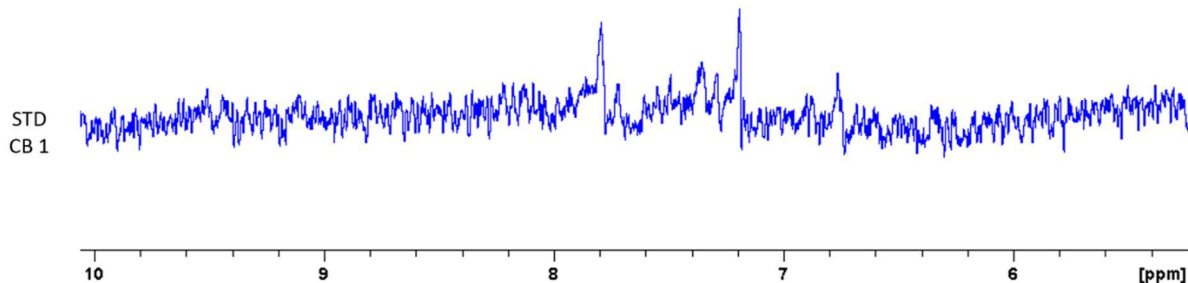
En couplant les résultats des deux tests, les composés qui s'avèrent les plus intéressants sont **CB1**, **CB5** et **CB6**. L'achat d'analogues structuraux du composé **CB1** pour réaliser de nouveaux tests *in vitro* a été réalisé et les tests sont en cours de réalisation. Des analogues de **CB5** et **CB6** n'étant pas disponibles commercialement, leur synthèse est en perspective.

### 3. Etude de l'interaction CB1-p97/VCP par RMN-STD

L'analyse de RMN-STD du composé **CB1** semble montrer que le composé interagit avec p97/VCP. En effet, les signaux aromatiques du composé sont visibles sur le spectre (Figure 108). Cependant, le



composé étant en solution dans le DMSO, la présence de ce solvant non deutéré conduit à une faible intensité des signaux correspondant au composé. Si par la suite il n'est pas possible d'avoir les composés dissout dans du DMSO deutéré, une double saturation du pic d'eau et de DMSO peut être envisagée.

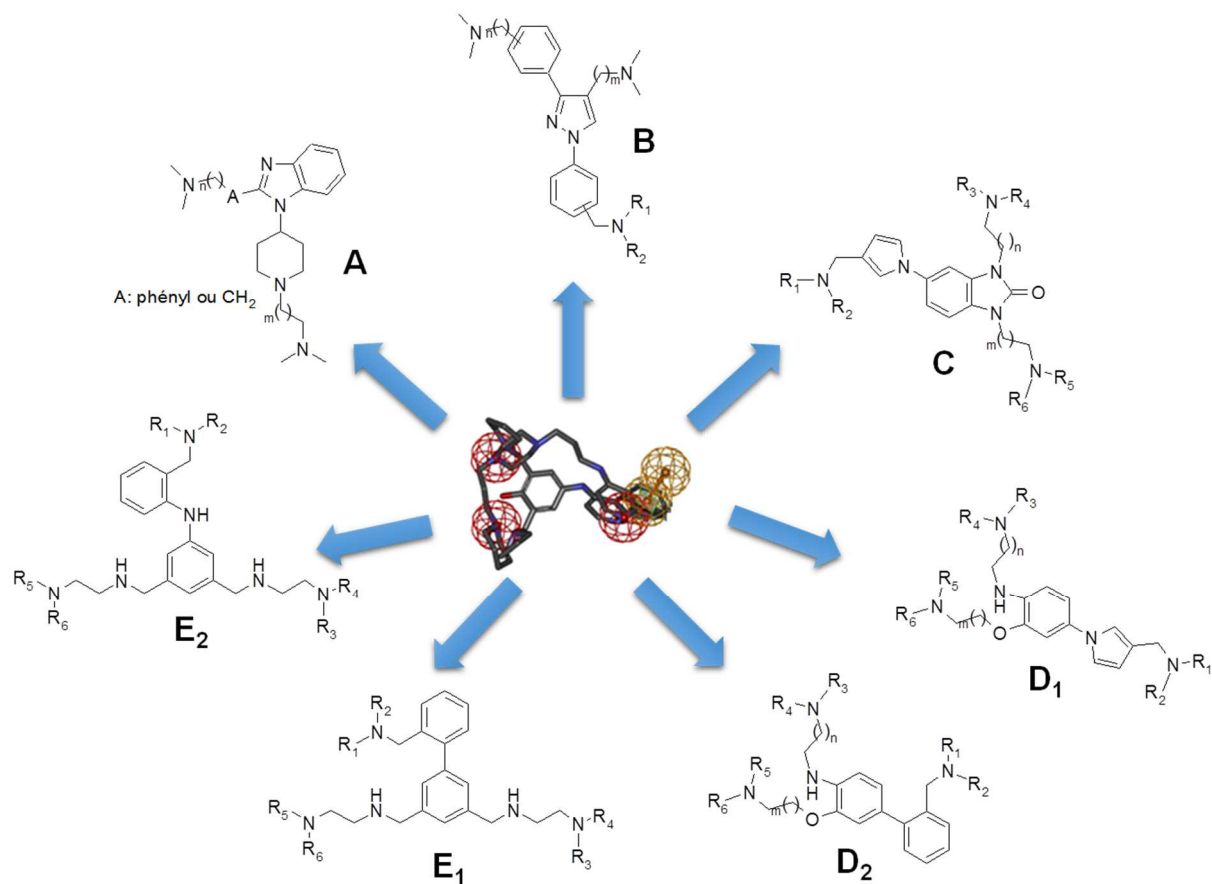


**Figure 108. Zoom de la partie aromatique du spectre de RMN-STD du composé CB1.**  
(CB1 200  $\mu$ M, p97/VCP 5  $\mu$ M)

L'évaluation en RMN-STD des autres composés ChemBridge est en cours de réalisation.

### C. Synthèse de ligands

Grâce à la validation du pharmacophore par les tests *in vitro*, diverses familles de modulateurs de p97/VCP ont été conçues (Figure 109).



**Figure 109. Sept familles identifiées.**

Les familles **A**, **B** et **C** ont été développées par un post-doctorant du laboratoire. Les travaux de cette thèse portent sur les familles **D1**, **D2**, **E1** et **E2**.

## 1. Synthèse de la famille D<sub>1</sub>

La structure de D<sub>1</sub> peut être simplifiée, en représentant les trois amines tertiaires par un groupement R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> comme représenté sur la Figure 110. Les longueurs de chaînes n et m correspondent à un nombre de carbones entre un et deux et les groupements R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> aux amines tertiaires de type : diméthylamine, pipéridine, morpholine ou N-méthylpipérazine.

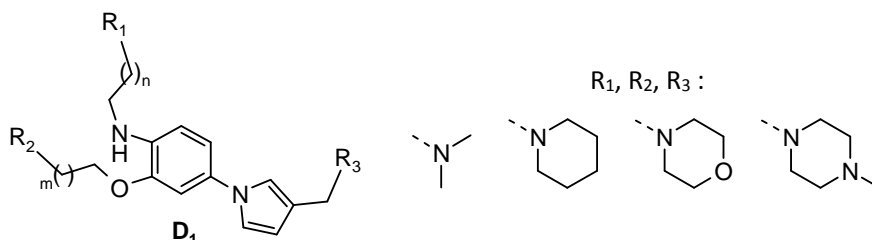


Figure 110. Structure générale de la famille envisagée et modulations.

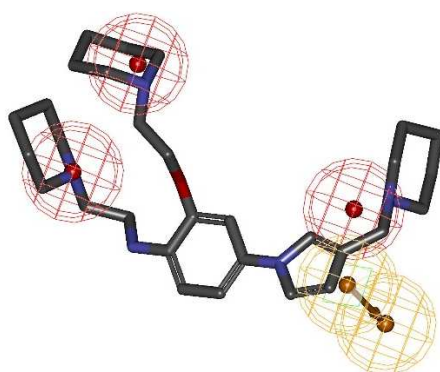


Figure 111. Superposition d'un représentant de la famille D<sub>1</sub> (37) avec le pharmacophore (R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = pipéridine et n = m = 1).

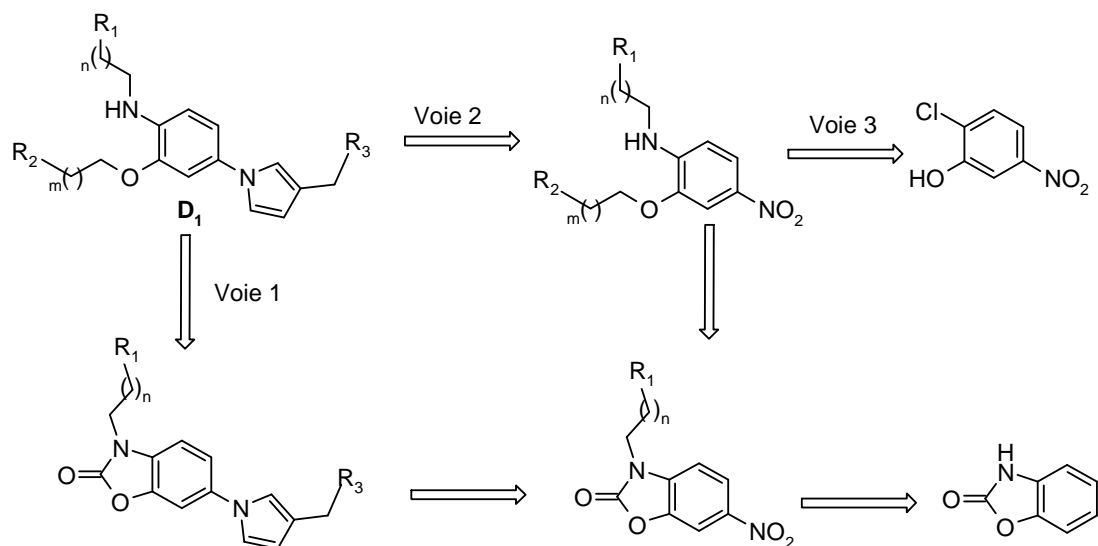
### • Etude rétrosynthétique

Selon la voie de synthèse 1 (Schéma 4), la chaîne aminée R<sub>2</sub> est introduite en dernière étape suite à l'ouverture de la 1,3-benzoxazol-2-one comme décrit Schéma 4. La seconde chaîne aminée est introduite lors d'une amination réductrice sur le formyle pyrrole. Ce dernier est obtenu suite à la réduction du groupement nitro. Le premier groupement aminé R<sub>1</sub> est introduit au début sur l'atome d'azote de la 6-nitro-3H-1,3-benzoxazol-2-one.

Une seconde voie de synthèse permet de réaliser l'ouverture de la 1,3-benzoxazol-2-one dans les premières étapes de la synthèse. La formation du pyrrole et l'amination réductrice permettent d'introduire le groupement R<sub>3</sub> en fin de synthèse.

Une troisième voie de synthèse permet de s'affranchir de la 3H-1,3-benzoxazol-2-one et conduit à un intermédiaire commun avec la voie 2. Les trois voies de synthèse s'avèrent complémentaires car la voie 1 permet une modulation aisée du groupement R<sub>2</sub>. Les voies 2 et 3 permettent une modulation facile du groupement R<sub>3</sub>.

Cette stratégie de synthèse est basée sur l'expérience du laboratoire dans la chimie des 3H-1,3-benzoxazol-2-one. L'utilisation de cet hétérocycle permet une protection de la fonction alcool lors de la fonctionnalisation de l'azote et une orientation en position 6 du groupement nitro.


 Schéma 4. Rétrosynthèse de la famille D<sub>1</sub>.

### • Etude de la voie 1

La synthèse a été mise au point pour le composé possédant une chaîne diméthylamine pour les groupements R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> et avec n = m = 1. Cette synthèse est réalisée en sept étapes (Schéma 5). Elle commence par une nitration régiosélective en position 6 de la 3H-1,3-benzoxazol-2-one dans l'acide nitrique à 70 %. Le composé **25** obtenu est utilisé pour une substitution nucléophile avec la 2-chloro-N,N-diméthyléthylamine pour obtenir le composé **26**. La réduction du groupement nitro se fait en présence d'hydrogène et de Pd/C 10 %.

Le dérivé aminé **27** permet la construction du cycle pyrrole selon la réaction de Clauson-Kaas pour obtenir le composé **28**. Cette méthode permet la formation de l'hétérocycle à partir du 2,5-diméthoxy-3-tétrahydrofurancarboxaldéhyde dans l'acide acétique.<sup>260, 261, 262</sup>

<sup>260</sup> G. Sbardella *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 1537–1541

<sup>261</sup> Z. Wang, Clauson-Kaas Reaction. In *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, **2010**

<sup>262</sup> N. Clauson-Kaas *et al.*, *Acta Chem. Scand.*, **1952**, 6, 867-874

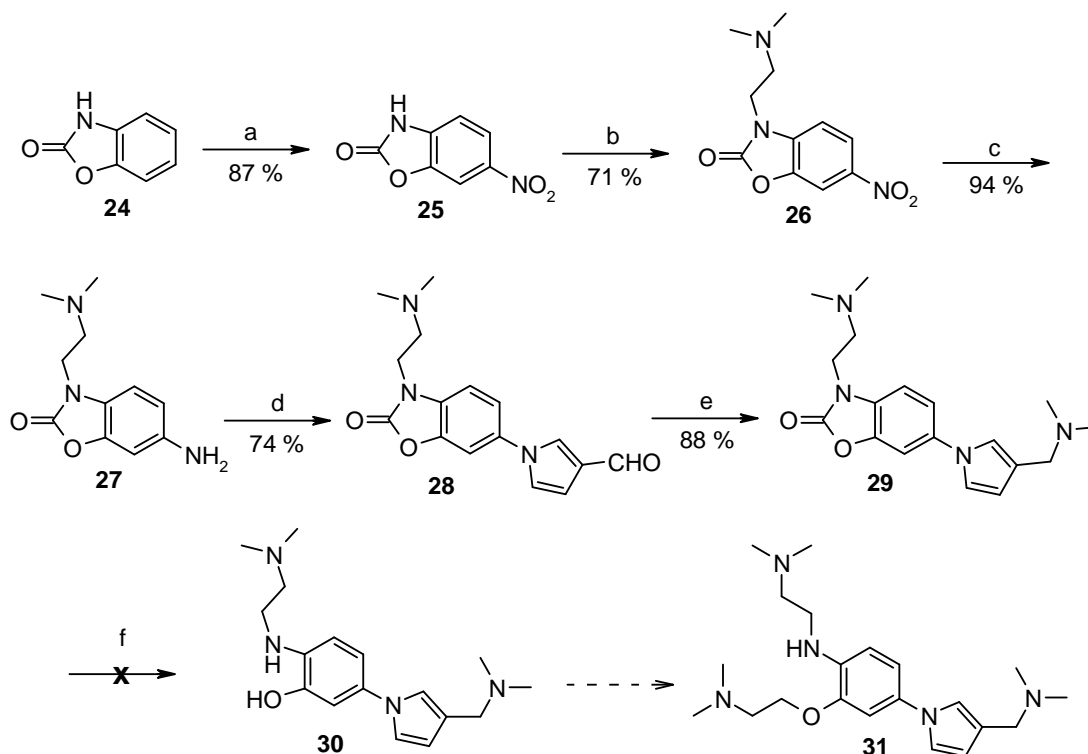
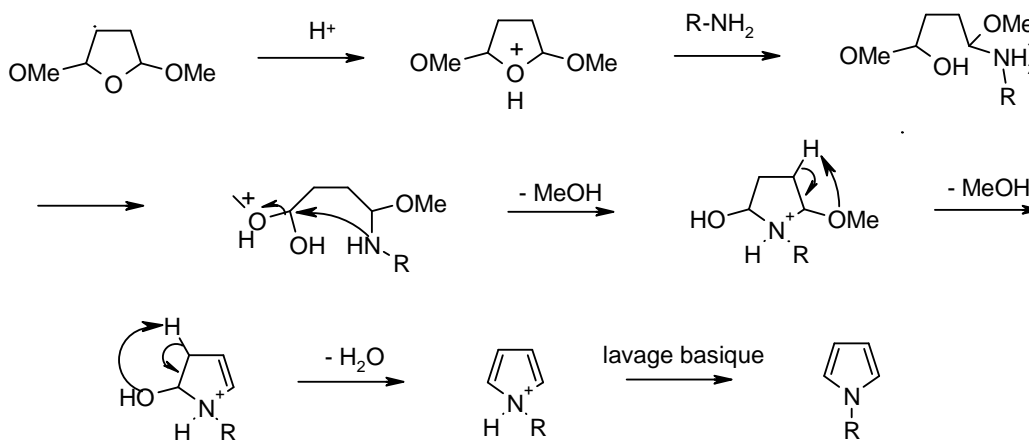


Schéma 5. Synthèse du composé 31.

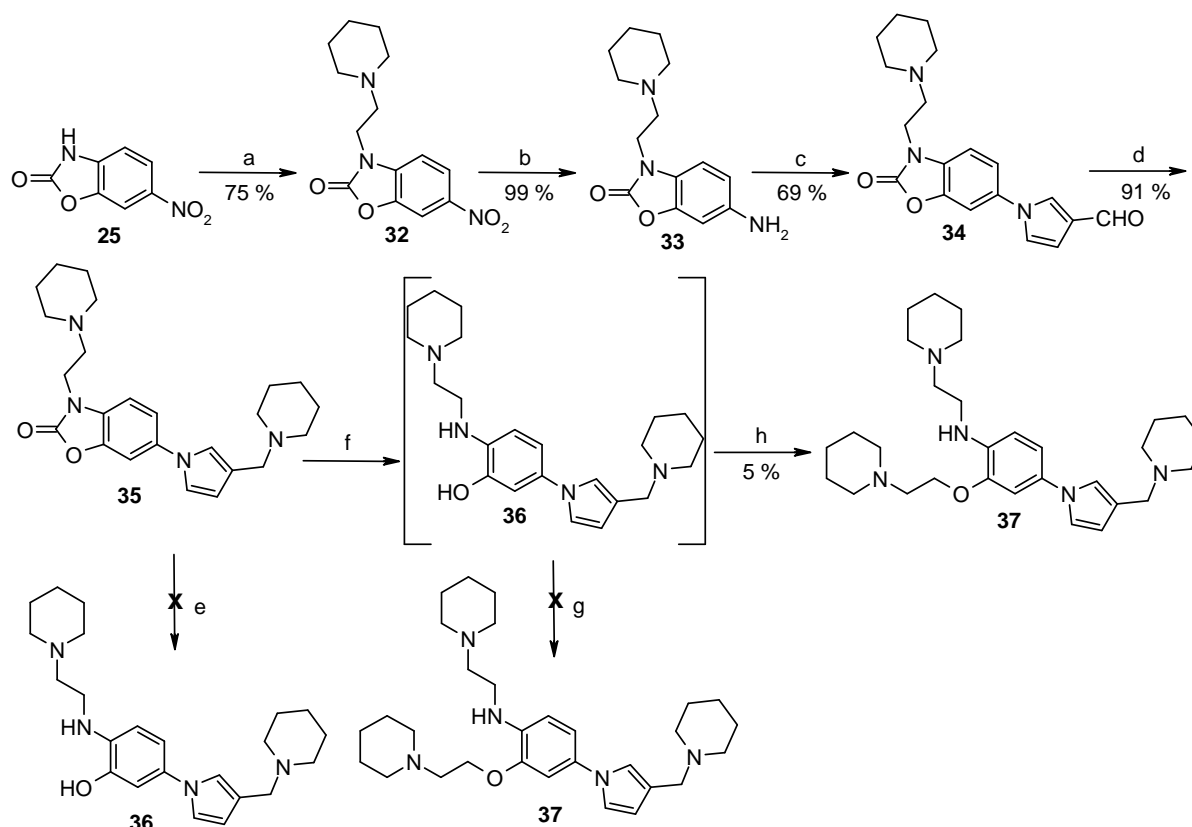
Le mécanisme de cette réaction (Schéma 6) se déroule en sept étapes. Dans un premier temps, la protonation de l'oxygène du tétrahydrofurane induit l'attaque de l'amine secondaire sur un des atomes de carbone tertiaire, entraînant l'ouverture de l'hétérocycle. L'attaque de l'éther hémiaminal formée à l'étape précédente conjointe à l'élimination d'une molécule de méthanol conduit à la fermeture du cycle azoté. L'élimination d'une seconde molécule de méthanol et d'une molécule d'eau, puis un lavage basique conduisent à l'obtention du pyrrole *N*-substitué.


 Schéma 6. Mécanisme de la réaction de Clauson-Kaas.<sup>261</sup>

Une amination réductrice avec la diméthylamine dans le dichloroéthane permet d'obtenir le composé **29**.<sup>263</sup>

L'avant-dernière étape de cette synthèse est l'ouverture de la 1,3-benzoxazol-2-one avec de la soude dans le méthanol pour former l'aminophénol souhaité. Bien que cette réaction soit bien connue au laboratoire et qu'elle soit largement décrite dans la littérature, elle s'est avérée être l'étape limitante de cette synthèse. Lors de l'étape d'ouverture, il a été constaté une dégradation totale du composé **29**.

La synthèse a été reprise en remplaçant la diméthylamine par la pipéridine, dans le but d'obtenir un composé plus stable, moins favorable à une élimination de l'amine, pour réaliser l'étape d'ouverture (Schéma 7). Les conditions de réaction sont identiques à la synthèse précédente jusqu'au composé **35**, avec des rendements similaires.

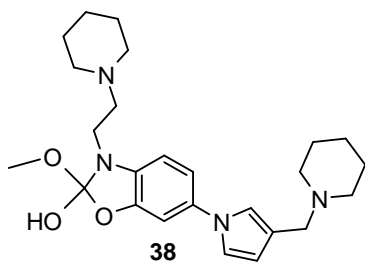


Réactifs et conditions : (a) 1-(2-chloroéthyl)pipéridine.HCl (1,5 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,0 éq.), ACN, reflux, 3 h 30 ; (b) H<sub>2</sub>, Pd/C 10 %, DCM, 20°C, 6 h ; (c) 2,5-diméthoxy-3-tétrahydrofurancarboxaldéhyde (1,2 éq.), AcOH, 90°C, 1 h ; (d) pipéridine.HCl (1,5 éq.), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (2,0 éq.), AcOH (1,5 éq.), DCE, 20°C, 22 h ; (e) NaOH 6 M (6 éq.), H<sub>2</sub>O, MeOH, 80°C, 18 h ; (f) NaOH 6 M (6,0 éq.), H<sub>2</sub>O, dioxane, 80°C, 2 h ; (g) 1-(2-chloroéthyl)pipéridine.HCl (1,1 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4 éq.), DMF, 20°C, 18 h ; (h) 1-(2-chloroéthyl)pipéridine.HCl (1,2 éq.), NaH (2,5 éq.), THF, 20°C, 5 h.

Schéma 7. Synthèse de **37**.

Les premiers essais d'ouverture réalisés dans l'eau et le méthanol montraient des résultats peu reproductibles et le produit est obtenu avec de très faibles rendements. Une tache apparue en CCM lors de la réaction a particulièrement attiré l'attention. Cette dernière ne correspondait ni au produit de départ, ni au produit final. Après analyse LC-MS, il a été montré que la masse pouvait correspondre au produit de l'addition du méthanol sur la fonction carbonyle de la 1,3-benzoxazol-2-one (**38**) (Figure 112).

<sup>263</sup> A. F. Abdel-Magid *et al.*, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 3849-3862



**Figure 112. Structure envisagée du produit secondaire.**

De plus, une RMN du proton et un COSY du brut réactionnel ont apporté une nouvelle confirmation de cette hypothèse. En comparant le spectre du produit de départ (**35**) et du produit (**38**), un signal correspondant à un méthyle apparaît à 3,62 ppm. De plus, les protons des CH<sub>2</sub> de la chaîne aminée, initialement équivalents, ne le sont plus dans ce produit. Ainsi, trois signaux intégrant pour un proton sont visibles à 3,80, 3,06 et 4,47 ppm. Le quatrième proton se trouve dans un massif entre 2,31 et 2,65 ppm.

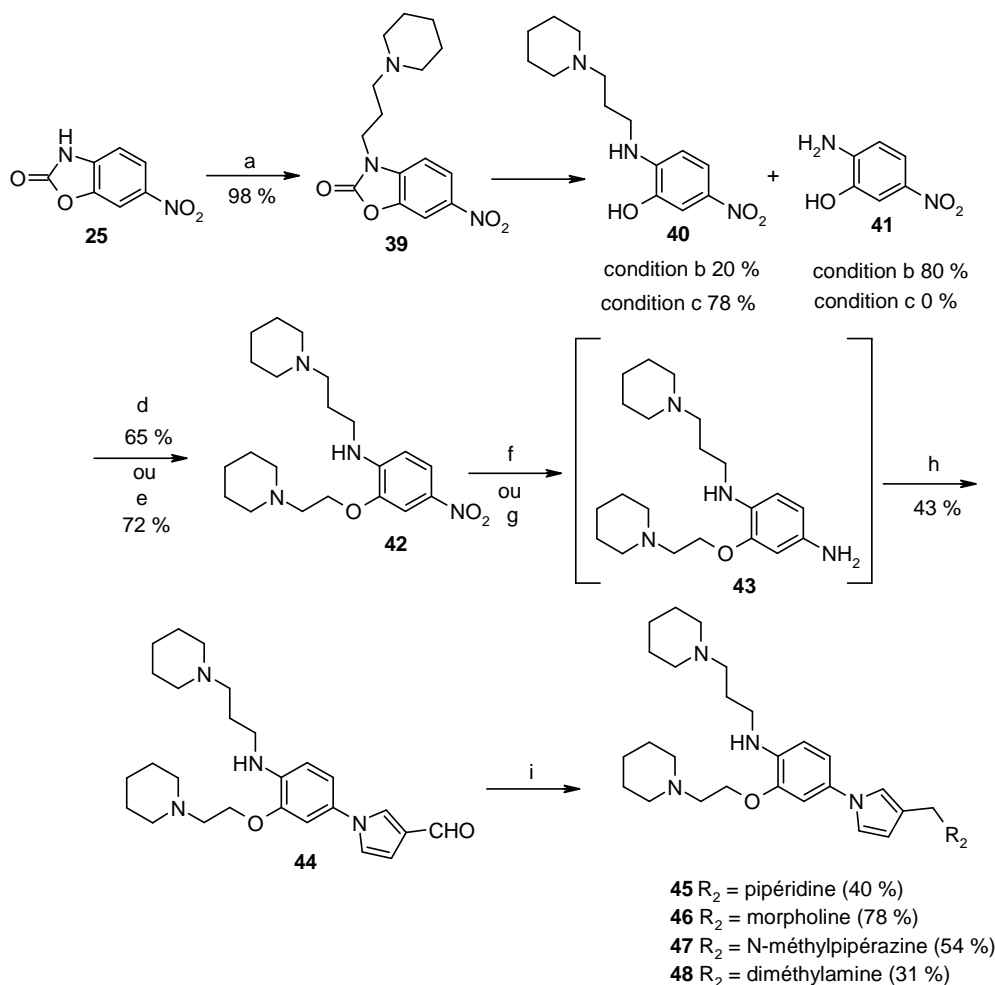
Il a été décidé de ne plus utiliser de méthanol, mais du dioxane pour éviter la formation de ce produit secondaire. Avec ce solvant, la tâche correspondante au produit secondaire ne se forme plus, ce qui a conforté l'hypothèse émise.

L'ouverture de la 1,3-benzoxazol-2-one avec un mélange eau/dioxane semble efficace au vu des CCM de suivi de réaction et des LC-MS. En deux heures, le réactif de départ réagit entièrement pour former le produit d'ouverture. Cependant, il a été observé que ce produit se dégrade facilement lors du traitement. Le traitement classique décrit consiste à acidifier le milieu réactionnel jusqu'à pH = 1 avec une solution de HCl 3 M, puis de remonter à un pH = 7-8 avec une solution de NaHCO<sub>3</sub> saturée. Ainsi, le produit se dégrade en milieu acide, probablement à cause de l'instabilité du pyrrole à ce pH. Il a donc été choisi de neutraliser la solution par ajout au goutte à goutte de la solution de HCl jusqu'à pH = 7, le produit **36** précipite partiellement. Il est alors rapidement extrait de la phase aqueuse à l'acétate d'éthyle pour limiter sa dégradation. Des tentatives de purification du produit ont été réalisées mais ce dernier se dégrade sur colonne de silice. De ce fait, le brut est utilisé directement pour l'étape finale de la synthèse. Des essais de substitution du phénol avec K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans le diméthylformamide ne se sont pas avérés concluants, le produit de départ se dégradant. Ainsi la substitution du phénol en présence de NaH dans le tétrahydrofurane et la 1-(2-chloroéthyl)pipéridine a permis l'obtention de **37** avec un rendement de 5 %.

Pour pallier aux nombreux problèmes rencontrés lors de l'ouverture de la 1,3-benzoxazol-2-one, les deux autres voies de synthèse alternative ont été étudiées.

- **Etude de la voie 2**

Selon la voie 2 (Schéma 8), l'ouverture de la 1,3-benzoxazol-2-one se fait directement sur le composé **39**. La chaîne éthyle portée par l'azote de la 1,3-benzoxazol-2-one a également été remplacée par une chaîne propyle, dans le but d'augmenter la stabilité des composés.



Réactifs et conditions : (a) 1-(3-chloropropyl)pipéridine.HCl (1,2 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,0 éq.), ACN, reflux, 5 h ; (b) NaOH 6 M (6,0 éq.), H<sub>2</sub>O, dioxane, 80°C, 2 h ; (c) NaOH 2,5 M (20,0 éq.), H<sub>2</sub>O, dioxane, 20°C, 2 j ; (d) 1-pipéridineéthanol (1,5 éq.), PPh<sub>3</sub> (2,0 éq.), DEAD (2,0 éq.), THF, 20°C, 20 h ; (e) 1-(2-chloroéthyl)pipéridine.HCl (1,2 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 éq.), ACN, 60°C, 5 h ; (f) H<sub>2</sub>, Pd/C 10 %, MeOH, 20°C, 6 h ; (g) formiate d'ammonium (7 éq.), Pd/C 10 %, MeOH, 40°C, 30 min ; (h) 2,5-diméthoxy-3-tétrahydrofurancarboxaldéhyde (1,2 éq.), AcOH, 90°C, 2 h ; (i) amine (2,0 éq.), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (2,0 éq.), AcOH (1,5 éq.), DCE, 20°C, 18-21 h.

**Schéma 8. Voie de synthèse alternative 1.**

L'ouverture de la 1,3-benzoxazol-2-one a tout d'abord été réalisée à 80°C (conditions b), dans les mêmes conditions utilisées dans le Schéma 7. Le produit **40** est obtenu avec un rendement de 20 %. Une élimination de la propylpipéridine conduisant au composé **41** est observée avec un rendement de 80 %. Ce produit secondaire a été caractérisé par LC-MS et RMN mais sa formation reste inexplicée. La réaction réalisée à 20°C permet d'aboutir facilement au composé **40** avec un rendement de 78 % (conditions c).

Après ouverture de la 1,3-benzoxazol-2-one, une réaction de Mitsunobu permet de fonctionnaliser le phénol et d'obtenir le composé **42**.<sup>264</sup> Cette substitution nucléophile sur un alcool décrite pour la première fois en 1967 par Oyo Mitsunobu nécessite comme réactifs l'azodicarboxylate de diéthyle (DEAD) et la triphénylphosphine (Schéma 9). Dans un premier temps, la triphénylphosphine combinée au DEAD génère un intermédiaire phosphonium. Ce dernier forme une liaison avec l'oxygène de l'alcool créant ainsi

<sup>264</sup> S. Denoyelle et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, 22, 402-409

un bon groupe partant. La substitution par le phénol (ou d'autres nucléophiles) est l'étape finale de ce mécanisme.<sup>265, 266, 267</sup>

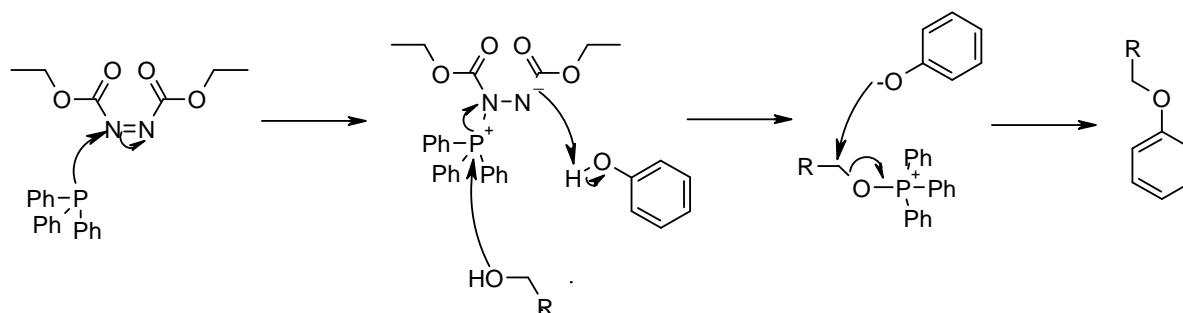


Schéma 9. Mécanisme de la réaction de Mitsunobu.<sup>265</sup>

Cette réaction engendre une inversion de configuration lorsqu'un alcool secondaire est utilisé, ce qui en fait une méthode très efficace pour l'inversion de centres chiraux lors de la synthèse de produits naturels.

Malgré l'efficacité de cette méthode, lors de l'étape de purification l'élimination du DEAD résiduel s'est avérée compliquée. Des tentatives de purification par chromatographie flash, par recristallisation ou par formation du chlorhydrate du composé puis lavages ont toutes échoué, le composé final contenant toujours les signaux éthyles caractéristiques du DEAD. Afin d'éviter ces problèmes de purification, la fonctionnalisation du phénol a été réalisée par une réaction de type Williamson, utilisant du carbonate de potassium dans l'acétonitrile (condition e, Schéma 8). Cette méthode s'est révélée plus efficace que la réaction de Mitsunobu pour obtenir le produit **42**, en termes de pureté et de rendement.

Les étapes suivantes conduisant aux composés **45** à **48** sont les réactions classiques de réduction du groupement nitro (**43**), formation du pyrrole (**44**) puis amination réductrice (**45** à **48**) décrite dans les synthèses précédentes.

La réduction du groupement nitro en amine primaire (**43**) était initialement réalisée sous atmosphère d'hydrogène avec du palladium sur charbon. Avec cette méthode, le suivi CCM en continu est compliqué. Une dégradation de l'amine finale a été constatée, ce qui implique un traitement rapide de la réaction et la mise en œuvre immédiatement de la formation du pyrrole. Une autre méthode de réduction a été choisie, avec du formiate d'ammonium, à 40°C, la réaction est complète en 30 minutes.<sup>268</sup> Le résidu obtenu est mis directement en réaction pour la formation du pyrrole. Cette méthode permet d'obtenir un rendement de 40 % pour le composé **45** sur les deux étapes, alors qu'avec la méthode précédente ce dernier était très variable entre 0 et 20 %.

Finalement, une étape d'amination réductrice a conduit à la synthèse de quatre composés ayant pour groupement R<sub>2</sub> une pipéridine, une morpholine, une N-méthylpipérazine et une diméthylamine.

### • Etude de la voie 3

Une troisième voie de synthèse alternative permettant d'obtenir le composé **42** sans avoir recours à la 3H-1,3-benzoxazol-2-one a été étudiée (Schéma 10). Le 2-amino-5-nitrophénol est utilisé comme produit de départ.

<sup>265</sup> D. L. Hughes *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 6487-6491

<sup>266</sup> D. Camp *et al.*, *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 3045-3049

<sup>267</sup> E. Grochowski *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 6876-6877

<sup>268</sup> S. Ram *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 3415-3418



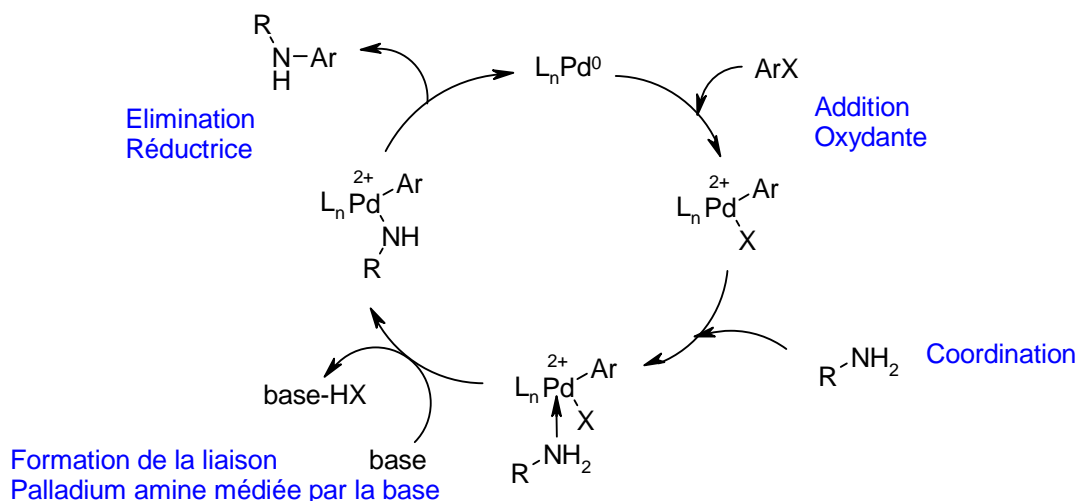


Tableau 4. Récapitulatif des essais de substitution du chlore pour l'obtention de **42**.

Entrée	Méthode	Réactifs	Solvant	Remarque
1	SN <sub>Ar</sub>	Condition c : K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 80°C	ACN	Produit de départ
2	SN <sub>Ar</sub>	Condition d : K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 120°C	DMF	Produit de départ + 2 produits secondaires (élimination du chlore <i>m/z</i> 251,0 [M+H] <sup>+</sup> , <i>m/z</i> 235,0 [M+H] <sup>+</sup> )
3	Buchwald	Condition e : BINAP (0,05 éq.), Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,4 éq.), Pd <sub>2</sub> dba <sub>3</sub> (0,05 éq.)	Dioxane	Produit de départ + 2 produits secondaires (élimination du chlore <i>m/z</i> 251,0 [M+H] <sup>+</sup> , <i>m/z</i> 235,0 [M+H] <sup>+</sup> )
4	Buchwald	Condition f : Xantphos (0,1 éq.), Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3 éq.), Pd <sub>2</sub> dba <sub>3</sub> (0,05 éq.)	Dioxane	Produit <b>42</b> (35 %)

Dans le premier cas, la réaction n'a pas lieu, le produit de départ est récupéré. Dans le second cas, le produit de départ est toujours présent, mais la formation de deux produits secondaires est observée. Le premier serait le résultat d'une élimination du chlore (*m/z* 251,0 [M+H]<sup>+</sup>), le second reste à ce jour non identifié (*m/z* 235,0 [M+H]<sup>+</sup>). Un premier essai de couplage de Buchwald réalisé avec la BINAP, du carbonate de césium et du tris(dibenzylidèneacétone)dipalladium (Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub>) (Tableau 4, entrée 3) n'a pas conduit au produit désiré. Le produit de départ et les deux produits secondaires obtenus lors de l'essai précédent sont récupérés. Lorsque le Xantphos est utilisé comme ligand (Tableau 4, entrée 4), le produit **42** est obtenu avec un rendement de 35 %.

Le mécanisme de cette réaction est très similaire à la formation palladocatalysée de liaison C-C (Schéma 12). La première étape est une addition oxydante de l'aromatique halogéné sur un palladium (0). L'amine se coordine avec le complexe. Une base permet alors l'élimination de l'halogène, conduisant à la formation de la liaison entre le palladium et l'amine. Une étape finale d'élimination réductrice conduit au produit désiré. Lors de cette dernière étape, une réaction secondaire peut conduire à la formation de l'aromatique déhalogéné et d'une imine. Le cycle catalytique démarre à nouveau.<sup>274</sup>

Schéma 12. Cycle catalytique du couplage de Buchwald.<sup>274</sup>

Le composé **42** permet la synthèse des composés **45-48** selon l'enchaînement réactionnel précédemment décrit dans la voie de synthèse 2 (Schéma 8).

<sup>274</sup> F. Paul et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 5969-5970

La voie de synthèse 3 (Schéma 10) comporte trois étapes et conduit à la formation du composé **42** avec un rendement global de 15 %. La voie de synthèse 2, bien que comportant une étape supplémentaire, conduit à la formation du même composé avec un rendement de 49 % (Tableau 5).

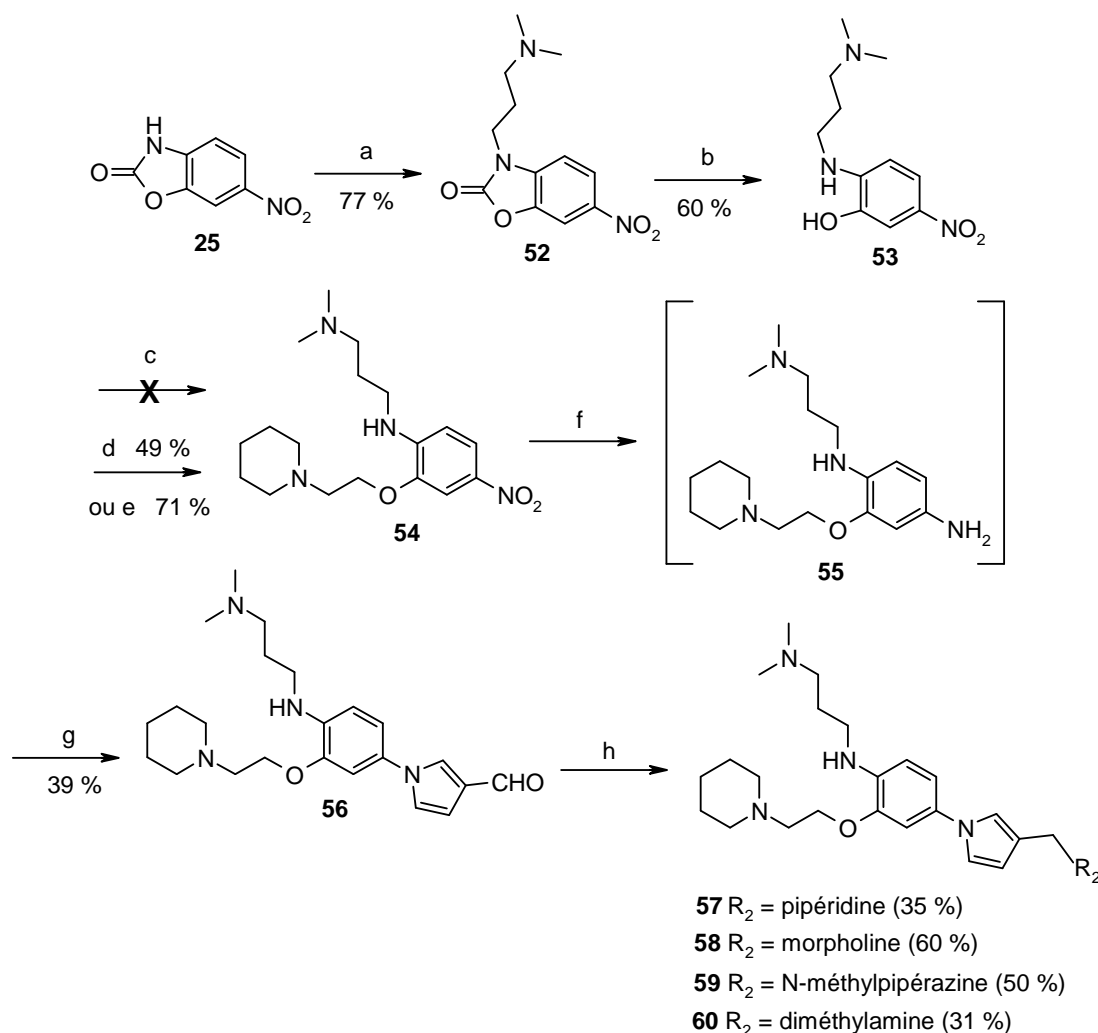
Tableau 5. Comparatif des deux voies de synthèse.

Voie de synthèse	Nombre d'étapes	Rendement global pour obtenir 42
<b>2</b>	4	49 %
<b>3</b>	3	15 %

La voie de synthèse 2 a été adoptée pour synthétiser des analogues de cette famille en modulant le groupement R<sub>1</sub>.

### • Synthèse d'analogues R<sub>1</sub> = diméthylamine

Pour juger de l'influence du groupement R<sub>1</sub>, la synthèse d'analogues avec la diméthylamine a été réalisée. Le schéma de synthèse est très similaire au Schéma 8, bien qu'il ait nécessité quelques modulations.

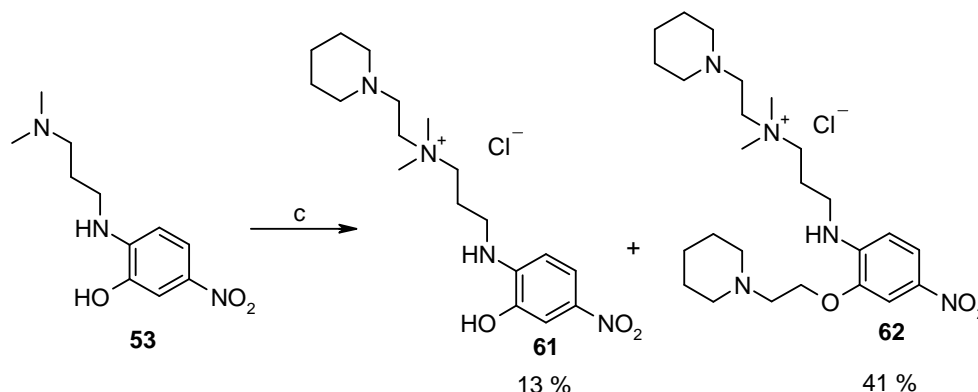


Réactifs et conditions : (a) 1-(3-chloropropyl)diméthylamine.HCl (1,7 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,0 éq.), ACN, reflux, 6 h 30 ; (b) NaOH 2,5 M (20,0 éq.), H<sub>2</sub>O, dioxane, 20°C, 16 h ; (c) 1-(2-chloroéthyl)pipéridine.HCl (1,2 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 éq.), ACN, 60°C, 16 h ; (d) 1-(2-chloroéthyl)pipéridine.HCl (1,2 éq.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 éq.), DMF, 20°C, 16 h ; (e) 1-pipéridineéthanol (1,5 éq.), PPh<sub>3</sub> (2,0 éq.), DEAD (2,0 éq.), THF, 50°C, 6 h ; (f) formiate d'ammonium (7 éq.), Pd/C 10 %, EtOH, 80°C, 1 h 30 ; (g) 2,5-diméthoxy-3-tétrahydrofurancarboxaldéhyde (1,2 éq.), AcOH, 90°C, 1 h 30 ; (h) amine (2,0 éq.), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (2,0 éq.), AcOH (1,5 éq.), DCE, 20°C, 20 h.

Schéma 13. Voie de synthèse des analogues R<sub>1</sub> = diméthylamine.

De manière similaire au Schéma 8, une substitution nucléophile à partir de la 6-nitro-3H-1,3-benzoxazol-2-one permet d'obtenir le composé **52**. L'ouverture de la 1,3-benzoxazol-2-one est réalisée à 20°C suivie de l'étape de substitution du phénol.

Si la réaction est réalisée dans les conditions décrites précédemment (1-(2-chloroéthyl)pipéridine.HCl (1,2 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 éq.), ACN, 60°C, conditions c, Schéma 13), un mélange de deux composés est obtenu. La diméthylamine intervient dans la substitution nucléophile, ce qui conduit à la formation d'un ammonium quaternaire. Ainsi, les composés avec l'ammonium quaternaire et le phénol substitué (**62**) ou non (**61**) ont été isolés et caractérisés (Schéma 14).



Réactifs et conditions : (c) 1-(2-chloroéthyl)pipéridine.HCl (1,2 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,0 éq.), ACN, 60°C, 18 h.

**Schéma 14. Formation des ammoniums quaternaires 61 et 62.**

Pour pallier à ce problème de formation d'ammoniums quaternaires, un essai a été réalisé à froid en utilisant du carbonate de césium comme base (condition d, Schéma 13). Le produit désiré est alors obtenu avec un rendement de 49 %. Une réaction de Mitsunobu permet d'obtenir le produit avec un rendement de 71 % sans risque de formation d'ammonium quaternaire et sans problème de purification du DEAD.

La complémentarité des deux méthodes peut être soulignée. Alors qu'avec R<sub>1</sub> = pipéridine, une réaction de substitution nucléophile avec du carbonate de potassium s'avère être la meilleure option, la réaction de Mitsunobu permet d'éviter la formation d'un ammonium quaternaire lorsque R<sub>1</sub> = diméthylamine.

L'étape suivante est la réduction du groupement nitro. Lorsque les conditions sont similaires au Schéma 8 (formiate d'ammonium (7 éq.), Pd/C 10 %, MeOH, 40°C), le taux de conversion n'est que de 50 % (Tableau 6). Une conversion totale est obtenue lorsque le mélange est chauffé à 80°C dans l'éthanol. Celle-ci est vraisemblablement due à l'augmentation de température du mélange réactionnel, et non à la nature du solvant (éthanol).

**Tableau 6. Essais de réduction du groupement nitro.**

Solvant	Température	Temps de réaction	Conversion*
MeOH	40°C	2 h	50 %
MeOH	60°C	3 h	60 %
EtOH	80°C	1.5 h	100 %

\*Suivi par LC-MS.

Le composé **55** obtenu est directement utilisé pour la formation du pyrrole (**56**). L'amination réductrice finale permet d'obtenir les quatre composés **57-60** avec des rendements compris entre 31 et 60 %.

## 2. Synthèse de la famille D<sub>2</sub>

Etant donné l'instabilité potentielle du pyrrole en milieu acide qui peut induire une décomposition des composés lors de la formation des sels de chlorhydrate et afin d'étudier l'influence de la nature de l'aromatique dans cette famille de composés, il a été envisagé de remplacer le pyrrole par un noyau phényle.

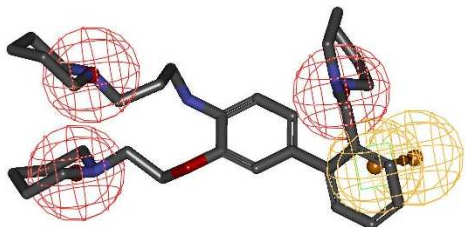


Figure 113. Superposition du composé 68 sur le pharmacophore.

Le groupement CH<sub>2</sub>R<sub>2</sub> sont introduits en position 2 du noyau phényle alors qu'ils sont en position 3 du pyrrole de la famille D<sub>1</sub>, permettant ainsi d'obtenir de meilleurs scores en modélisation moléculaire, proche de 3,6 (Figure 113).

### • Etude rétrosynthétique

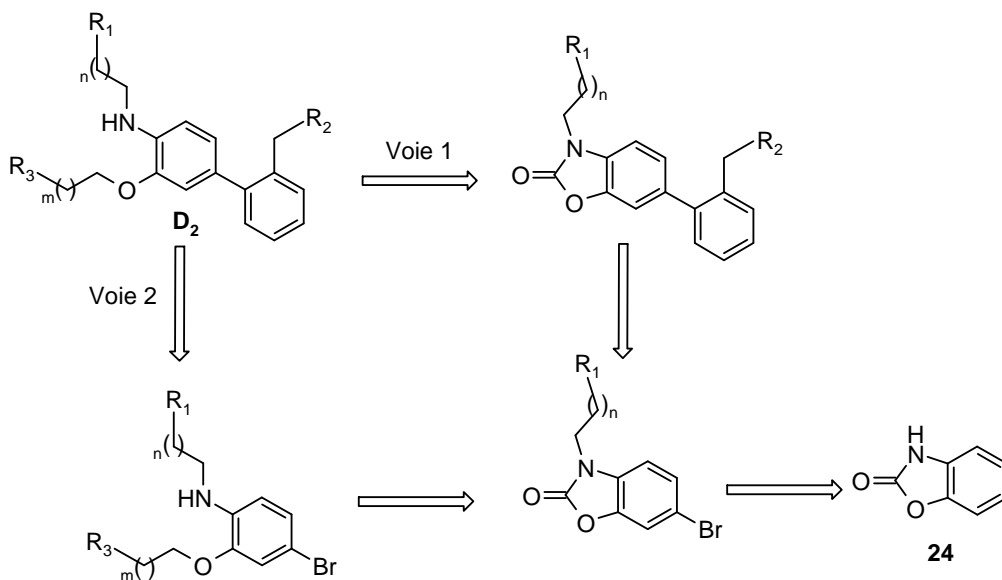


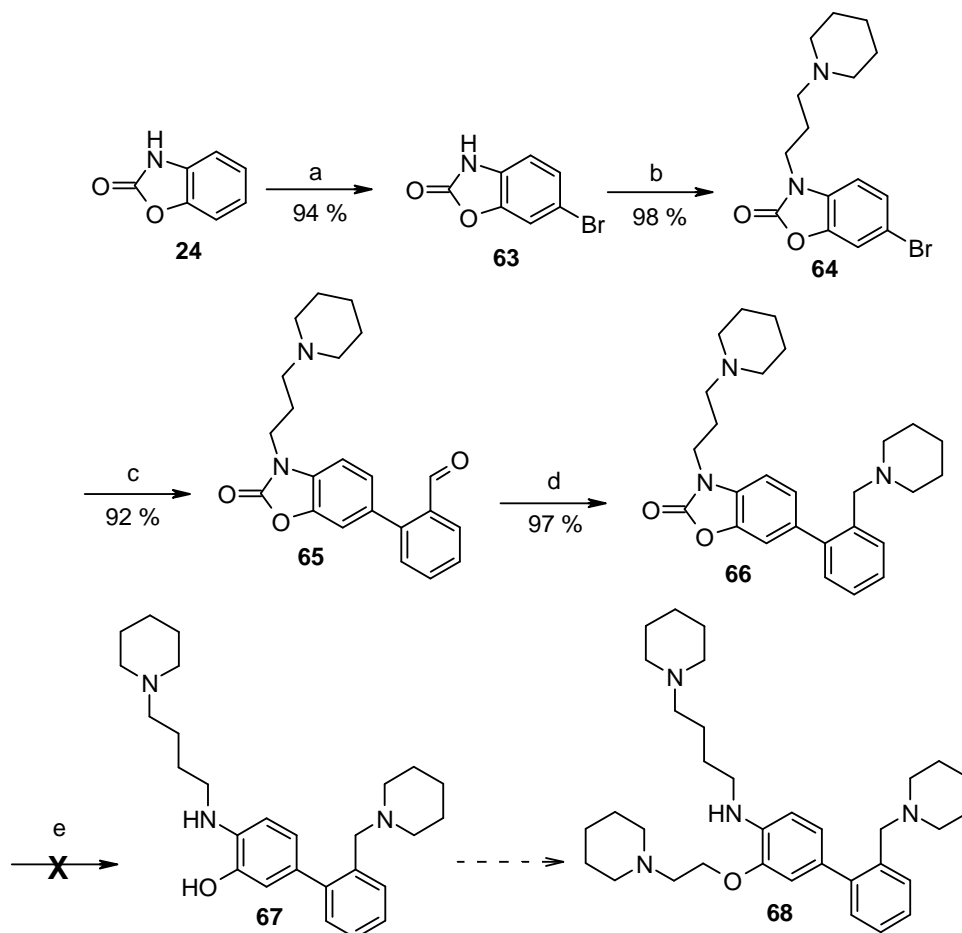
Schéma 15. Rétrosynthèse de la famille D<sub>2</sub>.

Pour la synthèse de cette famille deux voies sont envisageables, identiques à la famille D<sub>1</sub>. Selon la voie 2 le produit final est obtenu suite à une amination réductrice. Le groupement 2-formylphényle est introduit grâce à un couplage de Suzuki, obtenu après ouverture de la 1,3-benzoxazol-2-one bromée *N*-substituée. Avec la voie de synthèse 1, l'ouverture de la 1,3-benzoxazol-2-one constitue la dernière étape de la synthèse. Les composés finaux sont obtenus après un couplage de Suzuki et une amination réductrice à partir de l'intermédiaire commun des deux méthodes.

Ces deux voies s'avèrent complémentaires car la première permettrait une modulation du groupement R<sub>3</sub> alors que la seconde faciliterait la modulation de R<sub>2</sub>.

### • Etude de la voie 1

Les deux premières étapes de la synthèse sont communes aux deux voies. Dans un premier temps la 3*H*-1,3-benzoxazol-2-one est bromée régiosélectivement en position 6 dans de l'acide acétique (**63**) puis une substitution nucléophile permet d'introduire le premier groupement basique de la molécule (**64**).



Réactifs et conditions : (a) Br<sub>2</sub> (1 éq.), AcOH, 20°C, 3 h 30 ; (b) 1-(2-chloropropyl)pipéridine.HCl (1,2 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 éq.), ACN, 80°C, 5 h ; (c) acide 2-formylphénylboronique (1,2 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,3 éq.), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,02 éq.), toluène, EtOH, reflux, 18 h (d) pipéridine (2,0 éq.), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (2,0 éq.), AcOH (1,5 éq.), DCE, 20°C, 21 h ; (e) NaOH 2,5 M (20,0 éq.), H<sub>2</sub>O, dioxane, 20°C, 16 h.

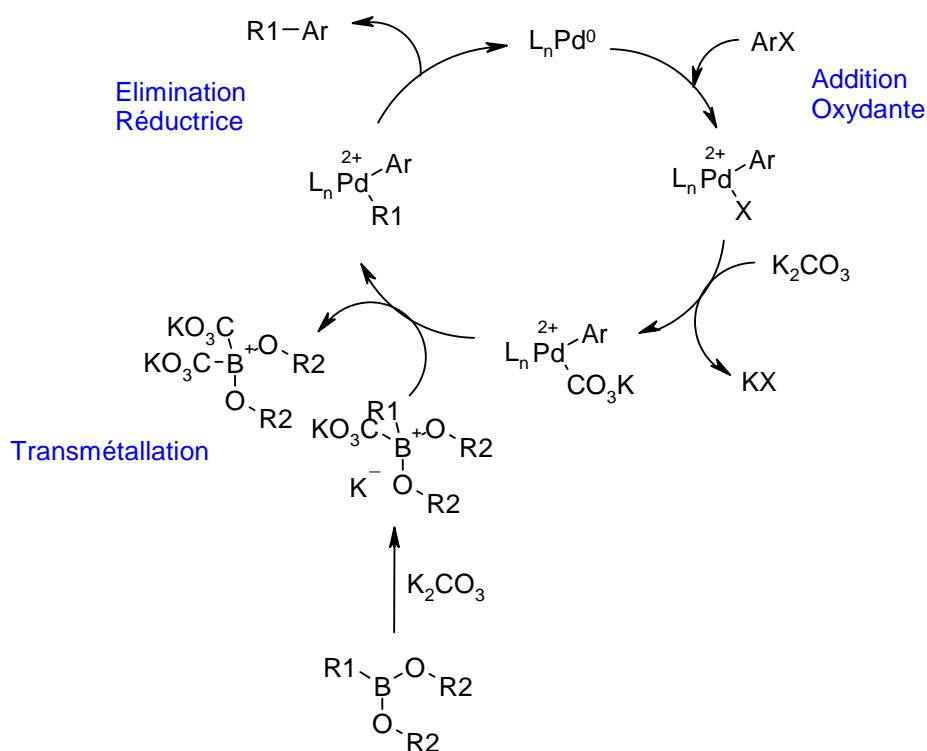
Schéma 16. Synthèse de 68 selon la voie 1.

A partir du composé **64**, un couplage de Suzuki mis en œuvre selon un mode opératoire décrit au laboratoire conduit au composé **65** avec un rendement de 92 %.

Le cycle catalytique de cette réaction comporte quatre étapes similaires à celui du couplage de Buchwald (Schéma 17). Dans un premier temps une addition oxydante d'un aromatique halogéné sur le palladium (0) conduit à la formation d'un complexe de palladium (II). Un échange d'anion a lieu entre la base et l'halogénure. Puis une transmétallation se produit entre le complexe palladié et l'alkylborate. Finalement, une élimination réductrice conduit à la formation du produit voulu et régénère le palladium (0) qui peut à nouveau entrer en jeu dans le cycle catalytique.<sup>275, 276</sup>

<sup>275</sup> N. Miyaura *et al.*, *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 2457-2483

<sup>276</sup> A. Suzuki, *J. Organometallic Chem.*, **1999**, 576, 147-168

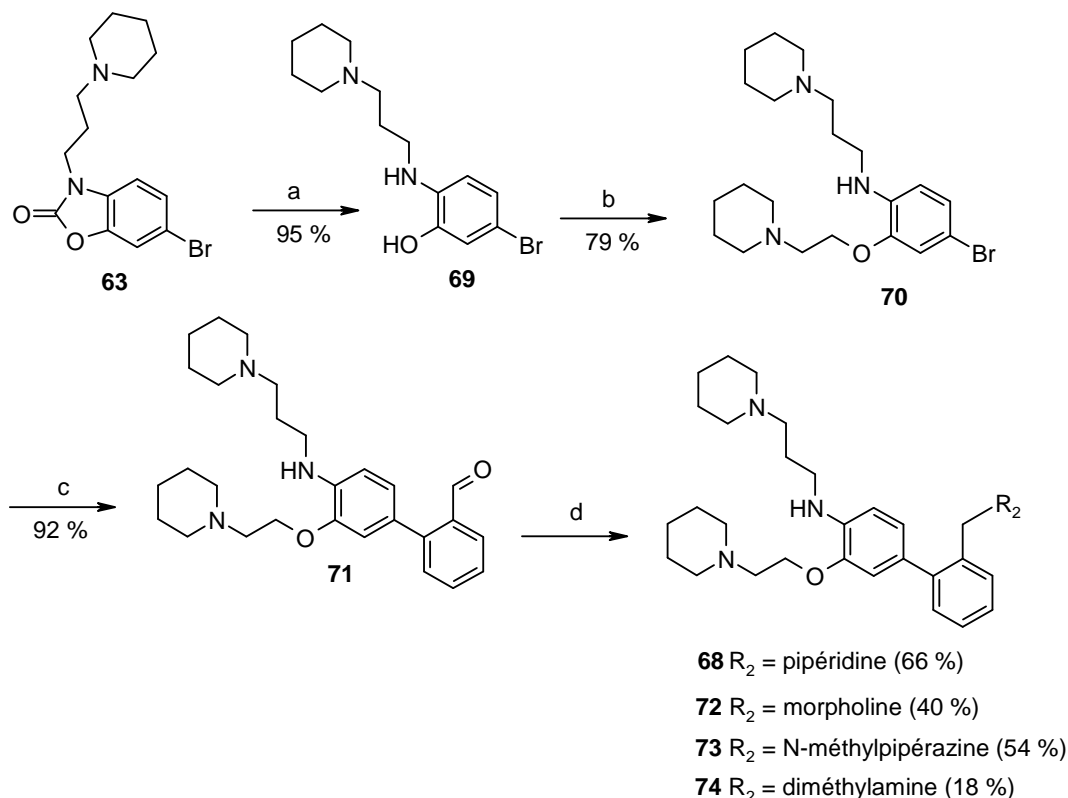

 Schéma 17. Cycle catalytique du couplage de Suzuki.<sup>276</sup>

A partir du composé **65**, une amination réductrice conduit au dérivé **66** avec un excellent rendement. L'ouverture de ce cycle en aminophénol (**67**) n'a pas pu être réalisée malgré les conditions douces utilisées à température ambiante, une dégradation du milieu réactionnel a été constatée.

Ainsi, il peut être conclu que l'échec de l'ouverture de la 1,3-benzoxazol-2-one substituée par un pyrrole lors de la synthèse de la famille **D<sub>1</sub>** n'est pas seulement dû à l'instabilité de cet hétérocycle en milieu acide, mais probablement dû à la présence d'un substituant aromatique sur cette position.

### • Etude de la voie 2

A partir du composé commun **63** obtenu, le phénol **69** est synthétisé *via* l'ouverture de la 1,3-benzoxazol-2-one.



Réactifs et conditions : (a) NaOH 2,5 M (20,0 éq.), H<sub>2</sub>O, dioxane, 20°C, 16 h ; (b) 1-(2-chloroéthyl)pipéridine.HCl (1,0 éq.), NaH (2,3 éq.), DMF, 20°C, 2 j ; (c) acide 2-formylphénylboronique (1,2 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,3 éq.), P(*o*-tol)<sub>3</sub> (0,2 éq.), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (0,02 éq.), toluène, EtOH, reflux, 18 h ; (d) amine (1,5 éq.), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (1,5 éq.), AcOH (1,5 éq.), DCE, 20°C, 21 h.

#### Schéma 18. Schéma de synthèse de la voie 2.

Le phénol **69** est fonctionnalisé pour introduire le second groupement basique de la molécule. Dans ce cas, une simple substitution nucléophile ou une réaction de Mitsunobu peuvent être employées. Plusieurs essais ont été réalisés pour obtenir des conditions optimales.

Un premier essai avec K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,0 éq.), ACN, 60°C, 3 h (Tableau 7, entrée 1) a conduit à la formation de deux composés difficiles à séparer par CCM. Le spectre RMN du mélange (Figure 115) permet d'identifier les deux composés : le produit désiré *O*-substitué **70** et le produit de *N,N*-substitution **75** (Figure 114), dont les spectres respectifs sont présentés Figure 116 et Figure 117.

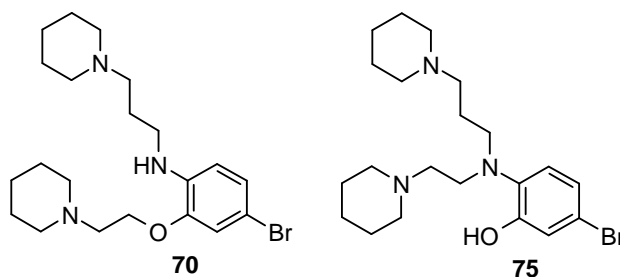


Figure 114. Produits *O*-substitué **70** et *N,N*-substitué **75**.



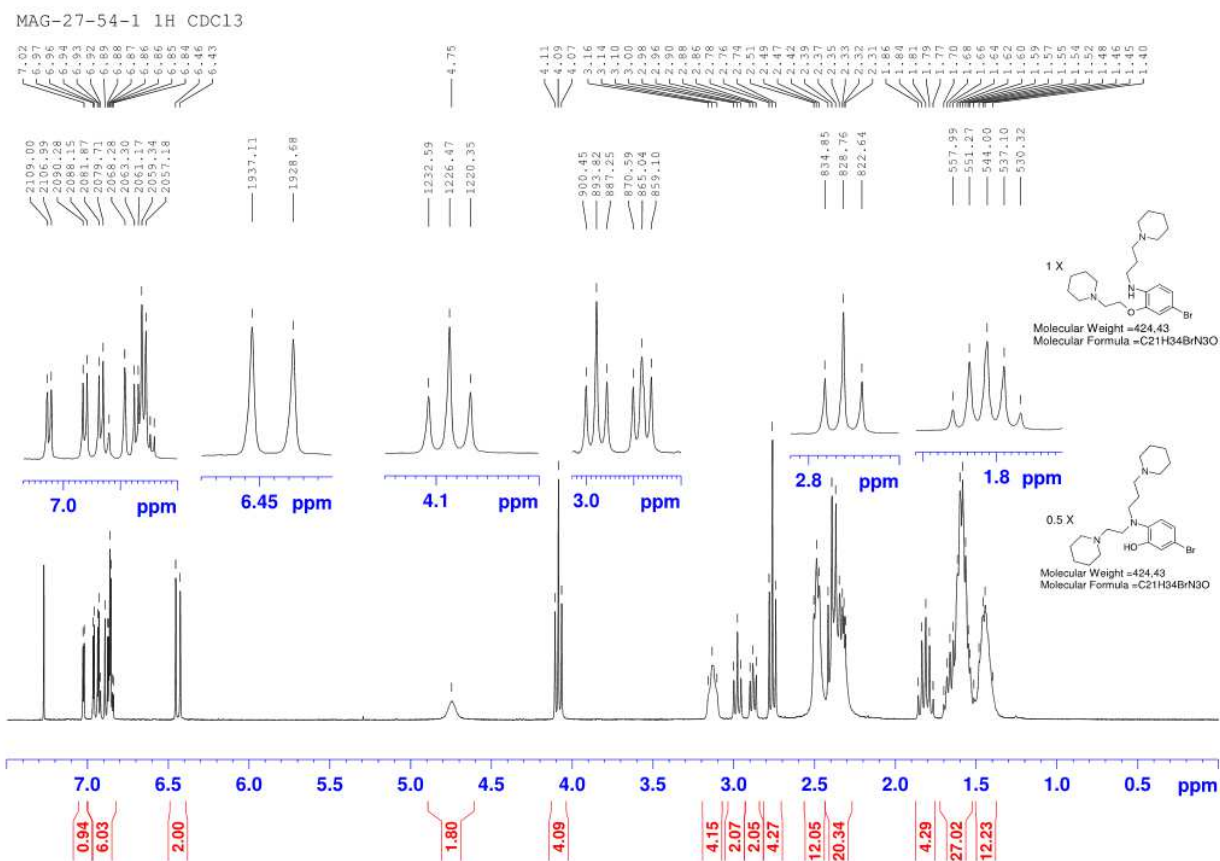


Figure 115. Spectre RMN du mélange de *O* et *N,N* substitution.

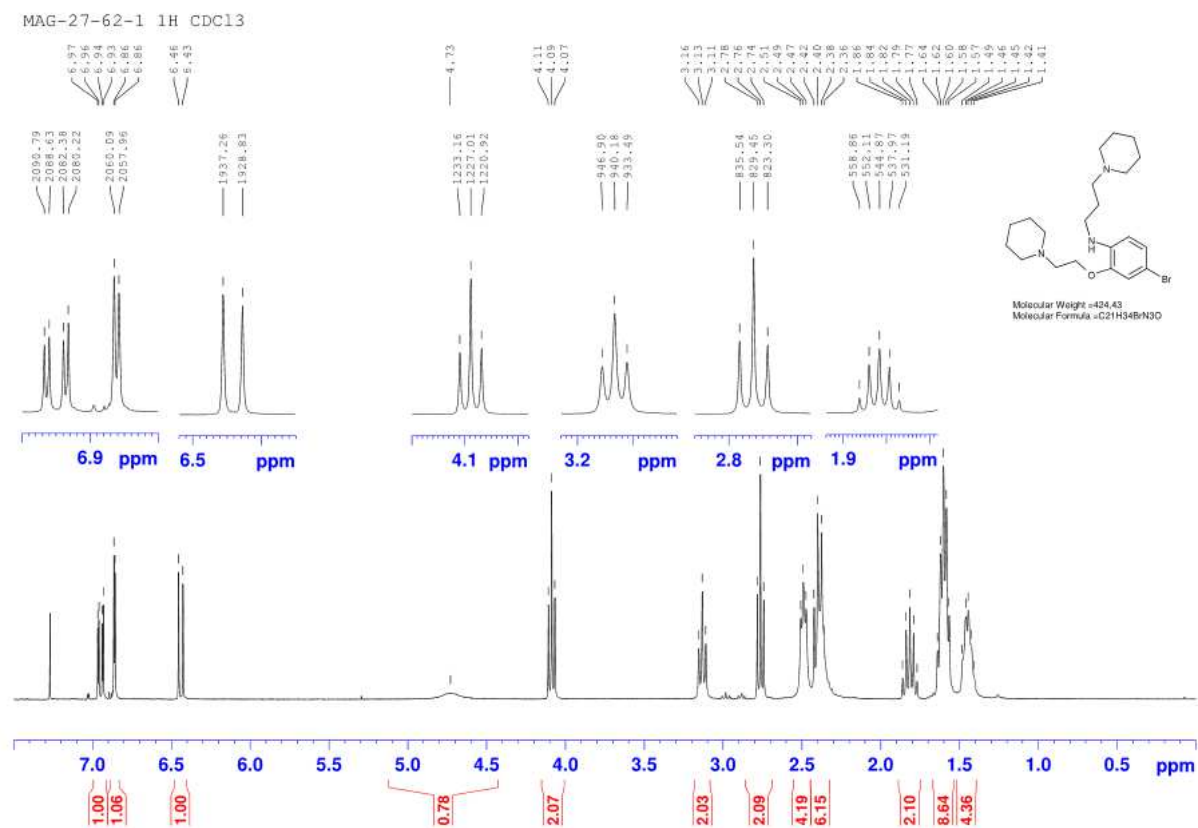
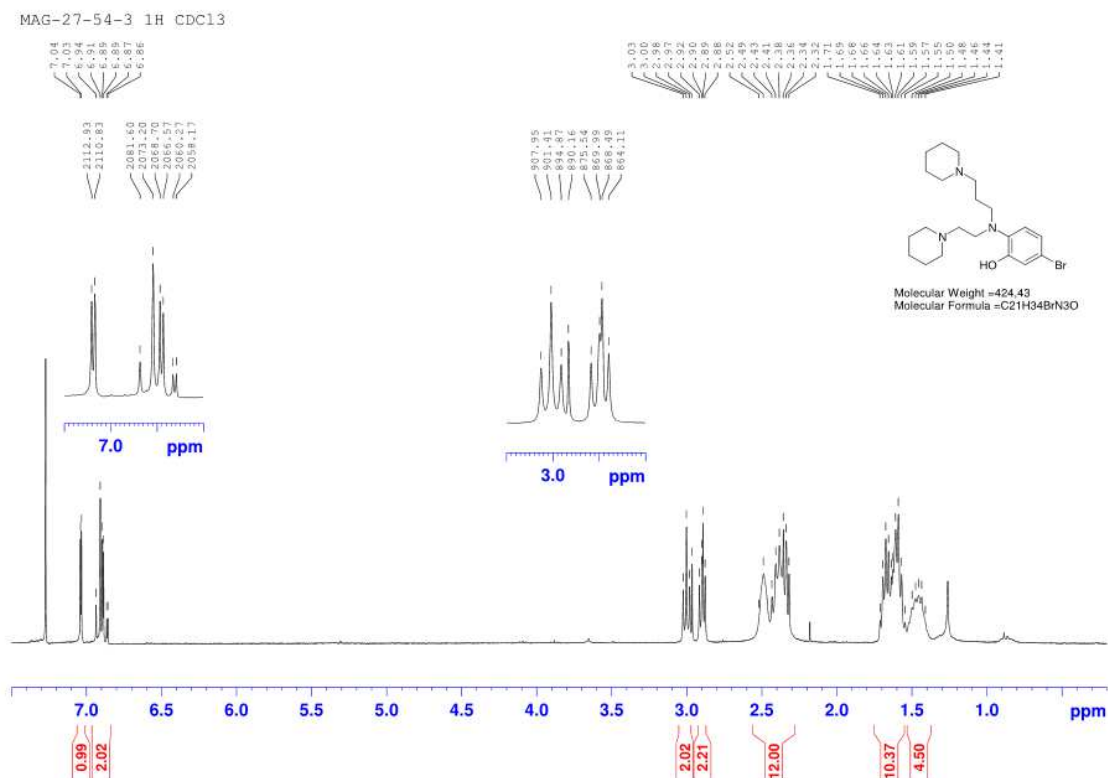


Figure 116. Spectre du composé *O*-substitué 70.


 Figure 117. Spectre du composé *N,N*-substitué **75**.

Un deuxième essai avec du  $K_2CO_3$  à température ambiante (Tableau 7, entrée 2) a également conduit à la formation du mélange de composés. Une réaction de Mitsunobu conduit aussi au mélange mais avec le composé *O*-substitué majoritaire. Finalement, les conditions optimales permettant d'éviter la formation du produit de *N,N*-substitution **75** consistent à utiliser de l'hydruire de sodium dans le DMF (Tableau 7, entrée 3).

 Tableau 7. Essais de substitution du dérivé phénolique **69** afin de synthétiser le composé **70**.

Entrée	Méthode	Réactifs	Solvant	Conditions	<i>O</i> subst.	<i>N,N</i> subst.	Remarques
1	SN	$K_2CO_3$ (3 éq.)	ACN	60°C, 3 h	27 %	13 %	Séparation par prep-MS
2	SN	$K_2CO_3$ (3 éq.)	ACN	20°C, 16 h	24 %	30 %	
3	SN	NaH (2,3 éq.)	DMF	20°C, 16 h	<b>79 %</b>	0 %	Ajout du NaH et du réactif à 0°C
4	Mitsunobu	DEAD (1,2eq.), $PPh_3$ (1,2 éq.)	THF	20°C, 16 h	65 %	14 %	

Une fois le composé **70** obtenu, une réaction de Suzuki permet d'introduire le groupement 2-formylphényle. Cette réaction de couplage étant très substrat dépendante, divers essais ont été menés afin d'obtenir une conversion totale et un bon rendement pour le composé **71** (Tableau 8).

Tableau 8. Essais de couplage de Suzuki afin de synthétiser le composé **71**.

Catalyseur	Base	Ligand	Conditions	Rendements
<b>Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub></b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	18 h, reflux	52 %
<b>Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub></b>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	18 h, reflux	25 %
<b>Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub></b>	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	18 h, reflux	57 %
<b>Pd(OAc)<sub>2</sub></b> <sup>277</sup>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	PPh <sub>3</sub>	18 h, reflux	50 %
<b>Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub></b> <sup>278</sup>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	PPh <sub>3</sub>	18 h, reflux	53 %
<b>Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub></b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	P( <i>o</i> -tol) <sub>3</sub>	18 h, reflux	<b>92 %</b>

Lorsque le palladium triphénylphosphine est utilisé comme catalyseur, les rendements varient en fonction de la nature de la base. Ainsi, le carbonate de sodium conduit au rendement le plus faible de 25 % alors que les carbonates de césium ou de potassium conduisent à des rendements similaires de 57 et 52 % respectivement. Lorsque la triphénylphosphine est utilisée, avec du carbonate de potassium, le rendement est proche de 50 %. Cependant, lorsque la P(*o*-tol)<sub>3</sub> est utilisée une nette augmentation du rendement est constatée pour atteindre 92 %. Pour la suite de la synthèse, le couple Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub>- P(*o*-tol)<sub>3</sub> est utilisé.

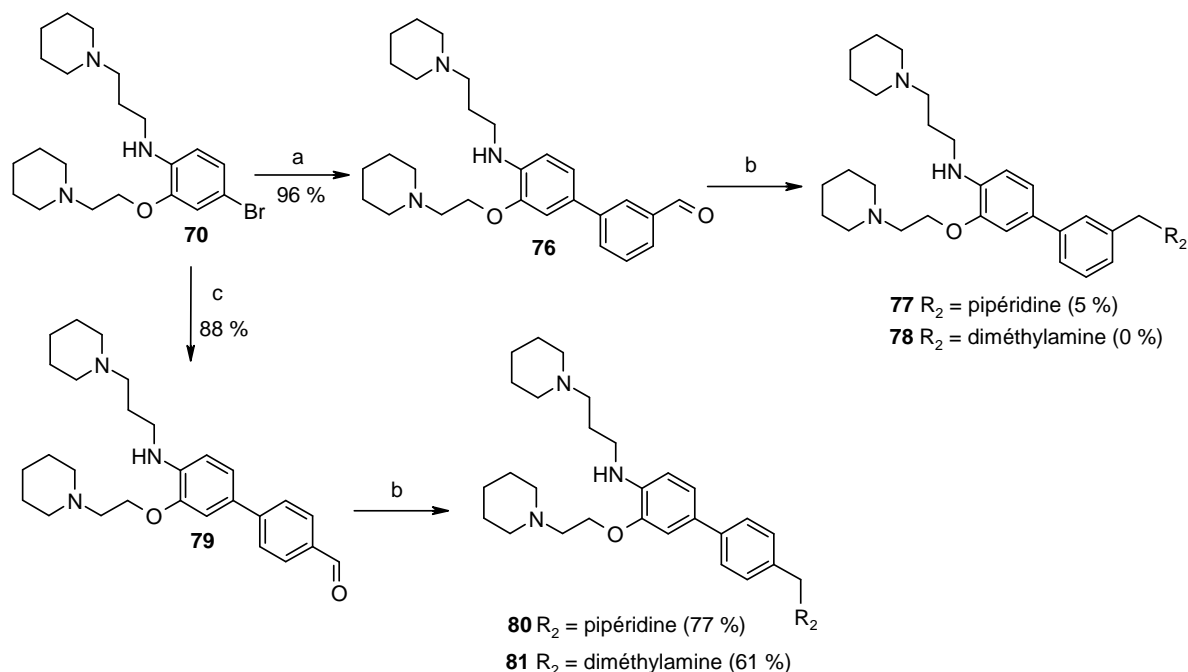
Finalement, une réaction d'amination réductrice à partir du dérivé **71**, conduit aux composés **68**, **72** et **73** avec des rendements compris entre 40 et 66 %. Le composé **74** est obtenu avec un rendement de 18 % qui s'explique par la difficulté de la purification du composé. C'est une constatation générale pour toutes les familles, les produits finaux possédant une diméthylamine sont beaucoup plus complexes à purifier.

- **Synthèse d'isomères de position**

Afin de déterminer l'importance de la position de l'amine R<sub>2</sub> sur l'aromatique, des isomères de position ont été synthétisés. Un isomère en méta et deux en para ont été obtenus suivant le même schéma réactionnel, par une réaction de Suzuki, suivie d'une amination réductrice (Schéma 19).

<sup>277</sup> R. Bhatt *et al.*, US20040204386 A1, **2004**.

<sup>278</sup> M. H. Norman *et al.*, US6187777 B1, **2001**.



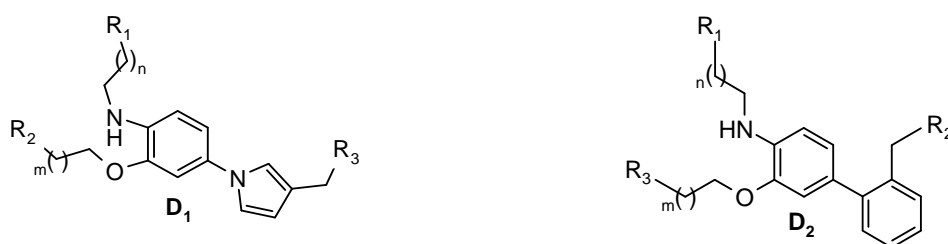
Réactifs et conditions : (a) acide 3-formylphénylboronique (1,2 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,3 éq.), P(*o*-tol)<sub>3</sub> (0,2 éq.), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (0,02 éq.), toluène, EtOH, reflux, 18 h ; (b) amine (1,5 éq.), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (1,5 éq.), AcOH (1,5 éq.), DCE, 20°C, 18-21 h ; (c) acide 4-formylphénylboronique (1,2 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,3 éq.), P(*o*-tol)<sub>3</sub> (0,2 éq.), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (0,02 éq.), toluène, EtOH, reflux, 18 h.

**Schéma 19. Schéma de synthèse des isomères de position.**

Les rendements obtenus pour le groupement R<sub>3</sub> équivalant à une pipéridine sont similaires entre la position ortho et para de l'aldéhyde sur l'aromatique. Un faible rendement est obtenu pour la position méta. Pour la diméthylamine, un rendement de 18 % est obtenu en ortho et 61 % en para. L'amination réductrice en position méta n'a pas permis d'obtenir le composé **78**. Il semblerait donc que la position para soit plus favorable à l'amination réductrice et que la position méta soit défavorable.

### 3. Evaluation biologique des familles D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub>

































#### • Tests *in vitro*



Les différents représentants de la famille D<sub>1</sub> (**37**, **45-48**, **57-60**) présentent un fitscore de 2,5 (Tableau 9). Leur évaluation sur l'inhibition de la prolifération cellulaire ne montre pas de toxicité, excepté pour le composé **37** (n = 1). Tous les composés ont une action sur la diminution de la formation des peptides Aβ<sub>40</sub> et Aβ<sub>42</sub> entre 2,8 et 6,7 μM sauf le composé **47** constitué d'une pipéridine en R<sub>1</sub> et d'une pipérazine en R<sub>2</sub>.

La famille D<sub>2</sub> présente un fitscore de 3,6 lorsque le groupement R<sub>2</sub> est en ortho, 3,0 lorsqu'il est en méta et 0,9 lorsqu'il est en para. Les composés constitués d'une pipéridine ou d'une pipérazine en R<sub>2</sub> présentent une cytoxicité, inhibant la prolifération cellulaire avec des CC<sub>50</sub> comprises entre 28 et 74 μM. Les composés présentent également une capacité d'inhibition de la formation des peptides Aβ<sub>40</sub> et Aβ<sub>42</sub>, avec des IC<sub>50</sub> comprises entre 2,1 et 3,8 pour Aβ<sub>40</sub> et 3,1 et 4,1 pour Aβ<sub>42</sub>. Le meilleur représentant de cette famille est le composé **74**, présentant une faible toxicité et une bonne capacité d'inhibition de la formation des peptides Aβ<sub>40</sub> et Aβ<sub>42</sub>.

Tableau 9. Récapitulatif de l'évaluation biologique des composés.

Familie	Composé	Aromatique	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	ModMol	Toxicité	Métabolisme APP	
					FitScore	% d'inhibition à 100 µM	IC <sub>50</sub> (µM)	Aβ <sub>40</sub>
D <sub>1</sub>	37	pyrrole	 n = 1	 n = 1	2,5	CC <sub>50</sub> = 25 µM	4,0	4,8
D <sub>1</sub>	45	pyrrole	 n = 2	 n = 2	2,5	24 %	2,8	4,8
D <sub>1</sub>	46	pyrrole	 n = 2	 n = 2	2,5	40 %	3,4	2,7
D <sub>1</sub>	47	pyrrole	 n = 2	 n = 2	2,5	16 %	> 10	> 10
D <sub>1</sub>	48	pyrrole	 n = 2	 n = 2	2,5	6 %	5,5	7,4
D <sub>1</sub>	57	pyrrole	 n = 2	 n = 2	2,5	6 %	6,7	8,1
D <sub>1</sub>	58	pyrrole	 n = 2	 n = 2	2,5	15 %	3,3	4,1
D <sub>1</sub>	59	pyrrole	 n = 2	 n = 2	2,5	10 %	5,8	5,8
D <sub>1</sub>	60	pyrrole	 n = 2	 n = 2	2,5	4 %	6,1	9,1
D <sub>2</sub>	68	phényl	 n = 2	 n = 2 ortho	3,6	CC <sub>50</sub> = 63 µM	2,5	4,1
D <sub>2</sub>	72	phényl	 n = 2	 n = 2 ortho	3,7	CC <sub>50</sub> = 69 µM	3,6	5,9
D <sub>2</sub>	73	phényl	 n = 2	 n = 2 ortho	3,6	CC <sub>50</sub> = 45 µM	2,6	3,2
D <sub>2</sub>	74	phényl	 n = 2	 n = 2 ortho	3,6	12 %	2,8	3,4
D <sub>2</sub>	77	phényl	 n = 2	 n = 2 méta	3,0	CC <sub>50</sub> = 28 µM	2,1	3,3
D <sub>2</sub>	80	phényl	 n = 2	 n = 2 para	0,7	CC <sub>50</sub> = 74 µM	3,8	4,4
D <sub>2</sub>	81	phényl	 n = 2	 n = 2 para	0,9	nd	nd	nd
Chloroquine					nd	CC <sub>50</sub> = 30 µM	7,0	12,7
AZP2006					nd	CC <sub>50</sub> = 30 µM	2,0	1,5

Les composés **68**, **77** et **80** sont constitués des mêmes groupements en  $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_3$  mais avec un positionnement du groupement  $R_2$  différent. Il peut être noté que quelque soit la position du groupement  $R_2$  sur l'aromatique, les composés ont la même capacité d'inhibition. Ainsi, l'amine pourrait ne pas être un élément essentiel pour avoir une bonne activité biologique.

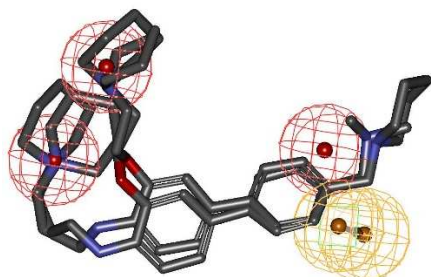


Figure 118. Superposition de **80** et **81** sur le pharmacophore.

La position para de l'amine des composés **80** et **81** conduit à un faible fitscore car les composés ne se superposent pas avec tous les éléments pharmacophoriques (Figure 118). Cependant, le composé **80** présente une capacité d'inhibition de la formation des peptides A $\beta$  correcte. Ainsi, un faible fitscore ne semble pas corrélé à une faible action biologique.

La quantification des CTF $\alpha$  et des AICD formés a été réalisée pour les composés **48**, **57**, **58**, **72-74** (Figure 119 et Figure 120). Les six composés conduisent à une forte augmentation de la sécrétion de ces fragments. Tous les composés présentent à 3  $\mu$ M une augmentation de la formation des fragments supérieure à la chloroquine à 5  $\mu$ M utilisée comme composé de référence. Les meilleurs composés sont les représentant **73** et **74** de la famille D<sub>2</sub>.

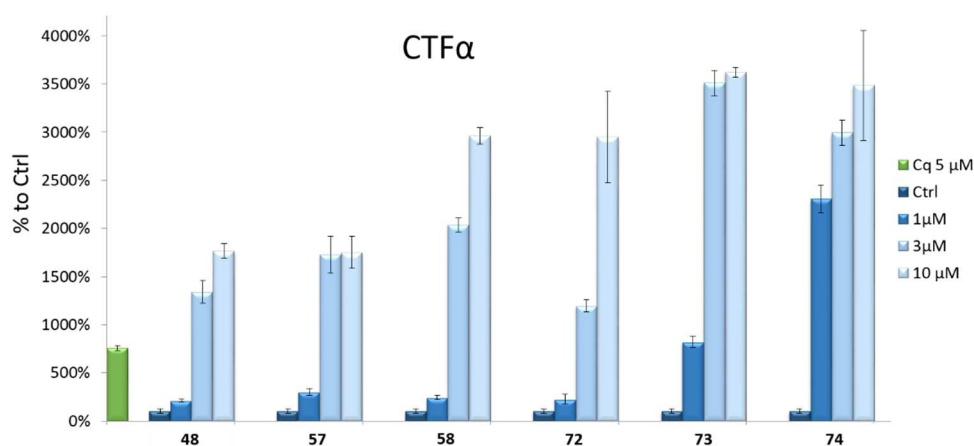


Figure 119. Effet des composés **48**, **57**, **58**, **72-74** sur la formation du fragment CTF $\alpha$ .

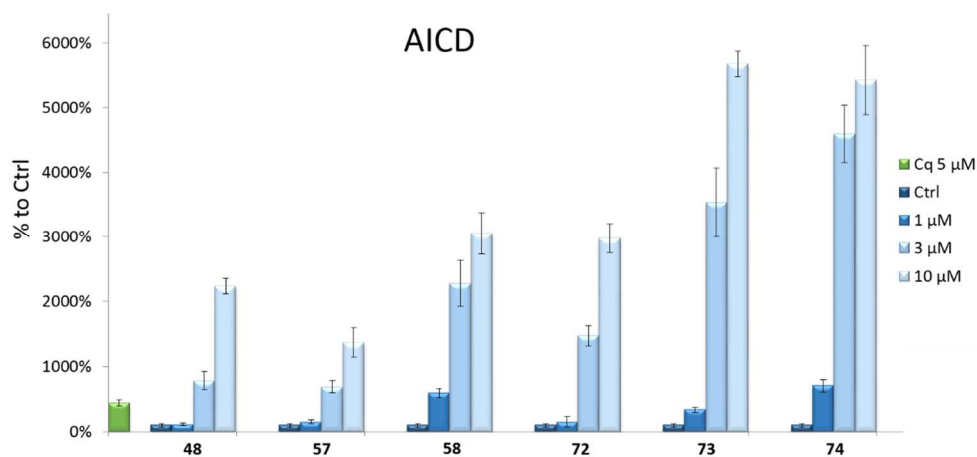
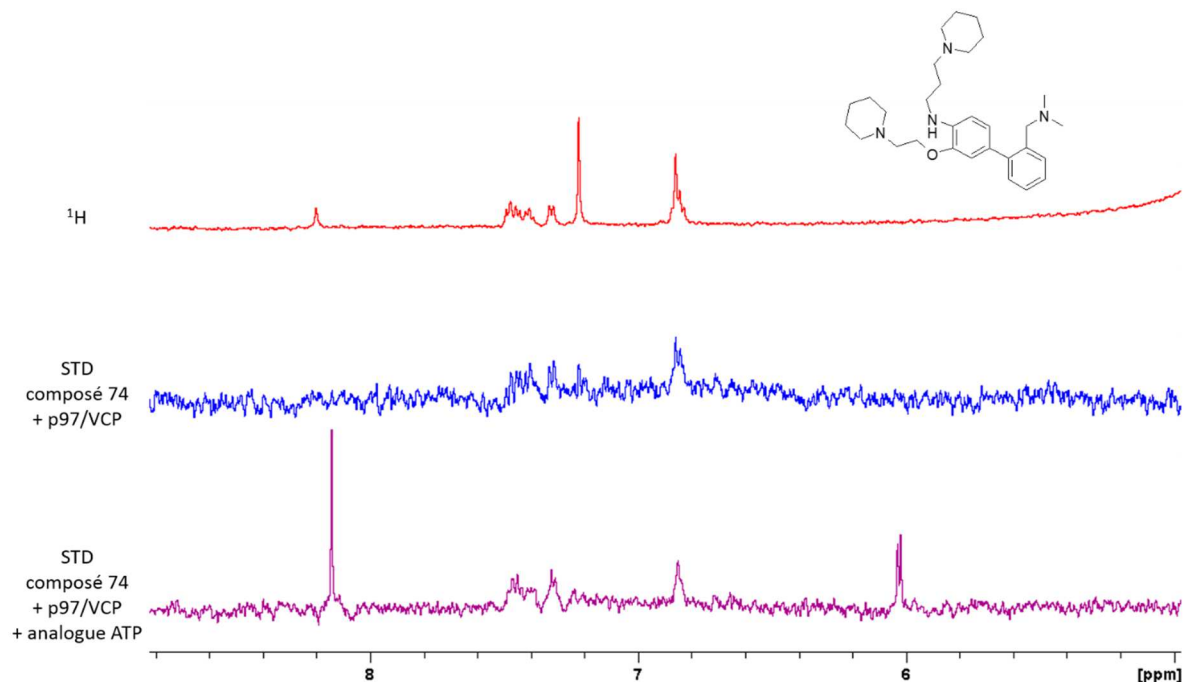


Figure 120. Effet des composés **48**, **57**, **58**, **72-74** sur la formation du fragment AICD.

- **RMN-STD**

L'un des meilleurs composés de la famille **D<sub>2</sub>**, le composé **74**, a été testé en RMN STD. Sur le spectre STD (bleu, Figure 121), les signaux aromatiques du composé sont visibles, ce qui suggère son interaction avec la protéine. Une seconde expérience avec l'analogue non hydrolysable de l'ATP a été réalisée. Sur le spectre STD (mauve), les signaux aromatiques du composé sont visibles ainsi que les signaux de l'analogue de l'ATP. Ceci confirme que les deux composés ont un site de liaison différent, comme dans le cas du composé AZP2006.



































**Figure 121. Spectres de RMN-STD du composé 74.**  
(74 200  $\mu$ M, p97/VCP 5  $\mu$ M, analogue ATP 2 nM)

- **Estimation des propriétés ADME**

Les propriétés ADME des composés ont été calculées en utilisant le logiciel ACD/ADME Suite 4.95 et la forme base des molécules (Tableau 10). Les représentants de la famille **D<sub>1</sub>** respectent globalement les règles de Lipinski avec un poids moléculaire inférieur ou proche de 500 g/mol, un log P inférieur à 5 (légèrement supérieur pour les composés **37** et **45**), un nombre de donneur de liaisons hydrogène inférieur à 5 et un nombre d'accepteur de liaisons hydrogène inférieur à 10. Les composés de la famille **D<sub>2</sub>** respectent également ces règles sauf pour le log P qui est systématiquement supérieur à 5. Toutes les molécules des deux familles présentent une estimation du passage de la BHE suffisante pour atteindre le SNC, qui est conforté par une valeur de PSA (polar surface area) inférieur à 80 Å<sup>2</sup>.<sup>279</sup> Elles présentent également toute une bonne biodisponibilité estimée, une stabilité en pH acide et une bonne solubilité (excepté pour le composé **73**). Le composé **73** présente une mauvaise solubilité estimée, cependant les produits sont testés *in vitro* sous leur forme salifiée, ce qui augmente leur solubilité. Pour les composés **37** et **57** à **60**, une probable interaction avec la glycoprotéine-P (P-GP) peut avoir lieu.

<sup>279</sup> S. A. Hitchcock *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 7559-7583

Tableau 10. Récapitulatif des propriétés ADME.

Fam.	Id	Ar	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Mw	pKa	Log P	Log D (pH = 7,4)	HBD	HBA	PSA Å <sup>2</sup>	Stab pH < 2	Sol. pH 7,4	Biodisp	BHE perm.	P-GP
D <sub>1</sub>	37	pyrrole	 n = 1		493,73	8,9	5,4	2,56	1	6	35	OK	OK	30-70 %	Suff SNC	Prob.
D <sub>1</sub>	45	pyrrole	 n = 2		507,75	10,0	5,7	1,30	1	6	35	OK	OK	30-70 %	Suff. SNC	nd
D <sub>1</sub>	46	pyrrole	 n = 2		509,72	10,0	4,9	0,91	1	7	45	OK	OK	30-70 %	Suff. SNC	nd
D <sub>1</sub>	47	pyrrole	 n = 2		522,77	10,0	4,7	0,67	1	7	37	OK	OK	30-70 %	Suff. SNC	nd
D <sub>1</sub>	48	pyrrole	 n = 2		467,69	10,0	4,9	0,66	1	6	35	OK	OK	30-70 %	Suff SNC	nd
D <sub>1</sub>	57	pyrrole	 n = 2		467,69	9,8	5,1	0,91	1	6	35	OK	OK	30-70 %	Suff. SNC	Prob.
D <sub>1</sub>	58	pyrrole	 n = 2		469,66	9,8	3,7	-0,06	1	7	45	OK	OK	30-70 %	Suff SNC	Prob.
D <sub>1</sub>	59	pyrrole	 n = 2		482,70	9,8	3,4	-0,49	1	7	39	OK	OK	30-70 %	Suff SNC	Prob.
D <sub>1</sub>	60	pyrrole	 n = 2		427,62	9,8	3,6	-0,43	1	6	35	OK	OK	30-70 %	Suff SNC	Prob.
D <sub>2</sub>	68	phényl	 n = 2	 ortho	518,77	10,0	6,4	1,40	1	5	31	OK	OK	30-70 %	Suff SNC	nd
D <sub>2</sub>	72	phényl	 n = 2	 ortho	520,75	10,0	5,6	1,91	1	6	40	OK	OK	30-70 %	Suff SNC	nd
D <sub>2</sub>	73	phényl	 n = 2	 ortho	533,79	10,0	5,3	1,33	1	6	34	OK	NO	30-70 %	Suff SNC	nd
D <sub>2</sub>	74	phényl	 n = 2	 ortho	478,71	10,0	5,9	1,11	1	5	31	OK	OK	30-70 %	Suff SNC	nd
D <sub>2</sub>	77	phényl	 n = 2	 méta	518,77	10,0	6,4	1,49	1	5	31	OK	OK	30-70 %	Suff SNC	nd
D <sub>2</sub>	78	phényl	 n = 2	 méta	478,71	10,0	5,9	1,12	1	5	31	OK	OK	30-70 %	Suff SNC	nd
D <sub>2</sub>	80	phényl	 n = 2	 para	518,77	10,0	6,4	1,49	1	5	31	OK	OK	30-70 %	Suff SNC	nd
D <sub>2</sub>	81	phényl	 n = 2	 para	478,71	10,0	5,9	1,12	1	5	31	OK	OK	30-70 %	Suff SNC	nd

pKa : constante d'acidité, Log P : coefficient de partage octanol/eau, Log D : valeur du Log P à pH 7,4, HBD : nombre de donneur de liaisons hydrogène, HBA : nombre d'accepteur de liaisons hydrogène, PSA : polar surface area, Stab. pH < 2 : stabilité à pH < 2, Sol. pH 7,4 : solubilité à pH 7,4, Biodisp. : biodisponibilité, BHE perm. : perméabilité de la BHE, Suff. : suffisant, P-GP : interaction avec la glycoprotéine-P, Prop. : probable.



#### 4. Synthèse de la famille E<sub>1</sub>

Cette nouvelle famille de composés, assez proche des familles D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> développées précédemment, permet un positionnement des deux chaînes aminées R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> en méta et non en ortho comme dans les familles D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> (Figure 122). Les groupements R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> correspondent aux amines tertiaires de type : diméthylamine, pipéridine, N-méthylpipérazine ou morpholine, comme dans le cas des familles D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub>.

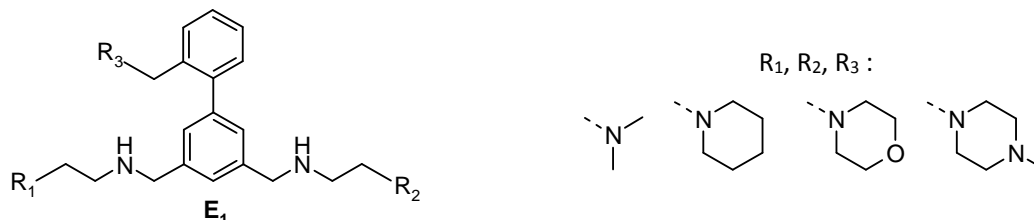


Figure 122. Structure de la famille E<sub>1</sub>.

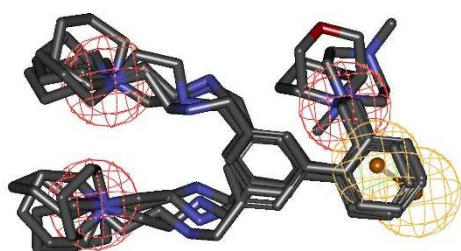


Figure 123. Superposition des composés de la famille E<sub>1</sub> réduits sur le pharmacophore.

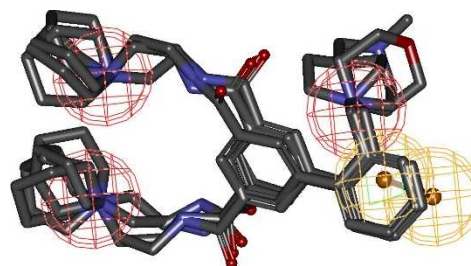


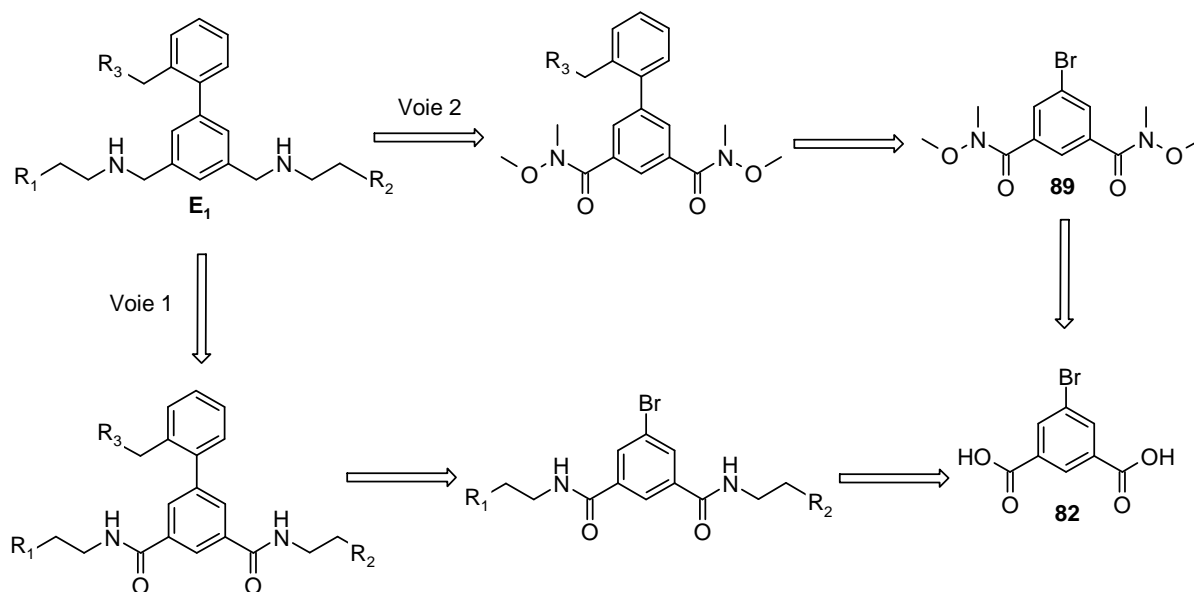
Figure 124. Superposition des composés de la famille E<sub>1</sub> non réduits sur le pharmacophore.

Une étude des composés constitués de pipéridines pour les groupements R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> et des quatre amines envisagées pour le groupement R<sub>3</sub> sur le modèle pharmacophorique montre une bonne superposition des différents composés sur le pharmacophore (Figure 123). Des analogues amides présentent également une bonne superposition (Figure 124). Un fitscore moyen de 3,7 est obtenu. Ainsi, les intermédiaires amides seront également testés *in vitro*. La pipéridine est choisie comme groupement R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>.

- **Etude rétrosynthétique**

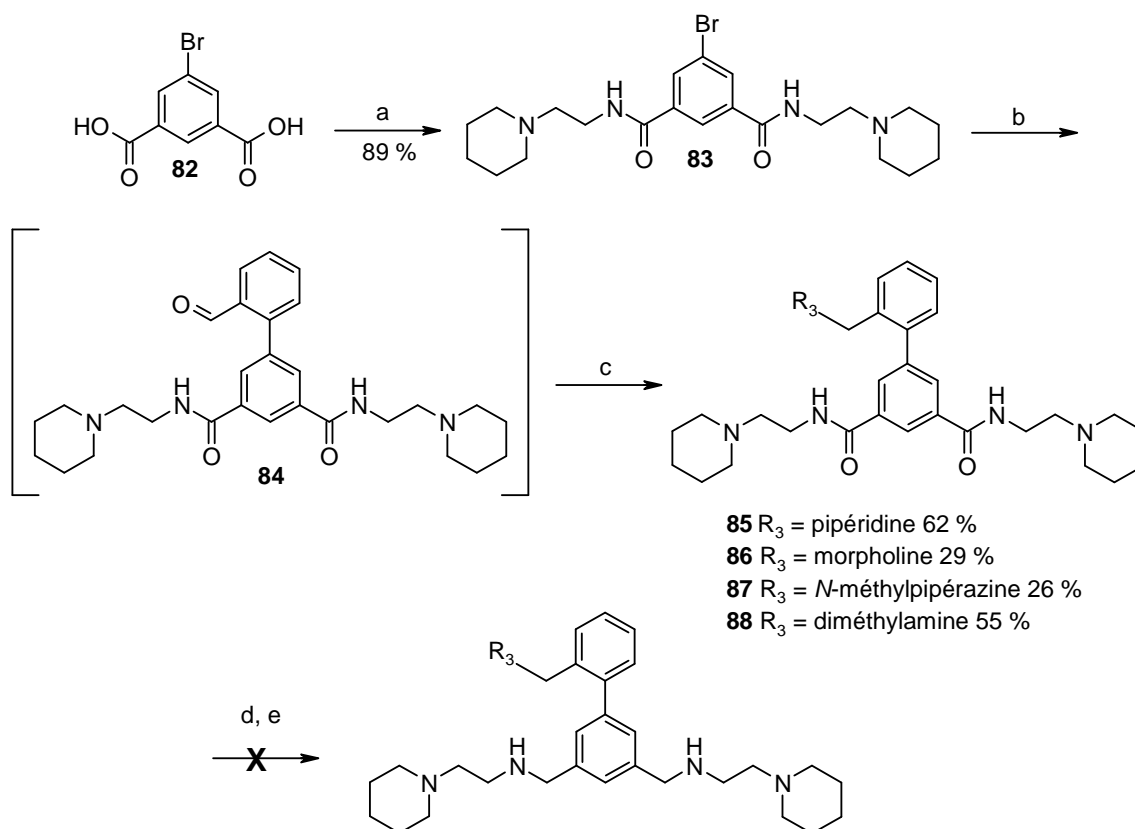
Les composés E<sub>1</sub> peuvent être obtenus selon la première voie de synthèse suite à la réduction des fonctions amides (Schéma 20). Une amination réductrice permet d'introduire le groupement R<sub>3</sub> à partir de l'aldéhyde inséré grâce à un couplage de Suzuki. Les deux chaînes aminées symétriques sont introduites *via* un couplage peptidique.

Selon la seconde voie de synthèse, les chaînes aminées sont introduites en dernière étape, ce qui permet de les moduler plus facilement. Une amination réductrice permet d'introduire les groupements amines R<sub>3</sub>. Une réaction de Suzuki est réalisée sur un dérivé bromé portant deux amides de Weinreb.


 Schéma 20. Rétrosynthèse de la famille E<sub>1</sub>.

### • Etude de la voie 1

La première étape de cette synthèse est un couplage peptidique entre l'acide 5-bromoisophthalique et la 1-pipéridineéthanamine à l'aide du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et d'hydroxybenzotriazole (HOBt) qui conduit au composé **83** avec un rendement de 89 % (Schéma 21).



Réactifs et conditions : (a) 1-pipéridineéthanamine (2,0 éq.), EDC.HCl (2,1 éq.), HOBt-H<sub>2</sub>O (0,2 éq.), DMF, 20°C, 16 h ; (b) acide 2-formylphénylboronique (1,2 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,3 éq.), P(*o*-tol)<sub>3</sub> (0,2 éq.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,02 éq.), toluène, EtOH, reflux, 18 h ; (c) amine (1,5 éq.), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (1,5 éq.), AcOH (1,5 éq.), DCE, 20°C, 29-39 h ; (d) BH<sub>3</sub>-THF (17 éq.), THF, reflux, 2 h ; (e) LiAlH<sub>4</sub> (4 éq.), THF, 20°C, 4 h.

 Schéma 21. Synthèse de la famille E<sub>1</sub>.

L'étape suivante est un couplage de Suzuki. Divers essais ont été infructueux. Il a finalement été constaté que le produit **84** est instable et se dégrade sur silice. Etant donné que le couplage est clairement mis en évidence par suivi CCM et LC-MS, le résidu obtenu après traitement est directement mis en réaction pour l'étape d'amination réductrice conduisant aux composés **85** à **88**. Une étude a été menée sur l'influence du catalyseur sur le couplage.

**Tableau 11. Réactions de Suzuki pour mener au composé **84** puis **85**.**

Catalyseur	Base	Ligand	Conditions	Rdt sur les 2 étapes
<b>Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub></b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	16 h, reflux	43 %
<b>Pd(OAc)<sub>2</sub></b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	PPh <sub>3</sub>	16 h, reflux	44 %
<b>Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub></b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	PPh <sub>3</sub>	16 h, reflux	43 %
<b>Pd(OAc)<sub>2</sub></b>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	P( <i>o</i> -tol) <sub>3</sub>	16 h, reflux	62 %

La nature du catalyseur n'a pas d'influence sur le rendement global des deux étapes (Tableau 11) car les rendements obtenus sont similaires (43-44 %). Une étude en substituant la triphénylphosphine par la P(*o*-tol)<sub>3</sub> a montré une augmentation significative du rendement (62 % contre 44 %). Ce ligand a donc été choisi pour synthétiser les autres analogues de la famille.

La réduction des fonctions amides a été tentée avec deux réducteurs, BH<sub>3</sub>-THF et LiAlH<sub>4</sub>. Le complexe de borane dans le THF a d'abord été utilisé.<sup>280</sup> Il a été constaté que le borane se complexe avec les différentes amines du composé. Afin de briser ce complexe, le brut réactionnel est dissout dans le dichlorométhane puis un excès de pipérazine est ajouté (25 éq.).<sup>281</sup> Le complexe est déplacé (formation d'un précipité). Un lavage à l'eau permet de récupérer le produit. Après lavage, le produit de départ est récupéré. Un nouvel essai a été réalisé avec du LiAlH<sub>4</sub>. Après 4 heures de réaction, une dégradation du milieu réactionnel est constatée. La seconde voie de synthèse a été étudiée afin d'obtenir les produits d'intérêt réduits.

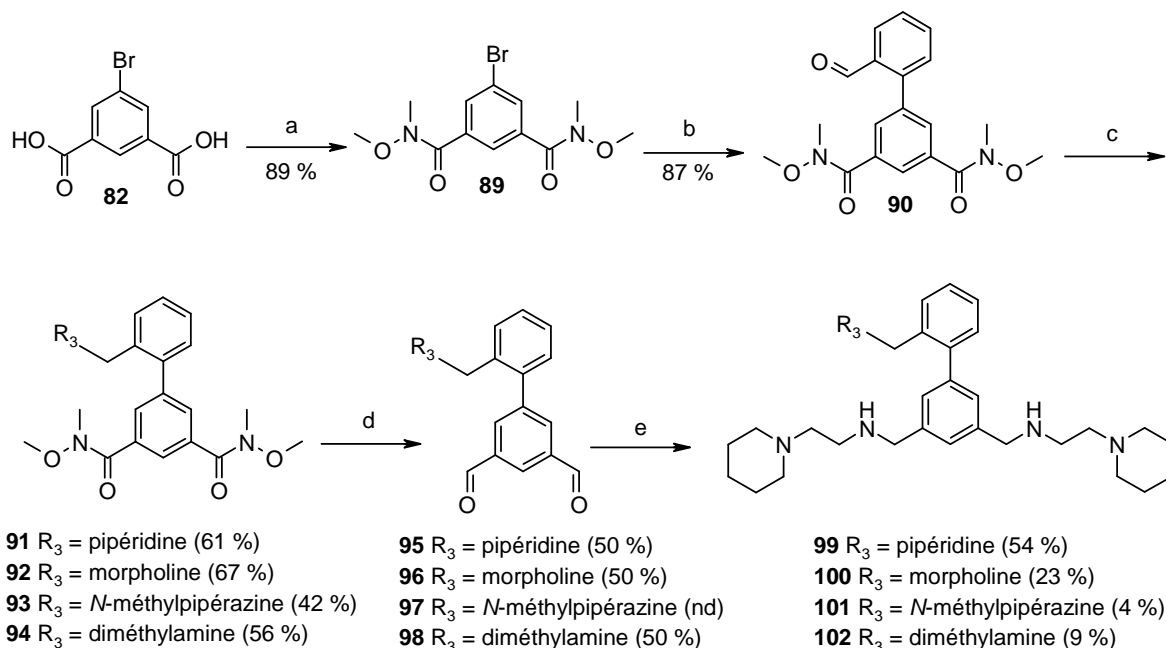
### • Etude de la voie 2

La première étape de cette synthèse est la formation des amides de Weinreb, grâce à un couplage peptidique. Le diamide **89** est obtenu avec un rendement de 89 % (Schéma 22). Le composé est ensuite utilisé pour une réaction de Suzuki, conduisant au composé **90** avec un rendement de 87 %. La formation du composé débromé **103** (Figure 125) est constatée, mais avec un faible rendement. Une amination réductrice avec les différentes amines permet de conduire aux composés **91** à **94**. Afin de favoriser la formation de l'iminium, le milieu réactionnel est chauffé à reflux du toluène avec un montage de Dean Stark. Une fois l'iminium formé, le toluène est évaporé, le résidu est repris dans le DCE et le réducteur est ajouté. Lors de l'étape de formation de l'iminium pour l'obtention du composé **94**, une probable évaporation de la diméthylamine a conduit à l'obtention du produit **104** (Figure 104). Afin d'éviter sa formation, lors de l'utilisation de la diméthylamine, l'étape du Dean Stark n'est pas réalisée, l'iminium est formé dans le DCE. Les amides sont ensuite réduits avec du LiAlH<sub>4</sub> et les composés **95**, **96** et **98** sont obtenus avec un rendement de 50 % après purification. Lors de la purification, une forte perte du produit **97** est constatée. Le brut réactionnel étant assez pur, il est directement utilisé pour l'étape d'amination réductrice. La formation de l'imine de l'amination réductrice finale est également réalisée *via* un Dean Stark. Le produit **99** est obtenu avec un rendement de 54 % mais les autres analogues **100-102** sont obtenus avec des rendements plus

<sup>280</sup> R. J. Lewis *et al.*, *Tetrahedron*, **2000**, 56, 5345-5352

<sup>281</sup> W. Watson, *What's New in Process Chemistry?*, **2008**, 23, 1

faibles de respectivement 23, 4 et 9 %. Malgré l'utilisation du Dean Stark et d'un excès de réactif, il s'est avéré difficile d'obtenir une conversion totale. De plus, des difficultés de purification ont été rencontrées.



Réactifs et conditions : (a) *N,O*-diméthylhydroxylamine.1HCl (4,2 éq.), EDC.HCl (2,6 éq.), HOBT-H<sub>2</sub>O (2,6 éq.), *N*-méthylmorpholine (13,0 éq.), ACN, DCM, 20°C, 16 h ; (b) acide 2-formylphénylboronique (1,2 éq.), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,3 éq.), P(*o*-tol)<sub>3</sub> (0,2 éq.), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,02 éq.), toluène, EtOH, reflux, 18 h ; (c) amine (1,5 éq.), toluène, reflux, 1 h (pas pour **94**) puis NaBH(OAc)<sub>3</sub> (1,5 éq.), AcOH (1,5 éq.), DCE, 20°C, 15 h ; (d) LiAlH<sub>4</sub> (1,9 éq.), THF anhydre, 0°C, 1 h ; (e) 1-pipéridineéthylamine (3,0 éq.), toluène, reflux, 1 h puis, NaBH(OAc)<sub>3</sub> (3,0 éq.), AcOH (3,0 éq.), DCE, 20°C, 16 h .

Schéma 22. Schéma de synthèse des produits réduits 99-102.



Figure 125. Structure des produits secondaires formés durant la synthèse.

## 5. Synthèse de la famille E<sub>2</sub>

La famille E<sub>2</sub> est proche de la famille E<sub>1</sub>. Un azote est introduit entre les deux aromatiques afin de permettre plus de flexibilité dans la structure et d'espacer les deux aromatiques.

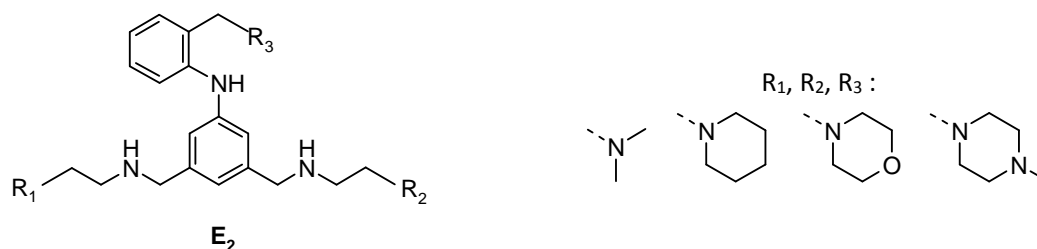


Figure 126. Structure générale de la famille E<sub>2</sub>.

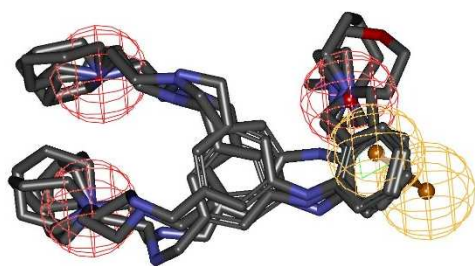


Figure 127. Superposition des composés de la famille E<sub>2</sub> réduits sur le pharmacophore.

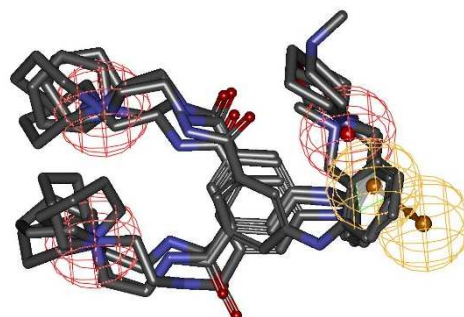


Figure 128. Superposition des composés de la famille E<sub>2</sub> non réduits sur le pharmacophore.

De la même manière que pour la famille E<sub>1</sub>, un superposition sur le pharmacophore de composés constitués de pipéridines pour les groupements R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> et des quatre amines envisagées pour le groupement R<sub>3</sub> montre une bonne superposition des différents composés sur le modèle pharmacophorique (Figure 127). Ici aussi les analogues amides présentes une bonne superposition (Figure 128). Un fitscore moyen de 3,7 est obtenu. Ainsi, les intermédiaires amides seront également testés *in vitro*.

### • Etude rétrosynthétique

Selon la voie 1 du schéma de rétrosynthèse (Schéma 23), les amides sont réduits en dernière étape suite à une réaction de Buchwald sur le dérivé bromé **83** utilisé lors de la synthèse de la famille E<sub>1</sub>. Selon la seconde voie de synthèse, les chaînes aminées R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> sont introduites en dernière étape, après réduction d'amide de Weinreb. Une réaction de Buchwald sur le diamide bromé **89** également utilisé lors de la synthèse de la famille E<sub>1</sub> permet d'introduire le groupement R<sub>3</sub>. Les 2-(amine-1-ylméthyl)anilines communes aux deux voies sont obtenues suite à une amination réductrice sur le 2-nitrobenzaldéhyde.

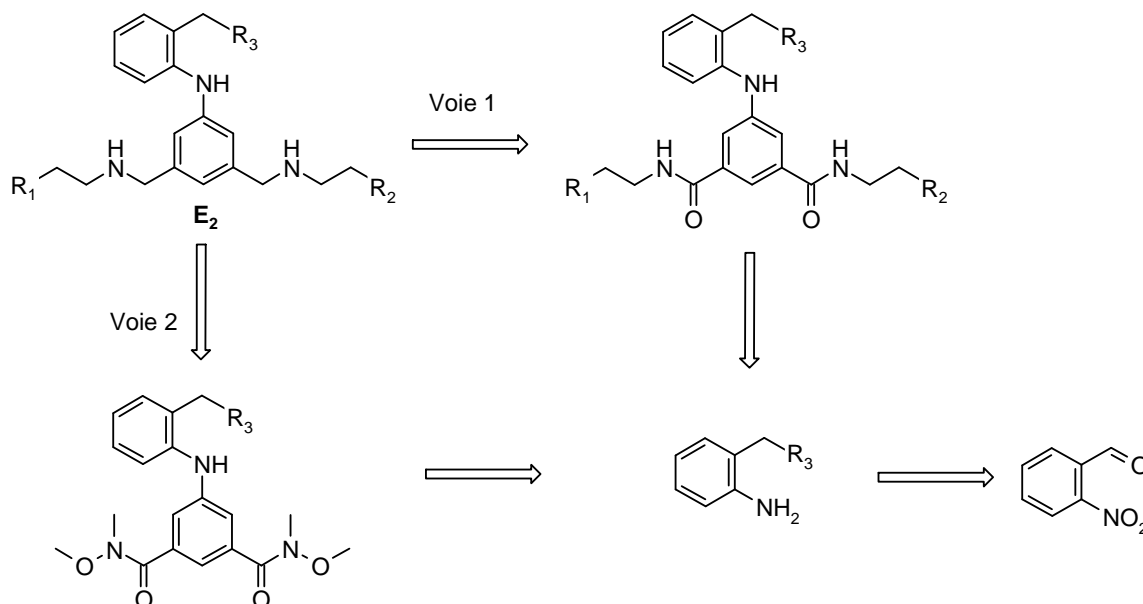


Schéma 23. Rétrosynthèse de l'obtention des composés de la famille E<sub>2</sub>.

### • Etude de la voie 1

La première étape de cette synthèse est la formation des composés 1-[(2-nitrophényl)méthyl]amines. La mise au point de la synthèse a été réalisée avec la pipéridine (Schéma 24). Plusieurs essais ont été réalisés (Tableau 12). Un premier essai avec le NaBH(OAc)<sub>3</sub> n'a pas permis d'obtenir

le produit, le produit de départ est récupéré. Un autre essai avec le  $\text{NaBH}_4$  conduit à la formation du produit désiré mais également à l'alcool **107** majoritaire. De plus, la réaction n'est pas complète. Lorsque le  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  est utilisé, le produit **106** est obtenu majoritairement, la réaction est complète mais l'alcool est également formé. Finalement, lorsque du  $\text{ZnCl}_2$  est ajouté au milieu réactionnel, la réaction est complète et seul le composé **106** est obtenu.<sup>282</sup> Le  $\text{ZnCl}_2$  formerait un complexe avec le  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ . Le nouveau complexe formé, dont la structure reste encore non identifiée, conduit à la réduction des iminiums plus rapidement que celle des aldéhydes.<sup>283</sup> Cette méthode est utilisée pour obtenir les autres analogues de la série.

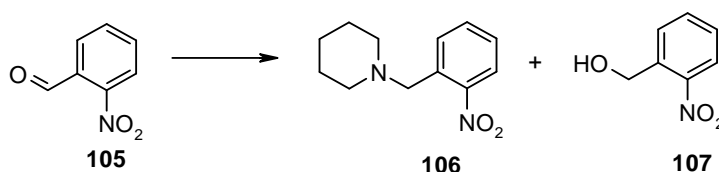
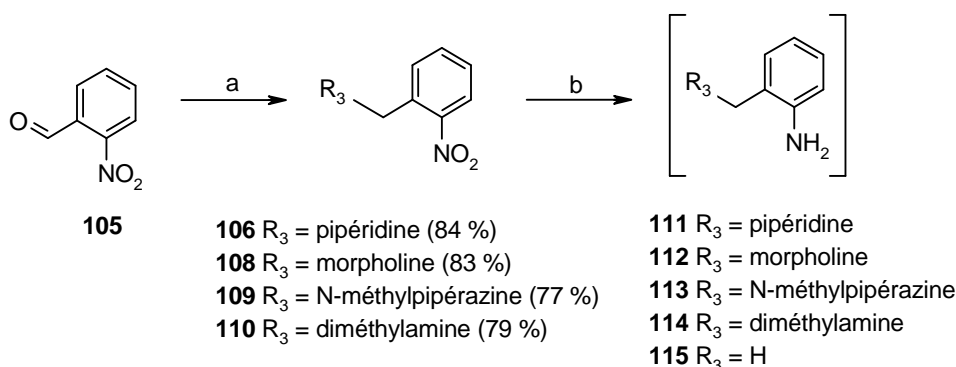


Schéma 24. Synthèse de la 1-[(2-nitrophényl)méthyl]pipéridine **106**.

Tableau 12. Essais d'obtention du composé **106**.

Réducteur	Solvant	105	106	107
$\text{NaH}(\text{OAc})_3$	DCE	100 %	0	0
$\text{NaBH}_4$	DCE	20 %	27 %	46 %
$\text{NaBH}_3\text{CN}$	DCE	0	47 %	34 %
$\text{NaBH}_3\text{CN} + \text{ZnCl}_2$	DCE	0	85 %	0

Les différentes 1-[(2-nitrophényl)méthyl]amine **106**, **108-110** ont été obtenues avec des rendements similaires compris entre 77 et 85 % (Schéma 25). Le groupement nitro est ensuite réduit avec du Pd/C en présence de formiate d'ammonium dans l'éthanol. Le temps de réaction est d'une heure pour les composés **106**, **108** et **109**. Le composé **110** est obtenu en 30 minutes. Si cette dernière réaction n'est pas traitée rapidement, une élimination de l'amine est constatée, conduisant à la 2-méthylaniline. Les anilines obtenues étant très instables, le brut réactionnel est utilisé directement pour la réaction de Buchwald suivante.



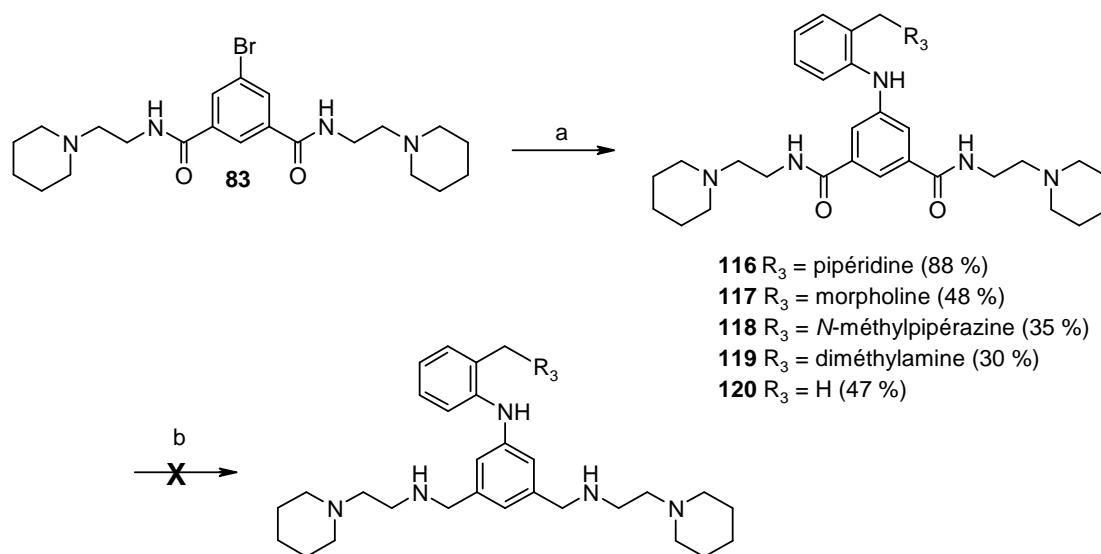
Réactifs et conditions : (a) amine (1,5 éq.),  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (1,5 éq.),  $\text{ZnCl}_2$  (1 éq.), DCE, 20°C, 19 h ; (b) Pd/C 10 % (0,07 éq.), formiate d'ammonium (7,0 éq.), EtOH, 20°C, 30-60 min.

Schéma 25. Synthèse des 2-(amine-1-ylméthyl)anilines.

<sup>282</sup> L. Peng et al., *Angew. Chem. Int. Edit.*, **1997**, 36, 398-400

<sup>283</sup> S. Kim et al., *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 1927-1932

Une fois les 2-(amine-1-ylméthyl)anilines obtenues, elles sont directement utilisées dans la réaction de Buchwald conduisant aux produits **116** à **120** (Schéma 26). Des tentatives de réduction des amides ont été réalisées avec du  $\text{LiAlH}_4$  mais une dégradation du milieu réactionnel a également été constatée pour ces produits.



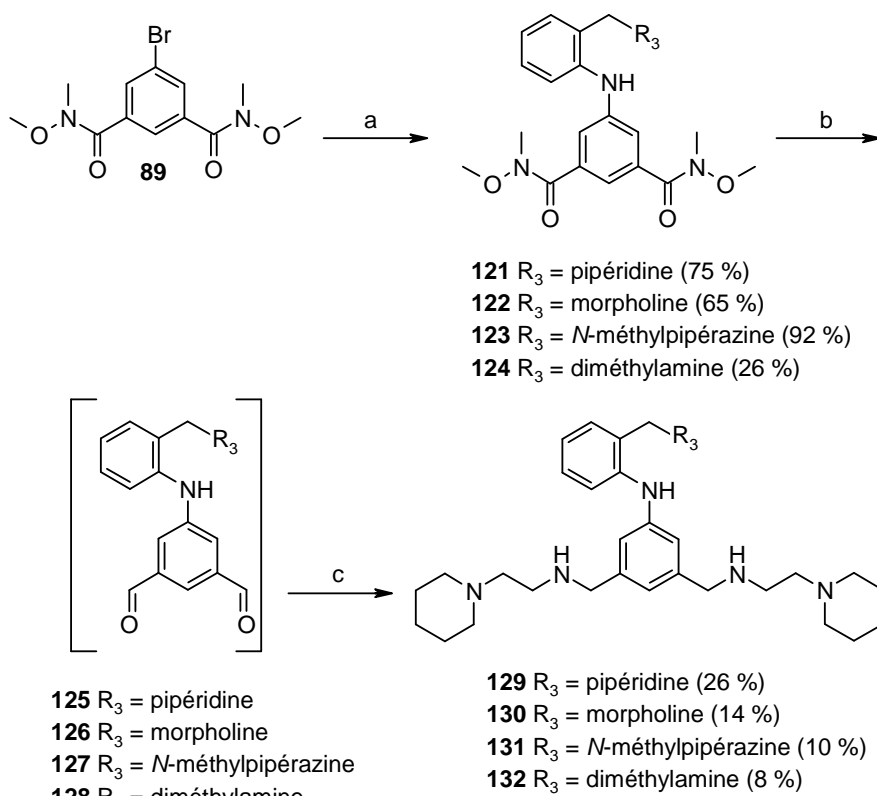
Réactifs et conditions : (a) 2-(amine-1-ylméthyl)aniline (1,2 éq.),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (1,4 éq.), Xantphos (0,15 éq.),  $\text{Pd}_2\text{dba}_3$  (0,05 éq.), dioxane, reflux, 16 h ; (b)  $\text{LiAlH}_4$  (4 éq.), THF, 20°C, 4 h.

**Schéma 26. Synthèse des composés amides 116-120.**

L'obtention des produits réduits *via* des amides de Weinreb a alors été mise en œuvre selon la seconde voie de synthèse.

### • Etude de la voie 2

Selon cette voie de synthèse, une réaction de Buchwald à partir du composé **89** permet d'obtenir les composés **121** à **123** avec des rendements compris entre 65 et 92 % (Schéma 27). Le composé **124** est obtenu avec un rendement plus faible qui peut s'expliquer par une instabilité plus élevée de la 2-[(diméthylamino)méthyl]aniline. Les amides de Weinreb sont ensuite réduits avec du  $\text{LiAlH}_4$  pour conduire aux composés **125** à **128**. Afin d'éviter une perte de produit lors de la purification étant donné l'instabilité des dialdéhydes, les composés sont directement utilisés pour la diamination réductrice sans purification préalable. Les composés **129** à **132** sont obtenus avec de faibles rendements (8-26 %). Pour cette famille aussi il est difficile d'obtenir une réaction totale et des difficultés de purification ont également été rencontrées.

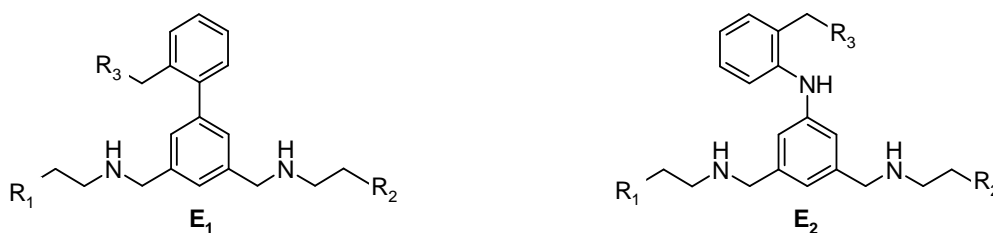


Réactifs et conditions : (a) 2-(amine-1-ylméthyl)aniline (1,2 éq.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,4 éq.), Xantphos (0,15 éq.), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (1,2 éq.), dioxane, reflux, 16 h ; (b) LiAlH<sub>4</sub> (1,9 éq.), THF, 0°C, 1 h ; (c) 1-pipéridineéthanamine (3,0 éq.), toluène, reflux, 1 h puis NaBH(OAc)<sub>3</sub> (3,0 éq.), AcOH (3,0 éq.), DCE, 20°C, 15 h .

Schéma 27. Schéma de synthèse des composés 129 à 132.

## 6. Evaluation biologique des familles E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>

### • Tests *in vitro*



La capacité d'inhibition de la formation des peptides Aβ<sub>40</sub> et Aβ<sub>42</sub> a été quantifiée pour les différents composés. Malgré des fitscores élevés, la majorité des composés de la famille E<sub>1</sub> semblent inactifs à 10 μM. Seul le composé **85**, composé d'un amide et de la pipéridine pour groupement R<sub>3</sub> présente une capacité d'inhibition de la formation des peptides Aβ<sub>40</sub> et Aβ<sub>42</sub> modérée. En ce qui concerne la famille E<sub>2</sub>, les composés non réduits **116** et **119** présentent une capacité d'inhibition modérée alors que les composés **117** et **118** sont inactifs. Lorsque les amides sont réduits, les composés présentent une inhibition de la formation des peptides Aβ<sub>40</sub> et Aβ<sub>42</sub> modérée sauf pour un groupement R<sub>3</sub> équivalent à une pipérazine, le composé **131**, qui est inactif. Le composé **120**, qui ne possède pas les trois positions ionisables essentielles au pharmacophore présente un fitscore nul. Cependant, ce composé conduit à une diminution de la formation des peptides Aβ<sub>40</sub> et Aβ<sub>42</sub>. Ceci conforte l'hypothèse que l'amine R<sub>3</sub> n'est pas essentielle à l'activité biologique. Pour ces familles de composés, il est également constaté une absence de corrélation entre le fitscore et l'efficacité *in vitro* des composés.

Excepté le composé **130**, les composés ne présentent pas de cytotoxicité.



Tableau 13. Récapitulatif de l'évaluation biologique des composés des familles E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub>.

Familie	Composé	Structure	R <sub>1</sub> /R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	ModMol	Toxicité	Métabolisme APP	
					FitScore (/4)	% d'inhibition à 100 µM	IC <sub>50</sub> (µM)	Aβ <sub>40</sub>
E <sub>1</sub>	85	amide			3,6	5 %	6,2	9,4
E <sub>1</sub>	86	amide			3,8	1 %	> 10	> 10
E <sub>1</sub>	87	amide			3,7	7 %	> 10	> 10
E <sub>1</sub>	88	amide			3,8	1 %	> 10	> 10
E <sub>1</sub>	93	amine			3,7	0	> 10	> 10
E <sub>1</sub>	94	amine			3,8	8 %	> 10	> 10
E <sub>1</sub>	95	amine			3,8	3 %	> 10	> 10
E <sub>1</sub>	96	amine			3,7	1 %	> 10	> 10
E <sub>2</sub>	116	amide			3,6	1 %	4,1	4,7
E <sub>2</sub>	117	amide			3,7	0 %	> 10	> 10
E <sub>2</sub>	118	amide			3,5	11 %	> 10	> 10
E <sub>2</sub>	119	amide			3,8	0 %	8,2	10,6
E <sub>2</sub>	120	amide		H	0	0 %	6,3	6,6
E <sub>2</sub>	129	amine			3,8	45 %	4,6	6,0
E <sub>2</sub>	130	amine			3,8	CC <sub>50</sub> = 77 µM	6,6	7,9
E <sub>2</sub>	131	amine			3,9	0 %	> 10	> 10
E <sub>2</sub>	132	amine			3,9	2 %	9,7	> 10
Chloroquine					nd	CC <sub>50</sub> = 30 µM	7,0	12,7
AZP2006					nd	CC <sub>50</sub> = 30 µM	2,0	1,5

### • Estimation des propriétés ADME

Le calcul des propriétés ADME des composés a été réalisé à partir des formes bases. Les composés respectent les règles de Lipinski avec un log P inférieur à 5, un nombre de donneur de liaisons H inférieur à 5 et un nombre d'accepteur de liaison H inférieur à 10. Certains des composés présentent cependant une valeur de masse molaire supérieure à 500 g/mol. Deux composés sont prédits inactifs sur le SNC et présentent une PSA supérieur à 80 Å<sup>2</sup>. Tous les composés sont prédits stables en milieu acide. Les composés de la famille E<sub>1</sub> sont tous prédits solubles. Les composés de la familles E<sub>2</sub> comportant pour groupement R<sub>3</sub> une pipéridine, une morpholine ou une diméthylamine sont prédits insolubles. Cependant, les composés salifiés sont utilisés pour les tests biologiques, ce qui permet d'avoir une bonne solubilité. Une bonne biodisponibilité et une possible interaction avec la P-GP sont également prédits.

Tableau 14. Récapitulatif de l'estimation des propriétés ADME.

Id	Struct.	R <sub>1</sub> /R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Mw	pKa	Log P	Log D (pH=7,4)	HBD	HBA	PSA Å <sup>2</sup>	Stab pH < 2	Sol. pH 7,4	Biodisp	BHE perm.	P-GP
85 E <sub>1</sub>	amide			559,78	9,1	4,9	1,34	2	7	68	OK	OK	30-70%	Suff. SNC	Prob.
86 E <sub>1</sub>	amide			561,76	9,1	3,8	1,10	2	8	77	OK	OK	30-70%	Suff. SNC	Prob.
87 E <sub>1</sub>	amide			574,80	9,1	3,9	0,86	2	8	71	OK	OK	30-70%	Suff. SNC	Prob.
88 E <sub>1</sub>	amide			519,72	9,1	4,3	0,88	2	7	68	OK	NO	30-70%	Suff. SNC	Prob.
93 E <sub>1</sub>	amine			531,82	9,5	5,3	1,04	2	5	34	OK	OK	30-70%	Suff. SNC	Prob.
94 E <sub>1</sub>	amine			533,79	9,4	4,2	0,78	2	6	43	OK	OK	30-70%	Suff. SNC	Prob.
95 E <sub>1</sub>	amine			546,83	9,4	4,1	0,38	2	6	37	OK	OK	30-70%	Suff. SNC	Prob.
96 E <sub>1</sub>	amine			491,75	9,4	4,5	0,41	2	5	34	OK	OK	30-70%	Suff. SNC	Prob.
116 E <sub>2</sub>	amide			574,80	9,3	4,6	0,43	3	8	80	OK	NO	30-70%	Suff. SNC	Prob.
117 E <sub>2</sub>	amide			576,77	9,1	3,6	0,72	3	9	89	OK	NO	30-70%	SNC Inact.	Prob.
118 E <sub>2</sub>	amide			589,81	9,1	3,6	0,47	3	9	83	OK	OK	30-70%	SNC Inact.	Prob.
119 E <sub>2</sub>	amide			534,73	9,2	3,9	-0,03	3	8	80	OK	NO	30-70%	Suff. SNC	Prob.
120 E <sub>2</sub>	amide		H	491,67	9,1	4,3	1,58	3	7	77	OK	OK	30-70%	Suff. SNC	Prob.
129 E <sub>2</sub>	amine			546,83	9,6	4,8	-0,12	3	6	46	OK	NO	30-70%	Suff. SNC	Prob.
130 E <sub>2</sub>	amine			548,80	9,5	3,9	0,21	3	7	55	OK	NO	30-70%	Suff. SNC	Prob.
131 E <sub>2</sub>	amine			561,85	9,5	3,9	-0,07	3	7	49	OK	OK	30-70%	Suff. SNC	Prob.
132 E <sub>2</sub>	amine			506,77	9,6	4,2	-0,56	3	6	46	OK	NO	30-70%	Suff. SNC	Prob.

Fam. : famille, Id. : numéro d'identification du composé, Mw : masse moléculaire, pKa : constante d'acidité, Log P : coefficient de partage octanol/eau, Log D : valeur du Log P à pH 7,4, HBD : nombre de donneur de liaisons hydrogène, HBA : nombre d'accepteur de liaisons hydrogène, PSA : polar surface area, Stab. pH < 2 : stabilité à pH inférieur à 2, Sol. pH 7,4 : solubilité à pH 7,4, Biodisp. : biodisponibilité, BHE perm. : perméabilité de la BHE, Suff. : suffisant, inact. : non perméable à la BHE, P-GP : interaction avec la glycoprotéine-P, Prop. : probable.

Lors de cette thèse, quatre familles de ligands ont été développées. Les familles D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> présentent un bon potentiel au vue des résultats biologiques encourageants obtenus. Les familles E<sub>1</sub> et E<sub>2</sub> présentent une plus faible capacité d'inhibition de la formation des peptides Aβ<sub>40</sub> et Aβ<sub>42</sub>. Les prédictions ADME sont plutôt favorables pour les quatres familles.

**CHAPITRE 6 :**  
**Conception et synthèse de composés mixtes**  
**MSBD-IChE**

La MA étant une maladie multifactorielle, la mise au point de composés ayant des sites d'action multiples est récemment devenue une des orientations de recherche préconisées.<sup>60</sup> Comme il a été décrit dans le chapitre 1, de plus en plus de composés mixtes sont conçus. Des études menées sur les IACHÉ commercialisés pour leurs effets bénéfiques sur les symptômes de la maladie ont révélé leurs activités neuroprotectrices. Le donépézil en particulier est capable *in vitro* et *in vivo* d'inhiber la formation des peptides A $\beta$  et leur agrégation.<sup>284, 285, 286</sup> Le laboratoire s'est intéressé à la mise au point de composés mixtes en associant des IACHÉ avec la famille MSBD.

### A. Rationnel des composés mixtes

Suites aux résultats très encourageant obtenus avec l'AZP2006, le laboratoire a choisi de s'intéresser à la synthèse de composés mixtes alliant l'activité anti A $\beta$  et Tau et l'effet sur l'autophagie de la famille MSBD et une activité cholinergique avec des IACHÉ actuellement sur le marché.

Ainsi la chaîne MSBD a été couplée avec deux IACHÉ disponibles commercialement : la tacrine et un analogue de la rivastigmine (Figure 129). Le remplacement de la partie aromatique de la famille MSBD par une 1,2,3,4-tétrahydroacridine (produit **RPEL**) ou par un 3-méthylphényl *N,N*-diméthylcarbamate (produit **MAG**) est le plus à même de respecter les RSA établies pour cette famille (Figure 42, page 50). De plus, la synthèse des composés semblait plus simple avec ces deux IACHÉ, qu'avec la galantamine.

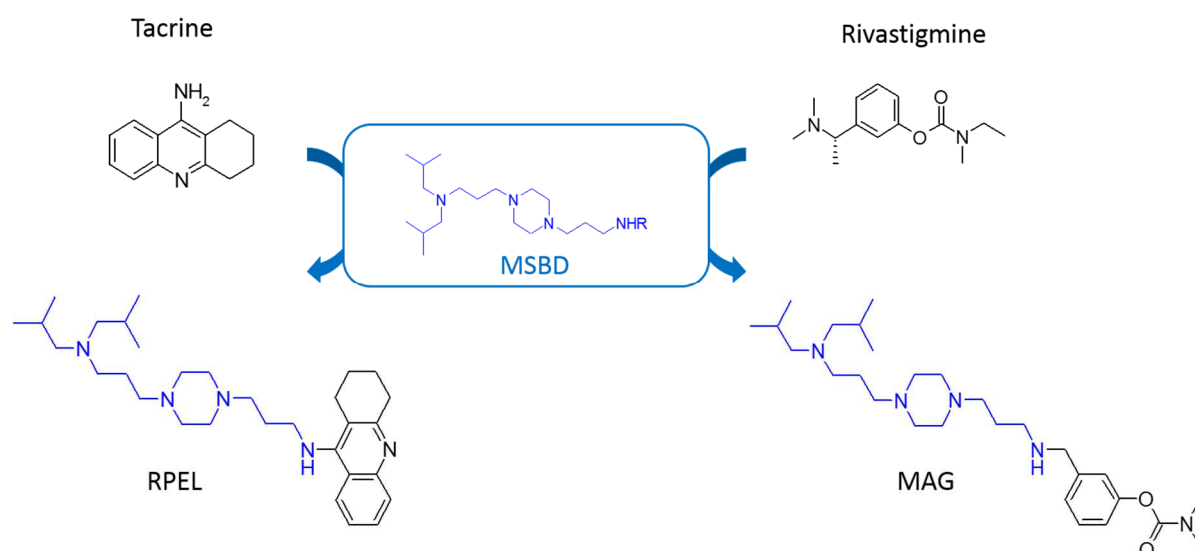


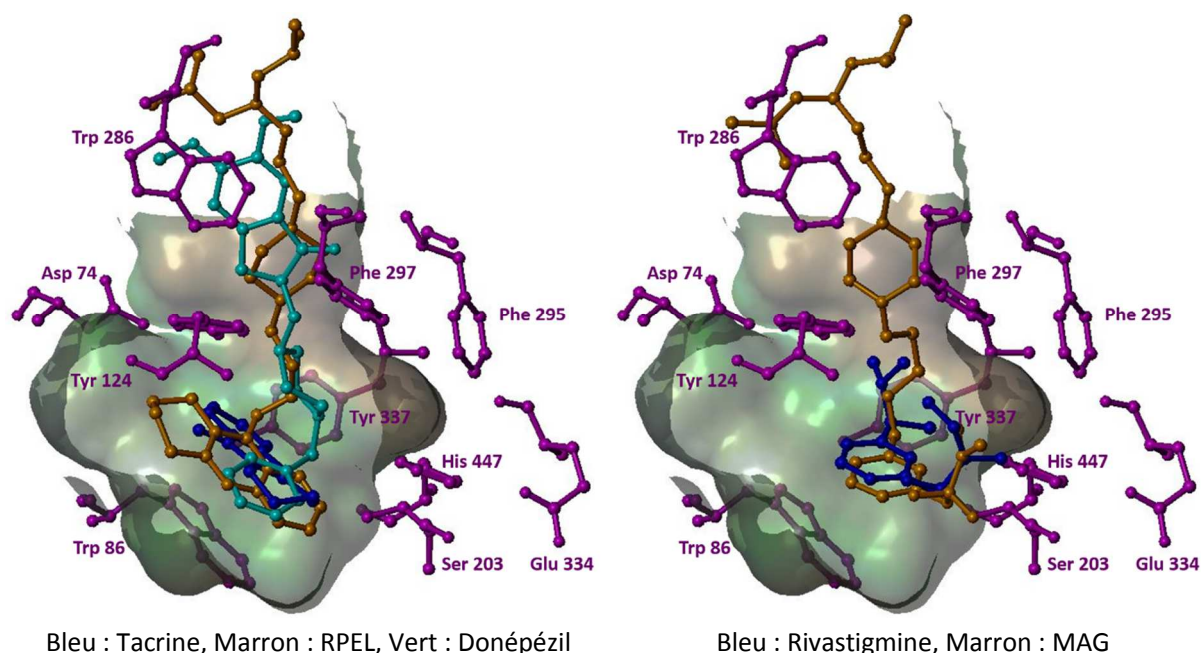
Figure 129. Rationnel des composés mixtes.

Une étude de modélisation moléculaire a été menée pour déterminer la position susceptible d'être adoptée par les composés dans la poche de l'enzyme (Figure 130) (PDB 4YE7).

<sup>284</sup> M. Kimura *et al.*, *Neurosci. Lett.*, **2005**, 391, 17-21

<sup>285</sup> M. Kimura *et al.*, *Brain Res.*, **2005**, 1047, 72-84

<sup>286</sup> E. Conti *et al.*, *Neurosci. Lett.*, **2010**, 486, 193-196



**Figure 130. Positionnement des composés RPEL et MAG dans la poche de l'ACHé.**

Le composé **RPEL** se positionne de façon très similaire au donépézil. La partie tricycle aromatique se place au fond de la poche catalytique de l'enzyme en interaction hydrophobe avec le Trp86, comme la tacrine. La longue chaîne aminée parcourt toute la gorge de l'enzyme pour interagir avec le site périphérique, mimant la position du donépézil. La rivastigmine, un inhibiteur irréversible, interagit avec la triade catalytique du fond de la gorge de l'enzyme, composée de la Ser 203, Glu 334 et His 447.<sup>287</sup> La partie **MAG** mimant celle-ci présente un positionnement similaire. La chaîne aminée, comme pour le **RPEL**, parcourt la gorge de l'enzyme pour interagir avec le site périphérique.

### ***B. Synthèse des composés mixtes***

Les deux composés mixtes peuvent être obtenus *via* la synthèse d'un intermédiaire commun **138** obtenu à partir de la 3-[4-(3-aminopropyl)piperazin-1-yl]propan-1-amine (**17**) commerciale (Schéma 28). Le précurseur de la partie tacrine (**134**) est synthétisé *via* une cyclisation à partir de l'acide 2-aminobenzoïque (**133**). Le précurseur de la partie rivastigmine (**136**) est quant à lui obtenu à partir du 3-hydroxybenzaldéhyde (**135**).

<sup>287</sup> A. Shafferman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 17640-17648

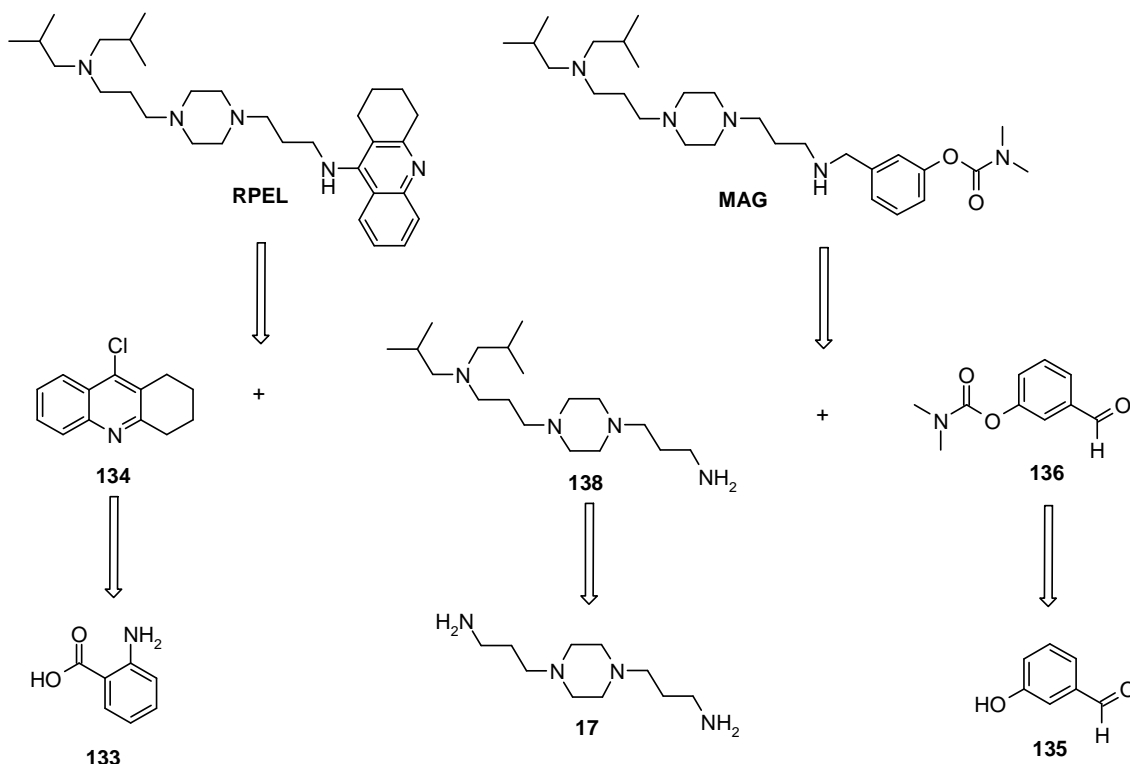
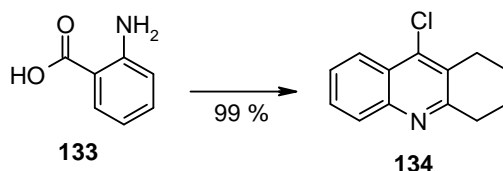


Schéma 28. Rétrosynthèse des composés mixtes.

La 9-chloro-1,2,3,4-tétrahydroacridine **134** est obtenue avec un rendement de 99 % suite à une cyclisation et une condensation entre l'acide 2-aminobenzoïque **133** et la cyclohexanone (Schéma 29).<sup>288</sup>



Réactifs et conditions : cyclohexanone (1,0 éq.), POCl<sub>3</sub> (3,6 éq.), 2 h, reflux.

Schéma 29. Synthèse du précurseur tacrine.

Le mécanisme de formation de la 9-chloro-1,2,3,4-tétrahydroacridine **134** proposé est représenté Schéma 30. La fonction amine de l'acide 2-aminobenzoïque attaque la cétone de la cyclohexanone. Suite à l'attaque de la fonction acide et à l'élimination d'une molécule d'eau, un ester spiro-carbinolamine est formé. Un réarrangement conduit à l'ouverture du cycle régénérant la fonction acide et formant une imine. Le POCl<sub>3</sub> réagit avec l'oxygène de la fonction acide et l'attaque de la double liaison conduit à la fermeture de cycle par élimination de PO<sub>2</sub>Cl. Un deuxième équivalent de POCl<sub>3</sub> réagit avec la cétone, son élimination induite par l'attaque d'un ion chlorure conduit à la formation de la 9-chloro-1,2,3,4-tétrahydroacridine **134**.

<sup>288</sup> M.-K. Hu, *J. Pharm. Pharmacol.*, **2001**, 53, 83-88

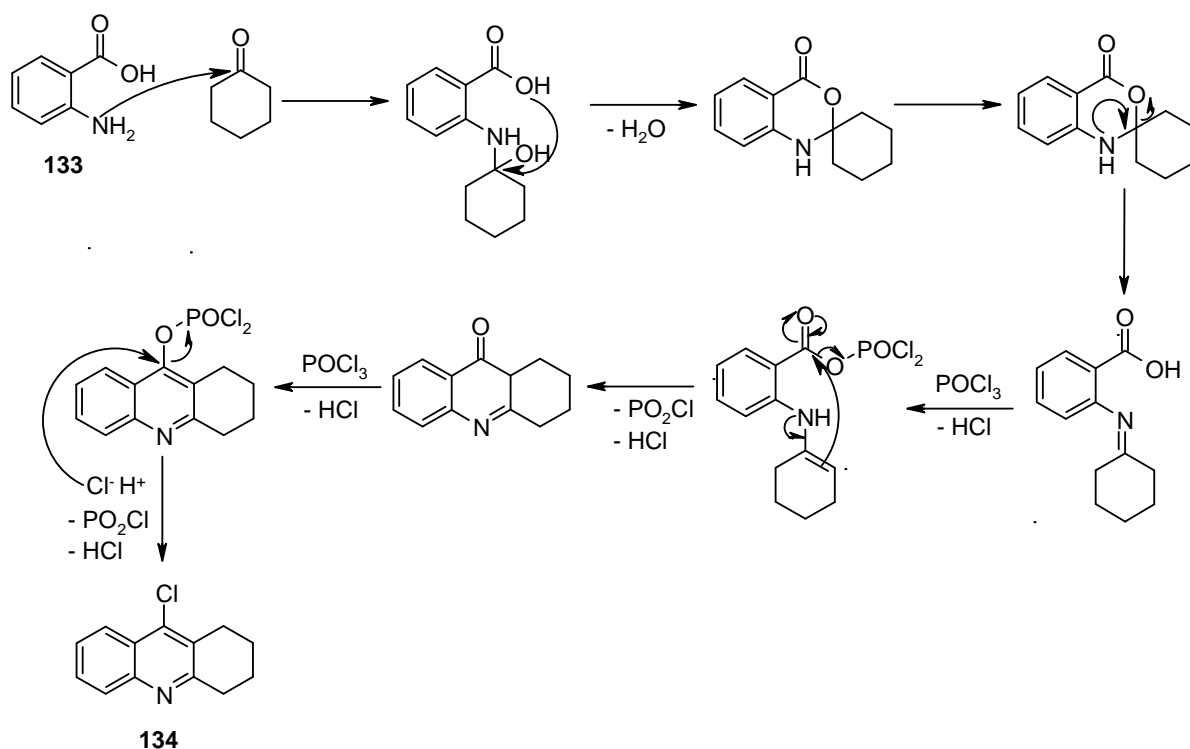
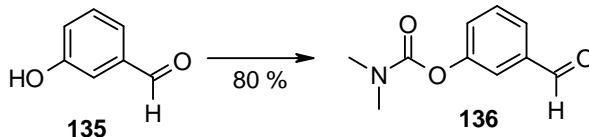


Schéma 30. Mécanisme de formation de la 9-chloro-1,2,3,4-tétrahydroacridine.

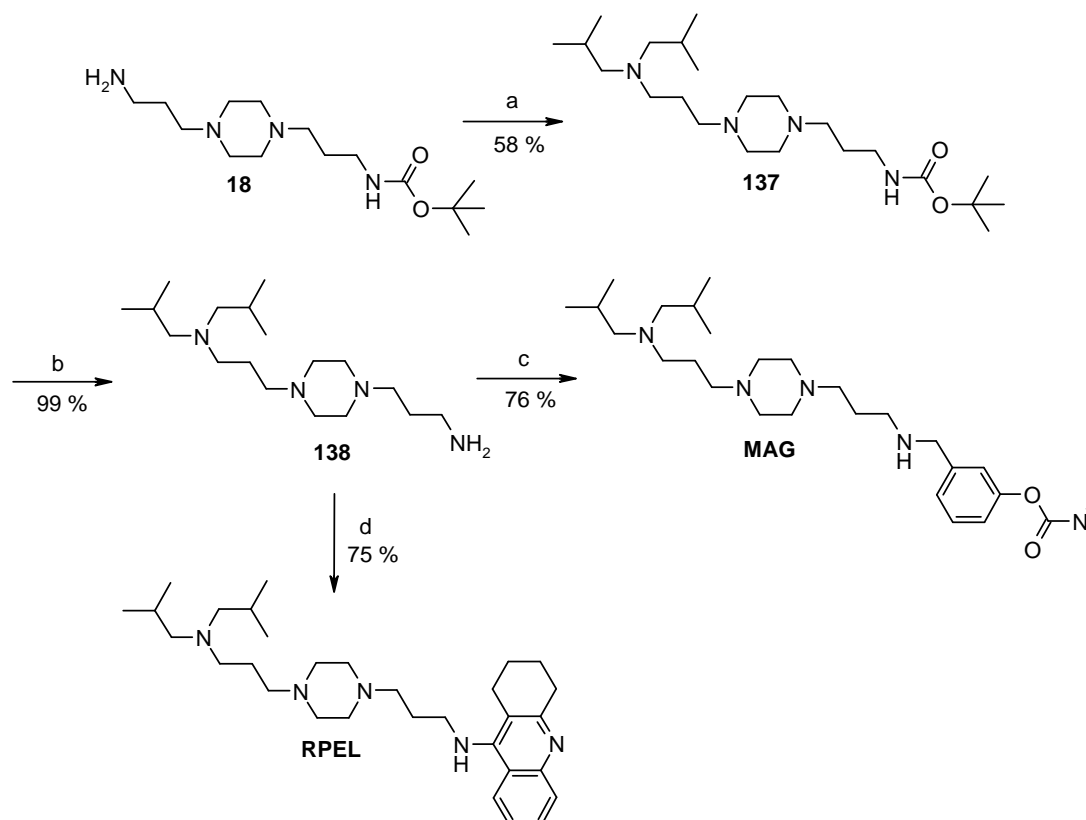
La partie mimant la rivastigmine est obtenue à partir du 3-hydroxybenzaldehyde **135** avec un rendement de 80 % (Schéma 31).



Réactifs et conditions : chlorure de diméthylcarbamoyl (1,2 éq.), pyridine, 90°C, 3 h.

Schéma 31. Synthèse du précurseur rivastigmine.

Suivant le schéma de synthèse d'obtention des composés, la 3-[4-(3-aminopropyl)pipérazin-1-yl]propan-1-amine monoprotégée **18**, obtenue lors de la synthèse des sondes (Schéma 1, page 77), est utilisée comme produit de départ (Schéma 32). Celle-ci subit alors une diamination réductrice permettant d'introduire les chaînes isobutyles caractéristiques de la famille MSBD (**137**).<sup>263</sup> Le groupement Boc est déprotégé dans du dioxane saturé d' $\text{HCl}_g$  ce qui conduit à la formation de l'intermédiaire commun **138**. Selon une amination réductrice avec le 3-formylphényl *N,N*-diméthylcarbamate, le composé conduit à la formation du produit **MAG** avec un rendement de 76 %. Si l'intermédiaire commun **138** subit une réaction de Buchwald avec le précurseur chloré 9-chloro-1,2,3,4-tétrahydroacridine **134**, le composé **RPEL** est obtenu avec un rendement de 75 %.



Réactifs et conditions : (a) isobutyraldéhyde (3,0 éq.), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (3,0 éq.), DCM, 20°C, 3 j ; (b) HCl<sub>g</sub> dans dioxane, 20°C, 4 h, puis MeOH(NH<sub>3</sub>), 20°C, 16 h ; (c) 3-formylphényl-*N,N*-diméthylcarbamate (1,1 éq.), NaBH<sub>4</sub> (6,5 éq.), MeOH, 20°C, 2 j ; (d) 9-chloro-1,2,3,4-tétrahydroacridine (0,5 éq.), (+/-) BINAP (0,15 éq.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,8 éq.), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (0,3 éq.), dioxane, reflux, 12 h.

Schéma 32. Synthèse des composés mixtes RPEL et MAG.

### C. Evaluation *in vitro* des composés mixtes

#### 1. Action sur l'acétylcholinestérase (Pr. Dallemagne, CERMN de Caen (EA4258))

L'IC<sub>50</sub> des composés a été déterminée sur l'AChE d'*Electrophorus electricus* (*EeAChE*) et sur l'AChE humaine (*hAChE*) (Tableau 15). Les composés **MAG** et **RPEL** ont une IC<sub>50</sub> de respectivement 738 et 1,27 nM sur *EeAChE*. Le composé **MAG** présente une IC<sub>50</sub> de 398 nM et une valeur de 0,84 nM est obtenue pour le **RPEL** sur l'AChE humaine (*hAChE*). A titre de comparaison, l'IC<sub>50</sub> de la rivastigmine est de l'ordre de 3 030 nM et celle de la tacrine vaut 424 nM.<sup>110</sup> Ainsi, ces composés mixtes présentent une meilleure capacité d'inhibition de l'AChE que l'AChE de base, le RPEL étant 500 fois plus efficace que la tacrine et le MAG 8 fois plus que la rivastigmine.

Tableau 15. Récapitulatif des résultats d'inhibition de l'AChE.

Molécule	IC <sub>50</sub> <i>EeAChE</i> (nM)	IC <sub>50</sub> <i>hAChE</i> (nM)
<b>MAG</b>	738 ± 7	398 ± 25
<b>RPEL</b>	1,27 ± 0,05	0,84 ± 0,15
<b>Donépézil</b>	11 ± 2	4,8 ± 0,6
<b>Rivastigmine</b>		3030 <sup>289</sup>
<b>Tacrine</b>		424 <sup>289</sup>

<sup>289</sup> M. L. Bolognesi *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 4882-4897



## 2. Cytotoxicité (Dr N. Sergeant)

Une étude de cytotoxicité des composés a été réalisée. Des cellules SY5Y ont été traitées à différentes concentrations de composé : 0,5, 1, 3, 5 et 10  $\mu\text{M}$ . La survie des cellules a été évaluée après 24 et 48 heures de traitement (Figure 131). Pour les deux composés, après 24 heures de traitement, plus de 90 % des cellules ont survécu. Les résultats sont également très bons après 48 heures où plus de 80 % des cellules ont survécu.

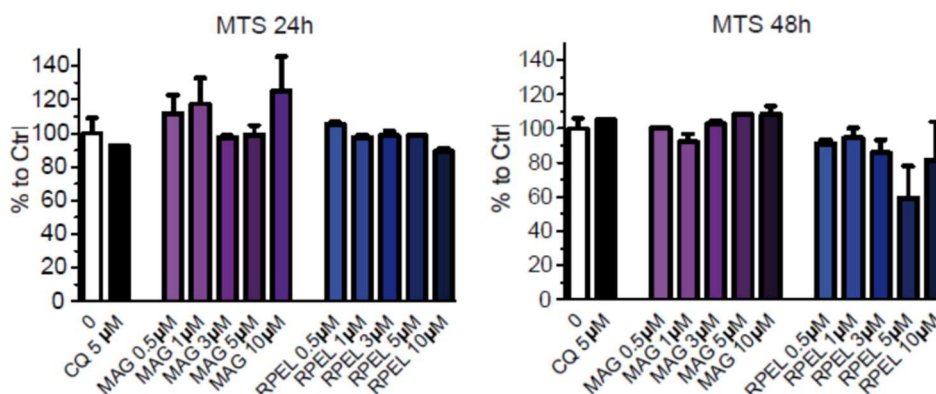


Figure 131. Etude de toxicité des composés RPEL et MAG.

Ces résultats permettent de conclure que ces deux composés ne présentent pas de toxicité dans la gamme de concentration étudiée.

## 3. Autophagie (Dr N. Sergeant)

La chloroquine et la bafylomycine sont des composés lysosomotropiques inhibiteurs de l'autophagie, un procédé cellulaire catalytique nécessaire pour maintenir l'homéostasie cellulaire.<sup>290</sup> L'action des deux composés **RPEL** et **MAG** a été étudiée sur l'autophagie. Les marqueurs Beclin-1 et p62 de l'autophagie ont été étudiés dans les conditions normales de croissance. Lors du processus autophagique normal, ces deux marqueurs sont dégradés *via* les autophagosomes dans les lysosomes. Un traitement avec le composé **RPEL** conduit à l'accumulation de Beclin-1 et p62 (Figure 132). Ceci suggère que le **RPEL** affecte l'autophagie.

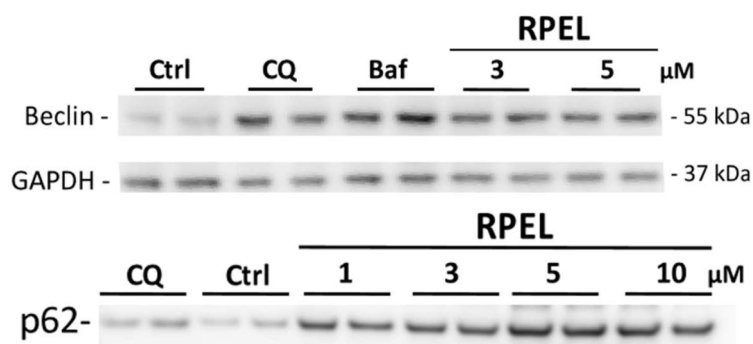


Figure 132. Action du composé RPEL sur l'accumulation de Beclin 1 et p62.

<sup>290</sup> P. Jiang *et al.*, *Methods*, 2015, 75, 13-18

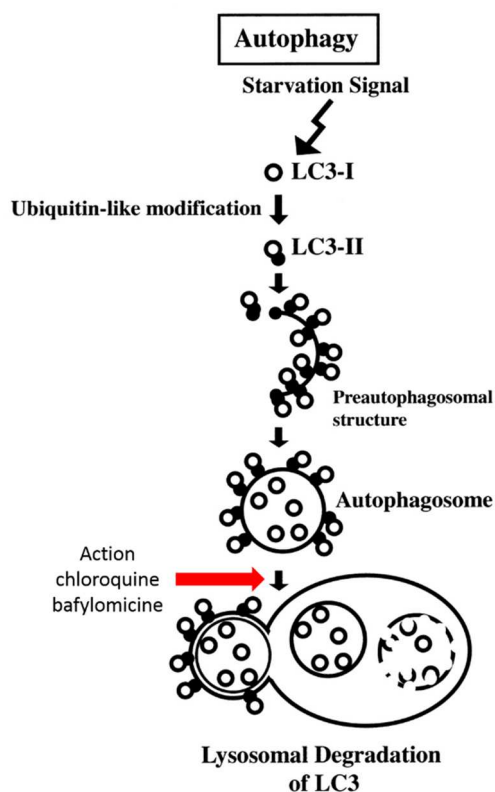


Figure 133. Processus de l'autophagie médiée par LC3.<sup>291</sup>

L'autophagie liée à LC3 a également été étudiée. Suivant l'activation de l'autophagie, LC3-I est couplée à un résidu phosphatidyléthanolamine conduisant à LC3-II qui s'associe à la membrane autophagosomale. Les autophagosomes matures fusionnent avec la membrane pour être dégradés (Figure 133). La chloroquine et la bafylomicine inhibent ce dernier stade. Les cellules SY5Y traitées avec ces composés présentent une forte accumulation de LC3-II et de nombreux autophagosomes. Un traitement aux composés **RPEL** ou **MAG** conduit à une faible accumulation de LC3-II (Figure 134) et un signal cytosolique diffus observé suggère que le flux autophagique n'est pas inhibé par les composés **RPEL** ou **MAG**.

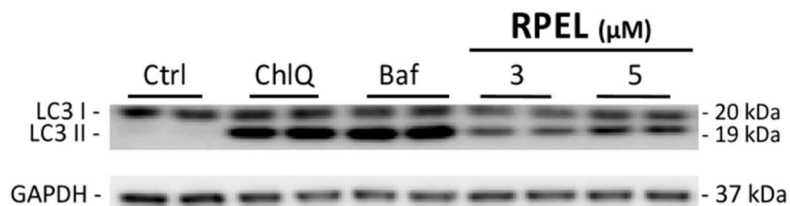


Figure 134. Action du composé RPEL sur l'accumulation de LC3-I et LC3-II

#### 4. Effet sur le métabolisme de l'APP (Dr N. Sergeant)

Les composés ont été testés sur le modèle cellulaire SY5Y-APPwt afin d'évaluer leur effet sur la modification du métabolisme de l'APP. Suivant le métabolisme de l'APP (Figure 4 page 25), un composé anti Alzheimer idéal doit permettre d'augmenter la formation des fragments neurotrophiques et neuroprotecteurs (AICD, CTF $\alpha$ ) et diminuer la formation des espèces longues du peptide A $\beta$ .

Les composés **RPEL** et **MAG** augmentent de manière dose dépendante la sécrétion de CTF $\alpha$ , le composé **RPEL** étant beaucoup plus efficace que le composé **MAG**. Ces composés induisent également une augmentation de la sécrétion des fragments AICD mais de façon non dose dépendante (Figure 135).

<sup>291</sup> K. Asanuma et al., *FASEB J.*, 2003, 17, 1165-1167

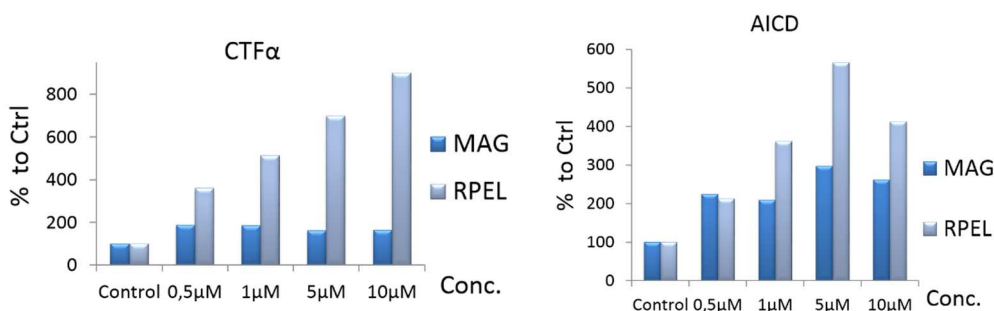


Figure 135. Influence des composés RPEL et MAG sur la sécrétion des CTFα et de l'AICD.

Les deux composés induisent une diminution de la formation des peptides Aβ<sub>38</sub>, Aβ<sub>40</sub> et Aβ<sub>42</sub> de façon dose dépendante (Figure 136). Ils ont tendance à diminuer de manière sélective la formation des peptides Aβ<sub>38</sub> et Aβ<sub>42</sub>, le composé **RPEL** étant plus efficace que le composé **MAG**. Ces résultats suggèrent que les deux composés **RPEL** et **MAG** moduleraient la γ-sécrétase, ciblant plus spécifiquement la voie Aβ<sub>42</sub>-Aβ<sub>38</sub> que Aβ<sub>40</sub>.

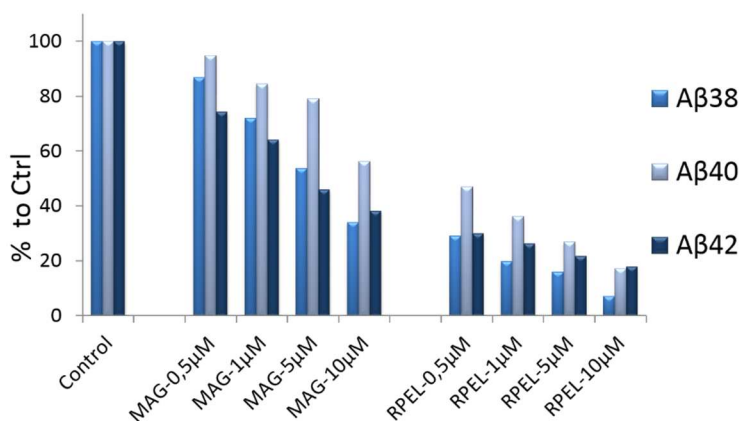


Figure 136. Influence des composés RPEL et MAG sur la sécrétion du peptide Aβ.

L'effet du composé **RPEL** sur l'expression de la β-sécrétase (BACE1) a également été investigué. Le composé n'affecte pas l'expression de la protéine ce qui suggère que son effet sur le métabolisme de l'APP n'est pas lié à la diminution de cette dernière (Figure 137).

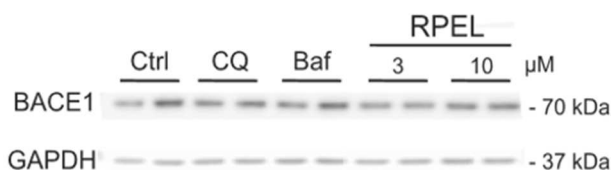


Figure 137. Effet du RPEL sur l'expression de BACE1.

Afin de vérifier si l'activité de la γ-sécrétase est modifiée par les deux composés, des tests sur le clivage de l'APP-CTFs en AICD ainsi que celui de ΔENotch en NICD ont été réalisés. Les inhibiteurs de γ-sécrétase DAPT et L685 inhibent la formation de l'AICD ou de NICD alors que les composés **RPEL** et **MAG** ne modifient pas la formation des deux fragments (Figure 138, Figure 139). Ainsi les effets pharmacologiques des deux composés **RPEL** et **MAG** ne résultent pas d'une modulation directe de l'activité protéolytique de la γ-sécrétase.

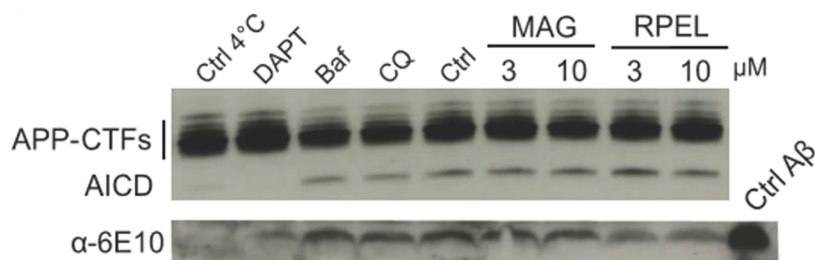


Figure 138. Effet des composés RPEL et MAG sur le clivage de l'APP-CTFs en AICD.

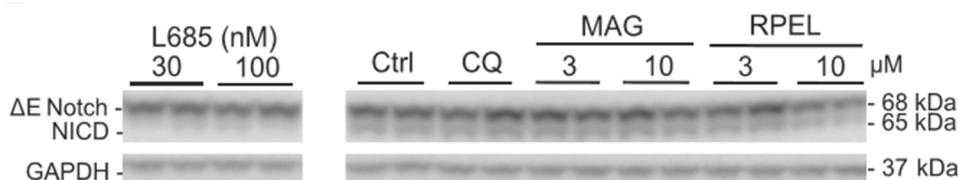


Figure 139. Effet des composés RPEL et MAG sur le clivage de ΔE Notch en NICD.

## 5. Action sur Tau (Dr N. Sergeant)

La modulation de l'autophagie *via* les lysosomes peut également impacter le métabolisme de la protéine Tau. Ainsi, une autophagie *via* les lysosomes défaillante peut contribuer à la MA.<sup>292, 293</sup> L'effet des composés **RPEL** et **MAG** sur la phosphorylation de Tau a été étudié. Des cellules de neuroblastomes SKNSH-SY5Y exprimant l'isoforme 412 de Tau humain ont été traitées avec 10 μM de **RPEL** ou de **MAG**. L'expression et la phosphorylation ont été suivies et comparées à celles des cellules non traitées. Un traitement avec le composé **MAG** conduit à une diminution de l'expression de Tau alors qu'aucun changement significatif n'est observé avec le **RPEL**. La phosphorylation de Tau au niveau des sérines 199 et 396 est diminuée suite à un traitement au **RPEL** et au **MAG** (Figure 140).

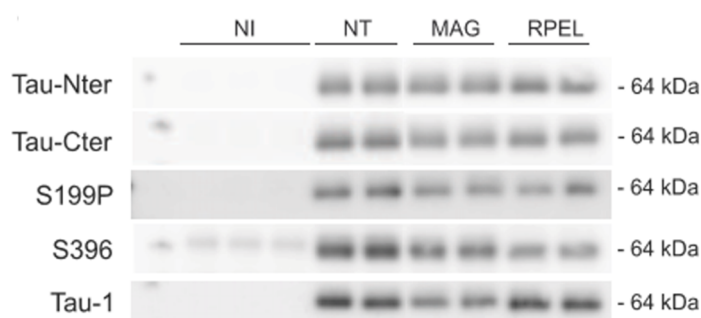


Figure 140. Effet des composés RPEL et MAG sur l'expression et la phosphorylation de Tau.

Les résultats *in vitro* combinés montrent que les composés **RPEL** et **MAG** modifient le métabolisme de Tau et de l'APP *via* probablement un effet modulateur de l'activité lysosomique et autophagique.

## 6. Evaluation par RMN-STD

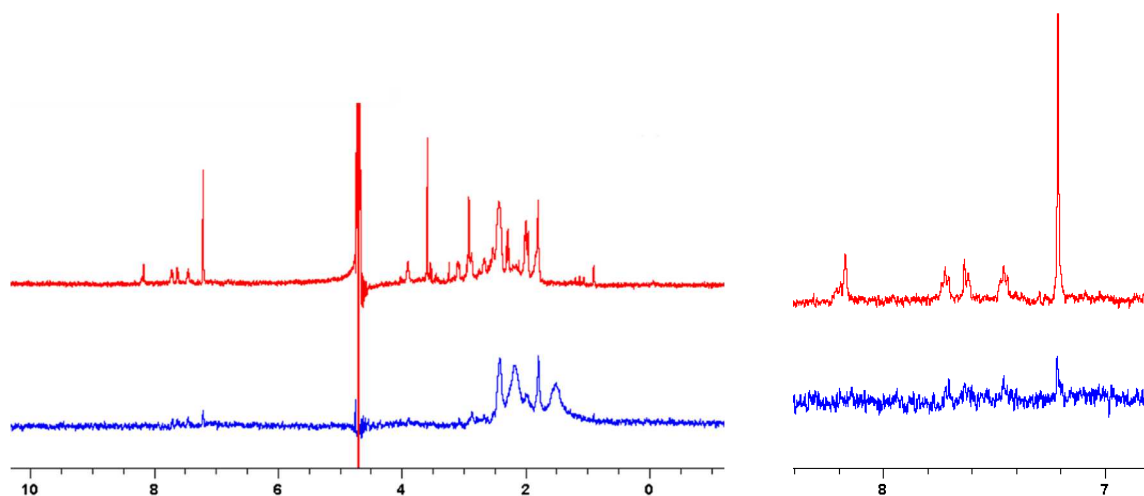
Les deux composés ont été évalués en RMN-STD afin de déterminer leur interaction potentielle avec la protéine cible p97/VCP.

<sup>292</sup> K. Inoue *et al.*, *Mol. Neurodegener.*, **2012**, 7, 48

<sup>293</sup> M. Nassif *et al.*, *BMC Biol.*, **2012**, 10, 78

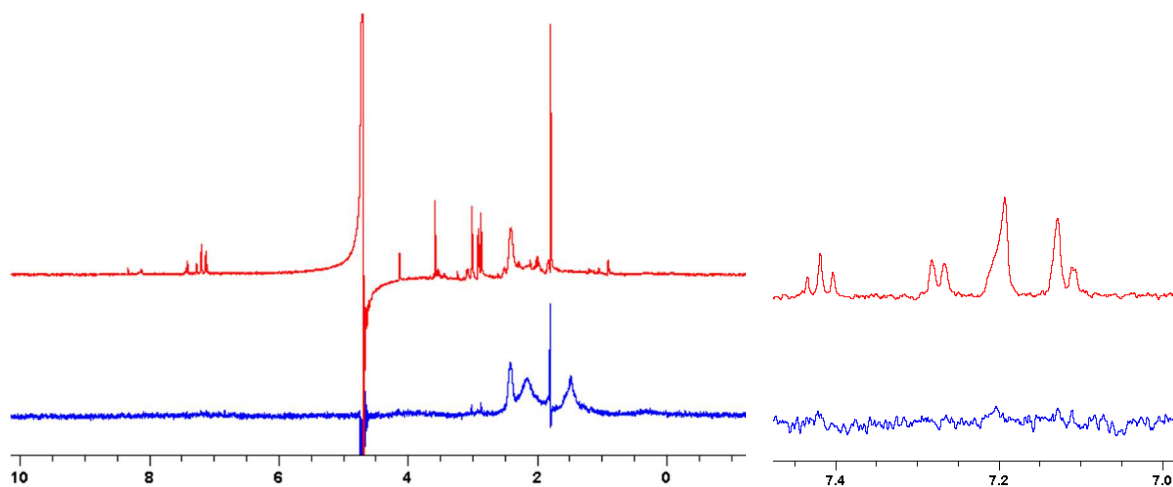
- **Etude de la liaison RPEL/MAG-VCP**

L'étude STD du composé **RPEL** montre une très faible interaction entre le composé et la protéine (Figure 141).



**Figure 141. Spectre de RMN-STD du composé RPEL.**  
(rouge avant STD, bleu STD, RPEL 200  $\mu$ M, p97/VCP 5  $\mu$ M)

L'étude STD du composé **MAG** montre également qu'il n'y a pas d'interaction entre le composé et p97/VCP (Figure 142).



**Figure 142. Spectre de RMN-STD du composé MAG.**  
(rouge avant STD, bleu STD, MAG 200  $\mu$ M, p97/VCP 5  $\mu$ M)

Ces résultats peuvent être interprétés de deux manières : soit p97/VCP n'est pas une des cibles des composés soit **RPEL** et **MAG** se lient avec une affinité importante à p97/VCP qui empêcherait de les observer en RMN-STD qui est une technique qui permet généralement d'observer des interactions comprises en 1  $\mu$ M et 1 mM. Afin de vérifier cette deuxième hypothèse une étude de compétition avec l'AZP2006 est envisagée en observant l'impact de ces deux composés sur les signaux RMN de l'AZP2006. La première hypothèse, quant à elle, nécessiterait la détermination de leur cible thérapeutique.

### D. Evaluation *in vivo* du RPEL (Dr N. Sergeant)

Etant donné les résultats encourageants obtenus *in vitro* avec le composé **RPEL** (inhibition subnanomolaire de l'AChE, modulation des métabolismes de l'APP et de Tau), ce dernier a été évalué *in vivo* sur deux modèles transgéniques murins.

- **Souris « naïves »**

Dans un premier temps, des souris naïves (C57/Bl6) (WT) ont été traitées à des doses de 0,5 ou 1 mg/kg de **RPEL** dans l'eau de boisson pendant un mois. Cette expérience a pour but de montrer l'absence de toxicité du produit et la possibilité d'une administration par cette voie simple du composé. Le composé s'est avéré inoffensif pour les souris, aucune diminution d'appétit et de perte de poids n'ont été observées.

- **Souris transgéniques APP/PS1**

Le modèle de souris APP/PS1 est porteur du gène APP humain muté couplé au gène muté de la préséniline qui accélère l'apparition et la sévérité des dépôts amyloïdes. Cette souris doublement transgénique produit des quantités plus élevées de peptide Aβ.<sup>294</sup>

Des souris double transgéniques APP/PS1 ainsi que des souris naïves ont été traitées à 1 mg/kg de **RPEL** dans l'eau de boisson pendant 15 semaines. L'évaluation de la mémoire spatiale à court terme des souris a été réalisée grâce au test du labyrinthe en Y, test relevant pour ces animaux. Pour ce test, les souris sont placées dans un labyrinthe en Y dont un bras est fermé. Elles peuvent librement explorer les deux bras ouverts. Puis le troisième bras est ouvert. Le temps que la souris passe dans le nouveau bras est mesuré et comparé au temps qu'elle passe dans les autres bras. Une souris dont la mémoire spatiale à court terme est intacte passe plus de temps dans le nouveau bras afin de l'explorer, que dans les autres qu'elle connaît déjà (Figure 143).

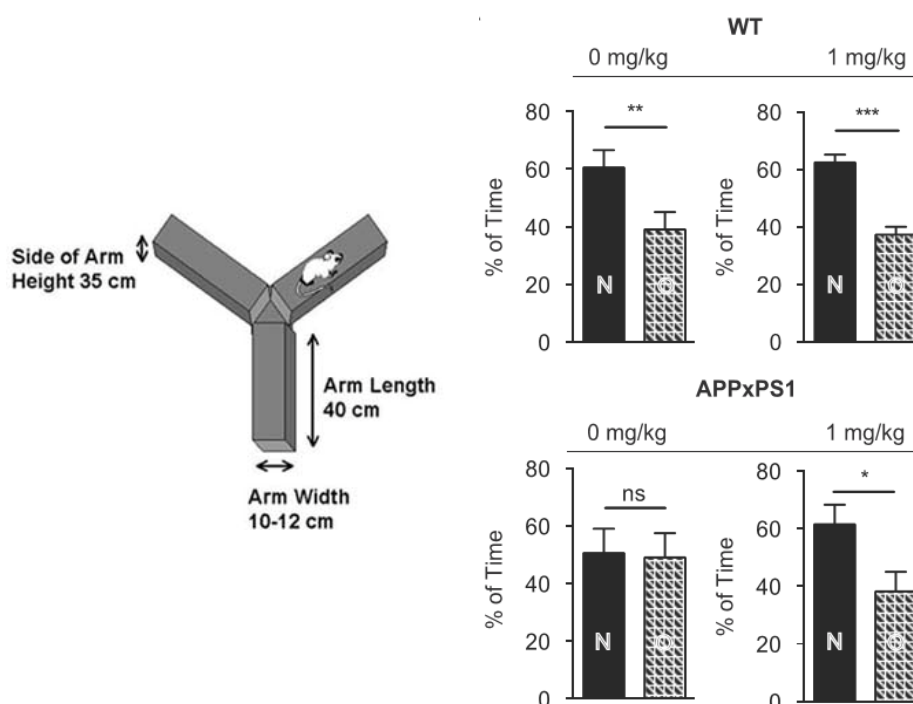


Figure 143. Principe du test du labyrinthe en Y et résultats.

<sup>294</sup> D. Langui *et al.*, *Med. Sci.*, 2007, 23, 180-6

Aucune modification de la mémoire spatiale à court terme n'a été observée chez les souris naïves traitées ou non (Figure 143). Pour les souris doublement transgéniques APP/PS1 non traitées, la mémoire spatiale à court terme est affectée car elles passent autant de temps à explorer le nouveau bras que les autres. Les souris APP/PS1 traitées quant à elles ont une mémoire spatiale à court terme restaurée car elles passent plus de temps à explorer le nouveau bras que les autres. Une analyse immuno-histologique de l'hippocampe et du cortex des souris transgéniques traitées a montré une réduction significative du nombre de plaques amyloïdes suivant le traitement au RPEL (Figure 144).

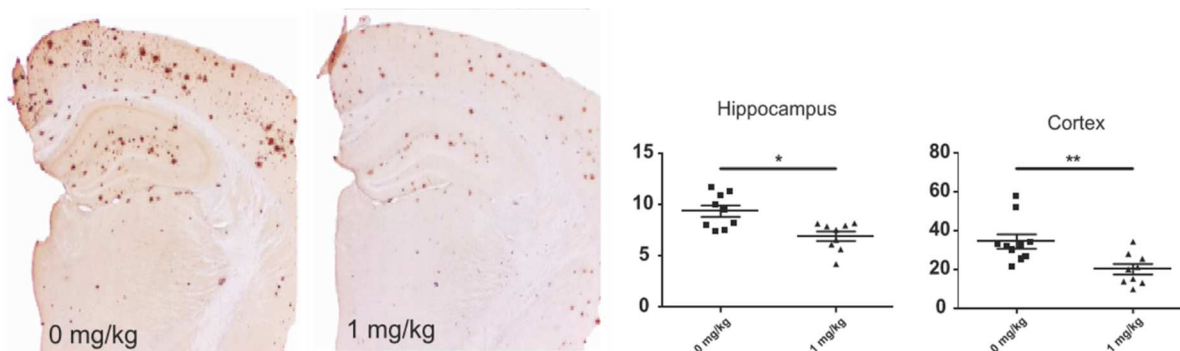


Figure 144. Analyse stéréologique dans l'hippocampe et le cortex des souris APP/PS1 traitées.

Cette diminution du nombre de plaques n'est pas corrélée avec une diminution de l'expression du peptide APP (Figure 145). Une diminution significative de l'APP-CTFs ainsi que du peptide A $\beta$  a été observée dans le cortex mais pas dans l'hippocampe. Cette réduction du nombre de plaques et du peptide A $\beta$  dans les tissus du cerveau est associée à une augmentation de la concentration plasmatique des peptides A $\beta_{40}$  et A $\beta_{42}$ , alors que la concentration en peptide A $\beta_{38}$  est inchangée.

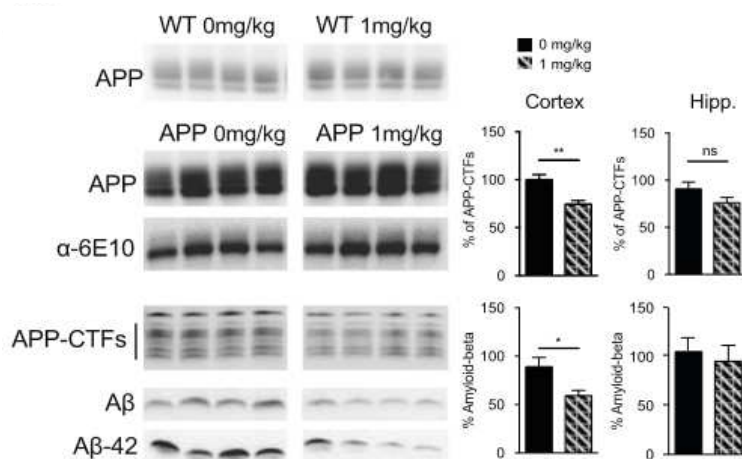


Figure 145. Effet du composé RPEL sur l'expression de l'APP et la formation du peptide A $\beta$ .

Les résultats obtenus suggèrent qu'un traitement au RPEL réduit la charge amyloïde et augmente la clairance plasmatique, conduisant à des effets cognitifs bénéfiques.

- **Souris transgéniques Thy-Tau22**

Chez les souris Thy-Tau22, le développement de la dégénérescence neurofibrillaire est corrélé à une diminution de la mémoire spatiale. La mémoire spatiale peut être préservée par des exercices



volontaires ou par immunothérapie, ce qui montre que les souris transgéniques Thy-Tau22 sont un bon modèle pour tester les effets positifs ou négatifs d'un composé.<sup>295, 296</sup>

Les souris Thy-Tau22 ont été traitées à la dose de 0,5 mg/kg de **RPEL** dans l'eau de boisson pendant quatre mois et la mémoire spatiale a été évaluée avec le test de la piscine de Morris décrit précédemment pour l'AZP2006 (Page 53). Tous les animaux, souris naïves ou Thy-Tau22, traitées ou non au **RPEL**, ont appris la position de la plateforme pendant cinq jours. Pour les souris naïves traitées ou non, les souris ont une préférence significative pour le cadran cible (T) par rapport aux trois autres cadrans (O) (Figure 146). Le traitement n'améliore pas les performances. Ceci montre que le **RPEL** n'a pas d'effet pro-mnésiant sur les souris naïves. Les souris Thy-Tau22 non traitées n'ont pas de préférence pour le cadran cible par rapport aux autres, montrant les déficits cognitifs des animaux. Les souris Thy-Tau22 traitées montrent, quant à elles, une nette préférence pour le cadran cible.

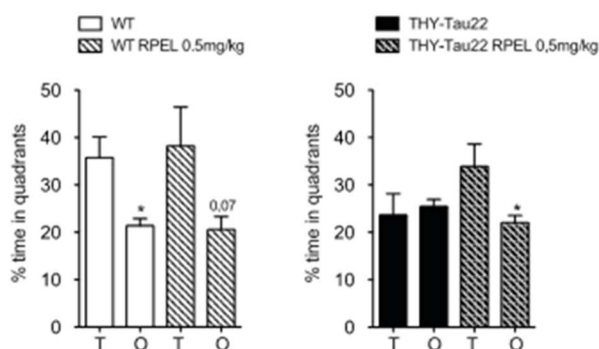


Figure 146. Résultats des souris naïves et Thy-Tau22 suite au test de la piscine de Morris.

Ces résultats suggèrent qu'un traitement au **RPEL** permet de protéger ou d'éviter les déficits de mémoire spatiale chez les souris Thy-Tau22. L'étude du cerveau des souris a montré que le composé **RPEL** agit sur la pathologie Tau en réduisant la phosphorylation de la protéine et en augmentant son catabolisme, ce qui suffit pour préserver les souris Thy-Tau22 des problèmes de mémoire spatiale.

### E. Dosage du RPEL dans le cerveau des souris traitées

Le composé **RPEL** a montré de très bons résultats *in vivo* à de faibles doses. La détermination de sa concentration dans les cerveaux des souris est une étape essentielle afin de confirmer sa capacité à passer la BHE, que son action cible le cerveau, ainsi que les quantités présentes au niveau central ayant conduit aux résultats obtenus.

#### 1. Principe du dosage : LC-MRM

Il a été choisi de doser le **RPEL** contenu dans les cerveaux par une technique de spectrométrie de masse en tandem LC/MS/MS, nommée également LC-MRM (Multiple Reaction Monitoring) ou LC-SRM (Selected Reaction Monitoring).

Pour cette technique, une chromatographie liquide permet de réaliser une séparation de l'échantillon à analyser (Figure 147). L'éluant sortant de la colonne est ensuite injecté dans un spectromètre de masse. Lors de l'analyse de masse, les molécules sont ionisées dans la cellule d'ionisation et un ion spécifique nommé ion précurseur est sélectionné parmi le mélange analysé dans le premier quadripôle (Q1).

<sup>295</sup> K. Belarbi *et al.*, *Curr. Alzheimer Res.*, **2009**, 6, 152-7

<sup>296</sup> L. Troquier *et al.*, *Curr. Alzheimer Res.*, **2012**, 9, 397-405



Les ions sont fragmentés dans la chambre de collision (deuxième quadripôle Q2). Les ions produits issus de l'ion précurseur sont ensuite spécifiquement filtrés dans le troisième quadripôle (Q3). Un détecteur permet de les identifier.

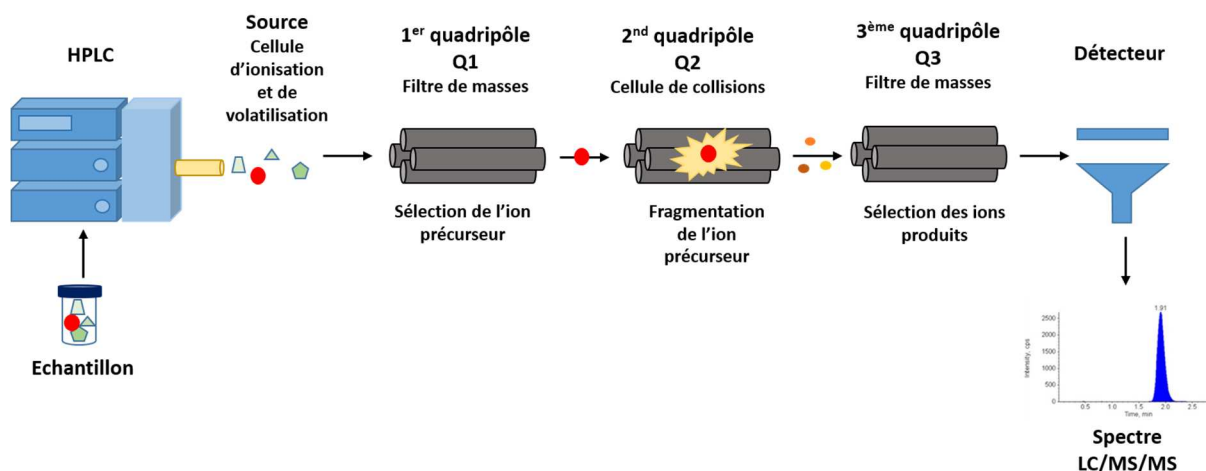


Figure 147. Schéma de principe de la LC-MRM.

Afin de réaliser un dosage par cette méthode, il est préférable d'avoir un étalon interne. L'utilisation d'un étalon interne dont une quantité parfaitement connue et unique est ajoutée dans les solutions étalons et dans les solutions inconnues permet de s'affranchir des pertes que peut engendrer la préparation de l'échantillon.

Avec la technique LC-MRM, l'étalon interne idéal doit avoir une structure très proche de la molécule à étudier et posséder une différence de masse significative ( $\geq 4$  g/mol). Ainsi, un étalon interne jugé comme idéal correspond à la molécule à étudier contenant des isotopes de type  $^2\text{H}$  (D) ou  $^{13}\text{C}$ . Ainsi, il possède le même comportement et donc le même temps de rétention que le composé à doser.

Afin de réaliser le dosage du **RPEL** dans les meilleures conditions, l'analogue deutéré du composé a été synthétisé. Cet isotope a été sélectionné en raison de sa facilité de manipulation.

## 2. Synthèse du RPEL deutéré

En étudiant la structure de **RPEL**, il a dans un premier temps été envisagé d'introduire deux atomes de deutérium grâce à l'utilisation de  $\text{NaBD}_4$  lors de la diamination réductrice (Figure 148). Cependant, cette technique ne permet pas d'avoir un écart de masse suffisant entre le composé de référence et le composé deutéré pour permettre son utilisation en tant qu'étalon interne.

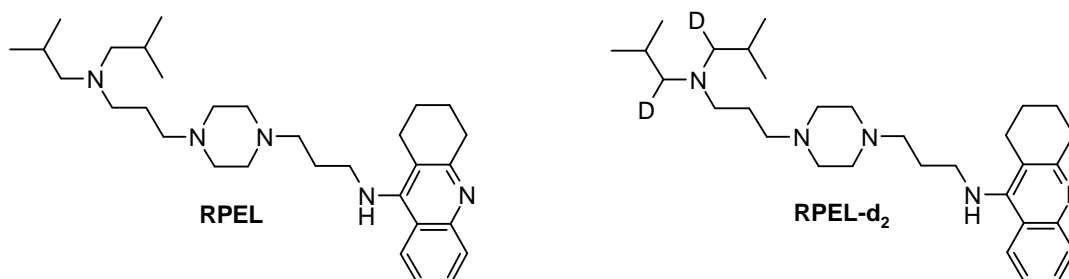


Figure 148. Structures du composé RPEL et de son analogue RPEL-d<sub>2</sub>.

Il est également possible d'introduire plusieurs atomes de deutérium *via* les chaînes isobutyles, l'acide précurseur d<sub>7</sub> de l'aldéhyde étant commercial. Ceci conduit à l'introduction de 7 ou 14 deutériums,

selon le nombre de chaînes deutérées introduites, qui permet d'avoir un écart de masse suffisant entre la molécule testée et la molécule deutérée (Figure 149).

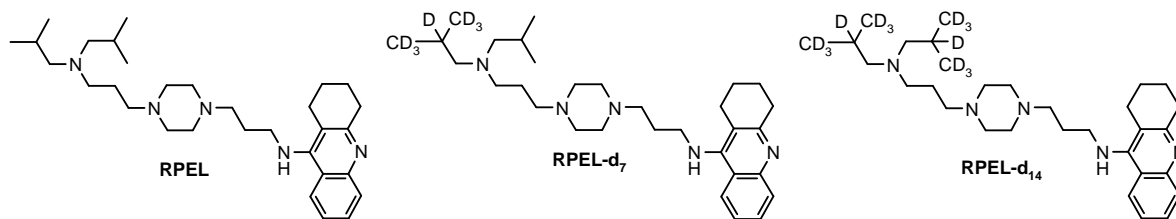


Figure 149. Structures du composé RPEL et de ses analogues RPEL-d<sub>7</sub> et RPEL-d<sub>14</sub>.

Etant donné le coût non négligeable du précurseur deutéré, il est préférable d'introduire les chaînes isobutyle en fin de synthèse. Ceci implique donc de revoir la synthèse du composé. La 1,2,3,4-tétrahydroacridine est introduite par une réaction de Buchwald dès les premières étapes (Schéma 33).

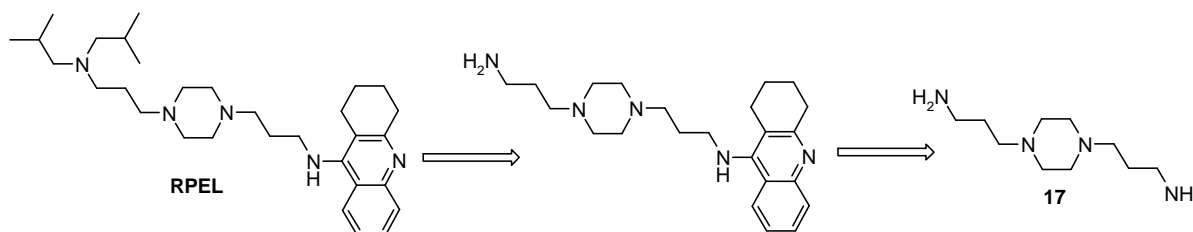


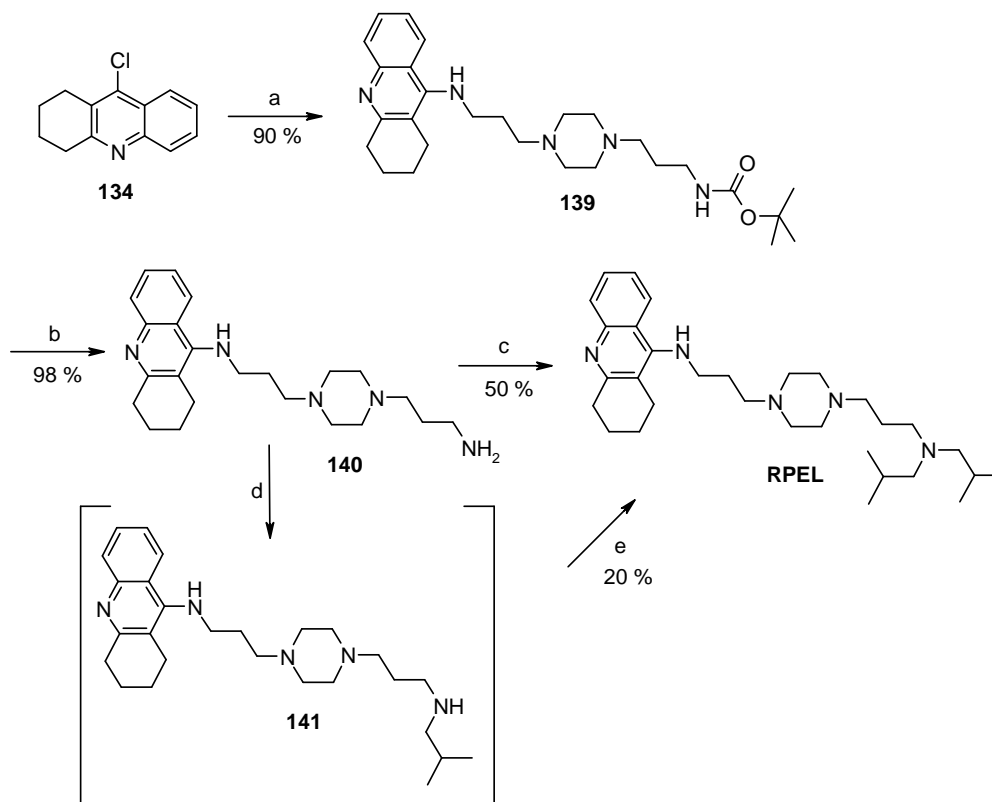
Schéma 33. Nouvelle rétrosynthèse pour l'obtention du composé RPEL.

Comme dans la synthèse précédente, la 3-[4-(3-aminopropyl)pipérazin-1-yl]propan-1-amine monoprotégée par un groupement Boc **18** est utilisée comme produit de départ dans une réaction de Buchwald (Schéma 34). Cette étape a nécessité une optimisation. Dans les conditions décrites Schéma 32 (condition e) la BINAP est utilisée comme ligand. Lorsque celle-ci est utilisée dans cette nouvelle voie de synthèse, un rendement de 10 % est obtenu (Tableau 16, entrée 1). L'utilisation du Xantphos permet d'obtenir un bon rendement de 85 % (entrée 2). Lorsque la quantité de catalyseur est diminuée, le rendement est faiblement impacté (entrée 3). Finalement, lorsque l'excès de bras **18** est diminué un très bon rendement de 90 % est obtenu (entrée 4). Ces conditions sont choisies pour la nouvelle synthèse du RPEL.

Le groupement Boc est ensuite clivé dans les conditions classiques dans du dioxane saturé en HCl<sub>g</sub>. Une double amination réductrice en présence d'isobutyraldéhyde permet d'obtenir le RPEL avec un rendement de 50 %.

Une autre stratégie a été envisagée en deux étapes afin d'introduire une seule chaîne deutérée sur le composé RPEL. Elle consiste à réaliser deux monoaminations réductrices successives. Une monoamination réductrice avec du NaBH<sub>4</sub> permet d'introduire une chaîne isobutyle, permettant d'obtenir le composé **141**. Une seconde amination réductrice utilisant le même réducteur permet d'obtenir le RPEL avec un rendement de 20 %.

Le composé **141** peut être utilisé pour l'obtention du composé d<sub>7</sub> et le composé **140** peut permettre de synthétiser le composé d<sub>14</sub>.



Réactifs et conditions : (a) Composé **18** (1,2 éq.), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,4 éq.), Xantphos (0,15 éq.), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (0,05 éq.), dioxane, reflux, 1 j ; (b) dioxane saturé en HCl<sub>g</sub>, 20 °C, 15 h ; (c) isobutyraldéhyde (3,0 éq.), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (3,0 éq.), DCM, 20°C, 1 j ; (d) isobutyraldéhyde (1,5 éq.), NaBH<sub>4</sub> (1,5 éq.), DCE, 20°C, 20 h ; (e) isobutyraldéhyde (1,5 éq.), NaBH<sub>4</sub> (1,5 éq.), DCE, 20°C, 20 h.

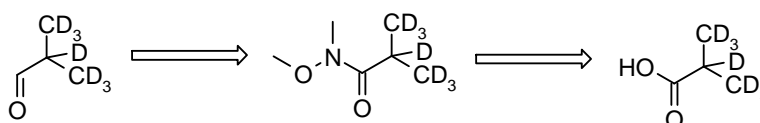
#### Schéma 34. Nouvelle voie de synthèse du composé RPEL.

Tableau 16. Optimisation de la réaction de Buchwald afin d'obtenir 139.

Entrée	134	18	Ligand	Pd <sub>2</sub> dba <sub>3</sub>	Rendement
1	1 éq.	1,8 éq.	BINAP (0,15 éq.)	0,15 éq.	10 %
2	1 éq.	1,8 éq.	Xantphos (0,15 éq.)	0,15 éq.	85 %
3	1 éq.	1,8 éq.	Xantphos (0,15 éq.)	0,05 éq.	82 %
4	1 éq.	1,2 éq.	Xantphos (0,15 éq.)	0,05 éq.	90 %

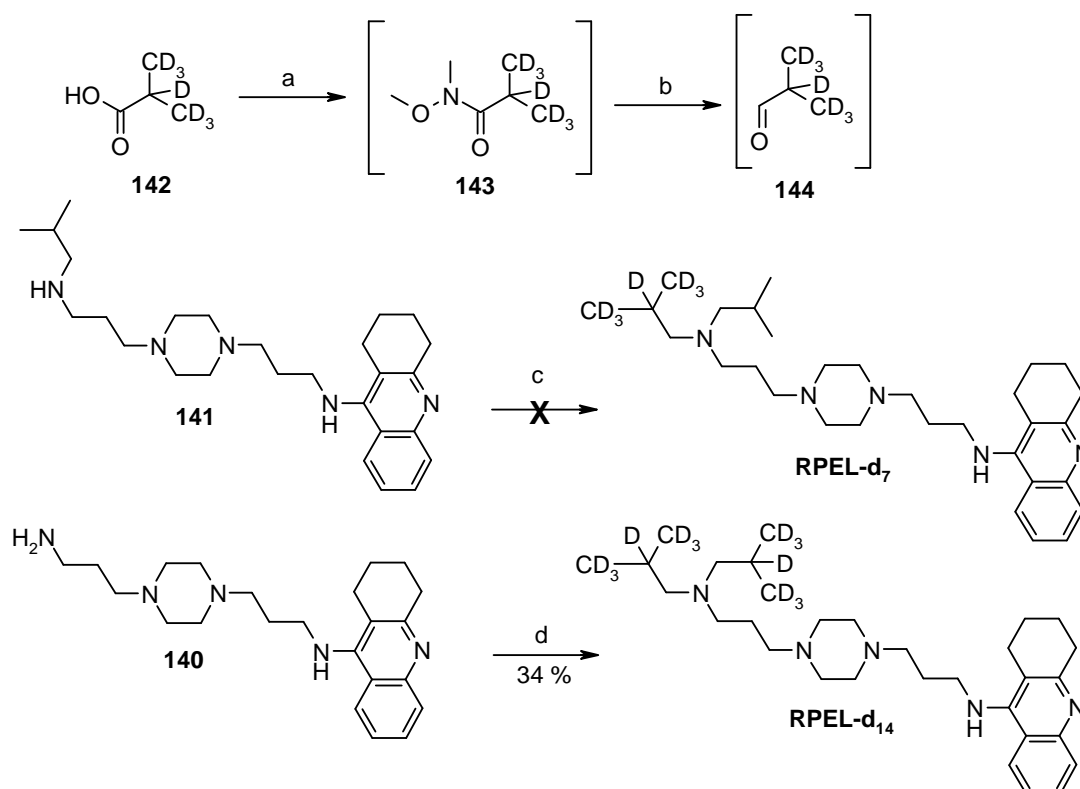
La nouvelle voie de synthèse utilisant le NaBH(OAc)<sub>3</sub> permet d'accéder au composé **RPEL** avec un rendement de 44 %, celle utilisant le NaBH<sub>4</sub> conduit au composé avec un rendement de 18 %. La voie précédemment utilisée conduit au **RPEL** avec un rendement de 43 %. Ainsi les deux voies de synthèse utilisant le NaBH(OAc)<sub>3</sub> sont équivalentes en termes de rendements globaux et de nombre d'étapes.

L'utilisation de l'acide isobutyrique-d<sub>7</sub> disponible commercialement peut permettre d'introduire les chaînes isobutyles. La réduction de cet acide en aldéhyde est réalisée *via* la formation d'un amide de Weinreb (Schéma 35).



#### Schéma 35. Rétrosynthèse pour l'obtention de l'isobutyraldéhyde d<sub>7</sub>.

La difficulté principale rencontrée lors de la synthèse de ce composé est son point d'ébullition très faible. Celui de l'acide isobutyrique est de 155°C alors que celui de l'aldéhyde est de 63°C. Les premiers essais ont conduit à la perte de l'amide et de l'aldéhyde lors des étapes d'évaporation. Il a donc été choisi d'éviter tout passage à l'évaporateur rotatif lors de cette synthèse. L'amide de Weinreb est formé dans des conditions classiques mais en utilisant uniquement le dichlorométhane comme solvant. La phase organique obtenue après traitement est directement utilisée dans l'étape de réduction. L'amide est réduit en utilisant le  $\text{LiAlH}_4$ . Après traitement du milieu réactionnel, la phase organique est directement mise en réaction dans l'étape d'amination réductrice pouvant conduire au composé **RPEL-d<sub>7</sub>** ou **RPEL-d<sub>14</sub>**. Afin d'obtenir le composé **RPEL-d<sub>7</sub>**, le composé **141** subit une monoamination réductrice avec du  $\text{NaBH}_4$  afin d'introduire le bras deutéré. Cependant, aucune évolution de la réaction n'est constatée, le produit désiré n'a pas été obtenu. Lorsque le composé **140** subit une diamination réductrice à partir de l'aldéhyde deutéré, le **RPEL-d<sub>14</sub>** est obtenu avec un rendement de 34 %, le produit de monoamination est également obtenu avec un rendement de 59 %.



Réactifs et conditions : (a) *N*-méthylmorpholine (6,5 éq.), EDC.HCl (1,3 éq.), HOBt (1,3 éq.), *N,O*-diméthylhydroxylamine.HCl (2,1 éq.), DCM, 20°C, 15 h ; (b)  $\text{LiAlH}_4$  dans le THF (1 M) (0,9 éq.), DCM, 0°C, 1 h ; (c) composé **144** (1,5 éq.),  $\text{NaBH}_4$  (1,5 éq.), DCM, 20°C, 15 h ; (d) composé **144** (4,0 éq.),  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  (4,0 éq.), DCM, 20°C, 15 h.

Schéma 36. Synthèse du composé **RPEL-d<sub>14</sub>**.

### 3. Etude de fragmentation du RPEL et du RPEL-d<sub>14</sub> (collab. CUMA)

L'étude de la fragmentation des deux composés permet de valider la structure du composé deutéré et d'étudier la fragmentation des molécules. Cette étude permettra de déterminer quels ions produits seront suivis lors de l'analyse MRM.

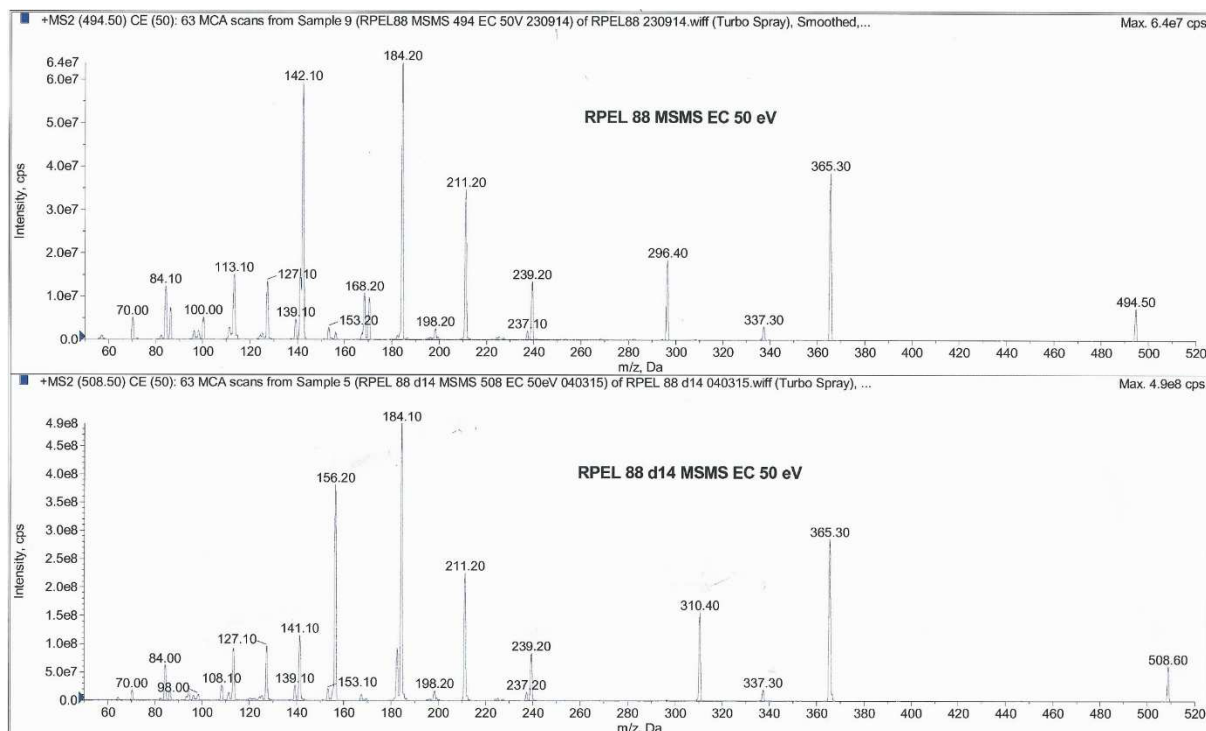


Figure 150. Etude de fragmentation du RPEL et du RPEL-d<sub>14</sub>.

Les pics moléculaires des deux composés sont visibles à 494,50 et 508,60 pour le **RPEL** et le **RPEL-d<sub>14</sub>** respectivement. Les deux composés présentent des fragments identiques correspondant aux masses 365,30 ; 337,30 ; 239,20 ; 211,20 ; 184,10 (Figure 150). Deux fragments présentent un écart de masse de +14 entre la masse obtenue pour le **RPEL-d<sub>14</sub>** et la masse obtenue avec le **RPEL** : 310,40/296,40 et 156,20/142,10. Cet écart de 14 unités de masse montre que ce sont des fragments contenant les chaînes isobutyles de la molécule. Une détermination structurale des fragments a été réalisée (Figure 151).

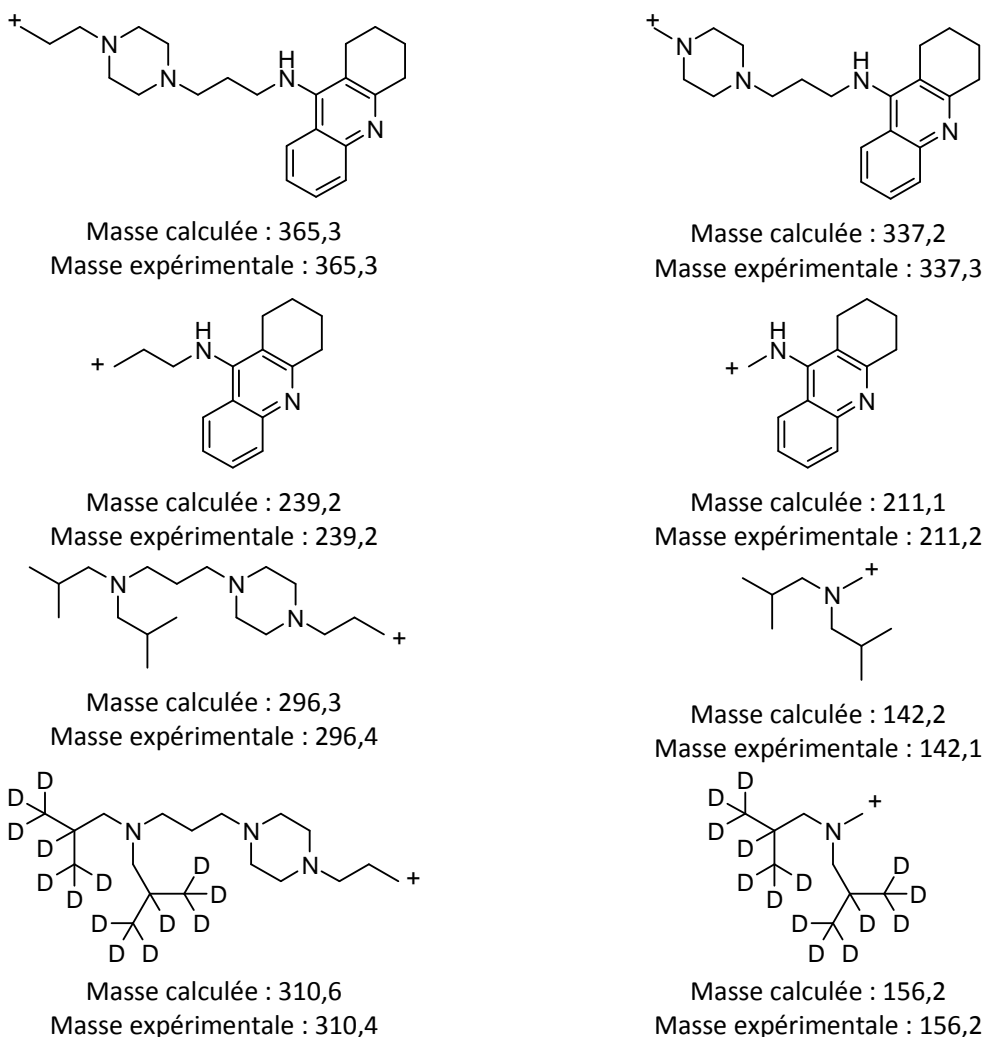


Figure 151. Détermination structurale des différents fragments.

Pour le dosage par MRM, les ions fils issus d'ions pères spécifiques seront suivis. Le choix de ces ions est essentiel. Suivant les diverses fragmentations obtenues avec les deux composés, il semble judicieux de suivre les transitions suivantes :

- Pour le **RPEL** : l'ion de masse 494,50 donne 365,30 et l'ion de masse 494,50 donne 184,20.
- Pour le **RPEL -d<sub>14</sub>** : l'ion de masse 508,60 donne 365,30 et l'ion de masse 508,60 donne 184,20.

#### 4. Essais préliminaires pour le dosage par LC-MRM (CUMA)

Dans un premier temps des essais préliminaires ont été nécessaires pour déterminer le type de colonne, l'éluant et le gradient à utiliser.

La colonne la plus adaptée à cette étude est une colonne Ace 3 C<sub>18</sub>, de dimension 100 x 2,1 mm, avec 3 µm de taille de particule et 100 Å pour la taille des pores.

Une meilleure résolution de pic est obtenue pour un éluant eau/méthanol avec 0,1 % d'acide formique. L'utilisation d'acétonitrile conduit à un élargissement des pics et un fort effet mémoire de la colonne. Le gradient est constitué d'un palier à 0 % de méthanol pendant 1 minute, puis un gradient

pendant 5 minutes jusqu'à 50 % de méthanol, un palier pendant une minute à cette concentration, un retour à 0 % de méthanol pendant 1 minute puis un palier à ce pourcentage pendant 1 minute.

Un premier essai de gamme de dilution a été réalisé afin de vérifier sa faisabilité. Les essais d'une gamme allant de 0,5 à 10 pmol/μL de RPEL ont montré des résultats très aléatoires et non reproductibles (Figure 152). Après une longue investigation, il a été remarqué que le RPEL s'adsorbe sur les parois de verre des tubes utilisés pour la préparation des échantillons, engendrant des résultats aberrants.

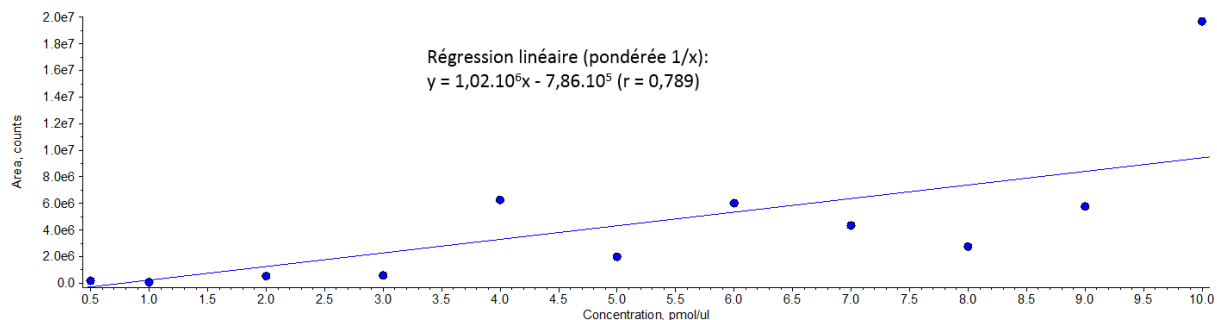


Figure 152. Gamme de dilution du RPEL dans des tubes en verre.

Des précautions ont alors été mises en œuvre afin d'éviter tout contact du produit avec le verre. La même gamme de dilution a été réalisée en triplicata dans les tubes en polypropylène. Les résultats obtenus sont reproductibles et une courbe quadratique est obtenue (Figure 153). Cette relation quadratique entre la concentration et la surface des pics est due à l'utilisation d'une gamme de concentration trop large et trop concentrée. Une étude sur de plus faibles concentrations sera menée par la suite.

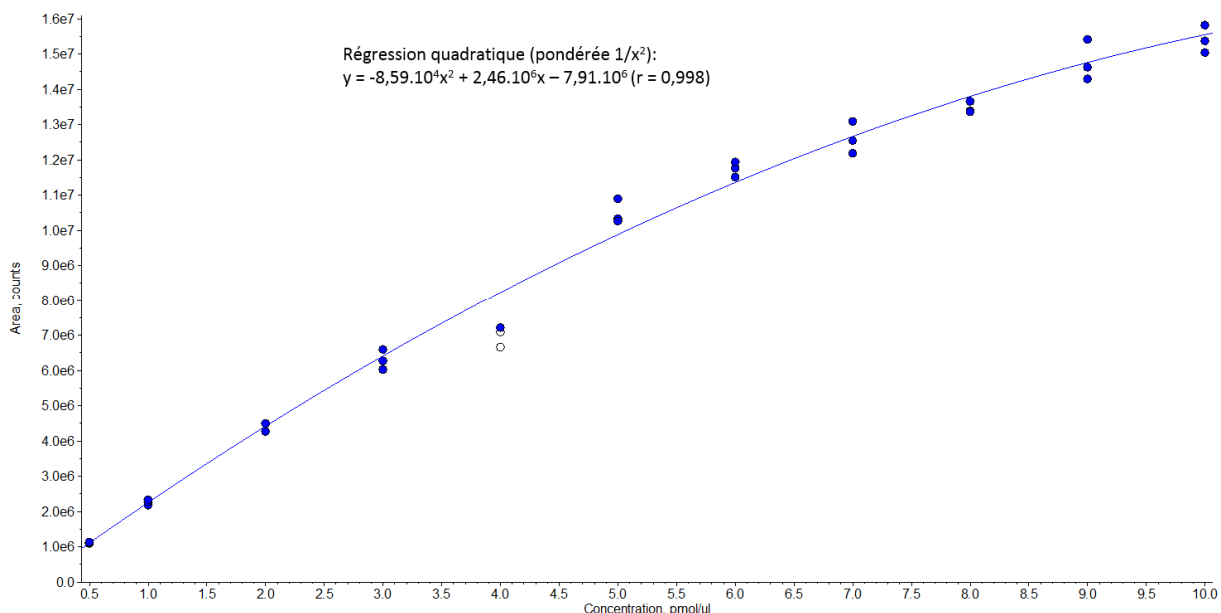


Figure 153. Gamme de dilution du RPEL dans des tubes en polypropylène.

### 5. Développement d'une gamme de dosage (collab. CUMA)

Une première gamme de dilution a été réalisée dans le méthanol pour une concentration en RPEL (analyte) allant de 5,1 à 2006,0 fmol/μL et une concentration fixe d'étalon interne deutéré (IS) de 201,5 fmol/μL. Cette première gamme a été injectée en triplicata. Lorsque le rapport des aires des signaux obtenus (Analyte Area/IS Area) est tracé en fonction du rapport des concentrations (Analyte Conc./IS Conc.),

une droite est obtenue. Il y a donc bien une relation de linéarité entre le rapport des concentrations et le rapport des aires des signaux.

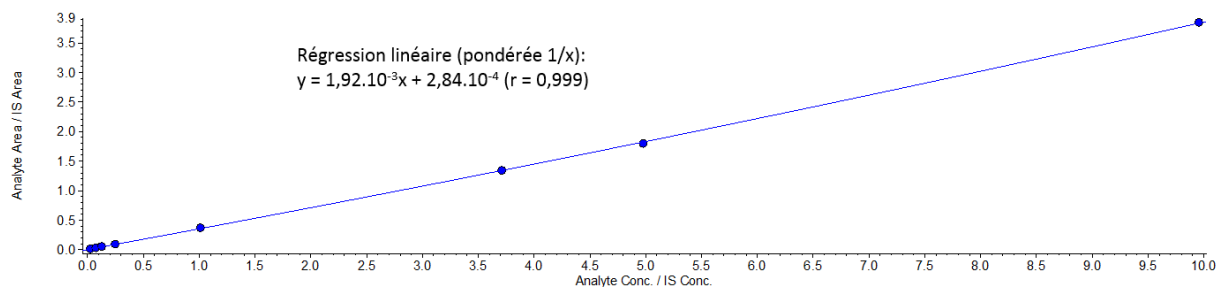


Figure 154. Droite d'étalonnage du RPEL avec l'étalon interne d14.

Un cerveau de souris traitée a été utilisé afin d'évaluer une concentration approximative de RPEL dans le but d'adapter au mieux une nouvelle gamme d'étalonnage. Il a été constaté que dans ce cerveau, la concentration de RPEL est à peu près de 10 fmol/μL. La gamme précédemment réalisée est donc trop étendue. Etant donné que le RPEL doit être dosé dans la matrice biologique complexe qui est le cerveau, la gamme d'étalonnage doit également être réalisée dans la matrice.

Une nouvelle gamme d'étalonnage a été mise au point, de 1 fmol/μL à 50 fmol/μL (gamme comportant les points suivants : 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 30 ; 40 et 50 fmol/μL) avec une concentration d'étalon interne de 20 fmol/μL. Ces concentrations sont très faibles mais l'utilisation de la technique LC-MRM permet d'avoir une sensibilité très élevée et de pouvoir mettre en évidence des concentrations très faibles. Cette gamme a été réalisée dans le méthanol et dans des cerveaux de souris naïves. Une relation linéaire entre le rapport (Analyte Conc./IS Conc.) et le rapport (Analyte Area/IS Area) est obtenue pour la gamme dans le méthanol (Figure 155, points bleus). Les points de la gamme dans le cerveau (Figure 155, points blancs) ne se superposent pas à la gamme dans le méthanol, mais ils restent cependant très proches.

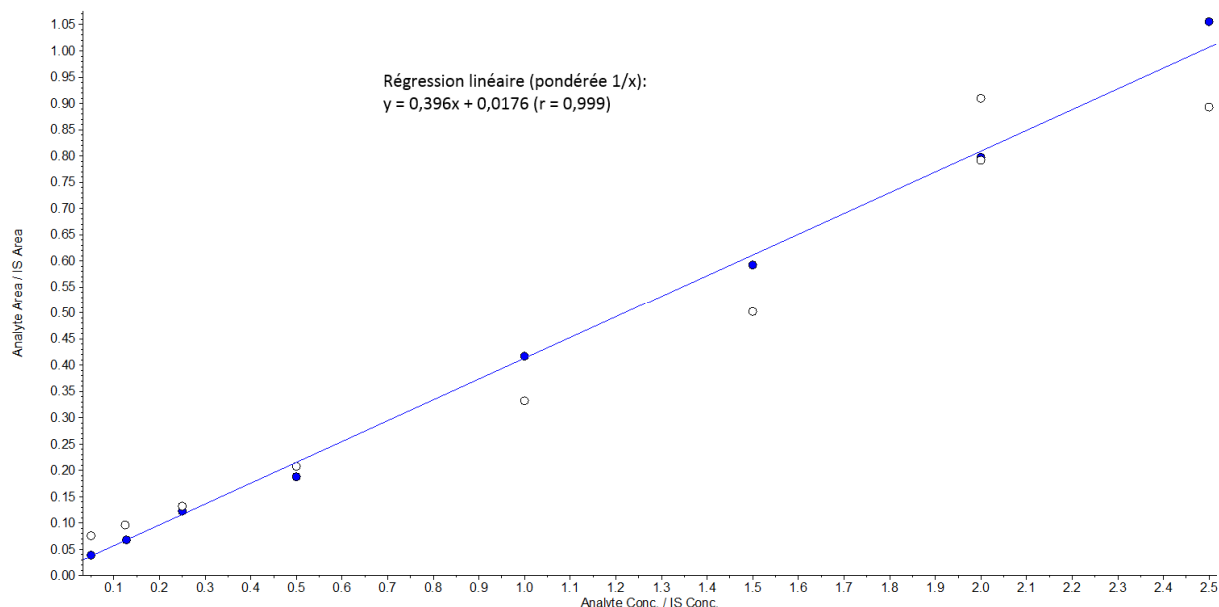


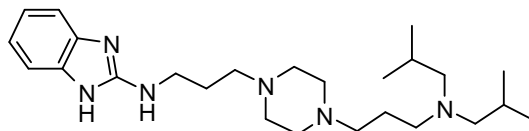
Figure 155. Comparaison d'une gamme de dilution dans le méthanol (points bleus) à une gamme de dilution dans les cerveaux (points blancs).

Une étude du rendement d'extraction et de l'effet matrice est actuellement en cours. Après leur détermination, la réalisation d'une nouvelle gamme de dilution dans les cerveaux et la validation de la méthode (réalisation d'une gamme en triplicata pendant trois jours consécutifs par le même manipulateur) devraient permettre le dosage du RPEL dans le cerveau des souris traitées.



# **Conclusion générale et perspectives**

Le développement de deux familles de composés (MSBD et PMAD) par l'équipe du Pr. Melnyk, actifs sur les deux lésions responsables de la maladie d'Alzheimer a conduit à l'identification de la protéine p97/VCP en tant que nouvelle cible thérapeutique pour le traitement des maladies neurodégénératives. Le meilleur composé, l'AZP2006 a achevé la phase I réglementaire avec succès. Il est le seul composé en développement connu au laboratoire agissant sur les deux lésions de la maladie.



**AZP2006**

**Figure 156. Rappel de la structure de l'AZP2006.**

La protéine p97/VCP est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires et notamment la dégradation de protéines anormales. L'agrégation de ce type de protéine est un phénomène physiopathologique commun aux maladies neurodégénératives. Ainsi, une augmentation des publications reliant p97/VCP aux maladies neurodégénératives a été constatée, comme notamment dans l'IBMPFD (syndrome de myopathie à inclusions associée à la maladie de Paget et à une démence fronto-temporale).

Les travaux de cette thèse ont consisté en la conception, la synthèse et l'évaluation de composés interagissant avec p97/VCP et intervenant dans la dégradation des protéines pour le traitement des maladies neurodégénératives. Un premier travail a été réalisé afin de mettre en évidence la liaison des différents ligands développés avec la protéine p97/VCP. Des sondes biotinylées ont été synthétisées afin de permettre le développement d'un test FRET. Les essais réalisés se sont révélés non concluants. Une nouvelle étude de la mise en œuvre du test doit être menée. Un test de RMN-STD a également été mis en place. Ce test a permis de mettre en évidence l'interaction de l'AZP2006 et de plusieurs autres ligands avec la protéine. Les sondes biotinylées développées ont également été testées et ont montré une interaction avec la protéine. Une compétition avec l'AZP2006 a conduit au déplacement de la sonde TH1-102 ce qui montre que l'affinité des sondes pour la protéine n'empêcherait pas la compétition. D'autres techniques sont également envisagées comme l'ITC, la thermophorèse à micro échelle ou la SPR.

Grâce à une étude de modélisation moléculaire, deux sites de liaison potentiels des composés ont été identifiés à l'entrée de la cavité où se loge l'ATP, sur le domaine N-D1 de la protéine. Une étude de RMN-STD en présence de la protéine p97/VCP tronquée et d'AZP2006 a permis de conforter cette hypothèse. La détermination d'un pharmacophore commun entre les deux familles antérieurement développées au laboratoire a permis le screening virtuel d'une librairie de composés commerciaux. 8 composés hit ont été commandés et testés *in vitro*. Les composés **CB1**, **CB5** et **CB6** ont montré une bonne action sur la diminution de la formation des peptides A $\beta$ <sub>40</sub> et A $\beta$ <sub>42</sub>. Une expérience de RMN-STD a permis de mettre en évidence l'interaction entre le composé **CB1** et p97/VCP. Maintenant que la production de la protéine est au point, l'ensemble des composés va pouvoir être évalué.

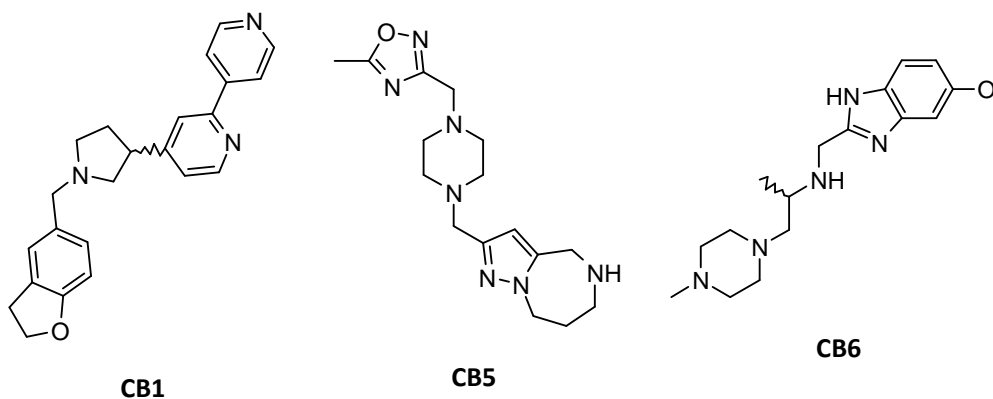


Figure 157. Structure des composés ChemBridge intéressants.

Le pharmacophore a également permis la conception de quatre nouvelles familles de ligands potentiels de la protéine (**D<sub>1</sub>**, **D<sub>2</sub>**, **E<sub>1</sub>**, **E<sub>2</sub>**). Différentes stratégies de synthèses ont été mises en œuvre et optimisées afin de conduire à la synthèse de 33 nouveaux composés.

L'évaluation biologique des composés pour leur action sur la formation des peptides Aβ<sub>40</sub> et Aβ<sub>42</sub> a révélé que les familles **D<sub>1</sub>** et **D<sub>2</sub>** ont un fort potentiel à diminuer leur formation. Les composés **45**, **46**, **68**, **73**, **74** et **77** présentent des IC<sub>50</sub> inférieures à 5 μM pour l'inhibition de la formation des peptides Aβ<sub>40</sub> et Aβ<sub>42</sub> (même ordre de grandeur que l'AZP2006). Certains représentants des deux familles ont également été testés pour leur action sur la formation de l'AICD et des CTFα. Les composés **48**, **57**, **58**, **72**, **73** et **74** conduisent à une augmentation de la formation de ces fragments, de façon nettement plus efficace que la chloroquine, le composé de référence. Tous les composés présentent une faible cytotoxicité. La liaison du composé **74** à la protéine p97/VCP a été mise en évidence par RMN-STD.

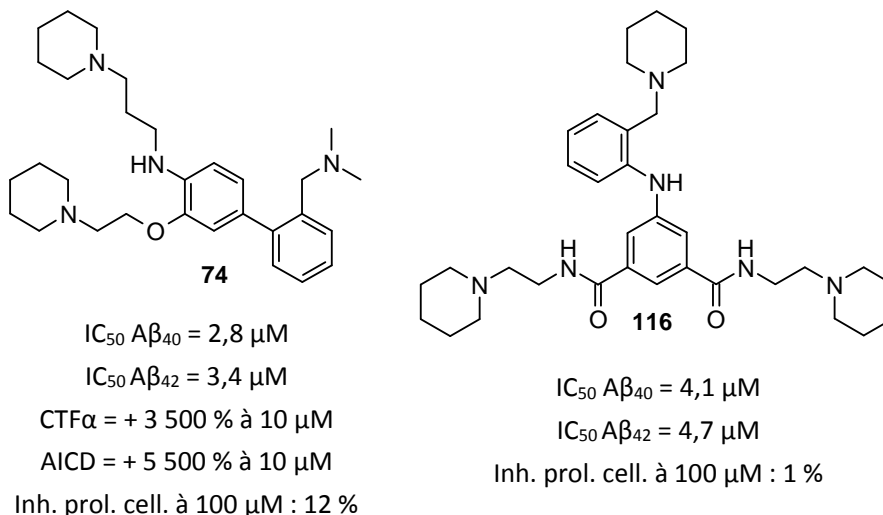


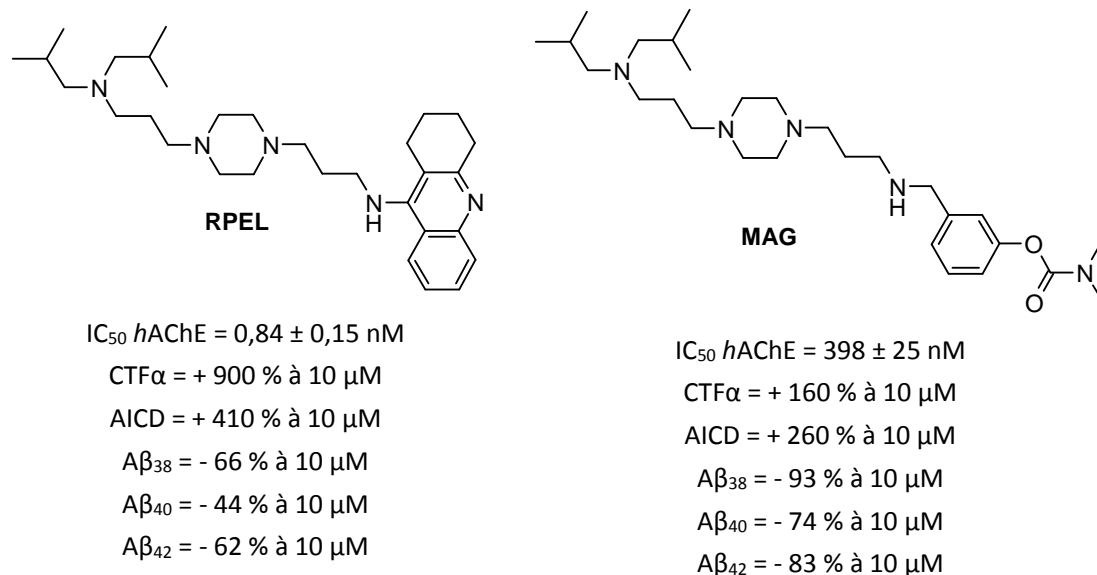
Figure 158. Structure du meilleur composé de chaque groupe de famille.

Les familles **E<sub>1</sub>** et **E<sub>2</sub>** ne présentent pas de toxicité à 100 μM. Les composés présentent une faible action sur la diminution des peptides Aβ<sub>40</sub> et Aβ<sub>42</sub>. Les composés **85**, **116**, **120**, **129** et **130** sont les plus actifs.

Les résultats biologiques positifs des composés **80** et **120** présentant un faible score de similarité avec le pharmacophore lors des études de modélisation moléculaire pourrait mener à une réévaluation de ce modèle pharmacophorique. Le groupement amine proche de l'aromatique pourrait ne pas être essentiel.

La synthèse des composés mixtes entre la famille MSBD et deux IChE commerciaux a été réalisée. Le composé **RPEL**, résultant du couplage entre la chaîne MSBD et la tacrine et le composé **MAG**, résultant

du couplage entre la chaîne MSBD et la rivastigmine ont montré des résultats biologiques très prometteurs. Les deux composés conduisent *in vitro* à une meilleure capacité d'inhibition de l'AChE que les IChE de référence (rivastigmine et tacrine). De plus, les composés induisent une diminution de la formation des peptides A $\beta_{40}$  et A $\beta_{42}$  et une augmentation de la formation des fragments AICD et CTF $\alpha$ . Une étude de RMN-STD des deux composés a révélé une faible interaction des composés avec la protéine p97/VCP.



**Figure 159. Rappel des structures des composés RPEL et MAG.**

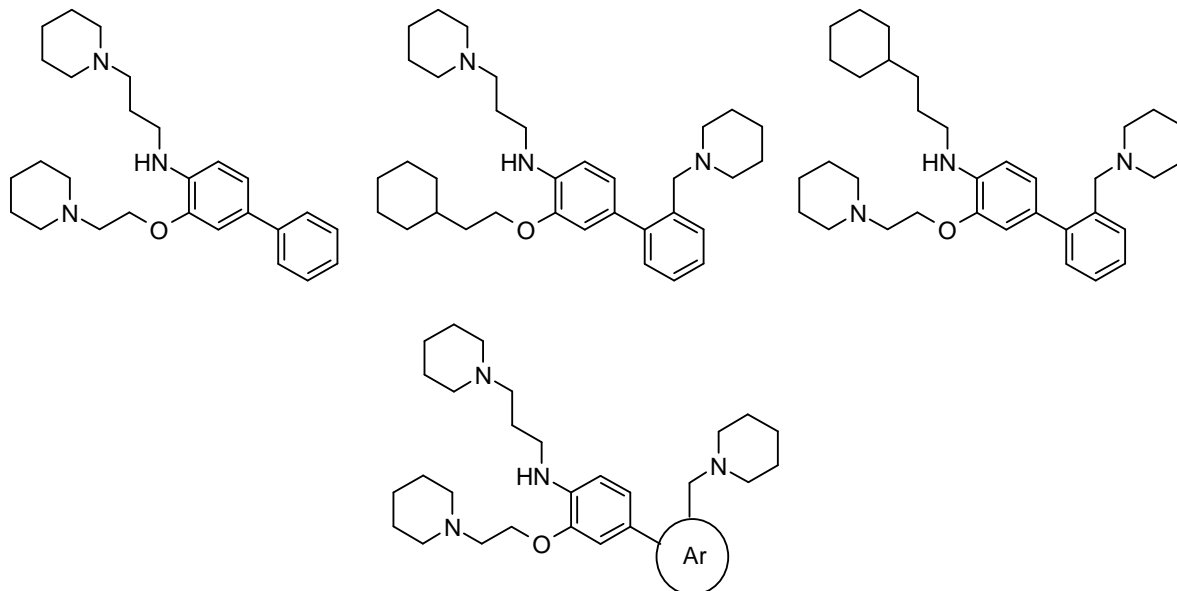
Le composé **RPEL** s'est révélé plus efficace *in vitro* et a été testé *in vivo*. Le composé a conduit à une diminution des troubles cognitifs des deux types de souris transgéniques mimant chacune une des lésions de la MA. D'autres études sont nécessaires pour préciser le mécanisme d'action de ce composé. Une étude de la concentration du composé dans le cerveau des souris traitées a été mise en œuvre, utilisant la technique de LC-MRM. La nécessité d'un étalon interne de structure proche du composé a conduit à la synthèse de l'analogue deutéré du composé **RPEL** contenant 14 deutériums. Une gamme de dilution à de faibles concentrations a mis en évidence une relation linéaire entre le rapport des concentrations et le rapport des aires sous la courbe du composé **RPEL** et de l'étalon interne. Une première analyse d'un cerveau de souris traitée a permis d'estimer la concentration du composé dans les cerveaux à 10 fmol/ $\mu$ L, soit presque 2 ng dans le cerveau d'une souris. La réalisation d'une gamme de concentrations dans le cerveau de souris doit permettre la détermination du rendement d'extraction, de l'effet matrice, la validation de la méthode et le dosage de tous les cerveaux.

De nombreux travaux restent encore à réaliser afin de quantifier l'interaction entre les ligands et la protéine p97/VCP. Le développement des techniques d'ITC, de thermophorèse à micro échelle et de SPR devrait permettre de caractériser quantitativement les interactions ligand/VCP. Ces techniques sont maintenant envisageables grâce au développement d'une méthode de production efficace de la protéine par les biologistes travaillant sur le projet.

Au vu des résultats prometteurs des composés **CB1**, **CB5** et **CB6** issus du screening virtuel, des analogues du composé **CB1** ont été commandés et sont actuellement en test. Aucun analogue des composés **CB5** et **CB6** n'étant disponibles commercialement, ces familles de composés sont de nouvelles perspectives de synthèse.

De plus, un travail de modulation de la famille **D<sub>2</sub>** est envisagé. Les résultats obtenus avec les composés **80** et **120** montrent que l'amine proche de l'aromatique n'est peut être pas essentielle. Ainsi, des

molécules sans ce groupement  $R_2$  sont envisagées. Les groupements  $R_1$  et  $R_3$  de la famille seront également remplacés par les cyclohexyles afin de juger de leur importance (Figure 160). Une modification de l'aromatique de la partie est de la molécule est également envisagée afin de déterminer l'influence de la nature de ce dernier. L'utilisation d'hétéroaromatiques pourrait permettre de diminuer le log D et le poids moléculaire des composés.



**Figure 160. Nouveaux composés de la famille D<sub>2</sub> envisagés.**

Les familles A, B et C développées par un post doctorant ont également montré des résultats prometteurs. La synthèse d'analogues de la famille B est également une perspective de travail.

## **Partie expérimentale**

## A. Chemical synthesis

### 1. Material and instrumentation

Chemicals and solvents were purchased from various suppliers (Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Fisher, VWR) and used without purification.

The reaction monitoring was performed by thin layer chromatography (TLC) on Macherey-Nagel Alugram® Sil 60/UV<sub>254</sub> (thickness 0.2 mm). TLC were revealed by UV ( $\lambda = 254$  nm) and/or the appropriate stain.

Purification of the compounds was carried out by column chromatography (flash or manual). Manual chromatography was performed using Macherey-Nagel silica gel (0.04-0.063 mm of particle size). While flash chromatography was performed on a Reveleris® Flash Chromatography System using Macherey-Nagel Chromabond flash RS columns.

NMR spectra were recorded on a Bruker DRX 300 spectrometer (operating at 300 MHz for <sup>1</sup>H and 75 MHz for <sup>13</sup>C). Chemical shifts are expressed in ppm relative to tetramethylsilane (TMS) or to residual proton signal in deuterated solvents. Chemical shifts are reported as position ( $\delta$  in ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad and M = massif), coupling constant ( $J$  in Hz), relative integral and assignment. The attributions of protons and carbons were achieved by analysis of 1D and 2D experiments (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HQC and HMBC).

LC-MS were performed on a Varian triple quadrupole 1200W mass spectrometer equipped with a non-polar C<sub>18</sub> TSK-gel Super ODS (4.6 x 50 mm) column, using electrospray ionisation and a UV detector (diode array). Elution was performed at a flow rate of 2 mL/min with water-formic acid (pH = 3.8) as eluent A and ACN-formic acid (pH = 3.8) as eluent B, employing a 0.25 min plateau with 0 % B and a linear gradient from 0 % B to 98 % B in 3.25 min, followed by a 0.5 min plateau with 98 % B. Then, column re-equilibration was performed for 1 min. The injection duty cycle was 5 min, taking into account the column equilibration time.

HRMS were recorded on a High Resolution Mass Spectrometer (HRMS) Thermo Scientific™ Exactive™. Analysed compounds were dissolved in methanol and directly introduced in the ionisation source ESI, in positive or negative mode according to the analysed compound, and recorded for one minute. The Xcalibur software was used to determine the elemental composition of main pics of the spectrum.

The purity of final compounds was determined by high pressure liquid chromatography (HPLC) using two columns: C<sub>18</sub> Interchrom UPTISPHERE and C<sub>4</sub> Interchrom UPTISPHERE. The HPLC analysis was carried out on a Shimadzu LC-2010AHT system equipped with a UV detector set at 254 and 215 nm. The compounds were dissolved in 100  $\mu$ L of buffer B and 900  $\mu$ L of buffer A. The eluent system used was: buffer A (H<sub>2</sub>O/TFA, 100:0.1) and buffer B (ACN/H<sub>2</sub>O/TFA, 80:20:0.1). Retention times ( $t_r$ ) were obtained at a flow rate of 0.2 mL/min for 37 min using a gradient from 100 % of buffer A over 1 min, to 100 % buffer B over the next 30 min, to 100 % of buffer A over 1 min and 100 % of buffer A over 1 min.

The melting point analyses were performed on Barnstead Electrothermel Melting Point Series IA9200.

All final compounds were transformed into their chlorohydrate salts following this procedure: the compound was dissolved in MeOH and HCl<sub>aq</sub> 2 M was added dropwise until pH1. The solvent was evaporated and the compound was freeze-dried.

## 2. General procedure

Many reactions were performed using similar procedures. These procedures are described as general procedures in this part.

- **Nucleophilic substitution**

**Procedure A:** 1.0 equivalent of the appropriate amine was dissolved in ACN. 3.0 equivalents of  $K_2CO_3$  were added and the reaction was heated at 80°C for 30 min. 1.4 equivalents of the appropriate chloroalkane-1-amine hydrochloride derivative were added and the mixture was stirred at 80°C until consumption of starting material. The mineral was removed by filtration and the filtrate was evaporated. The residue was purified by manual or flash chromatography.

- **Reductive amination**

**Procedure B:** 1.0 equivalent of the appropriate aldehyde was dissolved in DCE. 1.5 equivalents of the appropriate amine were added. After 1 h 30 to 15 h of stirring at 20°C, 1.5 equivalents of  $NaBH(OAc)_3$  and 1.5 equivalents of acetic acid were added. After 5 to 24 h of stirring at 20°C, a volume of saturated  $NaHCO_3$  solution was added. The reaction mixture was stirred for 1 h. DCM was added and the layers were separated. The organic layer was washed twice with saturated  $NaHCO_3$  solution. The organic layer was dried over  $MgSO_4$  and evaporated. The residue was purified by column or flash chromatography.

**Procedure C:** 1.0 equivalent of the appropriate aldehyde was dissolved in toluene. 1.5 equivalents of the appropriate amine were added. After 1 to 2 h of reflux with a Dean Stark apparatus, the solvent was evaporated and the residue was dissolved in DCE. 1.5 equivalents of  $NaBH(OAc)_3$  and 1.5 equivalents of acetic acid were added. After 15 h to 2 d of stirring at 20°C, a volume of saturated  $NaHCO_3$  solution was added. The reaction mixture was stirred for 1 h. DCM was added and the layers were separated. The organic layer was washed twice with saturated  $NaHCO_3$  solution. The organic layer was dried over  $MgSO_4$  and evaporated. The residue was purified by manual or flash chromatography.

**Procedure D:** 1.0 equivalent of the appropriate aldehyde was dissolved in DCE. 1.5 equivalents of the appropriate amine and 1.0 equivalents of  $ZnCl_2$  were added. After 3 h of stirring at 20°C, 1.5 equivalents of  $NaBH_3CN$  were added. After 16 to 18 h of stirring at 20°C, a saturated  $NaHCO_3$  solution was added. The reaction mixture was stirred for 1 h. DCM was added and the layers were separated. The organic layer was washed twice with saturated  $NaHCO_3$  solution. The organic layer was dried over  $MgSO_4$  and evaporated. The residue was purified by column or flash chromatography.

- **Suzuki reaction**

**Procedure E:** 1.2 equivalents of the appropriate boronic acid were dissolved in a mixture of toluene and EtOH. 1.3 equivalents of  $K_2CO_3$  and 1.0 equivalent of the appropriate bromine compound were added and the reaction was stirred for 30 min and deoxygenated by passing a stream of  $N_2$  through it. 0.02 equivalent of the appropriate palladium catalyst and 0.2 equivalent of the appropriate ligand were added and the mixture was refluxed for 18 h. After cooling, the mixture was poured into water, extracted with ethyl acetate. The combined organic layer was dried over  $MgSO_4$  and evaporated. The residue was purified by column or flash chromatography when necessary.

- **Buchwald reaction**

**Procedure F:** 1.0 equivalent of the appropriate bromine compound was dissolved in dioxane and 1.4 equivalents of  $Cs_2CO_3$  were added. The reaction was stirred for 30 min and deoxygenated by passing a



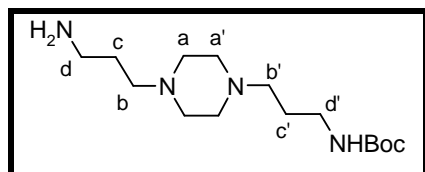
stream of N<sub>2</sub> through it. 0.15 equivalents of Xantphos, 0.05 of Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> and 1.2 equivalents of the appropriate amine dissolved in dioxane were added. The reaction mixture was stirred for 15 h at reflux. The reaction mixture was filtered through a celite pad and the filtrate was evaporated. The residue was purified by column or flash chromatography.

- **Weinreb amide reduction**

**Procedure G:** To a solution of the appropriate Weinreb amide in THF was added LiAlH<sub>4</sub> dropwise, under N<sub>2</sub> atmosphere at 0°C. The mixture was stirred at 0°C for 1 h. Saturated KHSO<sub>4</sub> solution was added dropwise. After evaporation of the THF, the residue was dissolved in DCM and washed twice with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution, twice with HCl (1 M) (if the compound does not contain an amine) and once with saturated NaCl solution. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated. If necessary, the product was purified by flash chromatography.

### 3. Synthesis of biotinylated probes

\* ***tert*-Butyl-*N*-[3-[4-(3-aminopropyl)piperazin-1-yl]propyl]carbamate (**18**)**



$C_{15}H_{32}N_4O_2$   
Mw: 300.45 g/mol

To a solution of 3-[4-(3-aminopropyl)piperazin-1-yl]propan-1-amine (**17**) (10.0 g, 49.9 mmol) in DCM (120 mL) was added dropwise at 0°C a solution of di-*tert*-butyl dicarbonate (3.6 g, 16.6 mmol) in DCM (60 mL) over 3 h. The mixture was stirred for 2 d. The reaction mixture was washed with NaOH 1 M (3 x 60 mL). The aqueous layer was saturated with NaCl and extracted with DCM (2 x 60 mL). The combined organic layer was dried over  $MgSO_4$  and evaporated. The compound was used without further purification in the next step.

The title compound (5.0 g, 16.6 mmol, 99 % yield) was obtained as a yellow oil.

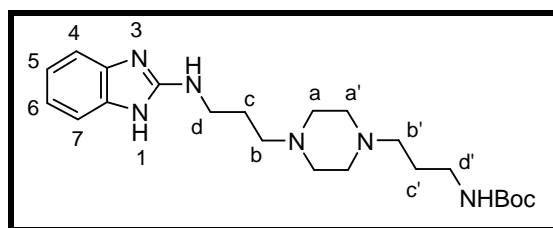
**TLC (Acetone/ $NH_4OH$ , 9:1, v/v):** Rf = 0.5

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 5.49 (br s, 1H, NH); 3.09 (m, 2H,  $H_{d'}$ ); 2.66 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H,  $H_d$ ); 2.40-2.30 (M, 12H,  $H_a, H_{a'}, H_b, H_{b'}$ ); 1.60-1.50 (M, 6H,  $H_c, H_{c'}$ ,  $NH_2$ ); 1.35 (s, 9H,  $C(CH_3)_3$ ).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 156.0 (CO); 78.6 ( $\underline{C}(CH_3)_3$ ); 56.8 ( $C_b, C_{b'}$ ); 56.4 ( $C_a, C_{a'}$ ); 40.8 ( $C_d$ ); 39.9 ( $C_{d'}$ ); 30.4 ( $C_c$ ); 28.4 ( $\underline{C}(CH_3)_3$ ); 26.3 ( $C_c$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 301.3, Found: 301.1  $[M+H]^+$ , 201.1  $[M+H-Boc]^+$ .

\* ***tert*-Butyl-*N*-[3-[4-[3-(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)propyl]piperazin-1-yl]propyl]carbamate (**19**)**



$C_{22}H_{36}N_6O_2$   
Mw: 416.56 g/mol

To a solution of *tert*-butyl-*N*-[3-[4-(3-aminopropyl)piperazin-1-yl]propyl]carbamate (**18**) (1.0 g, 3.3 mmol) in isobutanol (3.2 mL) was added 2-chlorobenzimidazole (0.40 g, 2.6 mmol). The mixture was stirred at reflux for 5 d. The solvent was evaporated. The residue was dissolved in  $MeOH(NH_3)$  and stirred for 1 h. The solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/ $MeOH(NH_3)$ , 10:0 to 9.4:0.6 (v/v)).

The title compound (0.5 g, 1.1 mmol, 42 % yield) was obtained as a brown oil.

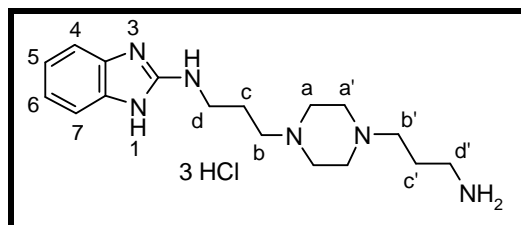
**TLC (DCM/ $MeOH(NH_3)$ , 9:1, v/v):** Rf = 0.2

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 9.55 (br s, 2H, 2NH), 7.20 (m, 2H,  $H_4, H_7$ ); 6.97 (m, 2H,  $H_5, H_6$ ); 5.48 (br s, 1H, NHBoc); 3.39 (m, 2H,  $H_d$ ); 3.17 (m, 2H,  $H_{d'}$ ); 2.58-2.37 (M, 12H,  $H_a, H_{a'}, H_b, H_{b'}$ ); 1.74 (m, 2H,  $H_c$ ); 1.61 (m, 2H,  $H_{c'}$ ), 1.43 (s, 9H,  $C(CH_3)_3$ ).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 157.3 (C<sub>2</sub>); 156.2 (CO); 138.0 (C<sub>aro</sub>); 120.2 (C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>); 111.9 (C<sub>4</sub>, C<sub>7</sub>); (78.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 54.2 (C<sub>b</sub> or C<sub>b'</sub>); 53.2 (C<sub>b</sub> or C<sub>b'</sub>); 53.0 (C<sub>a</sub> or C<sub>a'</sub>); 52.7 (C<sub>a</sub> or C<sub>a'</sub>); 40.9 (C<sub>d</sub>); 39.7 (C<sub>d'</sub>); 28.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 27.0 (C<sub>c</sub>); 26.5 (C<sub>c'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 417.3, Found: 417.1 [M+H]<sup>+</sup>, 317.1 [M+H-Boc]<sup>+</sup>, 415.1 [M-H]<sup>-</sup>.

\* ***N*-[3-[4-(3-Aminopropyl)piperazin-1-yl]propyl]-1*H*-benzimidazol-2-amine trihydrochloride (20)**



C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub> · 3 HCl  
Mw (base): 316.44 g/mol  
Mw (salt): 425.83 g/mol

A solution of *tert*-butyl-*N*-[3-[4-[3-(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)propyl]piperazin-1-yl]propyl]carbamate (**19**) (1.5 g, 3.6 mmol) in dioxane (60 mL) was saturated with HCl<sub>g</sub>. The reaction mixture was stirred at 20°C for 6 h. The solvent was evaporated. The residue was suspended in MeOH and evaporated. The compound was used without further purification in the next step.

The title compound (1.7 g, 3.6 mmol, 99 % yield) was obtained as a yellow oil.

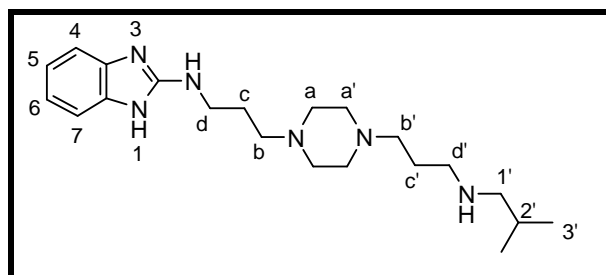
**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 8:2, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.1

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CD<sub>3</sub>OD):** 7.41 (m, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>7</sub>); 7.30 (m, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>); 3.96-3.68 (M, 8H, H<sub>a</sub>, H<sub>a'</sub>); 3.63 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H<sub>d</sub>); 3.52-3.37 (M, 4H, H<sub>b</sub>, H<sub>b'</sub>); 3.11 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H<sub>d'</sub>); 2.33-2.15 (M, 4H, H<sub>c</sub>, H<sub>c'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CD<sub>3</sub>OD):** 150.2 (C<sub>2</sub>); 129.7 (C<sub>aro</sub>); 123.6 (C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>); 111.1 (C<sub>4</sub>, C<sub>7</sub>); 53.6 (C<sub>b</sub>, C<sub>b'</sub>); 48.8 (C<sub>a</sub>, C<sub>a'</sub>); 40.0 (C<sub>d</sub>); 36.6 (C<sub>d'</sub>); 23.3 (C<sub>c</sub>); 21.9 (C<sub>c'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 317.3, Found: 317.1 [M+H]<sup>+</sup>, 315.1 [M-H]<sup>-</sup>.

\* ***N*-[3-[4-[3-(*Isobutylamino*)propyl]piperazin-1-yl]propyl]-1*H*-benzimidazol-2-amine (21)**



C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>  
Mw : 372.55 g/mol

To a suspension of *N*-[3-[4-(3-aminopropyl)piperazin-1-yl]propyl]-1*H*-benzimidazol-2-amine trihydrochloride (**20**) (1.00 g, 2.16 mmol) in dry MeOH (18 mL) was added TEA (0.35 mL, 2.52 mmol) and isobutyraldehyde (0.63 g, 8.76 mmol). The reaction mixture was stirred for 16 h under N<sub>2</sub> atmosphere. NaBH<sub>4</sub> (0.49 g, 13 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 1 h. The solvent was evaporated. The residue was dissolved in 20 mL of water. The aqueous layer was extracted with DCM (3 x 20 mL). The combined organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 10:0:0 to 8:1.75:0.25 (v/v)).

The title compound (0.50 g, 1.48 mmol, 63 % yield) was obtained as a yellow oil.

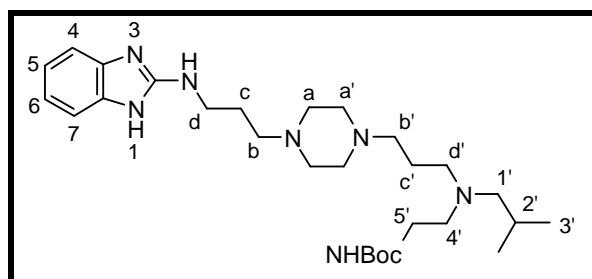
**TLC (DCM/MeOH/NH<sub>3</sub>aq, 8:1.7:0.3, v/v):** Rf = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CD<sub>3</sub>OD):** 7.18 (m, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>7</sub>); 6.95 (m, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>); 3.41 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H<sub>d</sub>); 2.71 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H<sub>d'</sub>); 2.65-2.43 (M, 14H, H<sub>a</sub>, H<sub>a'</sub>, H<sub>b</sub>, H<sub>b'</sub>, H<sub>1'</sub>); 1.91-1.71 (M, 5H, H<sub>c</sub>, H<sub>c'</sub>, H<sub>2'</sub>); 0.96 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, H<sub>3'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CD<sub>3</sub>OD):** 155.77 (C<sub>2</sub>); 137.0 (C<sub>aro</sub>, C<sub>aro</sub>); 119.8 (C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>); 111.3 (C<sub>4</sub>, C<sub>7</sub>); 57.3 (C<sub>b</sub> or C<sub>b'</sub> or C<sub>α</sub>); 56.6 (C<sub>b</sub> or C<sub>b'</sub> or C<sub>1'</sub>); 55.6 (C<sub>b</sub> or C<sub>b'</sub> or C<sub>1'</sub>); 52.5 (C<sub>a</sub>, C<sub>a'</sub>); 48.2 (C<sub>d'</sub>); 40.8 (C<sub>d</sub>); 27.6 (C<sub>2'</sub>); 26.3 (C<sub>c</sub>); 25.4 (C<sub>c'</sub>); 19.7 (C<sub>3'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 373.3, Found: 373.2 [M+H]<sup>+</sup>, 371.1 [M-H]<sup>-</sup>.

\* ***tert*-Butyl-*N*-[2-[3-[4-[3-(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)propyl]piperazin-1-yl]propyl]-isobutylamino]ethyl]carbamate (**22**)**



C<sub>28</sub>H<sub>49</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw : 515.73 g/mol

To a solution of *N*-[3-[4-[3-(isobutylamino)propyl]piperazin-1-yl]propyl]-1*H*-benzimidazol-2-amine (**21**) (540 mg, 1.45 mmol) in DCM (26 mL) was added *tert*-butyl-*N*-(2-oxoethyl)carbamate (690 mg, 4.35 mmol). The reaction mixture was stirred for 30 min at 20°C. It was cooled down to 0°C and NaBH(OAc)<sub>3</sub> (920 mg, 4.35 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 16 h at 20°C. A saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (25 mL) was added. The mixture was stirred for 1 h. 20 mL of DCM was added. The layers were separated and the organic layer was washed with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (3 x 20 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 10:0 to 9.2:0.8 (v/v)).

The title compound (550 mg, 1.07 mmol, 74 % yield) was obtained as a yellow oil.

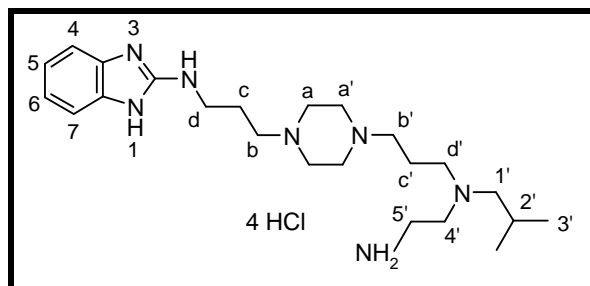
**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1, v/v):** Rf = 0.2

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CD<sub>3</sub>OD):** 7.18 (m, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>7</sub>); 6.95 (m, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>); 3.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H<sub>d</sub>); 3.10 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H<sub>5'</sub>); 2.65-2.40 (M, 16H, H<sub>a</sub>, H<sub>a'</sub>, H<sub>b</sub>, H<sub>b'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>d'</sub>); 2.16 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H<sub>1'</sub>); 1.86 (m, 2H, H<sub>c</sub>); 1.76-1.60 (M, 3H, H<sub>c'</sub>, H<sub>2'</sub>); 1.43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 0.90 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, H<sub>3'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CD<sub>3</sub>OD):** 157.0 (CO); 155.7 (C<sub>2</sub>); 138.1 (C<sub>aro</sub>); 119.8 (C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>); 111.3 (C<sub>4</sub>, C<sub>7</sub>); 78.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 63.0 (C<sub>1'</sub>); 56.1 (C<sub>b'</sub>); 55.6 (C<sub>b</sub>); 53.7 (C<sub>4'</sub>); 52.4 (C<sub>a</sub>, C<sub>a'</sub>, C<sub>d'</sub>); 40.8 (C<sub>d</sub>); 38.0 (C<sub>5'</sub>); 27.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); 26.4 (C<sub>2'</sub>); 26.2 (C<sub>c</sub>); 23.8 (C<sub>c'</sub>); 19.9 (C<sub>3'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 516.4, Found: 516.2 [M+H]<sup>+</sup>, 416.1 [M+H-Boc]<sup>+</sup>, 514.2 [M-H]<sup>-</sup>.

\* ***N'*-[3-[4-[3-(1*H*-Benzimidazol-2-ylamino)propyl]piperazin-1-yl]propyl]-*N'*-isobutylethane-1,2-diamine tetrahydrochloride (**23**)**



$C_{23}H_{41}N_7 + 4 HCl$   
Mw : 415.62 g/mol

A solution of tert-butyl *N*-[2-[3-[4-[3-(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)propyl]piperazin-1-yl]propyl]-isobutyl-amino]ethyl]carbamate (**22**) (400 mg, 0.79 mmol) in dioxane (13 mL) was saturated with HCl<sub>g</sub>. The reaction mixture was stirred at 20°C for 5 h. The solvent was evaporated. The residue was suspended in MeOH and evaporated. The compound was used without further purification in the next step.

The title compound (440 mg, 0.79 mmol, 99 % yield) was obtained as a yellow oil.

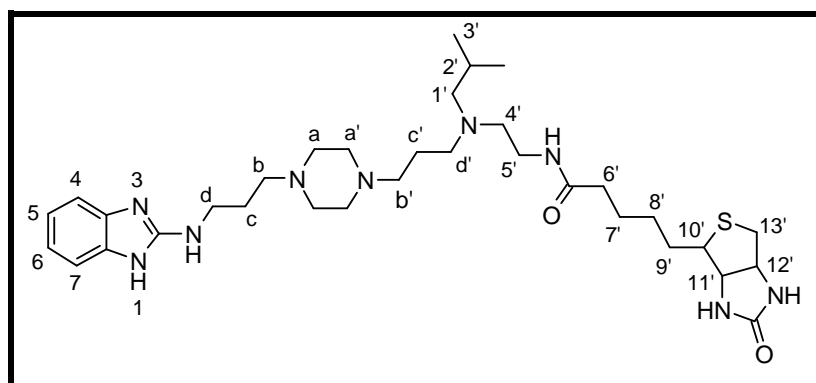
**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 8:2, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.1

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CD<sub>3</sub>OD):** 7.39 (m, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>7</sub>); 7.24 (m, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>); 4.32-3.52 (M, 20H, H<sub>a</sub>, H<sub>a'</sub>, H<sub>b</sub>, H<sub>b'</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>d'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>); 3.22 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H<sub>1'</sub>); 2.51 (m, 2H, H<sub>c</sub>); 2.40-2.19 (M, 3H, H<sub>c'</sub>, H<sub>2'</sub>); 1.12 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, H<sub>3'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CD<sub>3</sub>OD):** 149.9 (C<sub>2</sub>); 129.6 (C<sub>arO</sub>); 123.5 (C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>); 111.1 (C<sub>4</sub>, C<sub>7</sub>); 61.5 (C<sub>1'</sub>); 50.0 (C<sub>a</sub>, C<sub>a'</sub>, C<sub>b</sub>, C<sub>b'</sub>, C<sub>d</sub>, C<sub>4'</sub>); 40.2 (C<sub>d</sub>); 33.9 (C<sub>5'</sub>); 24.3 (C<sub>2'</sub>); 23.5 (C<sub>c</sub>); 19.8 (C<sub>3'</sub>); 18.4 (C<sub>c'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 416.4, Found: 416.1 [M+H]<sup>+</sup>, 414.1 [M-H]<sup>-</sup>.

\* ***Probe 4***



$C_{33}H_{55}N_9O_2S$   
Mw : 641.92 g/mol

To a solution of *N'*-[3-[4-[3-(1*H*-benzimidazol-2-ylamino)propyl]piperazin-1-yl]propyl]-*N'*-isobutylethane-1,2-diamine tetrahydrochloride (**23**) (91 mg, 0.16 mmol) in DMF (2 mL) was added TEA (60 μL, 0.44 mmol) and biotine-OSu (50 mg, 0.15 mmol). The reaction mixture was stirred at 20°C for 24 h. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in MeOH and evaporated three times. The residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1 (v/v)).

The title compound (60 mg, 0.09 mmol, 64 % yield) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 8:2, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CD<sub>3</sub>OD):** 7.22 (m, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>7</sub>); 7.02 (m, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>); 4.48 (m, 1H, H<sub>12'</sub>); 4.28 (m, 1H, H<sub>11'</sub>); 3.45 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H<sub>d</sub>); 3.28 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H<sub>5'</sub>); 3.20 (m, 1H, H<sub>10'</sub>); 2.92 (dd, *J* = 12.8 Hz, *J* = 5.4 Hz, 1H, H<sub>13'</sub>); 2.76-2.53 (M, 17H, H<sub>a</sub>, H<sub>a'</sub>, H<sub>b</sub>, H<sub>b'</sub>, H<sub>4'</sub>, 1H<sub>13'</sub>, H<sub>d'</sub>); 2.27-2.19 (M, 4H, H<sub>1'</sub>, H<sub>6'</sub>); 1.96-1.42 (M, 11H, H<sub>c</sub>, H<sub>c'</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>7'</sub>, H<sub>8'</sub>, H<sub>9'</sub>); 0.92 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H, H<sub>3'</sub>).

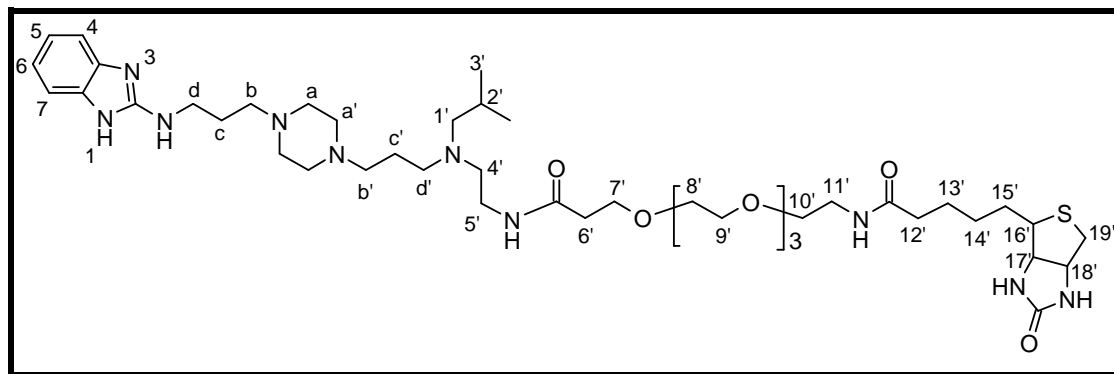
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CD<sub>3</sub>OD):** 174.8 (CO); 155.3 (C<sub>2</sub>); 137.3 (C<sub>aro</sub>); 120.4 (C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>); 111.3 (C<sub>4</sub>, C<sub>7</sub>); 63.0 (C<sub>6'</sub>); 62.0 (C<sub>11'</sub>); 60.2 (C<sub>12'</sub>); 55.8 (C<sub>b'</sub>); 55.6 (C<sub>10'</sub>); 55.0 (C<sub>b</sub>); 53.5 (C<sub>4'</sub>); 52.2 (C<sub>d'</sub>); 52.0 (C<sub>a</sub>, C<sub>a'</sub>); 40.6 (C<sub>d</sub>); 39.7 (C<sub>13'</sub>); 37.0 (C<sub>5'</sub>); 35.4 (C<sub>1'</sub>); 26.2 (C<sub>2'</sub>); 25.5 (C<sub>c</sub>, C<sub>c'</sub>, C<sub>7'</sub>, C<sub>8'</sub>, C<sub>9'</sub>); 19.9 (C<sub>3'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 642.4, Found: 642.2 [M+H]<sup>+</sup>, 321.6 [(M+2H)/2]<sup>+</sup>.

**HR-MS:** *m/z* Calculated: 642.42722, Found: 642.42528 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>33</sub>H<sub>56</sub>N<sub>9</sub>O<sub>2</sub>S.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 8.4 min, purity = 96 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 19.6 min, purity = 96 %.

\* **Probe 6**



C<sub>44</sub>H<sub>76</sub>N<sub>10</sub>O<sub>7</sub>S

M<sub>w</sub> : 889.22 g/mol

To a solution of *N'*-[3-[4-[3-(1*H*-Benzimidazol-2-ylamino)propyl]piperazin-1-yl]propyl]-*N'*-isobutylethane-1,2-diamine tetrahydrochloride (**23**) (120 mg, 0.19 mmol) in DCM (2.5 mL) was added TEA (0.11 mL, 0.78 mmol) and biotin-dPEG(4)-OSu (120 mg, 0.21 mmol). The reaction mixture was stirred at 20°C for 24 h. The solvent was evaporated. The residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 10:0 to 9.2:0.8 (v/v)).

The title compound (120 mg, 0.14 mmol, 70 % yield) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 8.5:1.5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.6

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.26 (m, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>7</sub>); 7.03 (m, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>); 6.75-6.62 (M, 3H, 3NH); 5.80-5.61 (M, 3H, 3NH), 4.48 (m, 1H, H<sub>18'</sub>); 4.30 (m, 1H, H<sub>17'</sub>); 3.74 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H<sub>7'</sub>); 3.62 (d, *J* = 3.4 Hz, 12H, H<sub>8'</sub>, H<sub>9'</sub>); 3.54 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H<sub>10'</sub>); 3.45-3.39 (M, 4H, H<sub>d'</sub>, H<sub>11'</sub>); 3.30 (m, 2H, H<sub>d</sub>); 3.12 (m, 1H, H<sub>16'</sub>); 2.91 (dd, *J* = 12.8 Hz, *J* = 4.8 Hz, 2H, H<sub>19'</sub>); 2.75-2.45 (M, 18H, H<sub>a</sub>, H<sub>a'</sub>, H<sub>b</sub>, H<sub>b'</sub>, H<sub>4'</sub>, 1H<sub>5'</sub>, H<sub>6'</sub>); 2.18-2.14 (M, 4H, H<sub>1'</sub>, H<sub>12'</sub>); 1.84-1.58 (M, 9H, H<sub>c</sub>, H<sub>c'</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>13'</sub>, H<sub>15'</sub>); 1.43 (m, 2H, H<sub>14'</sub>); 0.95 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H, H<sub>3'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 173.4 (CO); 171.1 (CO); 163.9 (CO); 156.6 (C<sub>2</sub>); 137.0 (C<sub>aro</sub>); 120.6 (C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>); 111.9 (C<sub>4</sub>, C<sub>7</sub>); 70.2 (3C<sub>8'</sub>, 3C<sub>9'</sub>, C<sub>10'</sub>); 67.3 (C<sub>7'</sub>); 63.0 (C<sub>1'</sub>); 61.9 (C<sub>17'</sub>); 60.1 (C<sub>18'</sub>); 56.3 (C<sub>6'</sub>); 55.6 (C<sub>16'</sub>); 53.0 (C<sub>d</sub>, C<sub>4'</sub>, C<sub>5'</sub>, C<sub>11'</sub>, C<sub>19'</sub>); 40.7 (C<sub>a</sub>, C<sub>a'</sub>); 39.2 (C<sub>d'</sub>); 37.1 (C<sub>b</sub>, C<sub>b'</sub>); 35.8 (C<sub>12'</sub>); 28.1 (C<sub>14'</sub>, C<sub>15'</sub>); 26.8 (C<sub>c</sub>); 26.5 (C<sub>2'</sub>); 24.3 (C<sub>c</sub> or C<sub>13'</sub>); 22.7 (C<sub>c</sub> or C<sub>13'</sub>); 20.6 (C<sub>3'</sub>).

## Partie expérimentale

**LC-MS (ESI)**  $m/z$  Calculated: 889.6, Found: 889.4  $[M+H]^+$ , 445.2  $[(M+2H)/2]^+$ , 297.2  $[(M+3H)/3]^+$ , 888.5  $[M-H]^-$ , 887.5  $[M-2H]^-$ .

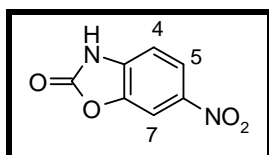
**HR-MS:**  $m/z$  Calculated: 889.56919, Found: 889.56675  $[M+H]^+ = C_{44}H_{77}N_{10}O_7S$ .

**Purity:** C<sub>4</sub> column:  $t_r = 16.4$  min, purity = 96 %; C<sub>18</sub> column:  $t_r = 19.0$  min, purity = 92 %.

## 4. Synthesis of D<sub>1</sub> family

- First synthetic route

\* **6-Nitro-3H-1,3-benzoxazol-2-one (25)**



$C_7H_4N_2O_4$   
Mw: 180.12 g/mol

Nitric acid (50 mL, 0.80 mol) was cooled to 0°C and 3H-1,3-benzoxazol-2-one (**24**) (5.00 g, 37.00 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 20°C for 3 h 30. The reaction mixture was poured in ice. The solid was collected by filtration, washed with water and dried. The compound was used without further purification in the next step.

The title compound (5.80 g, 32.20 mmol, 87 % yield) was obtained as a pink solid.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.5:0.5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.6

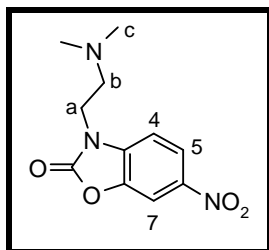
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-d<sub>6</sub>):** 12.41 (s, 1H, NH); 8.20 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H<sub>7</sub>); 8.13 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7.28 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H<sub>4</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-d<sub>6</sub>):** 154.7 (CO); 143.2 (C<sub>aro</sub>); 142.5 (C<sub>aro</sub>); 137.2 (C<sub>aro</sub>); 121.2 (C<sub>5</sub>); 109.8 (C<sub>4</sub>); 105.8 (C<sub>7</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z Calculated:** 179.0, Found: 179.0 [M-H]<sup>-</sup>

**Melting Point:** 249.6°C (Lit.: 248-249°C)<sup>297</sup>

\* **3-[2-(Dimethylamino)ethyl]-6-nitro-1,3-benzoxazol-2-one (26)**



$C_{11}H_{13}N_3O_4$   
Mw: 251.24 g/mol

Synthesized according to procedure A: 6-nitro-3H-1,3-benzoxazol-2-one (100 mg, 0.55 mmol) (**25**), 2-chloro-*N,N*-dimethylethylamine hydrochloride (90 mg, 0.77 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (214 mg, 1.55 mmol) and ACN (5 mL) were used. After 2 h 30 of reaction, the residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.9:0.1 to 9.5:0.5 (v/v)).

The title compound (98 mg, 0.39 mmol, 71 % yield) was obtained as a beige solid.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.8

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.22 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.3 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 8.11 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H<sub>7</sub>); 7.12 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H<sub>4</sub>); 3.38 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.69 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H<sub>b</sub>); 2.30 (s, 6H, H<sub>c</sub>).

<sup>297</sup> J. D. Bower *et al.*, *J. Chem. Soc.*, **1951**, 325-328

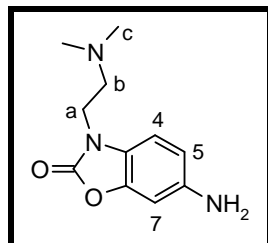


**$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 154.1 (CO); 143.1 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 142.0 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 137.0 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 120.9 ( $\text{C}_5$ ); 107.9 ( $\text{C}_4$ ); 106.3 ( $\text{C}_7$ ); 56.6 ( $\text{C}_b$ ); 45.6 ( $\text{C}_c$ ); 41.2 ( $\text{C}_a$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 252.1, Found: 251.8  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**Melting Point:** 123.2°C

\* **6-Amino-3-[2-(dimethylamino)ethyl]-1,3-benzoxazol-2-one (27)**



$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$   
Mw: 221.26 g/mol

To a stirred solution of 3-[2-(dimethylamino)ethyl]-6-nitro-1,3-benzoxazol-2-one (**26**) (2.50 g, 9.95 mmol) in DCM was added Pd/C 10 % as a catalytic quantity. The reaction mixture was stirred at 20°C under  $\text{H}_2$  atmosphere for 6 h. The catalyst was eliminated by filtration through a celite pad and the filtrate was evaporated. The compound was used without further purification in the next step.

The title compound (2.08 g, 9.40 mmol, 94 % yield) was obtained as a beige solid.

**TLC (DCM/MeOH( $\text{NH}_3$ ), 9.6:0.4, v/v):**  $R_f = 0.5$

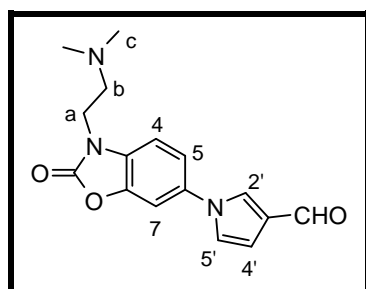
**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 6.71 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ); 6.52 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H,  $\text{H}_7$ ); 6.44 (dd,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 2.1$  Hz, 1H,  $\text{H}_5$ ); 3.81 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $\text{H}_a$ ); 3.74 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 2.59 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ); 2.25 (s, 6H,  $\text{H}_c$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 154.8 (CO); 143.7 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 142.8 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 123.0 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 110.1 ( $\text{C}_5$ ); 108.8 ( $\text{C}_4$ ); 98.1 ( $\text{C}_7$ ); 56.4 ( $\text{C}_b$ ); 45.6 ( $\text{C}_c$ ); 40.4 ( $\text{C}_a$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 222.1, Found: 222.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**Melting Point:** 121.3°C

\* **1-(3-[2-(Dimethylamino)ethyl]-2-oxo-1,3-benzoxazol-6-yl)-1H-pyrrole-3-carbaldehyde (28)**



$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$   
Mw: 299.32 g/mol

To a solution of 6-amino-3-[2-(dimethylamino)ethyl]-1,3-benzoxazol-2-one (**27**) (100 mg, 0.45 mmol) in acetic acid (450  $\mu\text{L}$ ) was added 2,5-dimethoxy-3-formyl-2,3,4,5-tetrahydrofuran (80  $\mu\text{L}$ , 0.56 mmol). The reaction mixture was stirred at 90°C for 1 h 30. Acetic acid was evaporated. The residue was dissolved in DCM and washed with a solution of NaOH (2 M, 2 x 10 mL) and with water (10 mL). The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated. The residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH( $\text{NH}_3$ ), 9.6:0.4 (v/v)).

The title compound (100 mg, 0.33 mmol, 74 % yield) was obtained as a beige solid.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.4:0.6, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.4

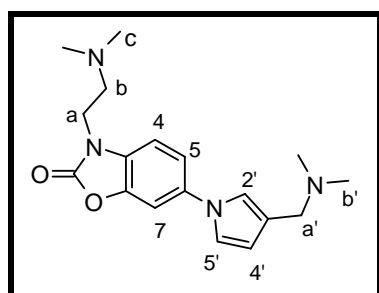
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 9.87 (s, 1H, CHO); 7.61 (dd, *J* = 1.9 Hz, *J* = 1.9 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H<sub>7</sub>); 7.26 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7.10 (d, *J* = 8.1, 1H, H<sub>4</sub>); 7.04 (dd, *J* = 2.4, *J* = 2.2, 1H, H<sub>4'</sub>); 6.82 (dd, *J* = 1.5, *J* = 1.7, 1H, H<sub>5'</sub>); 3.96 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.69 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H<sub>b</sub>); 2.32 (s, 6H, H<sub>c</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 185.4 (CHO); 154.3 (CO); 143.1 (C<sub>aro</sub>); 134.9 (C<sub>aro</sub>); 130.7 (C<sub>aro</sub>); 128.2 (C<sub>aro</sub>); 127.5 (C<sub>2'</sub>); 122.8 (C<sub>4'</sub>); 117.3 (C<sub>5</sub>); 109.7 (C<sub>5'</sub>); 109.1 (C<sub>4</sub>); 104.4 (C<sub>7</sub>); 56.6 (C<sub>b</sub>); 45.6 (C<sub>c</sub>); 40.8 (C<sub>a</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 300.1, Found: 300.1 [M+H]<sup>+</sup>.

**Melting Point:** 119.1°C

\* **3-[2-(Dimethylamino)ethyl]-6-(3-[(dimethylamino)methyl]-1H-pyrrol-1-yl)-1,3-benzoxazol-2-one (29)**



C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 328.41 g/mol

To a stirred solution of 1-(3-[2-(dimethylamino)ethyl]-2-oxo-1,3-benzoxazol-6-yl)-1H-pyrrole-3-carbaldehyde (**28**) (500 mg, 1.68 mmol) in DCE (20 mL) was added dimethylamine hydrochloride (410 mg, 5.00 mmol) and TEA (680 μL, 5.00 mmol). The reaction mixture was stirred at 20°C for 3 h and NaBH(OAc)<sub>3</sub> (1.00 g, 5.00 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 2 d. A saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (20 mL) was added. The mixture was stirred 30 min. The layers were separated and the organic layer was washed with a saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (3 x 20 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The compound was used without further purification in the next step.

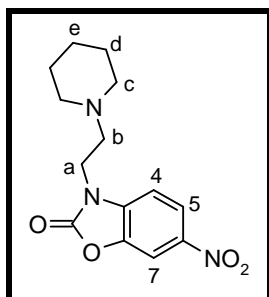
The title compound (484 mg, 1.47 mmol, 88 % yield) was obtained as a brown oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 94:6, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.25 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H<sub>7</sub>); 7.21 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.3 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H<sub>4</sub>); 6.98-6.95 (M, 2H, H<sub>2'</sub>, H<sub>5'</sub>); 6.30 (dd, *J* = 2.5 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 3.93 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 3.42 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.67 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H<sub>b</sub>); 2.31 (s, 12H, H<sub>c</sub>, H<sub>b'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 154.6 (CO); 143.2 (C<sub>aro</sub>); 136.3 (C<sub>aro</sub>); 129.1 (C<sub>aro</sub>); 122.6 (C<sub>aro</sub>); 119.8 (C<sub>2'</sub> or C<sub>5'</sub>); 119.0 (C<sub>2'</sub> or C<sub>5'</sub>); 116.2 (C<sub>5</sub>); 111.9 (C<sub>4'</sub>); 108.7 (C<sub>4</sub>); 103.7 (C<sub>7</sub>); 56.6 (C<sub>b</sub> or C<sub>a'</sub>); 56.2 (C<sub>b</sub> or C<sub>a'</sub>); 45.8 (C<sub>c</sub> or C<sub>b'</sub>); 45.0 (C<sub>c</sub> or C<sub>b'</sub>); 40.7 (C<sub>a</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 329.2, Found: 329.3 [M+H]<sup>+</sup>.

\* **6-Nitro-3-[2-(piperidin-1-yl)ethyl]-1,3-benzoxazol-2-one (32)**C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Mw: 291.30 g/mol

Synthesized according to procedure A: 6-nitro-3*H*-1,3-benzoxazol-2-one (**25**) (5.00g, 27.80 mmol), 2-chloroethylpiperidine hydrochloride (7.68 g, 41.70 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10.90 g, 83.40 mmol) and ACN (250 mL) were used. After 3 h 30 of reaction, the compound was recrystallized in EtOH.

The title compound (6.08 g, 20.87 mmol, 75 % yield) was obtained as a beige solid.

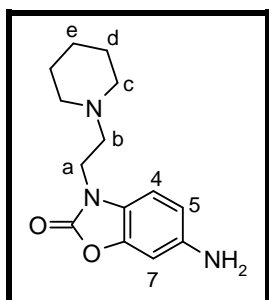
**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.5:0.5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.5

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.20 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 8.08 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H<sub>7</sub>); 7.15 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H<sub>4</sub>); 3.97 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.66 (t, *J* = 6.4, 2H, H<sub>b</sub>); 2.45 (m, 4H, H<sub>c</sub>); 1.50 (m, 4H, H<sub>d</sub>); 1.42 (m, 2H, H<sub>e</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 154.1 (CO); 143.0 (C<sub>aro</sub>); 141.9 (C<sub>aro</sub>); 137.3 (C<sub>aro</sub>); 120.7 (C<sub>5</sub>); 108.2 (C<sub>4</sub>); 106.1 (C<sub>7</sub>); 56.2 (C<sub>b</sub>); 54.8 (C<sub>c</sub>); 40.9 (C<sub>a</sub>); 26.0 (C<sub>d</sub>); 24.1 (C<sub>e</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 292.1, Found: 292.0 [M+H]<sup>+</sup>, 290.0 [M-H]<sup>-</sup>.

**Melting Point:** 120.2°C

\* **6-Amino-3-[2-(piperidin-1-yl)ethyl]-1,3-benzoxazol-2-one (33)**C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

Mw: 261.32 g/mol

6-Nitro-3-[2-(piperidin-1-yl)ethyl]-1,3-benzoxazol-2-one (**32**) (3.10 g, 10.60 mmol) was dissolved in DCM (75 mL). Then Pd/C 10 % (500 mg) was added. The reaction mixture was stirred at 20°C under a H<sub>2</sub> atmosphere for 6 h. The catalyst was eliminated by filtration through a celite pad and the filtrate was evaporated. The compound was used without further purification in the next step.

The title compound (2.76 g, 10.60 mmol, 99 % yield) was obtained as a beige solid.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.5:0.5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

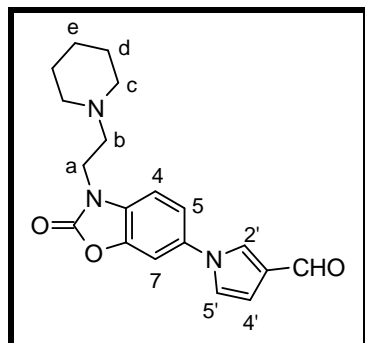
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 6.83 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H<sub>4</sub>); 6.61 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H<sub>7</sub>); 6.50 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 3.91 (t, *J* = 6.9, 2H, H<sub>a</sub>); 3.63 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>); 2.68 (t, *J* = 7.8, 2H, H<sub>b</sub>); 2.50 (m, 4H, H<sub>c</sub>); 1.59 (m, 4H, H<sub>d</sub>); 1.45 (m, 2H, H<sub>e</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 154.8 (CO); 143.7 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 142.5 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 123.4 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 110.1 ( $\text{C}_5$ ); 109.0 ( $\text{C}_4$ ); 98.2 ( $\text{C}_7$ ); 56.0 ( $\text{C}_b$ ); 54.7 ( $\text{C}_c$ ); 40.0 ( $\text{C}_a$ ); 25.9 ( $\text{C}_d$ ); 24.2 ( $\text{C}_e$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 262.2, Found: 262.1 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .

**Melting Point:** 96.4°C

\* **1-(2-Oxo-3-[2-(piperidin-1-yl)ethyl]-1,3-benzoxazol-6-yl)-1H-pyrrole-3-carbaldehyde (34)**



$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$   
Mw: 339.39 g/mol

To a solution of 6-amino-3-[2-(piperidin-1-yl)ethyl]-1,3-benzoxazol-2-one (**33**) (1.50 g, 5.74 mmol) in acetic acid (9 mL) was added 2,5-dimethoxy-3-formyl-2,3,4,5-tetrahydrofuran (1.02 mL, 7.17 mmol). The reaction mixture was stirred at 90°C for 1 h. Acetic acid was evaporated. The residue was dissolved in DCM and washed with a solution of NaOH (2 M, 2 x 10 mL) and with water (10 mL). The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated. The residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH( $\text{NH}_3$ ), 9.6:0.4 (v/v)).

The title compound (1.35 g, 3.98 mmol, 69 % yield) was obtained as a beige solid.

**TLC (DCM/MeOH( $\text{NH}_3$ ), 9.5:0.5, v/v):**  $R_f$  = 0.4

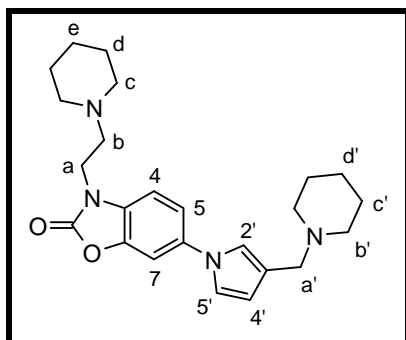
**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 9.87 (s, 1H, CHO); 7.62 (dd,  $J$  = 2.0 Hz,  $J$  = 1.8 Hz, 1H,  $\text{H}_2$ ); 7.30 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H,  $\text{H}_7$ ); 7.25 (dd,  $J$  = 8.4 Hz,  $J$  = 2.1 Hz, 1H,  $\text{H}_5$ ); 7.13 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ); 7.04 (dd,  $J$  = 3.0 Hz,  $J$  = 2.3 Hz, 1H,  $\text{H}_4'$ ); 6.82 (dd,  $J$  = 3.0 Hz,  $J$  = 1.6 Hz, 1H,  $\text{H}_5'$ ); 3.97 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H,  $\text{H}_a$ ); 2.68 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ); 2.47 (m, 4H,  $\text{H}_c$ ); 1.55 (m, 4H,  $\text{H}_d$ ); 1.44 (m, 2H,  $\text{H}_e$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 185.4 (CHO); 154.3 (CO); 143.1 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 134.8 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 130.8 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 128.2 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 127.5 ( $\text{C}_2'$ ); 122.8 ( $\text{C}_4'$ ); 117.1 ( $\text{C}_5$ ); 109.7 ( $\text{C}_5'$ ); 109.3 ( $\text{C}_4$ ); 104.3 ( $\text{C}_7$ ); 56.2 ( $\text{C}_b$ ); 54.8 ( $\text{C}_c$ ); 40.5 ( $\text{C}_a$ ); 26.0 ( $\text{C}_d$ ); 24.2 ( $\text{C}_e$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 340.2, Found: 340.0 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ .

**Melting Point:** 120.3°C

\* **3-[2-(Piperidin-1-yl)ethyl]-6-[3-(piperidin-1-ylmethyl)-1H-pyrrol-1-yl]-1,3-benzoxazol-2-one (35)**



$C_{24}H_{32}N_4O_2$   
Mw: 408.54 g/mol

Synthesized according to procedure B: 1-(2-oxo-3-[2-(piperidin-1-yl)ethyl]-1,3-benzoxazol-6-yl)-1H-pyrrole-3-carbaldehyde (**34**) (600 mg, 1.78 mmol), piperidine (0.26 mL, 2.67 mmol),  $NaBH(OAc)_3$  (566 mg, 2.67 mmol), acetic acid (0.15 mL, 2.67 mmol) and DCE (22 mL) were used. The iminium was formed for 6 h and reduced for 16 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 10:0 to 9:1 (v/v)).

The title compound (660 mg, 1.62 mmol, 91 % yield) was obtained as a brown oil.

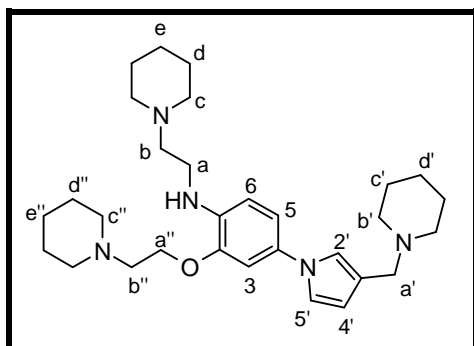
**TLC (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 9:1, v/v):** Rf = 0.4

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 7.24 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H,  $H_7$ ); 7.20 (dd,  $J = 8.6$  Hz,  $J = 2.1$  Hz, 1H,  $H_5$ ); 7.04 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H,  $H_4$ ); 6.98-6.93 (M, 2H,  $H_{2'}$ ,  $H_{5'}$ ); 6.30 (dd,  $J = 1.9$  Hz,  $J = 2.5$  Hz, 1H,  $H_{4'}$ ); 3.94 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H,  $H_a$ ); 3.44 (s, 2H,  $H_{a'}$ ); 2.68 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $H_b$ ); 2.51-2.43 (M, 8H,  $H_c$ ,  $H_{b'}$ ); 1.63-1.54 (M, 8H,  $H_d$ ,  $H_{c'}$ ); 1.47-1.41 (M, 4H,  $H_e$ ,  $H_{d'}$ ).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 154.6 (CO); 143.2 ( $C_{aro}$ ); 136.3 ( $C_{aro}$ ); 129.1 ( $C_{aro}$ ); 122.6 ( $C_{aro}$ ); 119.3 ( $C_{2'}$  or  $C_{5'}$ ); 119.0 ( $C_{2'}$  or  $C_{5'}$ ); 115.9 ( $C_5$ ); 112.3 ( $C_{4'}$ ); 109.0 ( $C_4$ ); 103.4 ( $C_7$ ); 56.2 ( $C_{a'}$ ); 56.0 ( $C_c$ ,  $C_{b'}$ ); 54.3 ( $C_b$ ); 40.4 ( $C_a$ ); 26.0 ( $C_d$ ,  $C_{c'}$ ); 24.4 ( $C_e$  or  $C_{d'}$ ); 24.2 ( $C_e$  or  $C_{d'}$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 409.3, Found: 409.0 [ $M+H$ ] $^+$ .

\* **2-[2-(Piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[2-(piperidin-1-yl)ethyl]-4-[3-(piperidin-1-ylmethyl)-1H-pyrrol-1-yl]aniline (37)**



$C_{30}H_{47}N_5O$   
Mw: 493.74 g/mol

A mixture of 3-[2-(piperidin-1-yl)ethyl]-6-[3-(piperidin-1-ylmethyl)-1H-pyrrol-1-yl]-1,3-benzoxazol-2-one (200 mg, 0.49 mmol) (**35**) was suspended in water (3 mL). Then dioxane (1 mL) was added. The mixture was stirred at 80°C. A solution of NaOH (6 M, 0.49 mL, 2.94 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 80°C for 2 h. A solution of HCl (3 M) was added dropwise until precipitation (pH = 7). The

reaction mixture was then extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated.

The residue (150 mg, 0.39 mmol) was dissolved in THF (0.80 mL). Then NaH (39.20 mg, 0.98 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 20°C for 1 h. Then 1-(2-chloroethyl)piperidine hydrochloride (79.4 mg, 0.47 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 4 h at 20°C. Water (10 mL) was added. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 10:0 to 9.5:0.5 (v/v)).

The title compound (10 mg, 0.02 mmol, 5 % yield) was obtained as a brown oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 6.94 (m, 1H, H<sub>2'</sub>); 6.91-6.85 (M, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>5'</sub>); 6.80 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 6.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 6.30 (dd, *J* = 2.1 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 4.15 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, H<sub>a''</sub>); 3.44 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.20 (m, 2H, H<sub>a</sub>); 2.85 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, H<sub>b''</sub>); 2.63 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H<sub>b</sub>); 2.57-2.52 (M, 8H, H<sub>b'</sub>, H<sub>c''</sub>); 2.43 (m, 4H, H<sub>c</sub>); 1.72-1.56 (M, 12H, H<sub>d</sub>, H<sub>c'</sub>, H<sub>d''</sub>); 1.51-1.43 (M, 6H, H<sub>e</sub>, H<sub>d'</sub>, H<sub>e''</sub>).

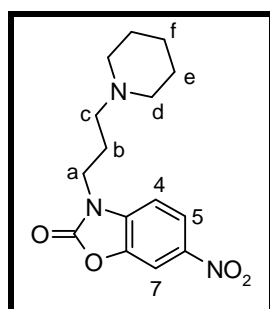
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 146.5 (C<sub>aro</sub>); 137.2 (C<sub>aro</sub>); 130.8 (C<sub>aro</sub>); 120.2 (C<sub>2'</sub> or C<sub>5'</sub>); 119.8 (C<sub>2'</sub> or C<sub>5'</sub>); 118.4 (C<sub>aro</sub>); 114.0 (C<sub>5</sub>); 111.2 (C<sub>4'</sub>); 109.8 (C<sub>6</sub>); 105.3 (C<sub>3</sub>); 66.6 (C<sub>a''</sub>); 58.1 (C<sub>b''</sub>); 57.4 (C<sub>b</sub>); 55.6 (C<sub>a'</sub>); 55.0 (C<sub>c''</sub>); 54.4 (C<sub>c</sub>); 53.6 (C<sub>b'</sub>); 40.5 (C<sub>a</sub>); 26.0 (C<sub>d</sub>, C<sub>d''</sub>), 25.2 (C<sub>c'</sub>), 24.5 (C<sub>e</sub> or C<sub>d'</sub> or C<sub>e''</sub>); 24.2 (C<sub>e</sub> or C<sub>d'</sub> or C<sub>e''</sub>); 23.9 (C<sub>e</sub> or C<sub>d'</sub> or C<sub>e''</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 494.4, Found 494.2 [M+H]<sup>+</sup>.

**HR-MS:** *m/z* Calculated: 494.38534, Found: 494.38598 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>5</sub>O.

- **Second synthetic route**

- \* **6-Nitro-3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-1,3-benzoxazol-2-one (39)**



C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 305.34 g/mol

Synthesized according to procedure A: 6-nitro-3*H*-1,3-benzoxazol-2-one (**25**) (3.00 g, 16.70 mmol), 1-(3-chloropropyl)piperidine hydrochloride (3.96 g, 20.00 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6.91 g, 50.00 mmol) and ACN (150 mL) were used. After 5 h of reaction the residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.8:0.2 (v/v)).

The title compound (5.00 g, 16.38 mmol, 98 % yield) was obtained as a beige solid.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.4

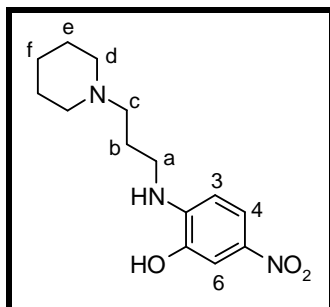
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.21 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 8.10 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H<sub>7</sub>); 7.25 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H<sub>4</sub>); 4.00 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.38-2.28 (M, 6H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>); 2.00 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.54 (m, 4H, H<sub>e</sub>); 1.43 (m, 2H, H<sub>f</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 154.1 (CO); 143.0 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 141.9 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 137.3 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 120.7 ( $\text{C}_5$ ); 108.0 ( $\text{C}_4$ ); 106.1 ( $\text{C}_7$ ); 55.4 ( $\text{C}_c$ ); 54.4 ( $\text{C}_d$ ); 41.1 ( $\text{C}_a$ ); 25.9 ( $\text{C}_e$ ); 24.4 ( $\text{C}_b$ ); 24.3 ( $\text{C}_f$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 306.2, Found: 306.2 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , 304.3 [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$ .

**Melting Point:** 81.2°C

\* **5-Nitro-2-([3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenol (40)**



$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$

Mw: 279.34 g/mol

6-Nitro-3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-1,3-benzoxazol-2-one (**39**) (1.00 g, 3.28 mmol) was dissolved in dioxane (5 mL) and a solution of NaOH (2.5 M, 26 mL, 65.50 mmol) was added and stirred at 20°C for 2 d. The reaction mixture was cooled to 0°C. A solution of HCl (2N, 40 mL) was added. Then a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  (50 mL) was added. After 30 min of stirring, the mixture was extracted with EtOAc (3 x 100 mL). The combined organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH( $\text{NH}_3$ ), 10:0 to 9.5:0.5 (v/v)).

The title compound (715 mg, 2.56 mmol, 78 % yield) was obtained as an orange solid.

**TLC (DCM/MeOH( $\text{NH}_3$ ), 9:1, v/v):** Rf = 0.5

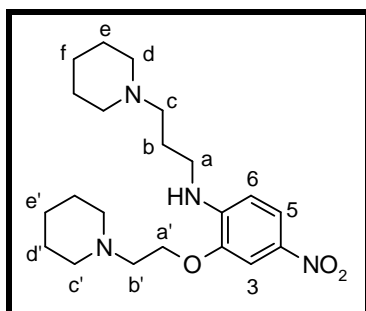
**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 7.69 (dd,  $J = 8.7$  Hz,  $J = 2.4$  Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ); 7.49 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H,  $\text{H}_6$ ); 6.32 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ); 3.23 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H,  $\text{H}_a$ ); 2.67-2.57 (M, 6H,  $\text{H}_c$ ,  $\text{H}_d$ ); 1.93 (m, 2H,  $\text{H}_b$ ); 1.69 (m, 4H,  $\text{H}_e$ ); 1.50 (m, 2H,  $\text{H}_f$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 145.4 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 144.3 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 136.7 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 118.5 ( $\text{C}_6$ ); 108.8 ( $\text{C}_4$ ); 106.4 ( $\text{C}_3$ ); 56.3 ( $\text{C}_c$ ); 54.1 ( $\text{C}_d$ ); 41.2 ( $\text{C}_a$ ); 25.1 ( $\text{C}_b$ ); 24.5 ( $\text{C}_e$ ); 23.5 ( $\text{C}_f$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 280.2, Found: 280.1 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ , 278.1 [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$ .

**Melting Point:** 152.0°C

\* **4-Nitro-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl]aniline (42)**



$\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_3$

Mw: 390.53 g/mol

5-Nitro-2-([3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenol (**40**) (200 mg, 0.72 mmol) was suspended in acetonitrile (6 mL) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (300 mg, 2.15 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 20°C for 10 min. Then 1-(2-chloroethyl)piperidin-1-ium chloride (160 mg, 0.86 mmol) was added. The reaction

mixture was stirred at 60°C for 5 h. The mineral was filtered and the solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 10:0 to 9.8:0.2 (v/v)).

The title compound (200 mg, 0.51 mmol, 72 % yield) was obtained as a brown oil.

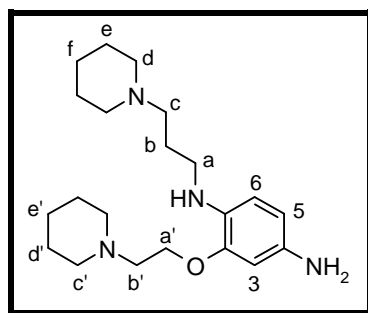
**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.5

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.86 (dd, *J* = 8.9 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7.62 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 6.46 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 6.19 (br t, *J* = 4.9 Hz, 1H, NH); 4.17 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.28 (m, 2H, H<sub>a</sub>); 2.77 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>), 2.48 (m, 4H, H<sub>c'</sub>); 2.45-2.33 (M, 6H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>); 1.83 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.65-1.54 (M, 8H, H<sub>e</sub>, H<sub>d'</sub>); 1.49-1.39 (M, 4H, H<sub>f</sub>, H<sub>e'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 145.1 (C<sub>aro</sub>); 144.3 (C<sub>aro</sub>); 136.3 (C<sub>aro</sub>); 120.3 (C<sub>3</sub>); 106.48 (C<sub>5</sub>); 106.3 (C<sub>6</sub>); 66.4 (C<sub>a'</sub>); 57.6 (C<sub>c</sub>); 57.2 (C<sub>b'</sub>); 54.8 (C<sub>d</sub>); 54.5 (C<sub>c'</sub>); 42.0 (C<sub>a</sub>); 25.8 (C<sub>e</sub>, C<sub>d'</sub>); 25.7 (C<sub>b</sub>); 24.2 (C<sub>f</sub>, C<sub>e'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 391.3, Found: 391.1 [M+H]<sup>+</sup>.

\* **2-[2-(Piperidin-1-yl)ethoxy]-N1-[3-(piperidin-1-yl)propyl]benzene-1,4-diamine (43)**



C<sub>21</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O  
Mw: 360.54 g/mol

4-Nitro-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-*N*-[3-(piperidin-1-yl)propyl]aniline (**42**) was dissolved in MeOH (4.2 mL). A catalytic amount of Pd/C 10 % was added and the reaction mixture was stirred at 20°C under a H<sub>2</sub> atmosphere for 6 h. The catalyst was eliminated by filtration through a celite pad and the filtrate was evaporated. The residue was used quickly without further purification in the next step (degradation).

The title compound (365 mg, 1.02 mmol, 99 %) was obtained as a purple oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

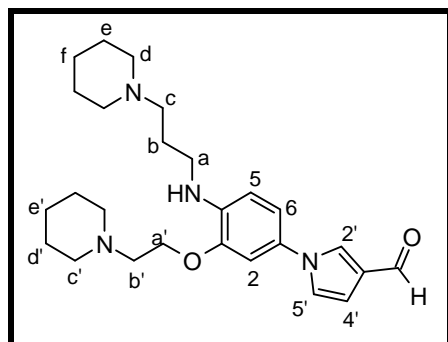
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 6.43 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 6.30-6.20 (M, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>3</sub>); 4.03 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.63 (br s, 3H, NH<sub>2</sub>, NH); 3.06 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.74 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>); 2.46 (m, 4H, H<sub>c'</sub>); 2.42-2.31 (M, 6H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>); 1.76 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.62-1.52 (M, 8H, H<sub>e</sub>, H<sub>d'</sub>); 1.47-1.35 (M, 4H, H<sub>f</sub>, H<sub>e'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 147.2 (C<sub>aro</sub>); 137.3 (C<sub>aro</sub>); 131.8 (C<sub>aro</sub>); 111.8 (C<sub>6</sub>); 108.0 (C<sub>5</sub>); 111.4 (C<sub>3</sub>); 66.3 (C<sub>a'</sub>); 58.0 (C<sub>c</sub>); 57.5 (C<sub>b'</sub>); 55.0 (C<sub>d</sub>); 54.7 (C<sub>c'</sub>); 43.5 (C<sub>a</sub>); 26.7 (C<sub>b</sub>); 26.0 (C<sub>e</sub>, C<sub>d'</sub>); 24.3 (C<sub>f</sub>, C<sub>e'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 361.3, Found: 361.1 [M+H]<sup>+</sup>.



\* **1-(3-[2-(Piperidin-1-yl)ethoxy]-4-([3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenyl)-1H-pyrrole-3-carbaldehyde (44)**



$C_{26}H_{38}N_4O_2$   
Mw: 438.60 g/mol

2-[2-(Piperidin-1-yl)ethoxy]-N1-[3-(piperidin-1-yl)propyl]benzene-1,4-diamine (**43**) (780 mg, 2.16 mmol) was dissolved in acetic acid (5 mL). Then 2,5-dimethoxy-3-formyl-2,3,4,5-tetrahydrofuran (380  $\mu$ L, 2.71 mmol) was added and the reaction mixture was heated at 90°C for 2 h. The solvent was evaporated. The residue was dissolved in a saturated solution of  $NaHCO_3$ . The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 50 mL). The combined organic layer was dried over  $MgSO_4$  and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 10:0 to 9.8:0.2 (v/v)).

The title compound (410 mg, 0.93 mmol, 43 % yield) was obtained as a brown oil.

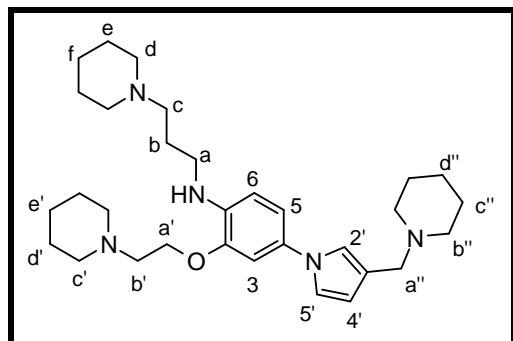
**TLC (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 9:1, v/v):**  $R_f = 0.3$

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 9.81 (s, 1H, CHO); 7.54 (dd,  $J = 2.1$  Hz,  $J = 1.7$  Hz, 1H,  $H_{2'}$ ); 6.95 (dd,  $J = 2.9$  Hz,  $J = 2.2$  Hz, 1H,  $H_{4'}$ ); 6.89 (dd,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 2.3$  Hz, 1H,  $H_6$ ); 6.81 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H,  $H_2$ ); 6.74 (dd,  $J = 2.8$  Hz,  $J = 1.8$  Hz, 1H,  $H_{5'}$ ); 6.59 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H,  $H_5$ ); 4.91 (br s, 1H, NH); 4.15 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H,  $H_{a'}$ ); 3.21 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H,  $H_a$ ); 2.80 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $H_{b'}$ ); 2.59-2.35 (M, 10H,  $H_c$ ,  $H_d$ ,  $H_{c'}$ ); 1.87 (m, 2H,  $H_b$ ); 1.69-1.53 (M, 8H,  $H_e$ ,  $H_{d'}$ ), 1.53-1.38 (M, 4H,  $H_f$ ,  $H_{e'}$ ).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 185.5 (CHO); 146.3 ( $C_{aro}$ ); 138.5 ( $C_{aro}$ ); 129.0 ( $C_{aro}$ ); 127.7 ( $C_2$ ); 127.3 ( $C_{aro}$ ); 123.0 ( $C_{4'}$ ); 114.8 ( $C_6$ ); 109.3 ( $C_5$ ); 108.9 ( $C_{5'}$ ); 105.8 ( $C_2$ ); 66.8 ( $C_{a'}$ ); 57.9 ( $C_{b'}$ ); 57.4 ( $C_c$ ); 55.0 ( $C_{c'}$ ); 54.7 ( $C_d$ ); 42.5 ( $C_a$ ); 26.2 ( $C_b$ ); 25.9 ( $C_e$ ,  $C_{d'}$ ), 24.2 ( $C_f$ ,  $C_{e'}$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 439.3, Found: 439.2 [ $M+H$ ] $^+$ .

\* **2-[2-(Piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-4-[3-(piperidin-1-ylmethyl)-1H-pyrrol-1-yl]aniline (45)**



$C_{31}H_{49}N_5O$   
Mw: 507.75 g/mol

Synthesized according to procedure B: 1-(3-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-4-([3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenyl)-1H-pyrrole-3-carbaldehyde (**44**) (80 mg, 0.18 mmol), piperidine (27  $\mu$ L, 0.27

mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (58 mg, 0.27 mmol), acetic acid (16 µL, 0.27 mmol) and DCE (2 mL) were used. The iminium was formed for 1.5 h and reduced for 16 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 10:0 to 9:1 (v/v)).

The title compound (20 mg, 0.07 mmol, 40 % yield) was obtained as a brown oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 6.95 (m, 1H, H<sub>2'</sub>); 6.91 (m, 1H, H<sub>5'</sub>); 6.87 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 2.7 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 6.81 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 6.58 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 6.25 (m, 1H, H<sub>4'</sub>); 4.71 (br s, 1H, NH); 4.15 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.58 (s, 2H, H<sub>a''</sub>); 3.20 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.81 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>); 2.65-2.36 (M, 14H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>c'</sub>, H<sub>b''</sub>); 1.95 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.77-1.56 (M, 12H, H<sub>e</sub>, H<sub>d'</sub>, H<sub>c''</sub>); 1.52-1.40 (M, 6H, H<sub>f</sub>, H<sub>e'</sub>, H<sub>d''</sub>).

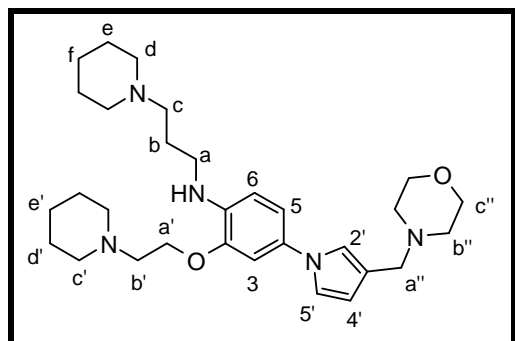
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 146.2 (C<sub>aro</sub>); 137.5 (C<sub>aro</sub>); 130.3 (C<sub>aro</sub>); 121.5 (C<sub>2'</sub>); 120.5 (C<sub>5'</sub>); 116.6 (C<sub>3'</sub>); 114.4 (C<sub>5</sub>); 111.6 (C<sub>4'</sub>); 109.6 (C<sub>6</sub>); 105.7 (C<sub>3</sub>); 66.4 (C<sub>a'</sub>); 57.7 (C<sub>b'</sub>); 57.2 (C<sub>b''</sub>); 54.7 (C<sub>d</sub>, C<sub>c'</sub>, C<sub>a''</sub>); 52.6 (C<sub>c</sub>); 42.4 (C<sub>a</sub>); 25.8 (C<sub>e</sub>, C<sub>d'</sub>, C<sub>c''</sub>); 24.04 (C<sub>b</sub>, C<sub>f</sub>, C<sub>e'</sub>, C<sub>d''</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 508.4, Found: 508.2 [M+H]<sup>+</sup>.

**HR-MS:** *m/z* Calculated: 508.40099, Found: 508.40132 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>N<sub>5</sub>O.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 10.4 min, purity = 97 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 18.5 min, purity = 95 %.

\* **4-[3-(Morpholin-4-ylmethyl)-1H-pyrrol-1-yl]-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl]aniline (46)**



C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 509.74 g/mol

Synthesized according to procedure B: 1-(3-[2-(Piperidin-1-yl)ethoxy]-4-([3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenyl)-1H-pyrrole-3-carbaldehyde (**44**) (100 mg, 0.23 mmol), morpholine (30 µL, 0.34 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (70 mg, 0.34 mmol), acetic acid (20 µL, 0.34 mmol) and DCE (3 mL) were used. The iminium was formed for 5 h and reduced for 16 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 10:0 to 9.5:0.5 (v/v)).

The title compound (90 mg, 0.18 mmol, 78 % yield) was obtained as a yellow oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 6.92-6.85 (M, 3H, H<sub>5</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>5'</sub>); 6.82 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 6.60 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 6.24 (m, 1H, H<sub>4'</sub>); 4.70 (br s, 1H, NH); 4.16 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.75 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H, H<sub>c''</sub>); 3.46 (s, 2H, H<sub>a''</sub>); 3.20 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.81 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>); 2.54-2.39 (M, 14H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>c'</sub>, H<sub>b''</sub>); 1.86 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.66-1.59 (M, 8H, H<sub>e</sub>, H<sub>d'</sub>); 1.50-1.43 (M, 4H, H<sub>f</sub>, H<sub>e'</sub>).

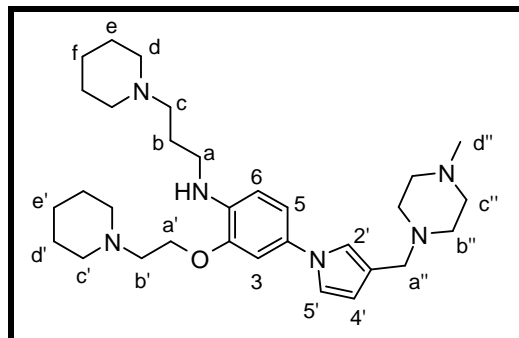
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 146.3 (C<sub>aro</sub>); 137.2 (C<sub>aro</sub>); 130.8 (C<sub>aro</sub>); 120.4 (C<sub>3'</sub>); 119.5 (C<sub>2'</sub>, C<sub>5'</sub>); 114.0 (C<sub>5</sub>); 110.7 (C<sub>4'</sub>); 109.7 (C<sub>6</sub>); 105.5 (C<sub>3</sub>); 67.1 (C<sub>c''</sub>); 66.8 (C<sub>a'</sub>); 57.9 (C<sub>b'</sub>); 57.5 (C<sub>c</sub>); 55.9 (C<sub>a''</sub>); 55.0 (C<sub>d</sub>, C<sub>c'</sub>); 53.5 (C<sub>b''</sub>); 42.7 (C<sub>a</sub>); 26.5 (C<sub>b</sub>); 26.0 (C<sub>e</sub>, C<sub>d'</sub>); 24.3 (C<sub>f</sub>, C<sub>e'</sub>).

**LC-MS (ESI)**  $m/z$  Calculated: 510.4, Found: 510.1  $[M+H]^+$ .

**HR-MS:**  $m/z$  Calculated: 510.38025, Found: 510.38051  $[M+H]^+ = C_{30}H_{48}N_5O_2$ .

**Purity:** C<sub>4</sub> column:  $t_r = 15.4$  min, purity = 98 %; C<sub>18</sub> column:  $t_r = 18.6$  min, purity = 99 %.

\* **4-(3-[(4-Methylpiperazin-1-yl)methyl]-1H-pyrrol-1-yl)-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3(piperidin-1-yl)propyl]aniline (47)**



$C_{31}H_{50}N_6O$   
Mw: 522.78 g/mol

Synthesized according to procedure B: 1-(3-[2-(Piperidin-1-yl)ethoxy]-4-([3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenyl)-1H-pyrrole-3-carbaldehyde (85 mg, 0.19 mmol), 1-methylpiperazine (22  $\mu$ L, 0.29 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (61 mg, 0.29 mmol), acetic acid (17  $\mu$ L, 0.29 mmol) and DCE (2.5 mL) were used. The iminium was formed for 5 h 30 and reduced for 16 h. The residue was purified by semi-preparative chromatography (eluent H<sub>2</sub>O formate/ACN formate (pH = 9.2), 9:1 to 1:9 (v/v)).

The title compound (55 mg, 0.11 mmol, 54 % yield) was obtained as a yellow oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 6.88-6.83 (M, 3H, H<sub>5</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>5'</sub>); 6.80 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 6.57 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 6.22 (dd,  $J = 2.2$  Hz,  $J = 2.3$  Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 4.65 (br s, 1H, NH); 4.14 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.47 (s, 2H, H<sub>a''</sub>); 3.19 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.79 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H, H<sub>b'</sub>); 2.53-2.37 (M, 18H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>c'</sub>, H<sub>b''</sub>, H<sub>c''</sub>); 2.29 (s, 3H, H<sub>d''</sub>); 1.85 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.65-1.57 (M, 8H, H<sub>e</sub>, H<sub>d'</sub>); 1.49-1.41 (M, 4H, H<sub>f</sub>, H<sub>e'</sub>).

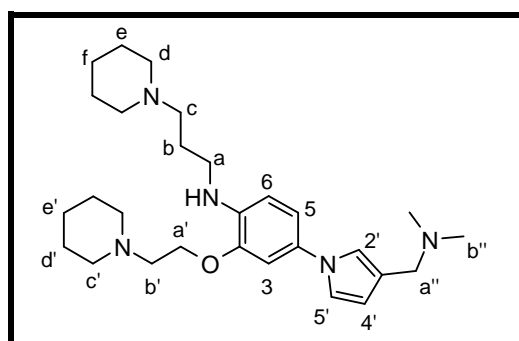
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 146.3 (C<sub>aro</sub>); 137.1 (C<sub>aro</sub>); 130.9 (C<sub>aro</sub>); 120.7 (C<sub>3'</sub>); 119.5 (C<sub>2'</sub>, C<sub>5'</sub>); 114.0 (C<sub>5</sub>); 110.8 (C<sub>4'</sub>); 109.7 (C<sub>6</sub>); 105.5 (C<sub>3</sub>); 66.7 (C<sub>a'</sub>); 57.9 (C<sub>b'</sub>); 57.5 (C<sub>c</sub>); 55.1 (C<sub>d</sub>, C<sub>c'</sub>, C<sub>b''</sub>, C<sub>c''</sub>); 52.9 (C<sub>a''</sub>); 46.0 (C<sub>d''</sub>); 42.7 (C<sub>a</sub>); 26.5 (C<sub>b</sub>); 26.0 (C<sub>e</sub>, C<sub>d'</sub>); 24.4 (C<sub>f</sub>, C<sub>e'</sub>).

**LC-MS (ESI)**  $m/z$  Calculated: 523.4, Found: 523.3  $[M+H]^+$ , 262.3  $[(M+2H)/2]^+$ .

**HR-MS:**  $m/z$  Calculated: 523.41189, Found: 523.41254  $[M+H]^+ = C_{31}H_{51}N_6O$ .

**Purity:** C<sub>4</sub> column:  $t_r = 14.5$  min, purity = 95 %; C<sub>18</sub> column:  $t_r = 17.0$  min, purity = 95 %.

\* **4-(3-[(Dimethylamino)methyl]-1H-pyrrol-1-yl)-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl]aniline (48)**



$C_{28}H_{45}N_5O$   
Mw: 467.70 g/mol

Synthesized according to procedure B: 1-(3-[2-(Piperidin-1-yl)ethoxy]-4-([3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenyl)-1*H*-pyrrole-3-carbaldehyde (**44**) (85 mg, 0.19 mmol), dimethylamine in THF (2 M, 144  $\mu$ L, 0.29 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (61 mg, 0.29 mmol), acetic acid (17  $\mu$ L, 0.29 mmol) and DCE (2.5 mL) were used. The iminium was formed for 5 h 30 and reduced for 16 h. The residue was purified by semi-preparative chromatography (eluent H<sub>2</sub>O formate/ACN formate (pH = 9.2), 9:1 to 1:9 (v/v)).

The title compound (28 mg, 0.06 mmol, 31 % yield) was obtained as a yellow oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 6.91-6.85 (M, 3H, H<sub>5</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>5'</sub>); 6.82 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 6.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 6.23 (dd, *J* = 2.0 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 4.68 (br s, 1H, NH); 4.15 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.40 (s, 2H, H<sub>a''</sub>); 3.19 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.80 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>); 2.53-2.41 (M, 10H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>c'</sub>); 2.29 (s, 6H, H<sub>b''</sub>); 1.85 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.65-1.58 (M, 8H, H<sub>e</sub>, H<sub>d'</sub>); 1.49-1.42 (M, 4H, H<sub>f</sub>, H<sub>e'</sub>).

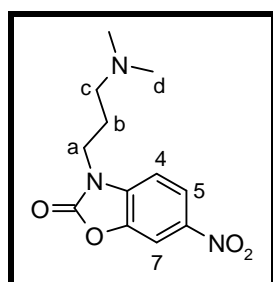
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 146.3 (C<sub>aro</sub>); 137.1 (C<sub>aro</sub>); 130.9 (C<sub>aro</sub>); 121.4 (C<sub>3'</sub>); 119.5 (C<sub>2'</sub>, C<sub>5'</sub>); 113.9 (C<sub>5</sub>); 110.5 (C<sub>4'</sub>); 109.7 (C<sub>6</sub>); 105.5 (C<sub>3</sub>); 66.7 (C<sub>a'</sub>); 57.9 (C<sub>b'</sub>); 57.5 (C<sub>c</sub>); 56.5 (C<sub>a''</sub>); 5.9 (C<sub>d</sub>, C<sub>c'</sub>); 45.0 (C<sub>b'</sub>); 42.7 (C<sub>a</sub>); 26.5 (C<sub>b</sub>); 26.0 (C<sub>e</sub>, C<sub>d'</sub>); 24.4 (C<sub>f</sub>, C<sub>e'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 468.4, Found: 468.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**HR-MS:** *m/z* Calculated: 468.36969, Found: 468.36960 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>ON<sub>5</sub>O.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 15.4 min, purity = 95 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 17.6 min, purity = 95 %.

\* **3-[3-(Dimethylamino)propyl]-6-nitro-1,3-benzoxazol-2-one (52)**



C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 265.27 g/mol

6-Nitro-3*H*-1,3-benzoxazol-2-one (**25**) (6.30 g, 35.00 mmol) was suspended in ACN (350 mL) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (14.50 g, 104 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 80°C for 30 min. Then 3-dimethylaminopropylchloride hydrochloride (6.63 g, 42.00 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 80°C for 4 h. 0.5 eq of amine was added and the mixture was stirred at 80°C for 2 h 30. The mineral was removed by filtration and the solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH, 9.8:0.2 (v/v)).

The title compound (7.10 g, 27.00 mmol, 77 % yield) was obtained as a yellow solid.

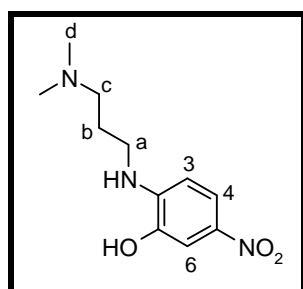
**TLC (DCM/MeOH, 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.20 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 8.07 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H<sub>7</sub>); 7.26 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H<sub>4</sub>); 3.96 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.31 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H<sub>c</sub>); 2.18 (s, 6H, H<sub>d</sub>); 1.94 (m, 2H, H<sub>b</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 153.1 (CO); 142.1 (C<sub>aro</sub>); 140.9 (C<sub>aro</sub>); 136.1 (C<sub>aro</sub>); 119.9 (C<sub>5</sub>); 106.9 (C<sub>4</sub>); 105.2 (C<sub>7</sub>); 54.9 (C<sub>c</sub>); 44.2 (C<sub>d</sub>); 39.8 (C<sub>a</sub>); 24.5 (C<sub>b</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 266.1, Found: 266.0 [M+H]<sup>+</sup>.

**Melting Point:** 44.8°C

\* **2-([3-(Dimethylamino)propyl]amino)-5-nitrophenol (53)**

$C_{11}H_{17}N_3O_3$   
Mw: 239.27 g/mol

3-[3-(Dimethylamino)propyl]-6-nitro-1,3-benzoxazol-2-one (**52**) (1.00 g, 3.77 mmol) was dissolved in dioxane (5.5 mL) and a solution of NaOH (2.5 M, 30 mL, 75.40 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 20°C for 16 h. The reaction was cooled to 0°C. A solution of HCl (2 M, 40 mL) was added until pH = 1. Then a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) was added until pH = 8. After 30 min of stirring, the mixture was extracted with DCM. The combined organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated.

The title compound (540 mg, 2.24 mmol, 60 % yield) was obtained as a red solid.

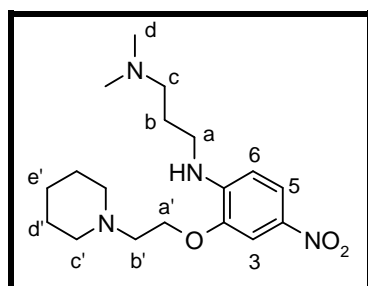
**TLC (DCM/MeOH, 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.1

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.73 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H<sub>4</sub>); 7.42 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 6.38 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 3.24 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.44 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H<sub>c</sub>); 2.26 (s, 6H, H<sub>d</sub>); 1.85 (m, 2H, H<sub>b</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 144.5 (C<sub>aro</sub>); 143.1 (C<sub>aro</sub>); 136.5 (C<sub>aro</sub>); 120.0 (C<sub>4</sub>); 108.1 (C<sub>6</sub>); 106.5 (C<sub>3</sub>); 56.3 (C<sub>c</sub>); 44.8 (C<sub>d</sub>); 40.5 (C<sub>a</sub>); 26.3 (C<sub>b</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 240.1, Found: 240.0 [M+H]<sup>+</sup>, 237.9 [M-H]<sup>-</sup>.

**Melting Point:** 147.6°C

\* **N-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-nitro-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]aniline (54)**

$C_{18}H_{30}N_4O_3$   
Mw: 350.46 g/mol

2-([3-(Dimethylamino)propyl]amino)-5-nitrophenol (**53**) (0.50 g, 2.10 mmol), 1-piperidineethanol (0.42 mL, 3.14 mmol) and triphenylphosphine (1.10 g, 4.18 mmol) were placed in round-bottom flask under N<sub>2</sub> atmosphere. Dry THF (6 mL) was added and the reaction mixture was cooled to 0°C. After 10 min of stirring, DEAD (0.66 mL, 4.18 mmol), was added. The reaction mixture was stirred at 50°C under nitrogen for 6 h. The solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>4</sub>OH 2.5 %), 9.8:0.2 to 9:1 (v/v)).

The title compound (520 mg, 1.48 mmol, 71 % yield) was obtained as a yellow oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>4</sub>OH 2.5 %), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.5

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.88 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7.58 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 6.48 (br m, 1H, NH); 6.43 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 4.17 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.32 (m, 2H, H<sub>a</sub>); 2.82 (t, *J* = 6.0 Hz,

2H, H<sub>b'</sub>); 2.52 (m, 4H, H<sub>c'</sub>); 2.45 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H<sub>c</sub>); 2.26 (s, 6H, H<sub>d</sub>); 1.87 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.65 (m, 4H, H<sub>d'</sub>); 1.48 (m, 2H, H<sub>e'</sub>).

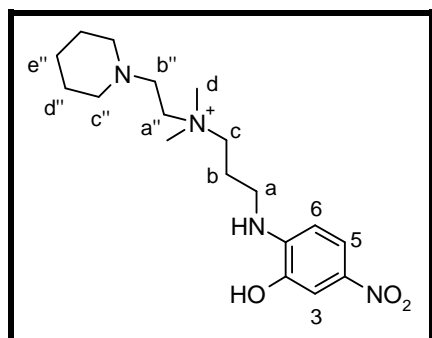
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 145.2 (C<sub>aro</sub>); 144.3 (C<sub>aro</sub>); 136.5 (C<sub>aro</sub>); 120.3 (C<sub>5</sub>); 106.3 (C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>); 66.1 (C<sub>a'</sub>); 57.8 (C<sub>b'</sub>, C<sub>c</sub>); 54.7 (C<sub>c'</sub>); 45.5 (C<sub>d</sub>); 42.3 (C<sub>a</sub>); 26.1 (C<sub>b</sub>); 25.7 (C<sub>d'</sub>); 24.0 (C<sub>e'</sub>).

LC-MS (ESI) *m/z* Calculated: 351.2, Found: 351.0 [M+H]<sup>+</sup>.

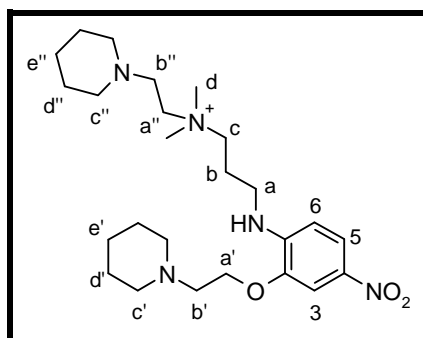
\* (3-[(2-Hydroxy-4-nitrophenyl)amino]propyl)dimethyl[2-(piperidin-1-yl)ethyl]azanium (61)

and

\* Dimethyl[3-[(4-nitro-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]phenyl)amino]propyl][2-(piperidin-1-yl)ethyl]azanium (62)



C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 351.46  
g/mol  
**61**



C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 462.65  
g/mol  
**62**

2-(3-Dimethylaminopropylamino)-5-nitro-phenol (1.32 g, 5.50 mmol) was suspended in ACN (55 mL) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.29 g, 16.60 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 60°C for 10 min. Then 1-(2-chloroethyl)piperidin-1-ium chloride (1.22 g, 6.60 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 60°C for 18 h. The mineral was removed by filtration and the solvent was evaporated. The residue was purified by semi-preparative chromatography (eluent H<sub>2</sub>O formate/ACN formate (pH = 9.2), 9:1 to 1:9 (v/v)).

**61** (251 mg, 0.71 mmol, 13 %) and **62** (1 g, 2.2 mmol, 41 %) were obtained as red oils.

#### Compound 61:

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

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 7.64 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.6 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7.58 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 6.38 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 3.60 (m, 2H, H<sub>c</sub>); 3.39 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, H<sub>a''</sub>); 3.33 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 3.15 (s, 6H, H<sub>d</sub>); 2.67 (m, 2H, H<sub>b''</sub>); 2.35 (m, 4H, H<sub>c''</sub>); 2.08 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.48 (m, 4H, H<sub>d'</sub>); 1.39 (m, 2H, H<sub>e''</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 144.3 (C<sub>aro</sub>); 137.1 (C<sub>aro</sub>); 118.0 (C<sub>5</sub>); 109.2 (C<sub>3</sub>); 106.7 (C<sub>6</sub>); 63.8 (C<sub>c</sub>); 60.2 (C<sub>a''</sub>); 54.3 (C<sub>c''</sub>); 52.9 (C<sub>b''</sub>); 51.3 (C<sub>d</sub>); 40.1 (C<sub>a</sub>); 25.7 (C<sub>d'</sub>); 23.9 (C<sub>e''</sub>); 22.2 (C<sub>b</sub>).

LC-MS (ESI) *m/z* Calculated: 351.2, Found: 351.2 [M+H]<sup>+</sup>.

#### Compound 62:

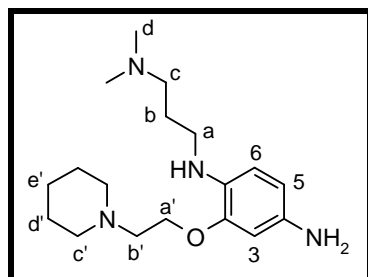
TLC (DCM/MeOH), 9:1, v/v): R<sub>f</sub> = 0.1

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>): 7.85 (dd, *J* = 9.2 Hz, *J* = 2.7 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7.55 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 7.09 (br m, 1H, NH); 6.46 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 4.15 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.86 (m, 2H, H<sub>c</sub>); 3.63 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, H<sub>a''</sub>); 3.41 (m, 2H, H<sub>a</sub>); 3.35 (s, 6H, H<sub>d</sub>); 2.86 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>); 2.70 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, H<sub>b''</sub>); 2.52-2.36 (M, 8H, H<sub>c''</sub>, H<sub>c'</sub>); 2.20 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.66-1.41 (M, 12H, H<sub>e'</sub>, H<sub>e''</sub>, H<sub>d''</sub>, H<sub>d'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 144.8 (C<sub>aro</sub>); 136.6 (C<sub>aro</sub>); 120.2 (C<sub>5</sub>); 106.3 (C<sub>6</sub>); 105.7 (C<sub>3</sub>); 64.8 (C<sub>a'</sub>); 63.6 (C<sub>c</sub>); 59.9 (C<sub>a''</sub>); 57.2 (C<sub>b'</sub>); 54.3 (C<sub>c'</sub>, C<sub>c''</sub>); 53.3 (C<sub>b''</sub>); 51.4 (C<sub>d</sub>); 39.9 (C<sub>a</sub>); 25.8 (C<sub>d'</sub>, C<sub>d''</sub>); 24.0 (C<sub>e'</sub>, C<sub>e''</sub>); 22.1 (C<sub>b</sub>).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 462.3, Found: 462.1 [M+H]<sup>+</sup>.

\* ***N1-[3-(Dimethylamino)propyl]-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]benzene-1,4-diamine (55)***



C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O  
Mw: 319.48 g/mol

*N*-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-nitro-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]aniline (**54**) (170 mg, 0.48 mmol) was dissolved in dry EtOH (10 mL). A catalytic amount of Pd/C 10 % and ammonium formate (210 mg, 3.36 mmol) were added and the reaction mixture was stirred at 80°C under N<sub>2</sub> for 1 h 30. The catalyst was quickly eliminated by filtration through a celite pad and the filtrate was evaporated. The purple oil obtained was used without further purification in the next step.

The title compound (520 mg, 1.48 mmol, 71 % yield) was obtained as a yellow oil.

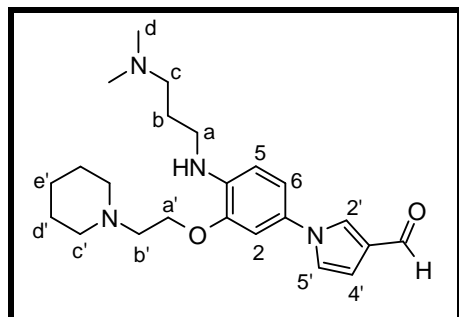
**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>4</sub>OH 2.5 %), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.7

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 6.47 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 6.27-6.25 (M, 2H, H<sub>5</sub>, H<sub>3</sub>); 4.09 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.72 (br s, 3H, NH<sub>2</sub>, NH); 3.13 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.82 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>); 2.55 (m, 4H, H<sub>c'</sub>); 2.49 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H, H<sub>c</sub>); 2.29 (s, 6H, H<sub>d</sub>); 1.87 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.68 (m, 4H, H<sub>d'</sub>); 1.49 (m, 2H, H<sub>e'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 147.2 (C<sub>6</sub>); 137.3 (C<sub>5</sub>); 131.7 (C<sub>3</sub>); 111.8 (C<sub>aro</sub>); 108.1 (C<sub>aro</sub>); 101.4 (C<sub>aro</sub>); 65.9 (C<sub>a'</sub>); 57.8 (C<sub>b'</sub>, C<sub>c</sub>); 54.8 (C<sub>c'</sub>); 45.1 (C<sub>d</sub>); 43.1 (C<sub>a</sub>); 27.1 (C<sub>b</sub>); 25.7 (C<sub>d'</sub>); 24.0 (C<sub>e'</sub>).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 321.3, Found: 321.1 [M+H]<sup>+</sup>.

\* ***1-(4-([3-(Dimethylamino)propyl]amino)-3-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]phenyl)-1H-pyrrole-3-carbaldehyde (56)***



C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 398.54 g/mol

*N1*-[3-(Dimethylamino)propyl]-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]benzene-1,4-diamine (102 mg, 0.32 mmol) was dissolved in acetic acid. Then 2,5-dimethoxy-3-formyl-2,3,4,5-tetrahydrofuran (64 mg, 0.4 mmol) was added and the reaction mixture was heated at 90°C for 1 h 30. The solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>4</sub>OH 2.5 %), 9.9:0.1 to 9:1 (v/v)).

The title compound (50 mg, 0.13 mmol, 39 % yield) was obtained as a yellow oil.

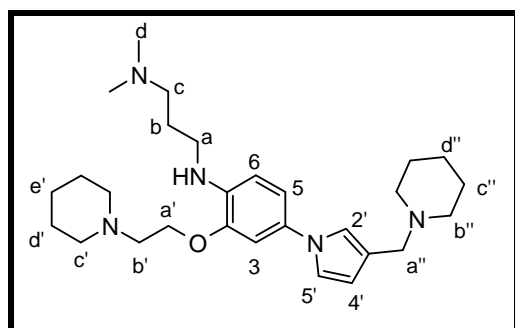
**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>4</sub>OH 2.5 %), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.8

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 9.80 (s, 1H, CHO); 7.54 (dd, *J* = 2.0 Hz, *J* = 1.7 Hz, 1H, H<sub>2'</sub>); 6.96 (dd, *J* = 3.0 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 6.90 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 2.3 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 6.80 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 6.73 (dd, *J* = 3.0 Hz, *J* = 1.7 Hz, 1H, H<sub>5'</sub>); 6.60 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 5.00 (br s, 1H, NH); 4.16 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.24 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.83 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>); 2.53 (m, 4H, H<sub>c'</sub>); 2.46 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H<sub>c</sub>); 2.27 (s, 6H, H<sub>d</sub>); 1.88 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.65 (m, 4H, H<sub>d'</sub>); 1.49 (m, 2H, H<sub>e'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 185.6 (CHO); 146.2 (C<sub>aro</sub>); 138.5 (C<sub>aro</sub>); 129.0 (C<sub>aro</sub>); 127.8 (C<sub>2'</sub>); 127.3 (C<sub>aro</sub>); 123.1 (C<sub>4'</sub>); 114.9 (C<sub>6</sub>); 109.2 (C<sub>5</sub>, C<sub>5'</sub>); 105.6 (C<sub>2</sub>); 66.2 (C<sub>a'</sub>); 57.8 (C<sub>b'</sub>); 54.9 (C<sub>c'</sub>, C<sub>c</sub>); 45.4 (C<sub>d</sub>); 42.2 (C<sub>a</sub>); 26.9 (C<sub>b</sub>); 25.8 (C<sub>d'</sub>); 24.1 (C<sub>e'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 399.3, Found: 399.0 [M+H]<sup>+</sup>.

\* ***N*-[3-(Dimethylamino)propyl]-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-4-[3-(piperidin-1-ylmethyl)-1H-pyrrol-1-yl]aniline (57)**



C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O  
Mw: 467.69 g/mol

Synthesized according to procedure B: 1-(4-([3-(dimethylamino)propyl]amino)-3-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]phenyl)-1H-pyrrole-3-carbaldehyde (**56**) (100 mg, 0.25 mmol), piperidine (50 μL, 0.50 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (106 mg, 0.50 mmol) and acetic acid (22 μL, 0.38 mmol) and DCE (2.5 mL) were used. The iminium was formed for 1 h 30 and reduced for 18 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>4</sub>OH 2.5 %), 9.9:0.1 to 9:1 (v/v)).

The title compound (41 mg, 0.09 mmol, 35 % yield) was obtained as a yellow oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>4</sub>OH 2.5 %), 9.5:0.5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 6.89-6.88 (M, 2H, H<sub>2'</sub>, H<sub>5'</sub>); 6.87 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.3 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 6.81 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 6.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 6.23 (dd, *J* = 2.2 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 4.77 (br s, 1H, NH); 4.15 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.45 (s, 2H, H<sub>a''</sub>); 3.22 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.82 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>); 2.53-2.83 (M, 10H, H<sub>c'</sub>, H<sub>b'</sub>, H<sub>c</sub>); 2.25 (s, 6H, H<sub>d</sub>); 1.88 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.65-1.58 (M, 8H, H<sub>d'</sub>, H<sub>c''</sub>); 1.49-1.43 (M, 4H, H<sub>e'</sub>, H<sub>d''</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 146.3 (C<sub>aro</sub>); 137.1 (C<sub>aro</sub>); 130.1 (C<sub>aro</sub>); 120.6 (C<sub>aro</sub>); 118.7 (C<sub>5'</sub>, C<sub>2'</sub>); 114.0 (C<sub>5</sub>); 111.0 (C<sub>4'</sub>); 109.6 (C<sub>6</sub>); 105.5 (C<sub>3</sub>); 67.2 (C<sub>a'</sub>); 58.0 (C<sub>b'</sub>, C<sub>c</sub>); 56.1 (C<sub>a''</sub>); 55.0 (C<sub>c'</sub>); 54.1 (C<sub>b''</sub>); 45.6 (C<sub>d</sub>); 42.5 (C<sub>a</sub>); 27.2 (C<sub>b</sub>); 26.0 (C<sub>d'</sub>, C<sub>c''</sub>); 24.4 (C<sub>e'</sub>, C<sub>d''</sub>).

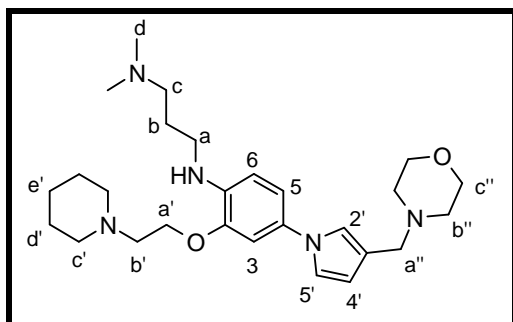
**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 468.4, Found: 468.1 [M+H]<sup>+</sup>.

**HR-MS:** *m/z* Calculated: 468.36969, Found: 468.36961 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>N<sub>5</sub>O.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 15.9 min, purity = 94 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 17.7 min, purity = 95 %.



\* ***N*-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[3-(morpholine-4-ylmethyl)-1H-pyrrol-1-yl]-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]aniline (58)**



$C_{27}H_{43}N_5O_2$   
Mw: 469.66 g/mol

Synthesized according to procedure B: 1-(4-([3-(dimethylamino)propyl]amino)-3-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]phenyl)-1H-pyrrole-3-carbaldehyde (**56**) (100 mg, 0.25 mmol), morpholine (44  $\mu$ L, 0.50 mmol),  $NaBH(OAc)_3$  (106 mg, 0.50 mmol), acetic acid (22  $\mu$ L, 0.38 mmol) and DCE (2.5 mL) were used. The iminium was formed for 1 h 30 and reduced for 18 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH( $NH_4OH$  2.5 %), 9.9:0.1 to 9:1 (v/v)).

The title compound (71 mg, 0.15 mmol, 60 %) was obtained as a yellow oil.

**TLC (DCM/MeOH( $NH_4OH$  2.5 %), 9.5:0.5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 6.90-6.88 (M, 2H,  $H_{2'}$ ,  $H_{5'}$ ); 6.86 (dd,  $J$  = 8.5 Hz,  $J$  = 2.3 Hz, 1H,  $H_5$ ); 6.80 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H,  $H_3$ ); 6.59 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H,  $H_6$ ); 6.23 (dd,  $J$  = 2.3 Hz,  $J$  = 1.9 Hz, 1H,  $H_{4'}$ ); 4.75 (br s, 1H, NH); 4.15 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 2H,  $H_{a'}$ ); 3.75 (t,  $J$  = 4.7 Hz, 4H,  $H_{c'}$ ); 3.45 (s, 2H,  $H_{a''}$ ); 3.22 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2H,  $H_a$ ); 2.82 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 2H,  $H_{b'}$ ); 2.51-2.50 (M, 8H,  $H_{c'}$ ,  $H_{b''}$ ); 2.43 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H,  $H_c$ ); 2.26 (s, 6H,  $H_d$ ); 1.87 (m, 2H,  $H_b$ ); 1.65 (m, 4H,  $H_{d'}$ ); 1.49 (m, 2H,  $H_{e'}$ ).

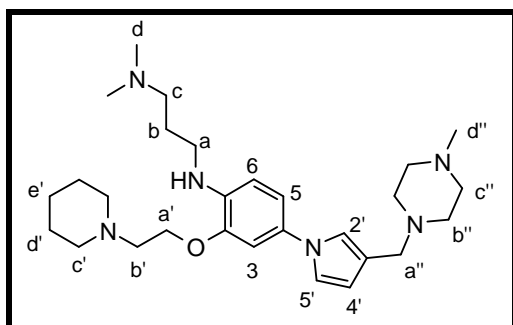
**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 146.3 ( $C_{aro}$ ); 137.2 ( $C_{aro}$ ); 130.8 ( $C_{aro}$ ); 120.4 ( $C_{aro}$ ); 119.7 ( $C_{5'}$ ,  $C_{2'}$ ); 114.0 ( $C_5$ ); 110.7 ( $C_{4'}$ ); 109.6 ( $C_6$ ); 105.5 ( $C_3$ ); 67.0 ( $C_{c''}$ ); 66.6 ( $C_{a'}$ ); 58.0 ( $C_{b'}$ ,  $C_c$ ); 55.9 ( $C_{a''}$ ); 55.0 ( $C_c$ ); 53.5 ( $C_{b''}$ ); 45.6 ( $C_d$ ); 42.5 ( $C_a$ ); 27.1 ( $C_b$ ); 26.0 ( $C_{d'}$ ); 24.2 ( $C_{e'}$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$**  Calculated: 470.4, Found: 470.3 [ $M+H$ ]<sup>+</sup>.

**HR-MS:**  $m/z$  Calculated: 470.34895, Found: 470.34762 [ $M+H$ ]<sup>+</sup> =  $C_{27}H_{44}N_5O_2$ .

**Purity:**  $C_4$  column:  $t_r$  = 14.9 min, purity = 98 %;  $C_{18}$  column:  $t_r$  = 16.8 min, purity = 97 %.

\* ***N*-[3-(dimethylamino)propyl]-4-[3-[[4-methylpiperazin-1-yl]methyl]-1H-pyrrol-1-yl]-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]aniline (59)**



$C_{28}H_{46}N_6O$   
Mw: 482.70 g/mol

Synthesized according to procedure B: 1-(4-([3-(dimethylamino)propyl]amino)-3-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]phenyl)-1H-pyrrole-3-carbaldehyde (**56**) (100 mg, 0.25 mmol), 1-methylpiperazine (56  $\mu$ L, 0.50

mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (106 mg, 0.50 mmol), acetic acid (22 μL, 0.38 mmol) and DCE (2.5 mL) were used. The iminium was formed for 1 h 30 and reduced for 18 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>4</sub>OH 2.5 %), 9.9:0.1 to 9:1 (v/v)).

The title compound (61 mg, 0.13 mmol, 50 % yield) was obtained as a yellow oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>4</sub>OH 2.5 %), 9.5:0.5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 6.87-6.86 (M, 2H, H<sub>2'</sub>, H<sub>5'</sub>); 6.86 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 6.79 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 6.58 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 6.22 (dd, *J* = 2.5 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 4.74 (br s, 1H, NH); 4.14 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.46 (s, 2H, H<sub>a''</sub>); 3.21 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.81 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>); 2.52-2.49 (M, 12H, H<sub>c'</sub>, H<sub>b''</sub>, H<sub>c''</sub>); 2.42 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H<sub>c</sub>); 2.28 (s, 3H, H<sub>d''</sub>); 2.24 (s, 6H, H<sub>d</sub>); 1.86 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.64 (m, 4H, H<sub>d'</sub>); 1.25 (m, 2H, H<sub>e'</sub>).

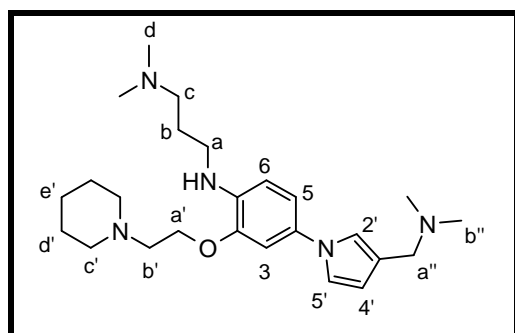
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 146.3 (C<sub>aro</sub>); 137.1 (C<sub>aro</sub>); 131.2 (C<sub>aro</sub>); 120.7 (C<sub>aro</sub>); 119.6 (C<sub>5'</sub>, C<sub>2'</sub>); 114.0 (C<sub>5</sub>); 110.8 (C<sub>4'</sub>); 109.6 (C<sub>6</sub>); 105.5 (C<sub>3</sub>); 66.7 (C<sub>a'</sub>); 58.0 (C<sub>b'</sub>, C<sub>c</sub>); 55.4 (C<sub>a''</sub>); 55.1 (C<sub>c'</sub>, C<sub>c''</sub>); 52.9 (C<sub>b''</sub>); 46.0 (C<sub>d''</sub>); 45.6 (C<sub>d</sub>); 42.5 (C<sub>a</sub>); 27.2 (C<sub>b</sub>); 26.0 (C<sub>d'</sub>); 24.2 (C<sub>e'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 483.4, Found: 483.2 [M+H]<sup>+</sup>.

**HR-MS:** *m/z* Calculated: 483.38059, Found: 483.37962 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>N<sub>6</sub>O.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 13.5 min, purity = 98 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 16.1 min, purity = 99 %.

\* **4-(3-[(dimethylamino)methyl]-1H-pyrrol-1-yl)-N-[3-(dimethylamino)propyl]-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]aniline (60)**



C<sub>25</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O  
Mw: 427.62 g/mol

Synthesized according to procedure B: 1-(4-([3-(dimethylamino)propyl]amino)-3-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]phenyl)-1H-pyrrole-3-carbaldehyde (**56**) (100 mg, 0.25 mmol), dimethylamine in THF (2 M, 250 μL, 0.50 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (106 mg, 0.50 mmol), acetic acid (22 μL, 0.38 mmol) and DCE (2.5 mL) were used. The iminium was formed for 1 h 30 and reduced for 18 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>4</sub>OH 2.5 %), 9.8:0.2 to 9:1 (v/v)).

The title compound (33 mg, 0.08 mmol, 31 %) was obtained as a yellow oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>4</sub>OH 2.5 %), 9.5:0.5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 6.90-6.89 (M, 2H, H<sub>2'</sub>, H<sub>5'</sub>); 6.88 (dd, *J* = 8.2 Hz, *J* = 2.3 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 6.81 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 6.59 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 6.24 (dd, *J* = 2.3 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 4.76 (br s, 1H, NH); 4.15 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.42 (s, 2H, H<sub>a''</sub>); 3.22 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.82 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>); 2.51 (m, 4H, H<sub>c'</sub>); 2.43 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H<sub>c</sub>); 2.30 (s, 6H, H<sub>b''</sub>); 2.26 (s, 6H, H<sub>d</sub>); 1.88 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.65 (m, 4H, H<sub>d'</sub>); 1.49 (m, 2H, H<sub>e'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 146.3 (C<sub>aro</sub>); 137.2 (C<sub>aro</sub>); 130.8 (C<sub>aro</sub>); 121.1 (C<sub>aro</sub>); 119.7 (C<sub>5'</sub>, C<sub>2'</sub>); 114.0 (C<sub>5</sub>); 110.6 (C<sub>4'</sub>); 109.6 (C<sub>6</sub>); 105.5 (C<sub>3</sub>); 66.6 (C<sub>a'</sub>); 58.0 (C<sub>b'</sub>, C<sub>c</sub>); 56.4 (C<sub>a''</sub>); 55.0 (C<sub>c'</sub>); 45.6 (C<sub>d</sub>); 44.8 (C<sub>b''</sub>); 42.5 (C<sub>a</sub>); 27.2 (C<sub>b</sub>); 26.0 (C<sub>d'</sub>); 24.2 (C<sub>e'</sub>).

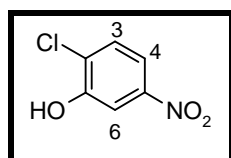
**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 428.3, Found: 428.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**HR-MS:** *m/z* Calculated: 428.33839, Found: 428.33695 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>N<sub>5</sub>O.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: *t<sub>r</sub>* = 14.9 min, purity = 92 %; C<sub>18</sub> column: *t<sub>r</sub>* = 16.8 min, purity = 96 %.

### • Third synthetic route

#### \* 2-Chloro-5-nitrophenol (50)



C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>ClNO<sub>3</sub>  
Mw: 173.55 g/mol

To a cooled solution (15°C) of 2-amino-5-nitrophenol (**49**) (320 mg, 2.08 mmol) in dioxane (2.6 mL), was added concentrated hydrochloric acid (2.3 mL). The mixture was cooled to 5°C, and a solution of NaNO<sub>2</sub> (290 mg, 4.16 mmol) in 0.35 mL of water was added dropwise at such a rate that the temperature reaction was kept below 0°C. After stirring at 0°C for 3 h, the reaction mixture was added slowly to a flask containing CuCl (I) (250 mg, 2.50 mmol) and concentrated hydrochloric acid (1.2 mL) and was stirred for 18 h. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in AcOEt, washed twice with saturated solution of NaCl. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and evaporated. The residue was purified by column chromatography (cyclohexane/AcOEt, 9.5:0.5 (v/v)).

The title compound (216 mg, 1.25 mmol, 60 % yield) was obtained as a yellow crystal.

**TLC (Cyclohexane/EtOAc), 7:3, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.5

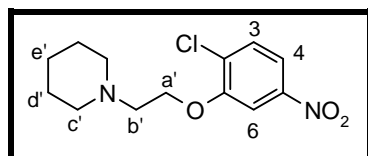
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.90 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 7.80 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H<sub>4</sub>); 7.51 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 151.9 (C<sub>1</sub>); 147.9 (C<sub>aro</sub>); 129.6 (C<sub>3</sub>); 126.8 (C<sub>aro</sub>); 116.3 (C<sub>4</sub>); 111.6 (C<sub>6</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 172.0, Found: 171.9 [M-H]<sup>-</sup>.

**Melting Point:** 121.1 °C. (Lit. 118-119°C)<sup>298</sup>

#### \* 1-[2-(2-Chloro-5-nitrophenoxy)ethyl]piperidine (51)



C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 284.74

To a solution of 2-chloro-5-nitrophenol (**50**) (194 mg, 1.12 mmol) in dry THF (3.1 mL) was added 1-piperidineethanol (216 mg, 222 μL, 1.68 mmol) and PPh<sub>3</sub> (590 mg, 2.24 mmol) under N<sub>2</sub> atmosphere. The reaction mixture was cooled to 0°C during 10 min. Then DEAD (350 μL, 2.24 mmol) was added and the

<sup>298</sup> J. B. S. Bonilha *et al.*, *Tetrahedron*, **1993**, 49, 3053-3064

reaction mixture was stirred for 1 d. The solvent was evaporated and the residue was purified by semi-preparative chromatography (eluent H<sub>2</sub>O formate/ACN formate (pH = 9.2), 9:1 to 1:9 (v/v)).

The title compound (225 mg, 0.79 mmol, 71 % yield) was obtained as a yellow solid.

**TLC (DCM/MeOH), 9.8:0.2, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

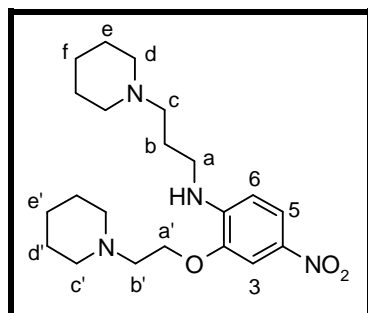
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.85 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H<sub>4</sub>); 7.80 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 7.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 4.47 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.28 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>); 3.01 (m, 4H, H<sub>c'</sub>); 1.85 (m, 4H, H<sub>d'</sub>); 1.61 (m, 2H, H<sub>e'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 154.0 (C<sub>1</sub>); 147.3 (C<sub>aro</sub>); 130.5 (C<sub>3</sub>); 130.1 (C<sub>aro</sub>); 116.9 (C<sub>4</sub>); 107.9 (C<sub>6</sub>); 66.1 (C<sub>a</sub>); 55.9 (C<sub>b</sub>); 54.1 (C<sub>c</sub>); 23.9 (C<sub>d</sub>); 22.8 (C<sub>e</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 285.1, Found: 285.0 [M+H]<sup>+</sup>.

**Melting Point:** 32.9°C

\* **4-Nitro-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl]aniline (42)**



C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 390.52 g/mol

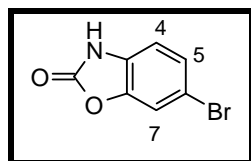
To a solution of 1-[2-(2-chloro-5-nitro-phenoxy)ethyl]piperidine (**51**) (50 mg, 0.176 mmol) in dioxane (1.8 mL) was added 3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine (34 μL, 0.21 mmol), Xantphos (10 mg, 0.02 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (171 mg, 0.53 mmol) and Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (8.04 mg, 0.01 mmol), under N<sub>2</sub> atmosphere. The mixture was heated at 140°C in micro-wave during 30 min. The solvent was evaporated and the residue was purified by semi-preparative chromatography (eluent H<sub>2</sub>O formate/ACN formate (pH = 9.2), 9:1 to 1:9 (v/v)).

The title compound (24 mg, 0.061 mmol, 35 % yield) was obtained as a yellow oil.

**Compound described previously.**

## 5. Synthesis of D<sub>2</sub> family

### \* 6-Bromo-3H-1,3-benzoxazol-2-one (63)



Mw: 214.02 g/mol

3H-1,3-benzoxazol-2-one (**24**) (5.00 g, 37.00 mmol) was dissolved in acetic acid (50 mL). Then dibromide (1.9 mL, 37.0 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at 20°C for 3 h 30. The reaction mixture was poured onto ice. The precipitate was collected by filtration, washed with water, air-dried, dissolved in EtOAc and the solvent was evaporated.

The title compound (7.48 g, 34.95 mmol, 94 %) was obtained as a pink powder.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.5:0.5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.2

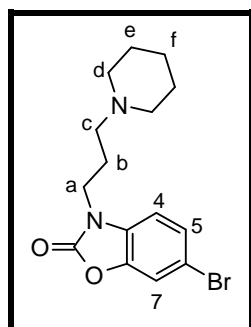
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, DMSO-d<sub>6</sub>):** 11.81 (s, 1H, NH); 7.57 (dd, *J* = 1.9 Hz, *J* = 0.3 Hz, 1H, H<sub>7</sub>); 7.30 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 1.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7.04 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 0.3 Hz, 1H, H<sub>4</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, DMSO-d<sub>6</sub>):** 154.5 (CO); 144.5 (C<sub>aro</sub>); 130.3 (C<sub>aro</sub>); 126.9 (C<sub>5</sub>); 113.5 (C<sub>aro</sub>); 113.2 (C<sub>7</sub>); 111.7 (C<sub>4</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 211.9-213.9, Found: 211.8-213.8 [M-H]<sup>+</sup>.

**Melting Point:** 191.6°C (Lit.: 190-195°C)<sup>299</sup>

### \* 6-Bromo-3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-1,3-benzoxazol-2-one (64)



Mw: 339.23 g/mol

Synthesized according to procedure A: 6-bromo-3H-1,3-benzoxazol-2-one (**63**) (0.71 g, 3.32 mmol), 1-(3-chloropropyl)piperidin-1-ium chloride (0.79 g, 3.98 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.38 g, 9.95 mmol) and ACN (30 mL). After 5 h of reaction the residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 10:0 to 9.8:0.2 (v/v)).

The title compound (1.10 g, 3.24 mmol, 98 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.5:0.5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.6

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.36 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H<sub>7</sub>); 7.30 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 1.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 6.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H<sub>4</sub>); 3.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.35-2.28 (M, 6H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>); 1.94 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.55 (m, 4H, H<sub>e</sub>); 1.42 (m, 2H, H<sub>f</sub>).

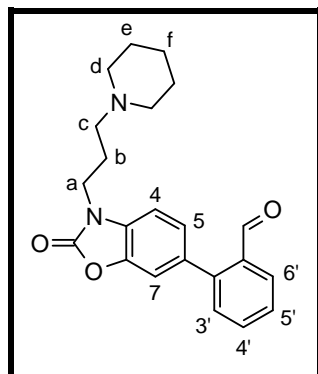
<sup>299</sup> S. S. Nikam *et al.*, WO/2001/094321, 2004.

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 154.1 (CO); 143.1 (C<sub>aro</sub>); 130.8 (C<sub>aro</sub>); 126.6 (C<sub>5</sub>); 114.4 (C<sub>aro</sub>); 113.5 (C<sub>7</sub>); 109.7 (C<sub>4</sub>); 55.5 (C<sub>c</sub>); 54.5 (C<sub>d</sub>); 40.6 (C<sub>a</sub>); 25.9 (C<sub>e</sub>); 24.8 (C<sub>b</sub>); 24.4 (C<sub>f</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 338.1-340.1, Found: 338.9-340.8 [M+H]<sup>+</sup>.

- **First synthetic route**

\* **2-(2-Oxo-3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-1,3-benzoxazol-6-yl)benzaldehyde (65)**



C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 364.44 g/mol

Synthesized according to procedure E: 6-bromo-3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-1,3-benzoxazol-2-one (**64**) (1.00 g, 2.95 mmol), 2-formylbenzeneboronic acid (0.53 g, 3.54 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (530 mg, 3.83 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.07 g, 0.06 mmol), toluene (65 mL) and EtOH (25 mL) were used. After 18 h of reaction, the residue was used without further purification in the next step.

The title compound (0.99 g, 2.70 mmol, 92 %) was obtained as a beige solid.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.8:0.2, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.4

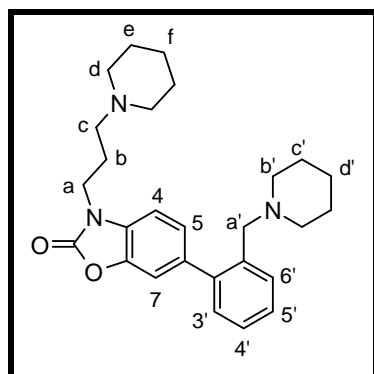
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 10.03 (s, 1H, CHO); 8.05 (m, 1H, H<sub>6'</sub>); 7.65 (m, 1H, H<sub>4'</sub>); 7.52 (m, 1H, H<sub>5'</sub>); 7.44 (m, 1H, H<sub>3'</sub>); 7.27 (m, 1H, H<sub>4</sub>); 7.18-7.15 (M, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>5</sub>); 3.97 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.42-2.31 (M, 6H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>); 2.01 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.56 (m, 4H, H<sub>e</sub>); 1.43 (m, 2H, H<sub>f</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 192.0 (CHO); 154.4 (CO); 144.9 (C<sub>aro</sub>); 142.8 C<sub>aro</sub>; 133.8 (C<sub>4'</sub>); 133.7 (C<sub>aro</sub>); 132.2 (C<sub>aro</sub>); 131.7 (C<sub>aro</sub>); 130.9 (C<sub>3'</sub>); 128.0 (C<sub>5'</sub>, C<sub>6'</sub>); 126.0 (C<sub>7</sub> ou C<sub>5</sub>); 111.3 (C<sub>4</sub>); 108.3 (C<sub>7</sub> ou C<sub>5</sub>); 55.7 (C<sub>c</sub>); 54.5 (C<sub>d</sub>); 40.8 (C<sub>a</sub>); 25.9 (C<sub>e</sub>); 24.9 (C<sub>b</sub>); 24.4 (C<sub>f</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 365.2, Found: 365.5[M+H]<sup>+</sup>.

**Melting Point:** 105.1°C

\* **3-[3-(Piperidin-1-yl)propyl]-6-[2-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl]-1,3-benzoxazol-2-one (66)**



C<sub>27</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 433.59 g/mol

Synthesized according to procedure B: 2-(2-oxo-3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-1,3-benzoxazol-6-yl)benzaldehyde (**65**) (100 mg, 0.27 mmol), piperidine (54  $\mu$ L, 0.55 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (116 mg, 0.55 mmol), acetic acid (24  $\mu$ L, 0.41 mmol) and DCE (3.5 mL) were used. The iminium was formed for 5 h and reduced for 16 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.3:0.7 (v/v)).

The title compound (115 mg, 0.27 mmol, 97 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.3:0.7, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.6

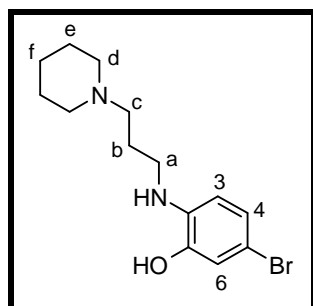
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.51-7.47 (M, 2H, H<sub>aro</sub>); 7.36-7.22 (M, 4H, H<sub>aro</sub>); 7.08 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H<sub>4</sub>); 3.94 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 3.31 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.42-2.28 (M, 10H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>b'</sub>); 2.01 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.60-1.50 (M, 8H, H<sub>e</sub>, H<sub>c'</sub>); 1.47-1.38 (M, 4H, H<sub>f</sub>, H<sub>d'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 154.9 (CO); 142.3 (C<sub>aro</sub>); 141.8 (C<sub>aro</sub>); 136.3 (C<sub>aro</sub>); 136.2 (C<sub>aro</sub>); 130.4 (C<sub>aro</sub>, C<sub>Haro</sub>); 127.1 (C<sub>Haro</sub>); 126.8 (C<sub>Haro</sub>); 125.1 (C<sub>Haro</sub>); 111.5 (C<sub>Haro</sub>); 107.7 (C<sub>4</sub>); 60.9 (C<sub>a'</sub>); 55.9 (C<sub>c</sub>); 54.4 (C<sub>d</sub>, C<sub>b'</sub>); 40.6 (C<sub>a</sub>); 26.0 (C<sub>e</sub>, C<sub>c'</sub>); 25.0 (C<sub>b</sub>); 24.4 (C<sub>f</sub>, C<sub>d'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 434.3, Found: 434.0 [M+H]<sup>+</sup>.

- **Second synthetic route**

\* **5-Bromo-2-([3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenol (**69**)**



C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>BrN<sub>2</sub>O  
Mw: 313.23 g/mol

6-bromo-3-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-1,3-benzoxazol-2-one (**63**) (2.47 g, 7.28 mmol) was dissolved in dioxane (11 mL). After complete dissolution, NaOH solution (2.5 M, 58 mL, 145.00 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 20°C for 16 h. The reaction mixture was cooled down to 0°C. pH was acidified until 1 with 34 mL of HCl solution 6 M. Then pH was made alkaline with K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. After 30 min of stirring, compound was extracted with EtOAc (3 x 30 mL). The combined organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The compound was used without further purification in next step.

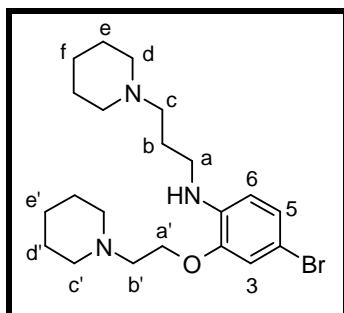
The title compound (2.16 g, 6.90 mmol, 95 %) was obtained as a brown oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.4:0.6, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, MeOD):** 6.82-6.78 (M, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 6.49 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 3.15 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.57-2.52 (M, 6H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>); 1.84 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.65 (m, 4H, H<sub>e</sub>); 1.52 (m, 2H, H<sub>f</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, MeOD):** 145.8 (C<sub>aro</sub>); 136.7 (C<sub>aro</sub>); 122.1 (C<sub>4</sub>); 115.9 (C<sub>6</sub>); 111.5 (C<sub>3</sub>); 107.6 (C<sub>aro</sub>); 56.7 (C<sub>c</sub>); 53.9 (C<sub>d</sub>); 41.8 (C<sub>a</sub>); 25.0 (C<sub>b</sub>); 24.7 (C<sub>e</sub>); 23.4 (C<sub>f</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 312.1-314.1, Found: 312.9-314.9 [M+H]<sup>+</sup>, 310.9-312.9 [M-H]<sup>-</sup>.

\* **4-Bromo-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl]aniline (70)**

$C_{21}H_{34}BrN_3O$   
Mw: 424.42 g/mol

5-Bromo-2-([3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenol (**69**) (2.16 g, 6.90 mmol) was dissolved in DMF (86 mL). The reaction mixture was cooled to 0°C with an ice bath. NaH (0.63 g, 15.90 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min. Then 1-(2-chloroethyl)piperidin-1-ium chloride (1.27 g, 6.90 mmol) was added at 0°C. The reaction mixture was stirred for 2 d. 60 mL of water was added. The mixture was stirred 30 min. Then aqueous layer was extracted with DCM (3 x 60 mL). The combined organic layer was dried over  $MgSO_4$  and evaporated. The residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 9.7:0.3 (v:v)).

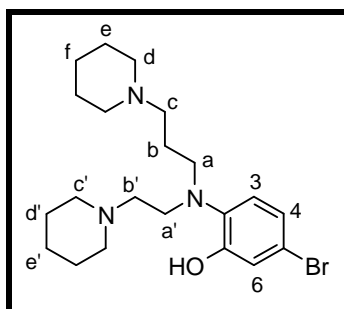
The title compound (2.30 g, 5.42 mmol, 79 %) was obtained as a red oil.

**TLC (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 9.7:0.3, v/v):**  $R_f$  = 0.2

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 6.95 (dd,  $J$  = 8.4 Hz,  $J$  = 2.2 Hz, 1H,  $H_5$ ); 6.86 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H,  $H_3$ ); 6.45 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H,  $H_6$ ); 4.73 (br s, 1H, NH); 4.09 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 2H,  $H_{a'}$ ); 3.13 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 2H,  $H_a$ ); 2.76 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 2H,  $H_{b'}$ ); 2.51-2.36 (M, 10H,  $H_c$ ,  $H_d$ ,  $H_{c'}$ ); 1.82 (m, 2H,  $H_b$ ); 1.64-1.57 (M, 8H,  $H_e$ ,  $H_{d'}$ ); 1.49-1.41 (M, 4H,  $H_f$ ,  $H_{e'}$ ).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 146.2 ( $C_{aro}$ ); 138.1( $C_{aro}$ ); 124.1 ( $C_5$ ); 114.4 ( $C_3$ ); 110.7 ( $C_6$ ); 107.2 ( $C_{aro}$ ); 66.6 ( $C_{a'}$ ); 57.9 ( $C_{b'}$ ); 57.4 ( $C_c$ ); 54.8 ( $C_d$ ,  $C_{c'}$ ); 42.5 ( $C_a$ ); 26.3 ( $C_b$ ); 26.0 ( $C_e$ ,  $C_{d'}$ ); 24.3 ( $C_f$ ,  $C_{e'}$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$**  Calculated: 424.2-426.2, Found: 424.0-426.0 [ $M+H$ ] $^+$ .

\* **5-Bromo-2-([2-(piperidin-1-yl)ethyl][3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenol (75)**

$C_{21}H_{34}BrN_3O$   
Mw: 424.42 g/mol

5-bromo-2-([3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenol (**69**) (100 mg, 0.32 mmol) was suspended in ACN (3.0 mL) and  $K_2CO_3$  (130 mg, 0.96 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 60°C for 30 min. Then 1-(2-chloroethyl)piperidin-1-ium chloride (71 mg, 0.38 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 60°C for 3 h. The mineral was filtered and the solvent was evaporated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 10:0 to 9.8:0.2 (v/v)). The title compound was obtained in mixture with 4-bromo-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl]aniline (**70**). They



were separated by semi-preparative chromatography (eluent H<sub>2</sub>O formate/ACN formate (pH = 9.2), 9:1 to 1:9 (v/v)). (66 % O-substitution, 33 % N-substitution).

The title compound (18 m g, 0.04 mmol, 13 %) was obtained as a red oil.

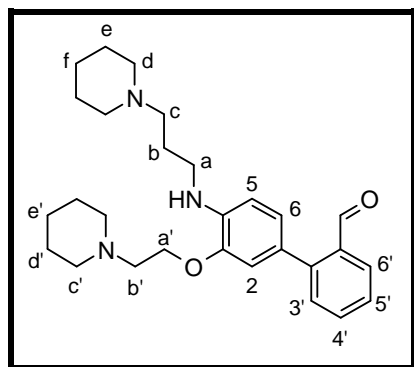
**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.6:0.4, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.03 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 6.94-6.86 (M, 2H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>); 3.0 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.90 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.52-2.33 (M, 12H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>b</sub>, H<sub>c'</sub>); 1.71-1.57 (M, 10H, H<sub>b</sub>, H<sub>e</sub>, H<sub>d'</sub>); 1.50-1.41 (M, 4H, H<sub>f</sub>, H<sub>e'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 156.3 (C<sub>aro</sub>); 136.5 (C<sub>aro</sub>); 123.7 (C<sub>3</sub>); 121.6 (C<sub>4</sub>); 120.2 (C<sub>6</sub>); 117.8 (C<sub>aro</sub>); 56.8 (C<sub>c</sub>, C<sub>b'</sub>); 54.4 (C<sub>d</sub>, C<sub>c'</sub>); 53.4 (C<sub>a</sub>); 52.2 (C<sub>a'</sub>); 25.3 (C<sub>b</sub>, C<sub>e</sub>, C<sub>d'</sub>); 24.3 (C<sub>f</sub>, C<sub>e'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 424.2-426.2, Found: 424.0-426.0 [M+H]<sup>+</sup>.

\* **2-(3-[2-(Piperidin-1-yl)ethoxy]-4-([3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenyl)benzaldehyde (71)**



C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 449.63 g/mol

Synthesized according to procedure E: 4-bromo-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl]aniline (**70**) (150 mg, 0.35 mmol), 2-formylbenzeneboronic acid (63 mg, 0.42 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (62 mg, 0.45 mmol), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (7 mg, 0.01 mmol), P(*o*-tol)<sub>3</sub> (22 mg, 0.07 mmol), toluene (8 mL) and EtOH (3.2 mL) were used. After 18 h of reaction, the residue was purified by flash chromatography (PE/EtOAc/MeOH(NH<sub>3</sub>), 10:0:0 to 5.2:4.4:0.4 (v/v)).

The title compound (146 mg, 0.32 mmol, 92 %) was obtained as a brown oil.

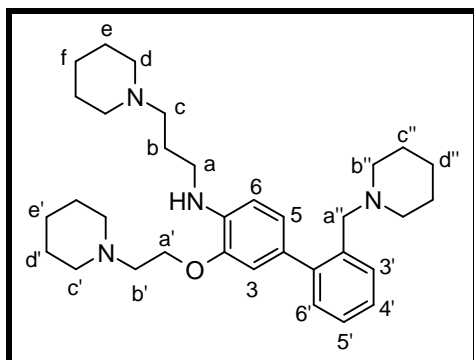
**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.4:0.6, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 10.03 (s, 1H, CHO); 7.99 (m, 1H, H<sub>6'</sub>); 7.59 (m, 1H, H<sub>4'</sub>); 7.47-7.38 (M, 2H, H<sub>3'</sub>, H<sub>5'</sub>); 6.87 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 6.82 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 6.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 4.98 (br s, 1H, NH); 4.16 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.25 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.81 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>); 2.53-2.41 (M, 10H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>c'</sub>); 1.89 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.68-1.58 (M, 8H, H<sub>e</sub>, H<sub>d'</sub>); 1.49-1.43 (M, 4H, H<sub>f</sub>, H<sub>e'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 193.2 (CHO); 146.6 (C<sub>aro</sub>); 145.8 (C<sub>aro</sub>); 139.0 (C<sub>aro</sub>); 133.8 (C<sub>aro</sub>); 133.3 (C<sub>4'</sub>); 130.6 (C<sub>3'</sub> or C<sub>5'</sub>); 127.5 (C<sub>6'</sub>); 126.7 (C<sub>3'</sub> or C<sub>5'</sub>); 125.0 (C<sub>aro</sub>); 124.2 (C<sub>6</sub>); 113.0 (C<sub>2</sub>); 109.3 (C<sub>5</sub>); 66.6 (C<sub>a</sub>); 58.0 (C<sub>b'</sub>); 57.4 (C<sub>c</sub>); 54.9 (C<sub>d</sub>, C<sub>c'</sub>); 42.4 (C<sub>a</sub>); 26.4 (C<sub>b</sub>); 25.9 (C<sub>e</sub>, C<sub>d'</sub>); 24.3 (C<sub>f</sub>, C<sub>e'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 450.3, Found: 450.1 [M+H]<sup>+</sup>, 225.7 [(M+2H)/2]<sup>+</sup>.

\* **2-[2-(Piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-4-[2-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl]aniline (68)**



$C_{33}H_{50}N_4O$   
Mw: 518.78 g/mol

Synthesized according to procedure B: 2-(3-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-4-[(3-(piperidin-1-yl)propyl)amino]phenyl)benzaldehyde (**71**) (150 mg, 0.33 mmol), piperidine (50  $\mu$ L, 0.50 mmol),  $NaBH(OAc)_3$  (106 mg, 0.50 mmol), acetic acid (29  $\mu$ L, 0.50 mmol) and DCE (4.2 mL) were used. The iminium was formed for 5 h and reduced for 16 h. The residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 9.6 : 0.4 (v/v)).

The title compound (114 mg, 0.22 mmol, 66 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 9.6:0.4, v/v):**  $R_f = 0.2$

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 7.53 (m, 1H,  $H_{6'}$ ); 7.29-7.25 (M, 3H,  $H_{3'}$ ,  $H_{4'}$ ,  $H_{5'}$ ); 6.93 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H,  $H_3$ ); 6.89 (dd,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 1.8$  Hz, 1H,  $H_5$ ); 6.64 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H,  $H_6$ ); 4.98 (br s, 1H, NH); 4.15 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H,  $H_{a'}$ ); 3.42 (s, 2H,  $H_{a''}$ ); 3.23 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H,  $H_a$ ); 2.80 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H,  $H_b$ ), 2.52-2.30 (M, 14H,  $H_c$ ,  $H_d$ ,  $H_c'$ ,  $H_b''$ ); 1.90 (m, 2H,  $H_b$ ); 1.68-1.38 (M, 18H,  $H_e$ ,  $H_f$ ,  $H_d'$ ,  $H_e'$ ,  $H_c''$ ,  $H_d''$ ).

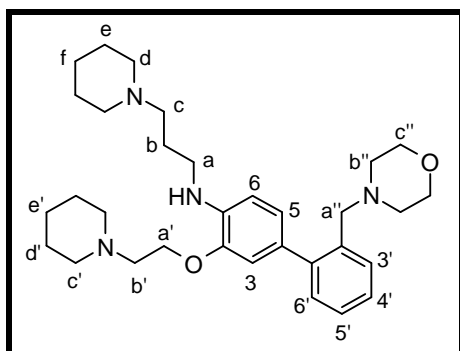
**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 145.3 ( $C_{aro}$ ); 143.1 ( $C_{aro}$ ); 137.1 ( $C_{aro}$ ); 136.1 ( $C_{aro}$ ); 130.1 ( $C_{3'}$ ,  $C_{6'}$ ); 129.5 ( $C_{aro}$ ); 126.3 ( $C_{4'}$ ,  $C_{5'}$ ); 122.8 ( $C_5$ ); 113.0 ( $C_3$ ); 109.3 ( $C_6$ ); 66.4 ( $C_{a'}$ ); 60.8 ( $C_{a''}$ ); 58.1 ( $C_{b'}$ ); 57.4 ( $C_c$ ); 54.9 ( $C_d$ ,  $C_c'$ ); 54.4 ( $C_{b''}$ ); 42.6 ( $C_a$ ); 26.6 ( $C_b$ ); 26.0 ( $C_e$ ,  $C_d'$ ,  $C_c''$ ); 24.3 ( $C_f$ ,  $C_e'$ ,  $C_d''$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 519.4, Found: 519.2  $[M+H]^+$ , 260.2  $[(M+2H)/2]^+$ .

**HR-MS:**  $m/z$  Calculated: 519.40574, Found: 519.40561  $[M+H]^+ = C_{33}H_{51}N_4O$ .

**Purity:**  $C_4$  column:  $t_r = 16.7$  min, purity = 99 %;  $C_{18}$  column:  $t_r = 19.3$  min, purity = 95 %.

\* **4-[2-(Morpholin-4-ylmethyl)phenyl]-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl]aniline (72)**



$C_{32}H_{48}N_4O_2$   
Mw: 520.76 g/mol

Synthesized according to procedure B: 2-(3-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-4-([3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenyl)benzaldehyde (**71**) (270 mg, 0.60 mmol), morpholine (90  $\mu$ L, 1.02 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (220 mg, 1.02 mmol), acetic acid (59  $\mu$ L, 1.02 mmol) and DCE (7.5 mL) were used. The iminium was formed for 5 h and reduced for 16 h. The residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.6:0.4 (v/v)).

The title compound (126 mg, 0.24 mmol, 40 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.6:0.4, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.2

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.49 (m, 1H, H<sub>6'</sub>); 7.29-7.26 (M, 3H, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>); 6.94-6.89 (M, 2H, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>); 6.64 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 4.80 (br s, 1H, NH); 4.14 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.68 (t, *J* = 4.4 Hz, 4H, H<sub>c''</sub>); 3.45 (s, 2H, H<sub>a''</sub>); 3.23 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.79 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>); 2.52-2.38 (M, 14H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>c'</sub>, H<sub>b''</sub>); 1.89 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.66-1.56 (M, 8H, H<sub>e</sub>, H<sub>d'</sub>); 1.50-1.42 (M, 4H, H<sub>f</sub>, H<sub>e'</sub>).

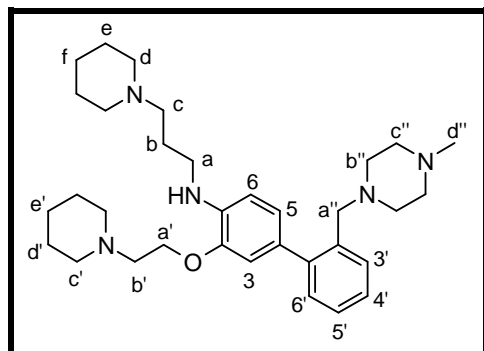
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 145.4 (C<sub>aro</sub>); 143.3 (C<sub>aro</sub>); 137.8 (C<sub>aro</sub>); 135.1 (C<sub>aro</sub>); 130.3 (C<sub>3'</sub>, C<sub>6'</sub>); 129.2 (C<sub>aro</sub>); 126.5 (C<sub>4'</sub>, C<sub>5'</sub>); 122.8 (C<sub>5</sub>); 112.9 (C<sub>3</sub>); 109.3 (C<sub>6</sub>); 67.2 (C<sub>c''</sub>); 66.3 (C<sub>a'</sub>); 60.5 (C<sub>a''</sub>); 58.1 (C<sub>b'</sub>); 57.5 (C<sub>c</sub>); 54.9 (C<sub>d</sub>, C<sub>c'</sub>); 53.4 (C<sub>b''</sub>); 42.6 (C<sub>a</sub>); 26.6 (C<sub>b</sub>); 26.0 (C<sub>e</sub>, C<sub>d'</sub>); 24.3 (C<sub>f</sub>, C<sub>e'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 521.4, Found: 521.4 [M+H]<sup>+</sup>, 261.3 [(M+2H)/2]<sup>+</sup>.

**HR-MS:** *m/z* Calculated: 521.38500, Found: 521.38520 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>32</sub>H<sub>49</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 18.3 min, purity = 96 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 18.8 min, purity = 96 %.

\* **4-(2-[(4-Methylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl)-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl]aniline (**73**)**



C<sub>33</sub>H<sub>51</sub>N<sub>5</sub>O  
Mw: 533.81 g/mol

Synthesized according to procedure B: 2-(3-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-4-([3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenyl)benzaldehyde (**71**) (340 mg, 0.75 mmol), 1-methylpiperazine (124  $\mu$ L, 1.12 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (240 mg, 1.12 mmol), acetic acid (64  $\mu$ L, 1.12 mmol) and DCE (10 mL) were used. The iminium was formed for 5 h and reduced for 16 h. The residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.6:0.4 (v/v)).

The title compound (213 mg, 0.40 mmol, 54 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.5:0.5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.2

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.47 (m, 1H, H<sub>6'</sub>); 7.27-7.24 (M, 3H, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>); 6.94-6.90 (M, 2H, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>); 6.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 4.13 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.44 (s, 2H, H<sub>a''</sub>); 3.22 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.79 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>); 2.50-2.27 (M, 21H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>c'</sub>, H<sub>b''</sub>, H<sub>c''</sub>, H<sub>d''</sub>); 1.88 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.66-1.56 (M, 8H, H<sub>e</sub>, H<sub>d'</sub>); 1.48-1.42 (M, 4H, H<sub>f</sub>, H<sub>e'</sub>).

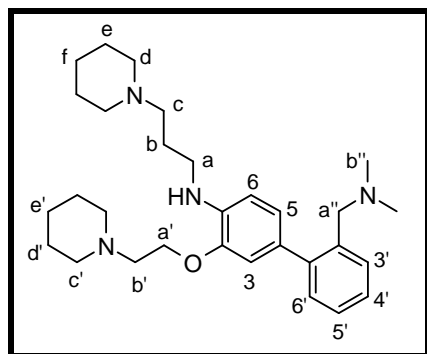
**$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 145.3 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 143.3 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 137.8 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 135.5 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 130.3 ( $\text{C}_{3'}$ ,  $\text{C}_{6'}$ ); 129.3 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 126.4 ( $\text{C}_{4'}$ ,  $\text{C}_{5'}$ ); 122.8 ( $\text{C}_5$ ); 113.0 ( $\text{C}_3$ ); 109.2 ( $\text{C}_6$ ); 66.5 ( $\text{C}_{a'}$ ); 60.1 ( $\text{C}_{a''}$ ); 58.1 ( $\text{C}_{b'}$ ); 57.5 ( $\text{C}_c$ ); 55.0 ( $\text{C}_d$ ,  $\text{C}_{c'}$ ,  $\text{C}_{b''}$ ,  $\text{C}_{c''}$ ); 46.1 ( $\text{C}_{d''}$ ); 42.6 ( $\text{C}_a$ ); 26.7 ( $\text{C}_b$ ); 26.0 ( $\text{C}_e$ ,  $\text{C}_{d'}$ ); 24.3 ( $\text{C}_f$ ,  $\text{C}_{e'}$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 534.2, Found: 534.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 267.4  $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$ .

**HR-MS:**  $m/z$  Calculated: 534.41664, Found: 534.41704  $[\text{M}+\text{H}]^+ = \text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{N}_5\text{O}$ .

**Purity:**  $\text{C}_4$  column:  $t_r = 18.6$  min, purity = 98 %;  $\text{C}_{18}$  column:  $t_r = 18.4$  min, purity = 97 %.

\* **4-(2-[(Dimethylamino)methyl]phenyl)-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl]aniline (74)**



$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}$   
Mw: 478.73 g/mol

Synthesized according to procedure B: 2-(3-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-4-[(3-(piperidin-1-yl)propyl)amino]phenyl)benzaldehyde (**71**) (200 mg, 0.44 mmol), dimethylamine in THF (2 M, 340  $\mu\text{L}$ , 0.67 mmol),  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  (142 mg, 0.67 mmol), acetic acid (39  $\mu\text{L}$ , 0.67 mmol) and DCE (5.5 mL) were used. The iminium was formed for 5 h and reduced for 16 h. The residue was purified by column chromatography ( $\text{DCM}/\text{MeOH}(\text{NH}_3)$ , 9.6:0.4 (v/v)).

The title compound (39 mg, 0.08 mmol, 18 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC ( $\text{DCM}/\text{MeOH}(\text{NH}_3)$ , 9.6:0.4, v/v):**  $R_f = 0.2$

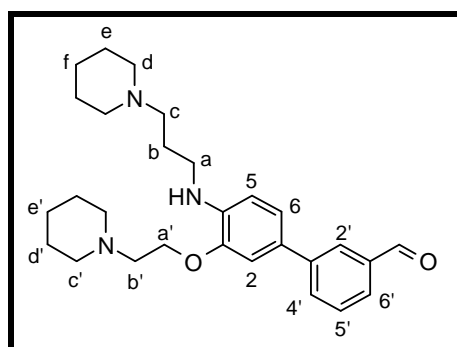
**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 7.51 (m, 1H,  $\text{H}_{6'}$ ); 7.33-7.25 (M, 3H,  $\text{H}_{3'}$ ,  $\text{H}_{4'}$ ,  $\text{H}_{5'}$ ); 6.91-6.85 (M, 2H,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_5$ ); 6.65 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H,  $\text{H}_6$ ); 4.14 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $\text{H}_{a'}$ ); 3.40 (s, 2H,  $\text{H}_{a''}$ ); 3.23 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H,  $\text{H}_a$ ); 2.80 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H,  $\text{H}_{b'}$ ); 2.54-2.40 (M, 10H,  $\text{H}_c$ ,  $\text{H}_d$ ,  $\text{H}_c$ ); 2.18 (s, 6H,  $\text{H}_{b''}$ ); 1.90 (m, 2H,  $\text{H}_b$ ); 1.67-1.57 (M, 8H,  $\text{H}_e$ ,  $\text{H}_{d'}$ ); 1.50-1.42 (M, 4H,  $\text{H}_f$ ,  $\text{H}_{e'}$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 145.4 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 142.9 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 137.7 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 136.3 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 130.0 ( $\text{C}_{3'}$ ,  $\text{C}_{6'}$ ); 129.4 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 126.5 ( $\text{C}_{4'}$ ,  $\text{C}_{5'}$ ); 122.7 ( $\text{C}_5$ ); 112.9 ( $\text{C}_3$ ); 109.3 ( $\text{C}_6$ ); 66.3 ( $\text{C}_{a'}$ ); 61.1 ( $\text{C}_{a''}$ ); 58.1 ( $\text{C}_{b'}$ ); 57.5 ( $\text{C}_c$ ); 54.9 ( $\text{C}_d$ ,  $\text{C}_{c'}$ ); 45.4 ( $\text{C}_{b''}$ ); 42.6 ( $\text{C}_a$ ); 26.6 ( $\text{C}_b$ ); 26.0 ( $\text{C}_e$ ,  $\text{C}_{d'}$ ); 24.3 ( $\text{C}_f$ ,  $\text{C}_{e'}$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 479.3, Found: 479.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 240.2  $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$ .

**HR-MS:**  $m/z$  Calculated: 479.37444, Found: 479.37408  $[\text{M}+\text{H}]^+ = \text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{ON}_4$ .

**Purity:**  $\text{C}_4$  column:  $t_r = 18.6$  min, purity = 91 %;  $\text{C}_{18}$  column:  $t_r = 18.6$  min, purity = 94 %.

\* **3-[3-[2-(Piperidin-1-yl)ethoxy]-4-([3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenyl]benzaldehyde (76)**

$C_{28}H_{39}N_3O_2$   
Mw: 449.64 g/mol

Synthesized according to procedure E: 4-bromo-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl]aniline (**70**) (592 mg, 1.40 mmol), 3-formylbenzeneboronic acid (252 mg, 1.68 mmol),  $K_2CO_3$  (252 mg, 1.82 mmol),  $Pd_2dba_3$  (26 mg, 0.03 mmol),  $P(o\text{-tol})_3$  (85 mg, 0.28 mmol), toluene (32 mL) and EtOH (13 mL) were used. After 18 h of reaction, the residue was purified by flash chromatography (PE/EtOAc/MeOH( $NH_3$ ), 10:0:0 to 5.2:4.4:0.4 (v/v)).

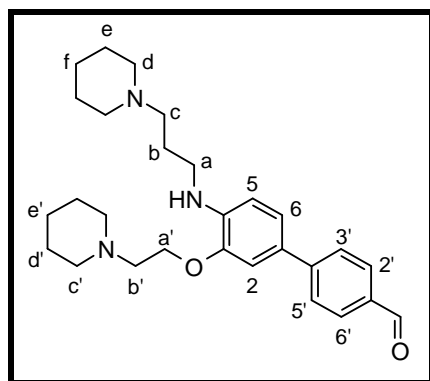
The title compound (600 mg, 1.34 mmol, 96 %) was obtained as a brown oil.

**TLC (PE/EtOAc/MeOH( $NH_3$ ), 5:4.5:0.5, v/v/v):** Rf = 0.3

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 10.07 (s, 1H, CHO); 8.05 (t,  $J = 1.6$  Hz, 1H,  $H_{2'}$ ); 7.81 (m, 1H,  $H_{4'}$  or  $H_{6'}$ ); 7.75 (dt,  $J = 7.7$  Hz,  $J = 1.3$  Hz, 1H,  $H_{4'}$  or  $H_{6'}$ ); 7.55 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H,  $H_{5'}$ ); 7.18 (dd,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 2.0$  Hz, 1H,  $H_6$ ); 7.07 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H,  $H_2$ ); 6.68 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H,  $H_5$ ); 4.95 (br s, 1H, NH); 4.22 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $H_{a'}$ ); 3.24 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H,  $H_a$ ); 2.83 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H,  $H_{b'}$ ); 2.56-2.41 (M, 10H,  $H_c$ ,  $H_d$ ,  $H_{c'}$ ); 1.89 (m, 2H,  $H_b$ ); 1.67-1.59 (M, 8H,  $H_e$ ,  $H_{d'}$ ); 1.49-1.45 (M, 4H,  $H_f$ ,  $H_{e'}$ ).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 192.7 (CHO); 146.4 ( $C_{aro}$ ); 142.5 ( $C_{aro}$ ); 139.1 ( $C_{aro}$ ); 136.8 ( $C_{aro}$ ); 132.2 ( $C_{4'}$  or  $C_{6'}$ ); 129.3 ( $C_{5'}$ ); 127.3 ( $C_{4'}$  or  $C_{6'}$ ,  $C_2$ ); 120.4 ( $C_6$ ); 110.0 ( $C_2$ ,  $C_5$ ); 66.6 ( $C_{a'}$ ); 58.1 ( $C_{b'}$ ); 57.4 ( $C_c$ ); 55.1 ( $C_d$  or  $C_{c'}$ ); 54.7 ( $C_d$  or  $C_{c'}$ ); 42.4 ( $C_a$ ); 26.4 ( $C_b$ ); 26.0 ( $C_e$ ,  $C_{d'}$ ); 24.3 ( $C_f$ ,  $C_{e'}$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 450.3, Found: 450.3 [ $M+H$ ] $^+$ .

\* **4-[3-[2-(Piperidin-1-yl)ethoxy]-4-([3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenyl]benzaldehyde (79)**

$C_{28}H_{39}N_3O_2$   
Mw: 449.63 g/mol

Synthesized according to procedure E: 4-bromo-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl]aniline (**70**) (306 mg, 0.72 mmol), 4-formylbenzeneboronic acid (130 mg, 0.87 mmol),  $K_2CO_3$  (126 mg, 0.92 mmol),  $Pd_2dba_3$  (14 mg, 0.02 mmol),  $P(o\text{-tol})_3$  (44 mg, 0.14 mmol), toluene (16 mL) and EtOH (6 mL) were used. After 18 h of reaction, the residue was purified by flash chromatography (PE/EtOAc/MeOH( $NH_3$ ), 10:0:0 to 4:5.5:0.5 (v/v)).

The title compound (285 mg, 0.64 mmol, 88 %) was obtained as a brown oil.

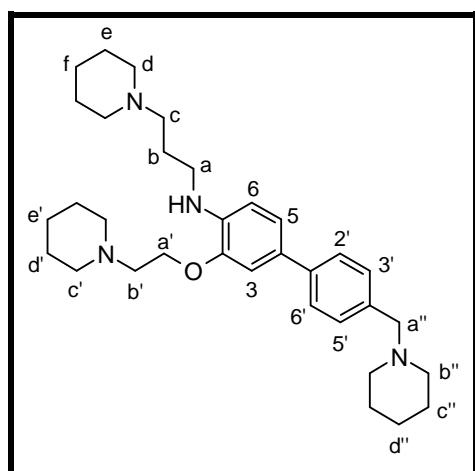
**TLC (PE/EtOAc/MeOH(NH<sub>3</sub>), 5:4.5:0.5, v/v/v):** R<sub>f</sub> = 0.2

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 10.01 (s, 1H, CHO), 7.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>); 7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>); 7.23 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 7.10 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 6.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 5.05 (br s, 1H, NH); 4.23 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.27 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.86 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>); 2.61-2.39 (M, 10H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>c'</sub>); 1.93 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.75-1.58 (M, 8H, H<sub>e</sub>, H<sub>d'</sub>); 1.53-1.43 (M, 4H, H<sub>f</sub>, H<sub>e'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 191.9 (CHO); 147.6 (C<sub>aro</sub>); 146.2 (C<sub>aro</sub>); 139.6 (C<sub>aro</sub>); 134.0 (C<sub>aro</sub>); 133.3 (C<sub>3'</sub>, C<sub>5'</sub>); 127.0 (C<sub>aro</sub>); 126.4 (C<sub>2'</sub>, C<sub>6'</sub>); 121.1 (C<sub>6</sub>); 110.0 (C<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>); 66.5 (C<sub>a</sub>); 57.9 (C<sub>b'</sub>); 57.2 (C<sub>c</sub>); 54.8 (C<sub>d</sub>, C<sub>c'</sub>); 42.1 (C<sub>a</sub>); 25.8 (C<sub>b</sub>); 25.5 (C<sub>e</sub>, C<sub>d'</sub>); 24.1 (C<sub>f</sub>, C<sub>e'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 450.3, Found: 450.2 [M+H]<sup>+</sup>, 225.6 [(M+H)/2]<sup>+</sup>.

\* **2-[2-(Piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl]-4-[4-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl]aniline (80)**



C<sub>33</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O  
Mw: 518.78 g/mol

Synthesized according to procedure C: 4-(3-[2-(Piperidin-1-yl)ethoxy]-4-([3-(piperidin-1-yl)propyl]amino)phenyl)benzaldehyde (**79**) (290 mg, 0.65 mmol), piperidine (96 μL, 0.97 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (206 mg, 0.97 mmol), acetic acid (56 μL, 0.97 mmol) and DCE (12 mL) were used. The iminium was formed for 2 h and reduced for 16 h. The residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.6:0.4 (v/v)).

The title compound (260 mg, 0.50 mmol, 77 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.5:0.5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.51 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H<sub>2'</sub>, H<sub>6'</sub>); 7.32 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H<sub>3'</sub>, H<sub>5'</sub>); 7.13 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7.04 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 6.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 4.20 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.50 (s, 2H, H<sub>a''</sub>); 3.22 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.81 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H<sub>b'</sub>), 2.54-2.34 (M, 14H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>c'</sub>, H<sub>b''</sub>); 1.87 (m, 2H, H<sub>b</sub>); 1.66-1.38 (M, 18H, H<sub>e</sub>, H<sub>f</sub>, H<sub>d'</sub>, H<sub>e'</sub>, H<sub>c''</sub>, H<sub>d''</sub>).

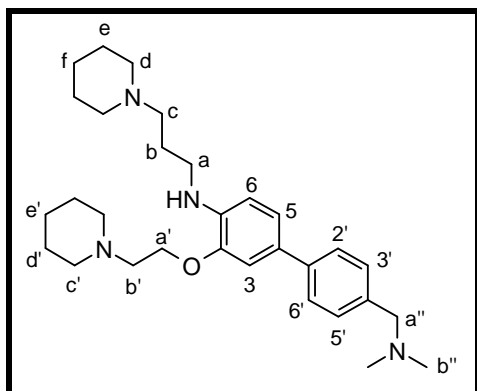
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 146.2 (C<sub>aro</sub>); 140.2 (C<sub>aro</sub>); 138.3 (C<sub>aro</sub>); 136.1 (C<sub>aro</sub>); 129.6 (C<sub>3'</sub>, C<sub>5'</sub>); 129.1 (C<sub>aro</sub>); 126.0 (C<sub>2'</sub>, C<sub>6'</sub>); 120.2 (C<sub>5</sub>); 110.1 (C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>); 66.6 (C<sub>a'</sub>); 63.6 (C<sub>a''</sub>); 58.1 (C<sub>b'</sub>); 57.5 (C<sub>c</sub>); 55.1 (C<sub>d</sub>, C<sub>c'</sub>); 54.5 (C<sub>b''</sub>); 42.5 (C<sub>a</sub>); 26.6 (C<sub>b</sub>); 26.0 (C<sub>e</sub>, C<sub>d'</sub>, C<sub>c''</sub>); 24.4 (C<sub>f</sub>, C<sub>e'</sub>, C<sub>d''</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 519.4, Found: 519.3 [M+H]<sup>+</sup>.

**HR-MS:** *m/z* Calculated: 519.40574, Found: 519.40598 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>33</sub>H<sub>51</sub>N<sub>4</sub>O.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 15.4 min, purity = 96 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 18.7 min, purity = 95 %.

\* **4-(4-[(Dimethylamino)methyl]phenyl)-2-[2-(piperidin-1-yl)ethoxy]-N-[3-(piperidin-1-yl)propyl]aniline (81)**



$C_{30}H_{46}N_4O$   
Mw: 478.73 g/mol

Synthesized according to procedure B: 4-(3-[2-(Piperidin-1-yl)ethoxy]-4-[(3-(piperidin-1-yl)propyl)amino]phenyl)benzaldehyde (**79**) (200 mg, 0.44 mmol), dimethylamine in THF (2 M, 334  $\mu$ L, 0.67 mmol),  $NaBH(OAc)_3$  (142 mg, 0.67 mmol), acetic acid (38  $\mu$ L, 0.67 mmol) and DCE (10 mL) were used. The iminium was formed for 5 h and reduced for 16 h. The residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 9.6:0.4 (v/v)).

The title compound (130 mg, 0.27 mmol, 61 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 9.6:0.4, v/v):**  $R_f$  = 0.2

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 7.49 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H,  $H_{2'}$ ,  $H_{6'}$ ); 7.31 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H,  $H_{3'}$ ,  $H_{5'}$ ); 7.12 (dd,  $J$  = 8.2 Hz,  $J$  = 1.9 Hz, 1H,  $H_5$ ); 7.04 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H,  $H_3$ ); 6.65 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H,  $H_6$ ); 4.20 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 2H,  $H_{a'}$ ); 3.45 (s, 2H,  $H_{a''}$ ); 3.23 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H,  $H_a$ ); 2.82 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 2H,  $H_{b'}$ ), 2.55-2.41 (M, 10H,  $H_c$ ,  $H_d$ ,  $H_c'$ ); 2.25 (s, 3H,  $H_{a''}$ ); 1.88 (m, 2H,  $H_b$ ); 1.66-1.58 (M, 8H,  $H_e$ ,  $H_{d'}$ ); 1.51-1.44 (M, 4H,  $H_f$ ,  $H_{e'}$ ).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 146.2 ( $C_{aro}$ ); 140.4 ( $C_{aro}$ ); 138.3 ( $C_{aro}$ ); 136.4 ( $C_{aro}$ ); 129.5 ( $C_{3'}$ ,  $C_{5'}$ ); 129.0 ( $C_{aro}$ ); 126.4 ( $C_{2'}$ ,  $C_{6'}$ ); 120.2 ( $C_5$ ); 110.0 ( $C_3$ ,  $C_6$ ); 66.4 ( $C_{a'}$ ); 64.1 ( $C_{a''}$ ); 58.1 ( $C_{b'}$ ); 57.4 ( $C_c$ ); 54.8 ( $C_d$ ,  $C_{c'}$ ); 45.3 ( $C_{b''}$ ); 42.5 ( $C_a$ ); 26.4 ( $C_b$ ); 25.8 ( $C_e$ ,  $C_{d'}$ ); 24.3 ( $C_f$ ,  $C_{e'}$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 479.3, Found: 479.4 [ $M+H$ ] $^+$ .

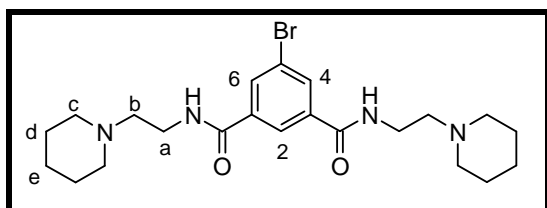
**HR-MS:**  $m/z$  Calculated: 479.37444, Found: 479.37165 [ $M+H$ ] $^+$  =  $C_{30}H_{47}N_4O$ .

**Purity:**  $C_4$  column:  $t_r$  = 14.3 min, purity = 95 %;  $C_{18}$  column:  $t_r$  = 16.5 min, purity = 95 %.

## 6. Synthesis of E<sub>1</sub> family

- First synthetic route

\* **5-Bromo-N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (83)**



$C_{22}H_{33}BrN_4O_2$   
Mw: 465.44 g/mol

To a solution of 5-bromoisophthalic acid (**82**) (200 mg, 0.82 mmol) and 1-piperidineethanamine (240  $\mu$ L, 1.17 mmol) in DMF (2.5 mL) was added EDC.HCl (330 mg, 1.73 mmol) and HOBT-H<sub>2</sub>O (25.2 mg, 0.165 mmol). The reaction mixture was stirred for 16 h. 10 mL of saturated NaHCO<sub>3</sub> solution was added. The aqueous layer was extracted with DCM (3 x 10 mL). The combined organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 10:0 to 9.7:0.3 (v/v)).

The title compound (340 mg, 0.73 mmol, 89 %) was obtained as a white solid.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.5:0.5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

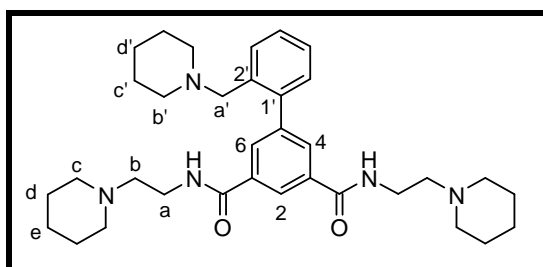
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.23 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 8.04 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.46 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H, 2NH); 3.48 (td, *J* = 5.9 Hz, *J* = 5.5 Hz, 4H, H<sub>a</sub>); 2.50 (t, *J* = 6.1 Hz, 4H, H<sub>b</sub>); 2.38 (m, 8H, H<sub>c</sub>); 1.54 (m, 8H, H<sub>d</sub>); 1.40 (m, 4H, H<sub>e</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 165.3 (CO); 136.3 (C<sub>aro</sub>); 133.2 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 123.7 (C<sub>2</sub>); 123.0 (C<sub>aro</sub>); 57.4 (C<sub>b</sub>); 54.3 (C<sub>c</sub>); 36.6 (C<sub>a</sub>); 25.7 (C<sub>d</sub>); 24.2 (C<sub>e</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 465.2-467.2, Found: 465.0-466.9, 233.1-234.0 [(M+2H)/2]<sup>+</sup>.

**Melting Point:** 127.3°C

\* **N1,N3-bis[2-(Piperidin-1-yl)ethyl]-5-[2-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl]benzene-1,3-dicarboxamide (85)**



$C_{34}H_{49}N_5O_2$   
Mw: 559.80 g/mol

The compound was synthesized according procedure E then B.

**Procedure E:** 2-formylbenzeneboronic acid (350 mg, 2.32 mmol), 5-bromo-N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (**83**) (900 mg, 1.93 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (350 mg, 2.51 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (10 mg, 0.04 mmol), P(*o*-tol)<sub>3</sub> (120 mg, 0.39 mmol), toluene (43 mL) and EtOH (16 mL) were used. After 18 h of reaction, the residue was used without further purification in the next step.

**Procedure B:** The previous residue, piperidine (290  $\mu$ L, 2.90 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (614 mg, 2.90 mmol), acetic acid (166  $\mu$ L, 2.90 mmol) and DCE (24 mL) were used. The iminium was formed for 15 h and



reduced for 24 h. The residue was purified by column chromatography (PE/EtOAc/MeOH(NH<sub>3</sub>), 4:5.5:0.5 (v/v/v)).

The title compound (670 mg, 1.20 mmol, 62 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (PE/EtOAc/MeOH(NH<sub>3</sub>), 4:5.5:0.5, v/v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.34 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 8.09 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.50 (m, 1H, H<sub>aro</sub>); 7.39-7.29 (M, 3H, H<sub>aro</sub>); 7.21 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, NH); 3.61 (td, *J* = 5.8 Hz, *J* = 5.6 Hz, 4H, H<sub>a</sub>); 3.30 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.62 (t, *J* = 6.1 Hz, 4H, H<sub>b</sub>); 2.49 (m, 8H, H<sub>c</sub>); 2.25 (m, 4H, H<sub>b'</sub>); 1.63 (m, 8H, H<sub>d</sub>); 1.54-1.36 (M, 10H, H<sub>e</sub>, H<sub>c'</sub>, H<sub>d'</sub>).

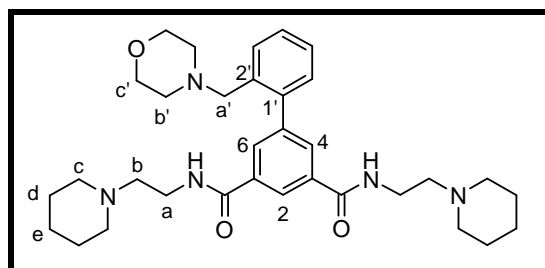
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 166.7 (CO); 142.5 (C<sub>aro</sub>); 141.2 (C<sub>aro</sub>); 136.3 (C<sub>aro</sub>); 134.3 (C<sub>aro</sub>); 131.3 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 130.5 (CH<sub>aro</sub>); 130.1 (CH<sub>aro</sub>); 127.6 (CH<sub>aro</sub>); 126.9 (CH<sub>aro</sub>); 123.8 (C<sub>2</sub>); 60.9 (C<sub>a'</sub>); 57.4 (C<sub>b</sub>); 54.4 (C<sub>c</sub>); 54.2 (C<sub>b'</sub>); 36.5 (C<sub>a</sub>); 26.1 (C<sub>c'</sub>); 25.7 (C<sub>d</sub>); 24.4 (C<sub>d'</sub>); 24.2 (C<sub>e</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 560.4, Found: 560.4 [M+H]<sup>+</sup>, 558.3 [M-H]<sup>-</sup>.

**HR-MS:** *m/z* Calculated: 560.39590, Found: 560.39511 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>34</sub>H<sub>50</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 18.8 min, purity = 98 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 18.4 min, purity = 98 %.

\* **5-[2-(Morpholine-4-ylmethyl)phenyl]-N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (86)**



C<sub>33</sub>H<sub>47</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 561.77 g/mol

The compound was synthesized according procedure E then B.

**Procedure E:** 2-formylbenzeneboronic acid (193 mg, 1.29 mmol), 5-bromo-N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (**83**) (500 mg, 1.07 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (193 mg, 1.4 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (5 mg, 0.02 mmol), P(*o*-tol)<sub>3</sub> (66 mg, 0.22 mmol), toluene (24 mL) and EtOH (9 mL) were used. After 18 h of reaction, the residue was used without further purification in the next step.

**Procedure B:** The previous residue, morpholine (134 μL, 1.53 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (323 mg, 1.53 mmol), acetic acid (88 μL, 1.53 mmol) and DCE (13 mL) were used. The iminium was formed for 5 h and reduced for 24 h. The residue was purified by column chromatography (PE/EtOAc/MeOH(NH<sub>3</sub>), 4:5.5:0.5 (v/v/v)).

The title compound (164 mg, 0.29 mmol, 29 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.6:0.4, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.2

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.34 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 8.09 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.48 (m, 1H, H<sub>aro</sub>); 7.37-7.29 (M, 5H, H<sub>aro</sub>, 2NH); 3.65-3.58 (M, 8H, H<sub>a</sub>, H<sub>c</sub>); 3.35 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.61 (t, *J* = 6.0 Hz, 4H, H<sub>b</sub>); 2.48 (m, 8H, H<sub>c</sub>); 2.35 (m, 4H, H<sub>b'</sub>); 1.63 (m, 8H, H<sub>d</sub>); 1.49 (m, 4H, H<sub>e</sub>).

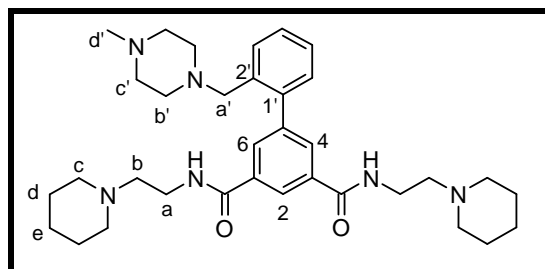
**$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 166.6 (CO); 142.4 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 141.4 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 135.2 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 134.3 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 131.5 ( $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_6$ ); 130.5 ( $\text{CH}_{\text{aro}}$ ); 130.3 ( $\text{CH}_{\text{aro}}$ ); 127.6 ( $\text{CH}_{\text{aro}}$ ); 127.3 ( $\text{CH}_{\text{aro}}$ ); 123.6 ( $\text{C}_2$ ); 67.1 ( $\text{C}_c'$ ); 60.6 ( $\text{C}_a'$ ); 57.5 ( $\text{C}_b$ ); 54.4 ( $\text{C}_c$ ); 53.2 ( $\text{C}_b'$ ); 36.5 ( $\text{C}_a$ ); 25.7 ( $\text{C}_d$ ); 24.2 ( $\text{C}_e$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$**  Calculated: 562.4, Found: 562.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 560.4  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

**HR-MS:**  $m/z$  Calculated: 562.37517, Found: 562.37540  $[\text{M}+\text{H}]^+ = \text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_3$ .

**Purity:**  $\text{C}_4$  column:  $t_r = 18.2$  min, purity = 99 %;  $\text{C}_{18}$  column:  $t_r = 17.9$  min, purity = 99 %.

\* **5-(2-[(4-Methylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl)-N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (87)**



$\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{N}_6\text{O}_2$   
Mw: 574.82 g/mol

The compound was synthesized according procedure E then B.

**Procedure E:** 2-formylbenzeneboronic acid (193 mg, 1.29 mmol), 5-bromo-N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (**83**) (500 mg, 1.07 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (193 mg, 1.4 mmol),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (5 mg, 0.02 mmol),  $\text{P}(o\text{-tol})_3$  (66 mg, 0.22 mmol), toluene (24 mL) and EtOH (9 mL) were used. After 18 h of reaction, the residue was used without further purification in the next step.

**Procedure B:** The previous residue, 1-methylpiperazine (170  $\mu\text{L}$ , 1.53 mmol),  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  (323 mg, 1.53 mmol), acetic acid (88  $\mu\text{L}$ , 1.53 mmol) and DCE (13 mL) were used. The iminium was formed for 5 h and reduced for 24 h. The residue was purified by column chromatography (PE/EtOAc/MeOH( $\text{NH}_3$ ), 4:5.5:0.5 (v/v/v)).

The title compound (174 mg, 0.27 mmol, 26 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH( $\text{NH}_3$ ), 9.6:0.4, v/v):**  $R_f = 0.2$

**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 8.28 (t,  $J = 1.5$  Hz, 1H,  $\text{H}_2$ ); 8.05 (d,  $J = 1.5$  Hz, 2H,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_6$ ); 7.45 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{aro}}$ ); 7.36-7.24 (M, 3H,  $\text{H}_{\text{aro}}$ ); 7.18 (br t,  $J = 4.9$  Hz, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 3.55 (td,  $J = 5.8$  Hz,  $J = 5.6$  Hz, 4H,  $\text{H}_a$ ); 3.33 (s, 2H,  $\text{H}_{a'}$ ); 2.56 (t,  $J = 6.0$  Hz, 4H,  $\text{H}_b$ ); 2.50-2.25 (M, 16H,  $\text{H}_c$ ,  $\text{H}_b'$ ,  $\text{H}_c'$ ); 2.22 (s, 3H,  $\text{H}_d'$ ); 1.58 (m, 8H,  $\text{H}_d$ ); 1.44 (m, 4H,  $\text{H}_e$ ).

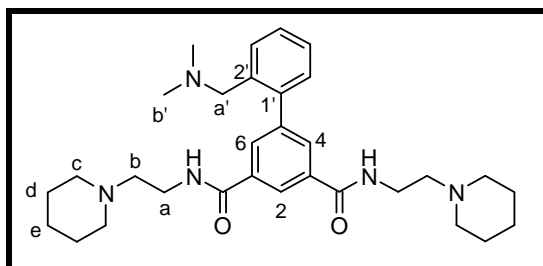
**$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 166.7 (CO); 142.3 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 141.2 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 135.6 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 134.4 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 131.2 ( $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_6$ ); 130.5 ( $\text{CH}_{\text{aro}}$ ); 130.1 ( $\text{CH}_{\text{aro}}$ ); 127.6 ( $\text{CH}_{\text{aro}}$ ); 127.2 ( $\text{CH}_{\text{aro}}$ ); 123.7 ( $\text{C}_2$ ); 60.1 ( $\text{C}_a'$ ); 57.4 ( $\text{C}_b$ ); 55.2 ( $\text{C}_b'$  or  $\text{C}_c'$ ); 54.3 ( $\text{C}_c$ ); 52.7 ( $\text{C}_b'$  or  $\text{C}_c'$ ); 46.0 ( $\text{C}_d'$ ); 36.6 ( $\text{C}_a$ ); 25.8 ( $\text{C}_d$ ); 24.2 ( $\text{C}_e$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$**  Calculated: 575.4, Found: 575.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 573.4  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

**HR-MS:**  $m/z$  Calculated: 575.40680, Found: 575.40717  $[\text{M}+\text{H}]^+ = \text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{N}_6\text{O}_2$ .

**Purity:**  $\text{C}_4$  column:  $t_r = 19.3$  min, purity = 98 %;  $\text{C}_{18}$  column:  $t_r = 18.0$  min, purity = 98 %.

\* **5-(2-[(Dimethylamino)methyl]phenyl)-N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (88)**



$C_{31}H_{45}N_5O_2$   
Mw: 519.54 g/mol

The compound was synthesized according procedure E then B.

**Procedure E:** 2-formylbenzeneboronic acid (204 mg, 1.36 mmol), 5-bromo-N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (**83**) (530 mg, 1.14 mmol),  $K_2CO_3$  (204 mg, 1.48 mmol),  $Pd(OAc)_2$  (5 mg, 0.02 mmol),  $P(o-tol)_3$  (701 mg, 0.23 mmol), toluene (25 mL) and EtOH (10 mL) were used. After 18 h of reaction, the residue was used without further purification in the next step.

**Procedure B:** The previous residue, dimethylamine in THF (2 M, 764  $\mu$ L, 1.53 mmol),  $NaBH(OAc)_3$  (323 mg, 1.53 mmol), acetic acid (88  $\mu$ L, 1.53 mmol) and DCE (13 mL) were used. The iminium was formed for 5 h and reduced for 24 h. The residue was purified by column chromatography (PE/EtOAc/MeOH( $NH_3$ ), 4:5.5:0.5 (v/v/v)).

The title compound (289 mg, 0.56 mmol, 55 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 9.6:0.4, v/v):**  $R_f$  = 0.2

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 8.33 (t,  $J$  = 1.6 Hz, 1H,  $H_2$ ); 8.07 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 2H,  $H_4, H_6$ ); 7.45 (m, 1H,  $H_{aro}$ ); 7.35-7.22 (M, 5H,  $H_{aro}$  and  $NH_2$ ); 3.53 (td,  $J$  = 5.8 Hz,  $J$  = 5.6 Hz, 4H,  $H_a$ ); 3.24 (s, 2H,  $H_{a'}$ ); 2.52 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 4H,  $H_b$ ); 2.39 (m, 8H,  $H_c$ ); 2.13 (s, 6H,  $H_{b'}$ ); 1.55 (m, 8H,  $H_d$ ); 1.42 (m, 4H,  $H_e$ ).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 166.6 ( $CO$ ); 142.1 ( $C_{aro}$ ); 141.0 ( $C_{aro}$ ); 136.2 ( $C_{aro}$ ); 134.3 ( $C_{aro}$ ); 131.3 ( $C_4, C_6$ ); 130.5 ( $CH_{aro}$ ); 130.0 ( $CH_{aro}$ ); 127.7 ( $CH_{aro}$ ); 127.1 ( $CH_{aro}$ ); 123.9 ( $C_2$ ); 61.2 ( $C_{a'}$ ); 57.5 ( $C_b$ ); 54.3 ( $C_c$ ); 45.7 ( $C_{b'}$ ); 36.6 ( $C_a$ ); 25.8 ( $C_d$ ); 24.2 ( $C_e$ ).

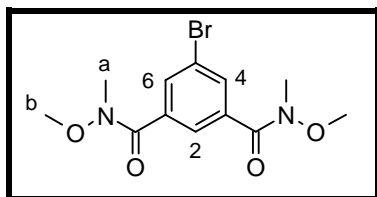
**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 520.4, Found: 520.4 [ $M+H$ ] $^+$ .

**HR-MS:**  $m/z$  Calculated: 520.36460, Found: 520.36475 [ $M+H$ ] $^+$  =  $C_{31}H_{46}N_5O_2$ .

**Purity:**  $C_4$  column:  $t_r$  = 18.1 min, purity = 96 %;  $C_{18}$  column:  $t_r$  = 17.9 min, purity = 96 %.

• **Second synthetic route**

\* **5-Bromo-N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (89)**



$C_{12}H_{15}BrN_2O_4$   
Mw: 331.17 g/mol

To a stirred solution of 5-bromoisophthalic acid (**82**) (4.00 g, 16.3 mmol) in ACN (32 mL) and DCM (32 mL) was added EDC.HCl (8.14 g, 42.40 mmol), HOBT-H<sub>2</sub>O (5.74 g, 42.40 mmol), *N*-méthylmorpholine (23.3 mL, 212.00 mmol) and *N,O*-dimethylhydroxylamine.HCl (6.69 g, 68.60 mmol). The mixture was stirred at 20°C for 16 h. The mixture was washed with a saturated solution of  $NaHCO_3$  (2 x 50 mL), a 1 M solution

of HCl (2 x 50 mL) and 50 mL of brine. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated. The compound was used without further purification in the next step.

The title compound (4.80 g, 14.49 mmol, 89 %) was obtained as a yellow oil.

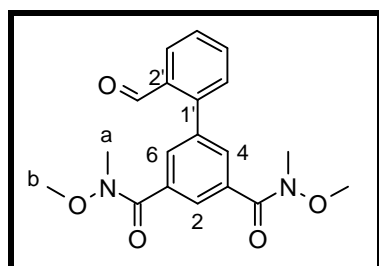
**TLC (PE/EtOAc, 5:5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.2

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.94 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 7.91 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 3.54 (s, 6H, H<sub>b</sub>); 3.35 (s, 6H, H<sub>a</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 167.4 (CO); 135.5 (C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>); 133.3 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 126.8 (C<sub>2</sub>); 121.7 (C<sub>5</sub>); 61.3 (C<sub>b</sub>); 33.5 (C<sub>a</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 331.0-333.0, Found: 331.0-333.0 [M+H]<sup>+</sup>.

\* **5-(2-Formylphenyl)-N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (90)**



C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  
Mw: 356.38 g/mol

Synthesized according to procedure E: 2-formylbenzeneboronic acid (151 mg, 1.01 mmol), 5-bromo-N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (**89**) (280 mg, 0.84 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (150 mg, 1.10 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (4 mg, 0.02 mmol), P(*o*-tol)<sub>3</sub> (52 mg, 0.17 mmol), toluene (19 mL) and EtOH (7 mL) were used. After 18 h of reaction, the residue was purified by flash chromatography (PE/EtOAc, 10:0 to 3.5:6.5 (v/v)).

The title compound (262 mg, 0.74 mmol, 87 %) was obtained as a red oil.

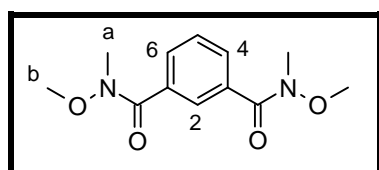
**TLC (PE/EtOAc, 3:7, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.2

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 10.00 (s, 1H, CHO), 8.11 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 8.06 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 7.83 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.68 (td, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7.56 (m, 1H, H<sub>4</sub>); 7.47 (dd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 3.61 (s, 6H, H<sub>b</sub>); 3.41 (s, 6H, H<sub>a</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 191.5 (CHO); 168.4 (CO); 144.0 (C<sub>aro</sub>); 137.7 (C<sub>aro</sub>); 134.2 (C<sub>aro</sub>); 133.8 (C<sub>aro</sub>); 133.7 (C<sub>5</sub>); 131.8 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 130.9 (C<sub>6</sub>); 128.5 (C<sub>4</sub>); 128.2 (C<sub>3</sub>); 127.9 (C<sub>2</sub>); 61.3 (C<sub>b</sub>); 33.5 (C<sub>a</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 357.2, Found: 357.1 [M+H]<sup>+</sup>.

\* **N1,N3-Dimethoxy-N1,N3-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (103)**



C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 252.27 g/mol

Synthesized according to procedure E: 2-formylbenzeneboronic acid (270 mg, 1.81 mmol), 5-bromo-N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (**89**) (500 mg, 1.51 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (270 mg, 1.96 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (7 mg, 0.03 mmol), P(*o*-tol)<sub>3</sub> (92 mg, 0.30 mmol), toluene (19 mL) and EtOH

(7 mL) were used. After 18 h of reaction, the residue was purified by flash chromatography (PE/EtOAc, 10:0 to 3.5:6.5 (v/v)).

The title compound (45 mg, 0.18 mmol, 10 %) was obtained as a purple oil.

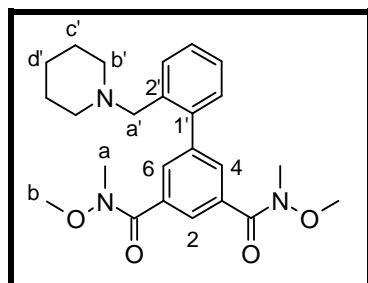
**TLC (PE/EtOAc, 5:5, v/v):** Rf = 0.7

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.01 (td, *J* = 1.6 Hz, *J* = 0.4 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 7.78 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.3 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.47 (td, *J* = 8.0 Hz, *J* = 0.5 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 3.55 (s, 6H, H<sub>b</sub>); 3.37 (s, 6H, H<sub>a</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 167.0 (CO); 133.8 (C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>); 130.4 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 128.0 (C<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>); 61.2 (C<sub>b</sub>); 33.7 (C<sub>a</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 253.1, Found: 253.1 [M+H]<sup>+</sup>.

\* ***N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethyl-5-[2-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl]benzene-1,3-dicarboxamide (91)***



C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 425.52 g/mol

Synthesized according to procedure C: 5-(2-formylphenyl)-*N1,N3*-dimethoxy-*N1,N3*-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (**90**) (300 mg, 0.84 mmol), piperidine (125 μL, 1.26 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (267 mg, 1.26 mmol), acetic acid (72 μL, 1.26 mmol), toluene (15 mL) and DCE (16 mL) were used. The iminium was formed for 1 h and reduced for 15 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>) 10:0 to 9.8:0.2 (v/v))

The title compound (220 mg, 0.52 mmol, 61 %) was obtained as a red oil.

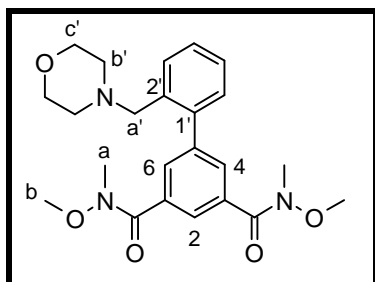
**TLC (PE/EtOAc, 5:5, v/v):** Rf = 0.1

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.96 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 7.89 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.51 (m, 1H, H<sub>aro</sub>); 7.38-7.25 (M, 3H, H<sub>aro</sub>); 3.60 (s, 6H, H<sub>b</sub>); 3.39 (s, 6H, H<sub>a</sub>); 3.34 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.28 (m, 4H, H<sub>b'</sub>); 1.50 (m, 4H, H<sub>c'</sub>); 1.38 (m, 2H, H<sub>d'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 169.2 (CO); 141.3 (C<sub>aro</sub>); 141.0 (C<sub>aro</sub>); 136.2 (C<sub>aro</sub>); 133.6 (C<sub>aro</sub>); 131.5 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 130.5 (CH<sub>aro</sub>); 130.1 (CH<sub>aro</sub>); 127.6 (CH<sub>aro</sub>); 126.9 (CH<sub>aro</sub>); 126.5 (C<sub>2</sub>); 61.2 (C<sub>b</sub>); 60.8 (C<sub>a'</sub>); 54.2 (C<sub>b'</sub>); 33.8 (C<sub>a</sub>); 26.0 (C<sub>c'</sub>); 24.4 (C<sub>d'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 426.2, Found: 426.2 [M+H]<sup>+</sup>.

\* ***N1,N3-Dimethoxy-N1,N3-dimethyl-5-[2-(morpholine-4-ylmethyl)phenyl]benzene-1,3-dicarboxamide (92)***



$C_{23}H_{29}N_3O_5$   
Mw: 427.49 g/mol

Synthesized according to procedure C: 5-(2-formylphenyl)-*N1,N3*-dimethoxy-*N1,N3*-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (**90**) (400 mg, 1.12 mmol), morpholine (148  $\mu$ L, 1.68 mmol),  $NaBH(OAc)_3$  (357 mg, 1.68 mmol), acetic acid (97  $\mu$ L, 1.68 mmol), toluene (15 mL) and DCE (16 mL) were used. The iminium was formed for 1 h and reduced for 15 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH( $NH_3$ ) 10:0 to 9.8:0.2 (v/v))

The title compound (320 mg, 0.74 mmol, 67 %) was obtained as a brown oil.

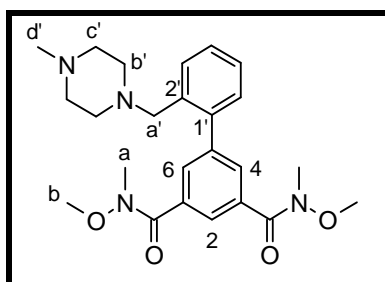
**TLC (PE/EtOAc, 5:5, v/v):**  $R_f$  = 0.1

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 7.98 (s, 1H,  $H_2$ ); 7.93 (s, 2H,  $H_4, H_6$ ); 7.47 (m, 1H,  $H_{aro}$ ); 7.37-7.33 (M, 3H,  $H_{aro}$ ); 3.65 (m, 4H,  $H_{c'}$ ); 3.60 (s, 6H,  $H_b$ ); 3.39 (s, 6H,  $H_a$ ); 3.38 (s, 2H,  $H_{a'}$ ); 2.38 (m, 4H,  $H_{b'}$ ).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 169.1 (CO); 141.2 ( $C_{aro}$ ); 135.2 ( $C_{aro}$ ); 133.7 ( $C_{aro}$ ); 131.5 ( $C_4, C_6$ ); 130.6 ( $CH_{aro}$ ); 130.3 ( $CH_{aro}$ ); 127.4 ( $CH_{aro}$ ); 126.5 ( $CH_{aro}$ ); 126.5 ( $C_2$ ); 67.0 ( $C_{c'}$ ); 61.2 ( $C_b$ ); 60.6 ( $C_{a'}$ ); 53.2 ( $C_{b'}$ ); 33.7 ( $C_a$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 428.2, Found: 428.2 [ $M+H$ ] $^+$ .

\* ***N1,N3-Dimethoxy-N1,N3-dimethyl-5-(2-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl)benzene-1,3-dicarboxamide (93)***



$C_{24}H_{32}N_4O_4$   
Mw: 440.54 g/mol

Synthesized according to procedure C: 5-(2-formylphenyl)-*N1,N3*-dimethoxy-*N1,N3*-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (**90**) (400 mg, 1.12 mmol), 1-methylpiperazine (187  $\mu$ L, 1.68 mmol),  $NaBH(OAc)_3$  (357 mg, 1.68 mmol), acetic acid (97  $\mu$ L, 1.68 mmol), toluene (15 mL) and DCE (16 mL) were used. The iminium was formed for 1 h reduced for 15 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH( $NH_3$ ) 10:0 to 9.6:0.4 (v/v))

The title compound (210 mg, 0.48 mmol, 42 %) was obtained as a brown oil.

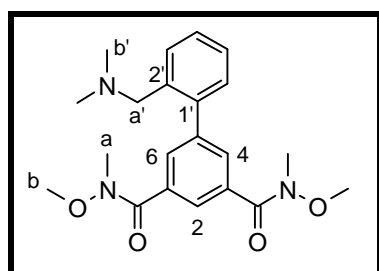
**TLC (PE/EtOAc, 5:5, v/v):** Rf = 0.1

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.94 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 7.88 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.47 (m, 1H, H<sub>aro</sub>); 7.36-7.25 (M, 3H, H<sub>aro</sub>); 3.57 (s, 6H, H<sub>b</sub>); 3.36 (s, 8H, H<sub>a</sub>, H<sub>a'</sub>); 2.40 (br s, 8H, H<sub>b</sub>, H<sub>c</sub>); 2.24 (s, 3H, H<sub>d</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 169.1 (CO); 141.2 (C<sub>aro</sub>); 141.1 (C<sub>aro</sub>); 135.7 (C<sub>aro</sub>); 133.6 (C<sub>aro</sub>); 131.5 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 130.5 (CH<sub>aro</sub>); 130.2 (CH<sub>aro</sub>); 127.6 (CH<sub>aro</sub>); 127.2 (CH<sub>aro</sub>); 126.4 (C<sub>2</sub>); 61.2 (C<sub>b</sub>); 60.0 (C<sub>a'</sub>); 55.1 (C<sub>b'</sub> or C<sub>c'</sub>); 52.6 (C<sub>b'</sub> or C<sub>c'</sub>); 46.0 (C<sub>c'</sub>); 33.7 (C<sub>a</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 441.3, Found: 441.2 [M+H]<sup>+</sup>.

\* **5-(2-[(Dimethylamino)methyl]phenyl)-N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (94)**



C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>  
Mw: 385.46 g/mol

Synthesized according to procedure B: 5-(2-formylphenyl)-N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (**90**) (440 mg, 1.24 mmol), dimethylamine in THF (2 M, 926 μL, 1.85 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (393 mg, 1.85 mmol), acetic acid (106 μL, 1.85 mmol) and DCE (18 mL) were used. The iminium was formed for 15 h and reduced for 5 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>) 10:0 to 9.8:0.2 (v/v)).

The title compound (265 mg, 0.69 mmol, 56 %) was obtained as a red oil.

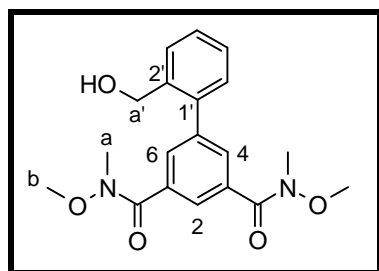
**TLC (PE/EtOAc, 5:5, v/v):** Rf = 0.1

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.99 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 7.82 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.56 (m, 1H, H<sub>aro</sub>); 7.42-7.26 (M, 3H, H<sub>aro</sub>); 3.60 (s, 6H, H<sub>b</sub>); 3.39 (s, 8H, H<sub>a</sub>, H<sub>a'</sub>); 2.16 (s, 6H, H<sub>b'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 169.0 (CO); 141.1 (C<sub>aro</sub>); 140.8 (C<sub>aro</sub>); 135.9 (C<sub>aro</sub>); 133.7 (C<sub>aro</sub>); 131.5 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 130.3 (CH<sub>aro</sub>); 130.0 (CH<sub>aro</sub>); 127.9 (CH<sub>aro</sub>); 127.1 (CH<sub>aro</sub>); 126.7 (C<sub>2</sub>); 61.2 (C<sub>b</sub>); 60.9 (C<sub>a'</sub>); 45.1 (C<sub>b'</sub>); 33.7 (C<sub>a</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 386.2, Found: 386.2 [M+H]<sup>+</sup>.

\* **5-[2-(Hydroxymethyl)phenyl]-N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (104)**



C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  
Mw: 358.39 g/mol

Synthesized according to procedure C: 5-(2-formylphenyl)-N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (**90**) (450 mg, 1.23 mmol), dimethylamine in THF (2 M, 947 μL, 1.89

mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (401 mg, 1.89 mmol), acetic acid (109 µL, 1.89 mmol), toluene (17 mL) and DCE (18 mL) were used. The iminium was formed for 1 h and reduced for 2 d. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>) 10:0 to 9.6:0.4 (v/v)).

The title compound (166 mg, 0.46 mmol, 37 %) was obtained as a red oil.

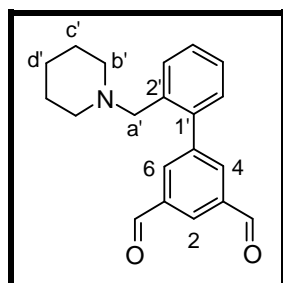
**TLC (DCM):** R<sub>f</sub> = 0.2

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.96 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 7.78 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.55 (dd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.7 Hz, 1H, H<sub>aro</sub>); 7.41-7.24 (M, 3H, H<sub>aro</sub>); 4.55 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.56 (s, 6H, H<sub>b</sub>); 3.35 (s, 6H, H<sub>a'</sub>); 2.71 (br s, 1H, OH).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 168.8 (CO); 140.5 (C<sub>aro</sub>); 139.5 (C<sub>aro</sub>); 138.2 (C<sub>aro</sub>); 133.8 (C<sub>aro</sub>); 131.0 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 129.9 (CH<sub>aro</sub>); 128.8 (CH<sub>aro</sub>); 128.3 (CH<sub>aro</sub>); 127.7 (CH<sub>aro</sub>); 126.8 (C<sub>2</sub>); 62.6 (C<sub>a'</sub>); 61.2 (C<sub>b</sub>); 33.7 (C<sub>a</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 359.2, Found: 359.1 [M+H]<sup>+</sup>, 341.1 [M-OH+H]<sup>+</sup>.

\* **5-[2-(Piperidin-1-ylmethyl)phenyl]benzene-1,3-dicarbaldehyde (95)**



C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>  
Mw: 307.39 g/mol

Synthesized according to procedure G: N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethyl-5-[2-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl]benzene-1,3-dicarboxamide (**91**) (200 mg, 0.47 mmol), LiAlH<sub>4</sub> in dry THF (1 M, 893 µL, 0.89 mmol), dry THF (4 mL) and KHSO<sub>4</sub> saturated solution (2 mL) were used. The residue was purified by flash chromatography (PE/EtOAc 10:0 to 6.5:3.5 (v/v)).

The title compound (72 mg, 0.23 mmol, 50 %) was obtained as a colourless oil.

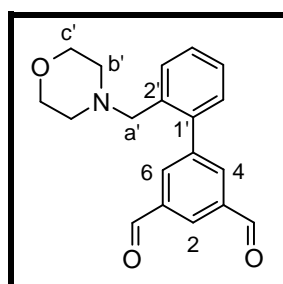
**TLC (PE/EtOAc, 5:5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 10.16 (s, 2H, CHO); 8.39-8.36 (M, 3H, H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.42-7.27 (M, 4H, H<sub>2'</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>); 3.26 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.29 (m, 4H, H<sub>b'</sub>); 1.50 (m, 4H, H<sub>c'</sub>); 1.41 (m, 2H, H<sub>d'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 191.3 (CHO); 143.8 (C<sub>aro</sub>); 140.2 (C<sub>aro</sub>); 136.6 (C<sub>aro</sub>); 136.2 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 131.3 (CH<sub>aro</sub>); 130.1 (CH<sub>aro</sub>); 129.1 (C<sub>2</sub>); 128.0 (CH<sub>aro</sub>); 127.5 (C<sub>aro</sub>); 61.3 (C<sub>a'</sub>); 54.0 (C<sub>b'</sub>); 26.0 (C<sub>c'</sub>); 24.4 (C<sub>d'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 308.2, Found: 308.1[M+H]<sup>+</sup>.

\* **5-[2-(Morpholine-4-ylmethyl)phenyl]benzene-1,3-dicarbaldehyde (96)**



C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>  
Mw: 309.36 g/mol



Synthesized according to procedure G: *N1,N3*-dimethoxy-*N1,N3*-dimethyl-5-[2-(morpholine-4-ylmethyl)phenyl]benzene-1,3-dicarboxamide (**92**) (300 mg, 0.70 mmol), LiAlH<sub>4</sub> in dry THF (1 M, 1.33 mL, 1.33 mmol), dry THF (6 mL) and KHSO<sub>4</sub> saturated solution (3 mL) were used. The residue was purified by flash chromatography (PE/EtOAc 10:0 to 6.5:3.5 (v/v)).

The title compound (108 mg, 0.35 mmol, 50 %) was obtained as a colourless oil.

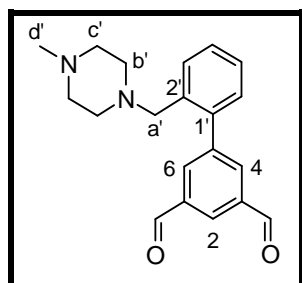
**TLC (PE/EtOAc, 5:5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.5

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 10.18 (s, 2H, CHO); 8.40-8.37 (M, 3H, H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.42-7.27 (M, 4H, H<sub>2'</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>); 3.65 (m, 4H, H<sub>c'</sub>); 3.32 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.37 (m, 4H, H<sub>b'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 191.1 (CHO); 143.6 (C<sub>aro</sub>); 140.3 (C<sub>aro</sub>); 136.7 (C<sub>aro</sub>); 135.0 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 131.3 (CH<sub>aro</sub>); 130.3 (CH<sub>aro</sub>); 129.7 (C<sub>2</sub>); 128.1 (CH<sub>aro</sub>); 127.8 (C<sub>aro</sub>); 67.0 (C<sub>c'</sub>); 61.0 (C<sub>a'</sub>); 53.1 (C<sub>b'</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 310.1, Found: 310.1[M+H]<sup>+</sup>.

\* **5-(2-[(4-Methylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl)benzene-1,3-dicarbaldehyde (97)**



C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 322.40 g/mol

Synthesized according to procedure G: *N1,N3*-dimethoxy-*N1,N3*-dimethyl-5-(2-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl)benzene-1,3-dicarboxamide (**93**) (110 mg, 0.25 mmol), LiAlH<sub>4</sub> in dry THF (1 M, 474 μL, 0.47 mmol), dry THF (2 mL) and KHSO<sub>4</sub> saturated solution (2 mL) were used. The residue was used without further purification in the next step (degradation).

The residue (80 mg) was obtained as a colourless oil.

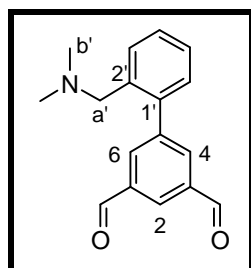
**TLC (PE/EtOAc, 5:5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 10.17 (s, 2H, CHO); 8.40-8.37 (M, 3H, H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.42-7.30 (M, 4H, H<sub>2'</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>); 3.32 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.46 (br s, 8H, H<sub>b'</sub>, H<sub>c'</sub>); 2.33 (s, 3H, H<sub>d'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 191.2 (CHO); 143.7 (C<sub>aro</sub>); 140.3 (C<sub>aro</sub>); 136.6 (C<sub>aro</sub>); 136.0 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 131.4 (CH<sub>aro</sub>); 130.2 (CH<sub>aro</sub>); 129.6 (C<sub>2</sub>); 128.1 (CH<sub>aro</sub>); 127.8 (C<sub>aro</sub>); 60.5 (C<sub>a'</sub>); 55.0 (C<sub>b'</sub> or C<sub>c'</sub>); 52.1 (C<sub>b'</sub> or C<sub>c'</sub>); 45.8 (C<sub>d'</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 323.2, Found: 323.1[M+H]<sup>+</sup>.

\* **5-(2-[(Dimethylamino)methyl]phenyl)benzene-1,3-dicarbaldehyde (98)**



C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>  
Mw: 267.32 g/mol

Synthesized according to procedure G: 5-(2-[(Dimethylamino)methyl]phenyl)-N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (**94**) (260 mg, 0.67 mmol), LiAlH<sub>4</sub> in dry THF (1 M, 1.28 mL, 1.28 mmol), dry THF (6 mL) and KHSO<sub>4</sub> saturated solution (6 mL) were used. The solvents were evaporated. The residue was suspended in DCM and filtrated on a celite pad.

The title compound (90 mg, 0.34 mmol, 50 %) was obtained as a colourless oil.

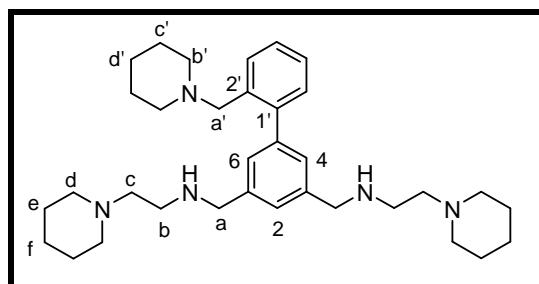
**TLC (PE/EtOAc, 5:5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.4

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 10.17 (s, 2H, CHO); 8.38 (m, 1H, H<sub>2</sub>); 8.30 (m, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.52 (m, 1H, H<sub>aro</sub>); 7.46-7.37 (M, 2H, H<sub>aro</sub>); 7.30 (m, 1H, H<sub>aro</sub>); 3.32 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.18 (s, 6H, H<sub>b'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 191.2 (CHO); 143.6 (C<sub>aro</sub>); 139.6 (C<sub>aro</sub>); 136.8 (C<sub>aro</sub>); 135.9 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 131.0 (CH<sub>aro</sub>); 130.1 (CH<sub>aro</sub>); 129.2 (C<sub>2</sub>); 128.4 (CH<sub>aro</sub>); 127.7 (C<sub>aro</sub>); 61.2 (C<sub>a</sub>); 44.8 (C<sub>b</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 268.13, Found: 268.1[M+H]<sup>+</sup>.

\* **[2-(piperidin-1-yl)ethyl]([3-([2-(piperidin-1-yl)ethyl]amino)methyl)-5-[2-(piperidin-1-yl)methyl]phenyl]phenyl)methyl)amine (**99**)**



C<sub>34</sub>H<sub>53</sub>N<sub>5</sub>

Mw: 531.82 g/mol

Synthesized according to procedure C: 5-[2-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl]benzene-1,3-dicarbaldehyde (**95**) (70 mg, 0.23 mmol), 1-piperidineethanamine (98 μL, 0.68 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (145 mg, 0.68 mmol), acetic acid (40 μL, 0.68 mmol), toluene (5 mL) and DCE (3.5 mL) were used. The imine was formed for 1 h and reduced for 15 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>) 10:0 to 9:1 (v/v)).

The title compound (65 mg, 0.12 mmol, 54 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, MeOD):** 7.54 (dd, J = 6.9 Hz, J = 2.0 Hz, 1H, H<sub>aro</sub>); 7.37-7.21 (M, 6H, H<sub>aro</sub>); 3.83 (s, 4H, H<sub>a</sub>); 3.43 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.74 (t, J = 6.6 Hz, 4H, H<sub>b</sub>); 2.49 (t, J = 7.0 Hz, 4H, H<sub>c</sub>); 2.40 (m, 8H, H<sub>d</sub>); 2.26 (m, 4H, H<sub>b'</sub>); 1.61-1.39 (M, 18H, H<sub>c'</sub>, H<sub>d'</sub>, H<sub>e</sub>, H<sub>f</sub>).

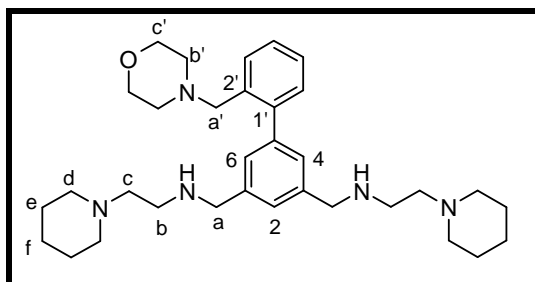
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, MeOD):** 142.6 (C<sub>aro</sub>); 142.0 (C<sub>aro</sub>); 139.3 (C<sub>aro</sub>); 135.1 (C<sub>aro</sub>); 129.9 (CH<sub>aro</sub>); 129.6 (CH<sub>aro</sub>); 128.3 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 126.9 (CH<sub>aro</sub>); 126.8 (CH<sub>aro</sub>); 126.6 (CH<sub>aro</sub>); 60.1 (C<sub>a'</sub>); 57.7 (C<sub>c</sub>); 54.4 (C<sub>d</sub>); 54.0 (C<sub>b'</sub>); 52.9 (C<sub>a</sub>); 44.7 (C<sub>b</sub>); 25.4 (C<sub>c'</sub>); 25.3 (C<sub>e</sub>); 23.8 (C<sub>d'</sub>, C<sub>f</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 532.4, Found: 532.4 [M+H]<sup>+</sup>, 266.8 [(M+2H)/2]<sup>+</sup>.

**HR-MS:** m/z Calculated: 532.43737, Found: 532.43743 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>34</sub>H<sub>54</sub>N<sub>5</sub>.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 15.0 min, purity = 95 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 17.9 min, purity = 95 %.

\* ***[(3-[2-(Morpholine-4-ylmethyl)phenyl]-5-([2-(piperidin-1-yl)ethyl]amino)methyl)phenyl)methyl][2-(piperidin-1-yl)ethyl]amine (100)***



$C_{33}H_{51}N_5O$   
Mw: 533.79 g/mol

Synthesized according to procedure C: 5-[2-(morpholine-4-ylmethyl)phenyl]benzene-1,3-dicarbaldehyde (**96**) (100 mg, 0.32 mmol), 1-piperidineethanamine (140  $\mu$ L, 0.97 mmol),  $NaBH(OAc)_3$  (206 mg, 0.97 mmol), acetic acid (56  $\mu$ L, 0.97 mmol), toluene (10 mL) and DCE (5 mL) were used. The imine was formed for 1 h and reduced for 15 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH( $NH_3$ ) 10:0 to 9:1 (v/v)).

The title compound (40 mg, 0.07 mmol, 23 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 9:1, v/v):**  $R_f$  = 0.3

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, MeOD):** 7.55 (m, 1H,  $H_{aro}$ ); 7.37-7.25 (M, 6H,  $H_{aro}$ ); 3.85 (s, 4H,  $H_a$ ); 3.64 (t,  $J$  = 4.6 Hz, 4H,  $H_{c'}$ ); 3.46 (s, 2H,  $H_{a'}$ ); 2.76 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 4H,  $H_b$ ); 2.52 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 4H,  $H_c$ ); 2.43 (m, 8H,  $H_d$ ); 2.34 (m, 4H,  $H_{b'}$ ); 1.59 (m, 8H,  $H_e$ ); 1.48 (m, 4H,  $H_f$ ).

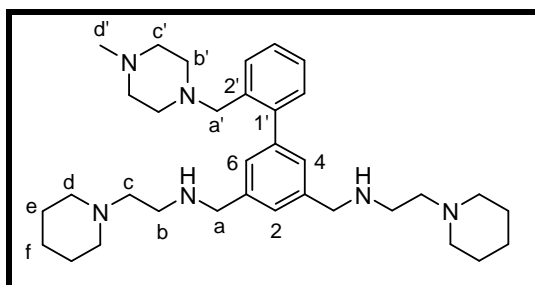
**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, MeOD):** 142.7 ( $C_{aro}$ ); 141.9 ( $C_{aro}$ ); 139.3 ( $C_{aro}$ ); 134.7 ( $C_{aro}$ ); 129.9 ( $CH_{aro}$ ); 129.7 ( $CH_{aro}$ ); 128.2 ( $C_4, C_6$ ); 126.9 ( $CH_{aro}$ ); 126.7 ( $CH_{aro}$ ); 66.6 ( $C_c$ ); 59.9 ( $C_{a'}$ ); 57.7 ( $C_c$ ); 54.4 ( $C_d$ ); 53.2 ( $C_{b'}$ ); 52.9 ( $C_a$ ); 44.8 ( $C_b$ ); 25.3 ( $C_e$ ); 23.8 ( $C_f$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$**  Calculated: 534.4, Found: 534.4 [ $M+H$ ] $^+$ , 267.8 [ $(M+2H)/2$ ] $^+$ .

**HR-MS:**  $m/z$  Calculated: 534.41664, Found: 534.41658 [ $M+H$ ] $^+$  =  $C_{33}H_{52}N_5O$ .

**Purity:**  $C_4$  column:  $t_r$  = 14.7 min, purity = 98 %;  $C_{18}$  column:  $t_r$  = 17.4 min, purity = 98 %.

\* ***[(3-[2-[(4-Methylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl]-5-([2-(piperidin-1-yl)ethyl]amino)methyl)phenyl)methyl][2-(piperidin-1-yl)ethyl]amine (101)***



$C_{34}H_{54}N_6$   
Mw: 546.85 g/mol

Synthesized according to procedure C: 5-(2-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl)benzene-1,3-dicarbaldehyde (**97**) (80 mg, 0.25 mmol), 1-piperidineethanamine (107  $\mu$ L, 0.74 mmol),  $NaBH(OAc)_3$  (156 mg, 0.74 mmol), acetic acid (43  $\mu$ L, 0.74 mmol), toluene (5 mL) and DCE (3.5 mL) were used. The imine was formed for 1 h and reduced for 15 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH( $NH_3$ ) 10:0 to 9.5:0.5 (v/v)).

The title compound (5 mg, 0.01 mmol, 4 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

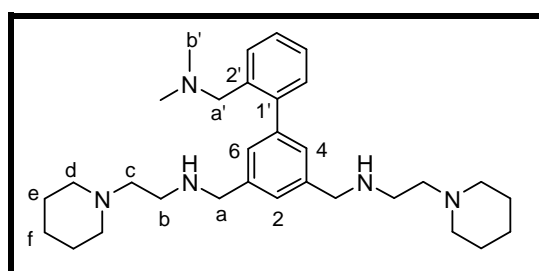
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, MeOD):** 7.50 (m, 1H, H<sub>aro</sub>); 7.39-7.25 (M, 6H, H<sub>aro</sub>); 3.85 (s, 4H, H<sub>a</sub>); 3.46 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.77 (t, *J* = 6.6 Hz, 4H, H<sub>b</sub>); 2.53 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H, H<sub>c</sub>); 2.36 (m, 16H, H<sub>d</sub>, H<sub>b'</sub>, H<sub>c'</sub>); 2.26 (s, 3H, H<sub>d'</sub>); 1.60 (m, 8H, H<sub>e</sub>); 1.47 (m, 4H, H<sub>f</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, MeOD):** 142.6 (C<sub>aro</sub>); 141.9 (C<sub>aro</sub>); 139.2 (C<sub>aro</sub>); 134.9 (C<sub>aro</sub>); 129.9 (CH<sub>aro</sub>); 129.8 (CH<sub>aro</sub>); 128.2 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 126.9 (CH<sub>aro</sub>); 126.8 (CH<sub>aro</sub>); 59.4 (C<sub>a'</sub>); 57.7 (C<sub>c</sub>); 54.6 (C<sub>d</sub>); 54.3 (C<sub>b'</sub> or C<sub>c'</sub>); 52.9 (C<sub>a</sub>); 51.9 (C<sub>b'</sub> or C<sub>c'</sub>); 44.8 (C<sub>b</sub>, C<sub>d'</sub>); 25.3 (C<sub>e</sub>); 23.8 (C<sub>f</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 547.5, Found: 547.4 [M+H]<sup>+</sup>, 274.2 [(M+2H)/2]<sup>+</sup>.

**HR-MS:** *m/z* Calculated: 547.44827, Found: 547.44699 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>34</sub>H<sub>55</sub>N<sub>6</sub>.

\* **[(3-(2-[(Dimethylamino)methyl]phenyl)-5-([(2-(piperidin-1-yl)ethyl)amino)methyl]phenyl)methyl][2-(piperidin-1-yl)ethyl]amine (102)**



C<sub>31</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>

Mw: 491.77 g/mol

Synthesized according to procedure C: 5-(2-[(dimethylamino)methyl]phenyl)benzene-1,3-dicarbaldehyde (**98**) (85 mg, 0.32 mmol), 1-piperidineethanamine (138 μL, 0.95 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (202 mg, 0.95 mmol), acetic acid (55 μL, 0.95 mmol), toluene (15 mL) and DCE (5 mL) were used. The imine was formed for 1 h and reduced for 15 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>) 10:0 to 9.6:0.4 (v/v)).

The title compound (14 mg, 0.03 mmol, 9 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.2

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, MeOD):** 7.55 (m, 1H, H<sub>aro</sub>); 7.42-7.24 (M, 6H, H<sub>aro</sub>); 3.85 (s, 4H, H<sub>a</sub>); 3.48 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.76 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H, H<sub>b</sub>); 2.52 (t, *J* = 7.0 Hz, 4H, H<sub>c</sub>); 2.12 (s, 6H, H<sub>b'</sub>); 1.59 (m, 8H, H<sub>e</sub>); 1.46 (m, 4H, H<sub>f</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, MeOD):** 142.5 (C<sub>aro</sub>); 141.8 (C<sub>aro</sub>); 139.4 (C<sub>aro</sub>); 135.1 (C<sub>aro</sub>); 129.7 (CH<sub>aro</sub>); 128.8 (CH<sub>aro</sub>); 128.2 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 127.1 (CH<sub>aro</sub>); 126.9 (CH<sub>aro</sub>); 126.7 (CH<sub>aro</sub>); 60.1 (C<sub>a'</sub>); 57.7 (C<sub>c</sub>); 54.4 (C<sub>d</sub>); 52.8 (C<sub>a</sub>); 44.8 (C<sub>b</sub>); 44.1 (C<sub>b'</sub>); 25.2 (C<sub>e</sub>); 23.8 (C<sub>f</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 492.4, Found: 492.4 [M+H]<sup>+</sup>, 246.7 [(M+2H)/2]<sup>+</sup>.

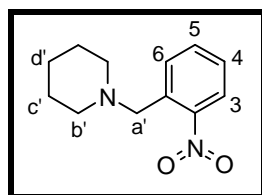
**HR-MS:** *m/z* Calculated: 492.40607, Found: 492.40654 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>N<sub>5</sub>.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 14.7 min, purity = 95 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 17.4 min, purity = 90 %.

## 7. Synthesis of E<sub>2</sub> family

- First synthetic route

\* **1-[(2-Nitrophenyl)methyl]piperidine (106)**



$C_{12}H_{16}N_2O_2$   
Mw: 220.27 g/mol

Synthesized according to procedure D: 2-nitrobenzaldehyde (**105**) (200 mg, 1.32 mmol), piperidine (196  $\mu$ L, 1.99 mmol),  $ZnCl_2$  (181 mg, 1.32 mmol),  $NaBH_3CN$  (125 mg, 1.99 mmol) and DCE (18 mL) were used. The iminium was formed for 3 h and reduced for 16 h. The residue was purified by flash chromatography (PE/EtOAc, 10:0 to 7:3 (v/v)).

The title compound (245 mg, 1.11 mmol, 84 %) was obtained as a yellow oil.

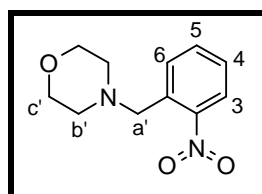
**TLC (PE/EtOAc, 7:3, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.2

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 7.77 (dd,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 1.2$  Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 7.62 (dd,  $J = 7.7$  Hz,  $J = 0.4$  Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 7.50 (td,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7.34 (ddd,  $J = 7.9$  Hz,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, 1H, H<sub>4</sub>); 3.71 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.34 (m, 4H, H<sub>b'</sub>); 1.52 (m, 4H, H<sub>c'</sub>); 1.40 (m, 2H, H<sub>d'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 149.8 (C<sub>2</sub>); 134.6 (C<sub>1</sub>); 132.3 (C<sub>5</sub>); 130.8 (C<sub>6</sub>); 127.6 (C<sub>4</sub>); 124.2 (C<sub>3</sub>); 59.7 (C<sub>a</sub>); 54.6 (C<sub>b</sub>); 26.0 (C<sub>c</sub>); 24.2 (C<sub>d</sub>).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 221.1, Found: 221.0 [M+H]<sup>+</sup>.

\* **4-[(2-Nitrophenyl)methyl]morpholine (108)**



$C_{11}H_{14}N_2O_3$   
Mw: 222.24 g/mol

Synthesized according to procedure D: 2-nitrobenzaldehyde (**105**) (1.00 g, 6.62 mmol), morpholine (874  $\mu$ L, 9.93 mmol),  $ZnCl_2$  (0.90 g, 6.62 mmol),  $NaBH_3CN$  (624 mg, 9.93 mmol) and DCE (95 mL) were used. The iminium was formed for 3 h and reduced for 16 h. The residue was purified by flash chromatography (PE/EtOAc, 10:0 to 7:3 (v/v)).

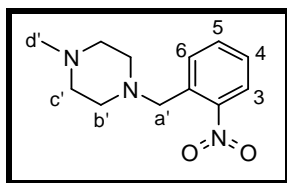
The title compound (1.22 g, 5.47 mmol, 83 %) was obtained as an orange oil.

**TLC (PE/EtOAc, 8:2, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.2

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 7.81 (dd,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 1.2$  Hz, 1H, H<sub>3</sub>); 7.59 (dd,  $J = 5.9$  Hz,  $J = 1.7$  Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 7.54 (ddd,  $J = 7.7$  Hz,  $J = 7.2$  Hz,  $J = 1.3$  Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7.40 (td,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 1.8$  Hz, 1H, H<sub>4</sub>); 3.79 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.66 (m, 4H, H<sub>c'</sub>); 2.44 (m, 4H, H<sub>b'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 149.9 (C<sub>2</sub>); 133.4 (C<sub>1</sub>); 132.3 (C<sub>6</sub>); 131.0 (C<sub>5</sub>); 128.1 (C<sub>4</sub>); 124.4 (C<sub>3</sub>); 67.0 (C<sub>c'</sub>); 59.5 (C<sub>a'</sub>); 53.6 (C<sub>b'</sub>).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 223.1, Found: 223.0 [M+H]<sup>+</sup>.

\* **1-Methyl-4-[(2-nitrophenyl)methyl]piperazine (109)**

$C_{12}H_{17}N_3O_2$   
Mw: 235.28 g/mol

Synthesized according to procedure D: 2-nitrobenzaldehyde (**105**) (500 mg, 3.31 mmol), 1-methylpiperazine (551  $\mu$ L, 4.96 mmol),  $ZnCl_2$  (451 mg, 3.31 mmol),  $NaBH_3CN$  (312 mg, 4.96 mmol) and DCE (47 mL) were used. The iminium was formed for 3 h and reduced for 16 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 10:0 to 9.8:0.2 (v/v)).

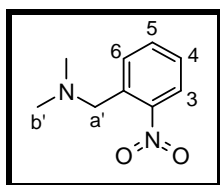
The title compound (600 mg, 2.55 mmol, 77 %) was obtained as a yellow oil.

**TLC (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 9.8:0.2, v/v):**  $R_f$  = 0.2

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 7.81 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H,  $H_3$ ); 7.56-7.41 (M, 3H,  $H_4$ ,  $H_5$ ,  $H_6$ ); 3.89 (s, 2H,  $H_{a'}$ ); 3.14 (m, 2H,  $H_{b'}$ ); 2.80 (m, 4H,  $H_{b'}$ ,  $H_{c'}$ ); 2.72 (s, 3H,  $H_{d'}$ ); 2.56 (m, 2H,  $H_{c'}$ ).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 149.7 ( $C_2$ ); 132.6 ( $C_6$ ); 132.3 ( $C_1$ ); 131.0 ( $C_5$ ); 128.7 ( $C_4$ ); 124.6 ( $C_3$ ); 58.4 ( $C_{a'}$ ); 58.2 ( $C_{b'}$ ); 48.8 ( $C_{d'}$ ); 47.0 ( $C_{c'}$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$**  Calculated: 236.1, Found: 236.0  $[M+H]^+$ .

\* **Dimethyl[(2-nitrophenyl)methyl]amine (110)**

$C_9H_{12}N_2O_2$   
Mw: 180.20 g/mol

Synthesized according to procedure D: 2-nitrobenzaldehyde (**105**) (500 mg, 3.31 mmol), dimethylamine in THF (2 M, 2.48 mL, 4.96 mmol),  $ZnCl_2$  (450 mg, 3.31 mmol),  $NaBH_3CN$  (312 mg, 4.96 mmol) and DCE (47 mL) were used. The iminium was formed for 3 h and reduced for 16 h. The residue was purified by flash chromatography (PE/EtOAc, 10:0 to 7:3 (v/v)).

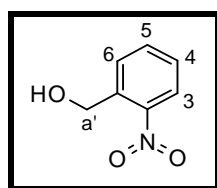
The title compound (470 mg, 2.61 mmol, 79 %) was obtained as a yellow oil.

**TLC (PE/EtOAc, 8:2, v/v):**  $R_f$  = 0.2

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 7.82 (dd,  $J$  = 8.1 Hz,  $J$  = 1.3 Hz, 1H,  $H_3$ ); 7.63 (dd,  $J$  = 7.6 Hz,  $J$  = 1.0 Hz, 1H,  $H_6$ ); 7.55 (ddd,  $J$  = 7.7 Hz,  $J$  = 7.4 Hz,  $J$  = 1.3 Hz, 1H,  $H_5$ ); 7.40 (td,  $J$  = 8.0 Hz,  $J$  = 1.6 Hz, 1H,  $H_4$ ); 3.72 (s, 2H,  $H_{a'}$ ); 2.24 (s, 6H,  $H_{b'}$ ).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 149.7 ( $C_2$ ); 134.4 ( $C_1$ ); 132.5 ( $C_5$ ); 131.0 ( $C_6$ ); 127.8 ( $C_4$ ); 124.3 ( $C_3$ ); 60.3 ( $C_{a'}$ ); 45.6 ( $C_{b'}$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$**  Calculated: 181.1, Found: 181.0  $[M+H]^+$ , 135.8  $[M-N(CH_3)_2+H]^+$ .

\* **(2-Nitrophenyl)methanol (107)**

$C_7H_7NO_3$   
Mw: 153.14 g/mol

Synthesized according to procedure B: 2-nitrobenzaldehyde (**105**) (500 mg, 3.31 mmol), piperidine (490  $\mu$ L, 4.96 mmol),  $NaBH(OAc)_3$  (1.05 g, 4.96 mmol), acetic acid (284  $\mu$ L, 4.96 mmol) and DCE (47 mL) were used. The iminium was formed for 15 h and reduced for 16 h. The residue was purified by flash chromatography (PE/EtOAc, 10:0 to 8:2 (v/v)).

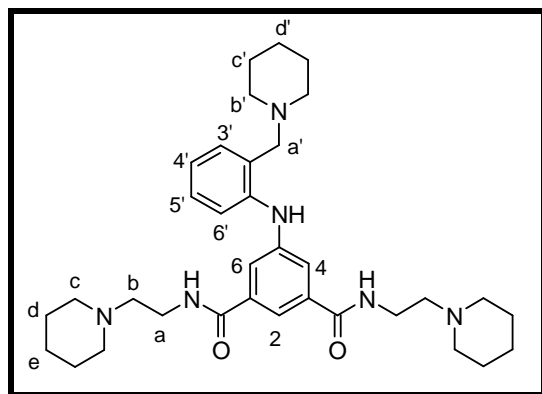
The title compound (350 mg, 2.29 mmol, 69 % yield) was obtained as a brown powder.

**TLC (PE/EtOAc, 8:2, v/v):**  $R_f = 0.3$

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 8.08 (dd,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 1.2$  Hz, 1H,  $H_3$ ); 7.73 (m, 1H,  $H_6$ ); 7.66 (td,  $J = 7.6$  Hz,  $J = 1.3$  Hz, 1H,  $H_5$ ); 7.40 (m, 1H,  $H_4$ ); 4.95 (s, 2H,  $H_{a'}$ ); 2.86 (br s, 1H, OH).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 147.5 ( $C_2$ ); 136.9 ( $C_1$ ); 134.1 ( $C_5$ ); 129.8 ( $C_6$ ); 128.4 ( $C_4$ ); 125.0 ( $C_3$ ); 62.4 ( $C_{a'}$ ).

**Melting Point:** 70.7°C (Lit.: 70-72°C)<sup>300</sup>

\* ***N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]-5-([2-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl]amino)benzene-1,3-dicarboxamide (116)***

$C_{34}H_{50}N_6O_2$   
Mw: 574.80 g/mol

To a solution of 1-[(2-nitrophenyl)methyl]piperidine (**106**) (220 mg, 1.00 mmol) in EtOH (28 mL) was added ammonium formate (441 mg, 6.99 mmol) and Pd/C 10 % (78 mg, 0.07 mmol). The mixture was stirred for 1 h at 20°C. The reaction mixture was filtered through a celite pad and the filtrate was evaporated. The residue was dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated. Because of the high instability of the compound, the residue was used directly without further purification in the next step.

Synthesized according to procedure F: the residue of 2-(piperidin-1-ylmethyl)aniline previously formed (**111**) (60 mg, 0.25 mmol) dissolved in dioxane (1 mL), 5-bromo-*N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide* (**83**) (98 mg, 0.21 mmol) in dioxane (1 mL),  $Cs_2CO_3$  (96 mg, 0.29 mmol),

<sup>300</sup> M. R. Naimi-Jamal *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 2009, 3567-3572

Xantphos (18 mg, 0.03 mmol), and Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (10 mg, 0.01 mmol) were used. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 10:0 to 9.5:0.5 (v/v)).

The title compound (1.05 g, 5.83 mmol, 88 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.6:0.4, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.2

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 9.25 (s, 1H, NH); 7.68 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 7.62 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.40 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, H<sub>6'</sub>); 7.20 (ddd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 7.11 (dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H, H<sub>3'</sub>); 7.05 (br t, *J* = 5.0 Hz, 2H, NH); 6.84 (td, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H, H<sub>5'</sub>); 3.57-3.51 (M, 6H, H<sub>a</sub>, H<sub>a'</sub>); 2.56 (t, *J* = 6.2 Hz, 4H, H<sub>b</sub>); 2.46-2.37 (M, 12H, H<sub>c</sub>, H<sub>b'</sub>); 1.67-1.55 (M, 12H, H<sub>d</sub>, H<sub>c'</sub>); 1.49-1.41 (M, 6H, H<sub>e</sub>, H<sub>d'</sub>).

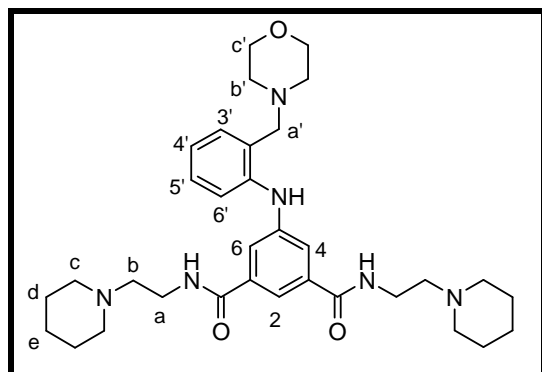
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 166.9 (CO); 144.3 (C<sub>aro</sub>); 142.6 (C<sub>aro</sub>); 136.2 (C<sub>aro</sub>); 130.8 (C<sub>3'</sub>); 128.1 (C<sub>5'</sub>); 126.0 (C<sub>aro</sub>); 120.3 (C<sub>4'</sub>); 118.0 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 116.1 (C<sub>2</sub>); 115.5 (C<sub>6'</sub>); 62.9 (C<sub>a'</sub>); 57.1 (C<sub>b</sub>); 54.3 (C<sub>c</sub>); 54.0 (C<sub>b'</sub>); 36.5 (C<sub>a</sub>); 26.3 (C<sub>c'</sub>); 25.9 (C<sub>d</sub>); 24.4 (C<sub>d'</sub>); 24.3 (C<sub>e</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 575.4, Found: 575.4 [M+H]<sup>+</sup>, 288.2 [(M+2H)/2]<sup>+</sup>.

**HR-MS:** *m/z* Calculated: 575.40680, Found: 575.40367 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>33</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 17.5 min, purity = 94 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 19.4 min, purity = 95 %.

\* **5-([2-(Morpholin-4-ylmethyl)phenyl]amino)-N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (117)**



C<sub>33</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>  
Mw: 576.77 g/mol

To a solution of 4-[(2-nitrophenyl)methyl]morpholine (**108**) (500 mg, 2.25 mmol) in EtOH (44 mL) was added ammonium formate (0.99 g, 15.75 mmol) and Pd/C 10 % (177 mg, 0.17 mmol). The mixture was stirred for 1 h at 20°C. The reaction mixture was filtered through a celite pad and the filtrate was evaporated. The residue was dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated. Because of the high instability of the compound, the residue was used directly without further purification in the next step.

Synthesized according to procedure F: the residue of 2-(morpholin-4-ylmethyl)aniline previously formed (**112**) (173 mg, 0.78 mmol) dissolved in dioxane (2.1 mL), 5-bromo-N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (**83**) (303 mg, 0.65 mmol) in dioxane (2.1 mL), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (297 mg, 0.91 mmol), Xantphos (57 mg, 0.10 mmol), and Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (30 mg, 0.03 mmol) were used. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 10:0 to 9.5:0.5 (v/v)).

The title compound (180 mg, 0.31 mmol, 48 %) was obtained as a colourless oil.



**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.6:0.4, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.2

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.69 (s, 1H, NH); 7.77 (s, 1H, H<sub>2</sub>); 7.67 (s, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.40 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H<sub>6'</sub>); 7.25-7.13 (M, 4H, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, 2NH); 6.88 (td, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, H<sub>5'</sub>); 3.77 (t, *J* = 4.3 Hz, 4H, H<sub>c'</sub>); 3.61-3.57 (M, 6H, H<sub>a</sub>, H<sub>a'</sub>); 2.63 (t, *J* = 5.7 Hz, 4H, H<sub>b</sub>), 2.51-2.45 (M, 12H, H<sub>c</sub>, H<sub>b'</sub>); 1.64 (m, 8H, H<sub>d</sub>); 1.50 (m, 4H, H<sub>e</sub>).

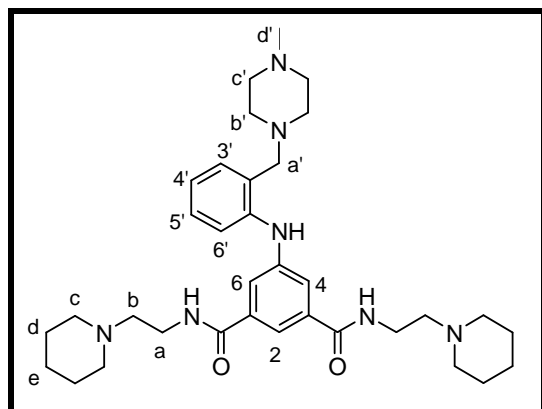
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 166.9 (CO); 144.1 (C<sub>aro</sub>); 142.4 (C<sub>aro</sub>); 136.0 (C<sub>aro</sub>); 131.1 (C<sub>3'</sub>); 128.6 (C<sub>5'</sub>); 125.1 (C<sub>aro</sub>); 120.7 (C<sub>4'</sub>); 118.3 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 116.3 (C<sub>2</sub>); 116.1 (C<sub>6'</sub>); 67.2 (C<sub>c'</sub>); 62.4 (C<sub>a'</sub>); 57.2 (C<sub>b</sub>); 54.3 (C<sub>c</sub>); 53.1 (C<sub>b'</sub>); 36.4 (C<sub>a</sub>); 25.7 (C<sub>d</sub>); 24.2 (C<sub>e</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 577.4, Found: 577.3 [M+H]<sup>+</sup>, 289.2 [(M+2H)/2]<sup>+</sup>.

**HR-MS:** *m/z* Calculated: 577.38607, Found: 577.38232 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>33</sub>H<sub>49</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 16.7 min, purity = 90 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 18.7 min, purity = 92 %.

\* **5-((2-[(4-Methylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl)amino)-N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (118)**



C<sub>34</sub>H<sub>51</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub>  
Mw: 589.83 g/mol

To a solution of 1-methyl-4-[(2-nitrophenyl)methyl]piperazine (**109**) (200 mg, 0.85 mmol) in EtOH (15 mL) was added ammonium formate (375 mg, 5.95 mmol) and Pd/C 10 % (67 mg, 0.06 mmol). The mixture was stirred for 1 h at 20°C. The reaction mixture was filtered through a celite pad and the filtrate was evaporated. The residue was dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated. Because of the high instability of the compound, the residue was used directly without further purification in the next step.

Synthesized according to procedure F: the residue of 2-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]aniline (**113**) previously formed (130 mg, 0.63 mmol) dissolved in dioxane (1.7 mL), 5-bromo-N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (**83**) (246 mg, 0.53 mmol) in dioxane (1.7 mL), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (241 mg, 0.74 mmol), Xantphos (46 mg, 0.08 mmol), and Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (24 mg, 0.03 mmol) were used. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 10:0 to 9.5:0.5 (v/v)).

The title compound (110 mg, 0.19 mmol, 35 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.4:0.6, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.1

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.83 (s, 1H, NH); 7.74 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 7.67 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.40 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 0.8 Hz, 1H, H<sub>6'</sub>); 7.23 (td, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 7.16 (dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H, H<sub>3'</sub>); 7.10 (br t, *J* = 5.1 Hz, 2H, NH); 6.89 (td, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H, H<sub>5'</sub>); 3.60-3.54 (M, 6H, H<sub>a</sub>, H<sub>a'</sub>); 2.61-2.43 (M, 20H, H<sub>b</sub>, H<sub>c</sub>, H<sub>b'</sub>, H<sub>c'</sub>); 2.34 (s, 3H, H<sub>d'</sub>); 1.62 (m, 8H, H<sub>d</sub>); 1.49 (m, 4H, H<sub>e</sub>).

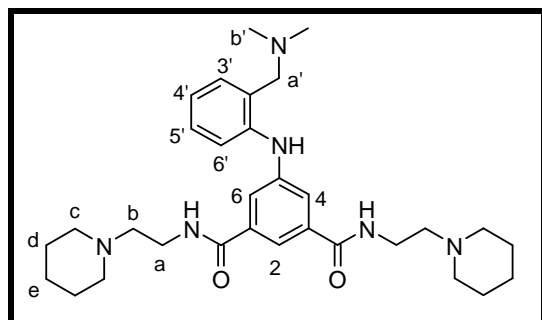
**$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 166.9 (CO); 144.3 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 142.4 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 136.1 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 131.0 ( $\text{C}_{3'}$ ); 128.4 ( $\text{C}_{5'}$ ); 125.8 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 120.6 ( $\text{C}_{4'}$ ); 118.0 ( $\text{C}_4, \text{C}_6$ ); 116.1 ( $\text{C}_2$ ); 116.1 ( $\text{C}_{6'}$ ); 62.0 ( $\text{C}_{a'}$ ); 57.1 ( $\text{C}_b$ ); 55.4 ( $\text{C}_{b'}$ ); 54.3 ( $\text{C}_c$ ); 52.7 ( $\text{C}_c$ ); 46.0 ( $\text{C}_{d'}$ ); 36.5 ( $\text{C}_a$ ); 25.9 ( $\text{C}_d$ ); 24.3 ( $\text{C}_e$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 590.4, Found: 590.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 295.7  $[(\text{M}+2\text{H})/2]^+$ .

**HR-MS:**  $m/z$  Calculated: 590.41770, Found: 590.41328  $[\text{M}+\text{H}]^+ = \text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{N}_7\text{O}_2$ .

**Purity:**  $\text{C}_4$  column:  $t_r = 16.1$  min, purity = 95 %;  $\text{C}_{18}$  column:  $t_r = 18.7$  min, purity = 97 %.

\* **5-((2-[(Dimethylamino)methyl]phenyl)amino)-N1,N3-bis[2-(piperidin-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (119)**



$\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_2$   
Mw: 534.75 g/mol

To a solution of dimethyl[(2-nitrophenyl)methyl]amine (**110**) (400 mg, 2.22 mmol) in EtOH (40 mL) was added ammonium formate (980 mg, 15.54 mmol) and Pd/C 10 % (175 mg, 0.07 mmol). The mixture was stirred for 30 minutes at 20°C. The reaction mixture was filtered through a celite pad and the filtrate was evaporated. The residue was dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated. Because of the high instability of the compound, the residue was used directly without further purification in the next step.

Synthesized according to procedure F: the residue of 2-[(dimethylamino)methyl]aniline previously formed (**114**) (96 mg, 0.64 mmol) dissolved in dioxane (1.7 mL), 5-bromo-N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (**83**) (248 mg, 0.53 mmol) in dioxane (1.7 mL),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (243 mg, 0.75 mmol), Xantphos (46 mg, 0.08 mmol), and  $\text{Pd}_2\text{dba}_3$  (24 mg, 0.03 mmol) were used. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH( $\text{NH}_3$ ), 10:0 to 9.5:0.5 (v/v)).

The title compound (130 mg, 0.19 mmol, 30 %) was obtained as a red oil.

**TLC (DCM/MeOH( $\text{NH}_3$ ), 9.4:0.6, v/v):**  $R_f = 0.2$

**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 8.92 (s, 1H, NH); 7.69 (t,  $J = 1.4$  Hz, 1H,  $\text{H}_2$ ); 7.65 (d,  $J = 1.4$  Hz, 2H,  $\text{H}_4, \text{H}_6$ ); 7.39 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H,  $\text{H}_{6'}$ ); 7.20 (td,  $J = 8.1$  Hz,  $J = 1.4$  Hz, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ); 7.11 (dd,  $J = 7.7$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, 1H,  $\text{H}_{3'}$ ); 7.06 (br t,  $J = 4.2$  Hz, 2H, NH); 6.85 (td,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 0.9$  Hz, 1H,  $\text{H}_{5'}$ ); 3.54 (q,  $J = 5.5$  Hz, 4H,  $\text{H}_a$ ); 3.46 (s, 2H,  $\text{H}_{a'}$ ); 2.55 (t,  $J = 6.0$  Hz, 4H,  $\text{H}_b$ ); 2.43 (br s, 8H,  $\text{H}_c$ ); 2.24 (s, 6H,  $\text{H}_{b'}$ ); 1.59 (m, 8H,  $\text{H}_d$ ); 1.46 (m, 4H,  $\text{H}_e$ ).

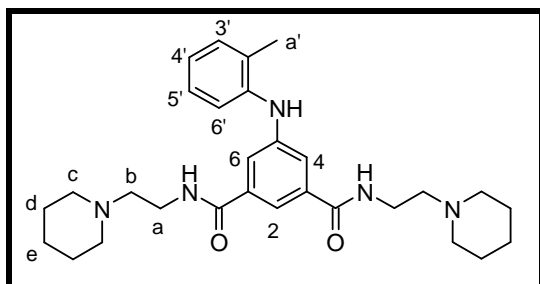
**$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 166.9 (CO); 144.2 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 142.6 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 136.1 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 130.6 ( $\text{C}_{3'}$ ); 128.3 ( $\text{C}_{5'}$ ); 126.5 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 120.4 ( $\text{C}_{4'}$ ); 118.2 ( $\text{C}_4, \text{C}_6$ ); 116.0 ( $\text{C}_2$ ); 115.6 ( $\text{C}_{6'}$ ); 63.9 ( $\text{C}_{a'}$ ); 57.1 ( $\text{C}_b$ ); 54.3 ( $\text{C}_c$ ); 44.9 ( $\text{C}_{b'}$ ); 36.5 ( $\text{C}_a$ ); 25.9 ( $\text{C}_d$ ); 24.3 ( $\text{C}_e$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 535.4, Found: 535.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**HR-MS:**  $m/z$  Calculated: 535.37550, Found: 535.37152  $[\text{M}+\text{H}]^+ = \text{C}_{31}\text{H}_{47}\text{N}_6\text{O}_2$ .

**Purity:**  $\text{C}_4$  column:  $t_r = 16.6$  min, purity = 90 %;  $\text{C}_{18}$  column:  $t_r = 17.8$  min, purity = 92 %.

\* **5-[(2-methylphenyl)amino]-N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (115)**



$C_{29}H_{41}N_5O_2$   
Mw: 491.67 g/mol

To a solution of dimethyl[(2-nitrophenyl)methyl]amine (**110**) (200 mg, 1.11 mmol) in EtOH (20 mL) was added ammonium formate (490 mg, 7.77 mmol) and Pd/C 10 % (87 mg, 0.08 mmol). The mixture was stirred for 15 h at 60°C. The reaction mixture was filtered through a celite pad and the filtrate was evaporated. The residue was dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated. Because of the high instability of the compound, the residue was used directly without further purification in the next step.

Synthesized according to procedure F: the residue of 2-methylaniline previously formed (**115**) (80 mg, 0.74 mmol) dissolved in dioxane (2 mL), 5-bromo-N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (**83**) (290 mg, 0.62 mmol) in dioxane (2 mL), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (283 mg, 0.87 mmol), Xantphos (54 mg, 0.09 mmol) and Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (29 mg, 0.03 mmol) and were used. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 10:0 to 9.5:0.5 (v/v)).

The title compound (145 mg, 0.29 mmol, 47 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.5:0.5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.73 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 7.44 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.32 (br t, *J* = 4.7 Hz, 2H, NH); 7.23-7.11 (m, 3H, 3H<sub>aro</sub>); 7.00 (td, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H, H<sub>aro</sub>); 6.03 (s, 1H, NH); 3.53 (q, *J* = 5.9 Hz, 4H, H<sub>a</sub>); 2.59 (t, *J* = 6.1 Hz, 4H, H<sub>b</sub>); 2.47 (br s, 8H, H<sub>c</sub>); 2.22 (s, 3H, H<sub>a'</sub>); 1.58 (m, 8H, H<sub>d</sub>); 1.44 (m, 4H, H<sub>e</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 167.0 (CO); 145.8 (C<sub>aro</sub>); 139.7 (C<sub>aro</sub>); 135.9 (C<sub>aro</sub>); 131.2 (CH<sub>aro</sub>); 130.8 (C<sub>aro</sub>); 126.9 (CH<sub>aro</sub>); 123.8 (CH<sub>aro</sub>); 121.6 (CH<sub>aro</sub>); 117.0 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 115.8 (C<sub>2</sub>); 57.1 (C<sub>b</sub>); 54.2 (C<sub>c</sub>); 36.4 (C<sub>a</sub>); 25.5 (C<sub>d</sub>); 24.0 (C<sub>e</sub>); 18.0 (C<sub>a</sub>).

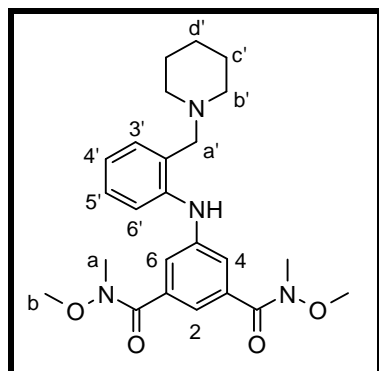
**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 492.3, Found: 492.3 [M+H]<sup>+</sup>, 490.2 [M-H]<sup>-</sup>.

**HR-MS:** *m/z* Calculated: 492.33330, Found: 492.33218 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>29</sub>H<sub>42</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 18.2 min, purity = 96 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 22.4 min, purity = 97 %.

- **Second synthetic route**

- \* ***N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethyl-5-[(2-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl)amino]benzene-1,3-dicarboxamide (121)***



$C_{24}H_{32}N_4O_4$   
Mw: 440.54 g/mol

To a solution of 1-[(2-nitrophenyl)methyl]piperidine (**106**) (220 mg, 1.00 mmol) in EtOH (28 mL) was added ammonium formate (441 mg, 6.99 mmol) and Pd/C 10 % (78 mg, 0.07 mmol). The mixture was stirred for 1 h at 20°C. The reaction mixture was filtered through a celite pad and the filtrate was evaporated. The residue was dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. Because of the high instability of the compound, the residue was used directly without further purification in the next step.

Synthesized according to procedure F: the residue of 2-(piperidin-1-ylmethyl)aniline previously formed (**111**) (261 mg, 1.37 mmol) dissolved in dioxane (3.7 mL), 5-bromo-N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (**89**) (379 mg, 1.14 mmol) in dioxane (3.7 mL), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (521 mg, 1.60 mmol), Xantphos (99 mg, 0.17 mmol) and Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (52 mg, 0.06 mmol) were used. The residue was purified by flash chromatography (PE/EtOAc, 10:0 to 1:9 (v/v)).

The title compound (380 mg, 0.86 mmol, 75 %) was obtained as a yellow oil.

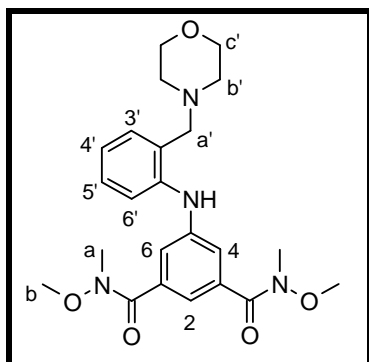
**TLC (PE/EtOAc, 1:9, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.1

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 9.25 (br s, 1H, NH); 7.43 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.41 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 7.36 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, H<sub>6'</sub>); 7.18 (td, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 7.08 (dd, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, H<sub>3'</sub>); 6.82 (td, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H, H<sub>5'</sub>); 3.61 (s, 6H, H<sub>b</sub>); 3.51 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.35 (s, 6H, H<sub>a</sub>); 2.39 (br s, 4H, H<sub>b'</sub>); 1.60 (m, 4H, H<sub>c'</sub>); 1.50 (m, 2H, H<sub>d'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 169.3 (CO); 141.3 (C<sub>aro</sub>); 142.8 (C<sub>aro</sub>); 135.0 (C<sub>aro</sub>); 130.7 (C<sub>3'</sub>); 128.1 (C<sub>4'</sub>); 125.6 (C<sub>aro</sub>); 120.0 (C<sub>5'</sub>); 118.8 (C<sub>2</sub>); 118.6 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 115.0 (C<sub>6'</sub>); 62.9 (C<sub>a'</sub>); 61.2 (C<sub>b</sub>); 53.9 (C<sub>b'</sub>); 33.8 (C<sub>a</sub>); 26.3 (C<sub>c'</sub>); 24.4 (C<sub>d'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 441.3, Found: 441.2 [M+H]<sup>+</sup>, 356.2 [M-piperidine+H]<sup>+</sup>.

\* ***N1,N3-Dimethoxy-N1,N3-dimethyl-5-([2-(morpholin-4-ylmethyl)phenyl]amino)benzene-1,3-dicarboxamide (122)***



$C_{23}H_{30}N_4O_5$   
Mw: 442.52 g/mol

To a solution of 4-[(2-nitrophenyl)methyl]morpholine (**108**) (500 mg, 2.25 mmol) in EtOH (44 mL) was added ammonium formate (0.99 g, 15.75 mmol) and Pd/C 10 % (177 mg, 0.17 mmol). The mixture was stirred for 15 h at 20°C. The reaction mixture was filtered through a celite pad and the filtrate was evaporated. The residue was dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. Because of the high instability of the compound, the residue was used directly without further purification in the next step.

Synthesized according to procedure F: the residue of 2-(morpholine-4-ylmethyl)aniline previously formed (**112**) (148 mg, 0.78 mmol) dissolved in dioxane (2.4 mL), 5-bromo-N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (**89**) (303 mg, 0.65 mmol) in dioxane (2.4 mL), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (298 mg, 0.91 mmol), Xantphos (64 mg, 0.11 mmol) and Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (34 mg, 0.04 mmol) were used. The residue was purified by flash chromatography PE/EtOAc, 10:0 to 0:10 (v/v).

The title compound (210 mg, 0.47 mmol, 65 %) was obtained as a yellow oil.

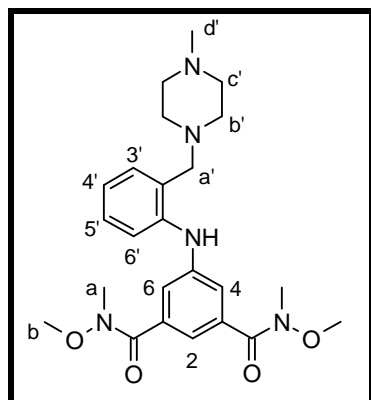
**TLC (PE/EtOAc, 1:9, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.1

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.72 (br s, 1H, NH); 7.44 (s, 3H, H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.36 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, H<sub>6'</sub>); 7.21 (td, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 7.12 (dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H, H<sub>3'</sub>); 6.85 (td, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H, H<sub>5'</sub>); 3.74 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H, H<sub>c'</sub>); 3.61 (s, 6H, H<sub>b</sub>); 3.56 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.36 (s, 6H, H<sub>a</sub>); 2.46 (t, *J* = 4.1 Hz, 4H, H<sub>b'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 169.2 (CO); 143.1 (C<sub>aro</sub>); 142.5 (C<sub>aro</sub>); 135.0 (C<sub>aro</sub>); 131.1 (C<sub>3'</sub>); 128.5 (C<sub>4'</sub>); 124.6 (C<sub>aro</sub>); 120.4 (C<sub>5'</sub>); 119.2 (C<sub>2</sub>); 118.8 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 115.4 (C<sub>6'</sub>); 67.2 (C<sub>c'</sub>); 62.4 (C<sub>a'</sub>); 61.2 (C<sub>b</sub>); 53.0 (C<sub>b'</sub>); 33.8 (C<sub>a</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 443.2, Found: 443.2 [M+H]<sup>+</sup>, 441.1 [M-H]<sup>-</sup>.

\* ***N1,N3-Dimethoxy-N1,N3-dimethyl-5-((2-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl)amino)benzene-1,3-dicarboxamide (123)***



$C_{24}H_{33}N_5O_4$   
Mw: 455.56 g/mol

To a solution of 1-methyl-4-[(2-nitrophenyl)methyl]piperazine (**109**) (425 mg, 1.42 mmol) in EtOH (20 mL) was added ammonium formate (628 mg, 9.94 mmol) and Pd/C 10 % (110 mg, 0.10 mmol). The mixture was stirred for 15 h at 20°C. The reaction mixture was filtered through a celite pad and the filtrate was evaporated. The residue was dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was dried over  $MgSO_4$  and evaporated. Because of the high instability of the compound, the residue was used directly without further purification in the next step.

Synthesized according to procedure F: the residue of 2-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]aniline previously formed (**113**) (289 mg, 1.42 mmol) dissolved in dioxane (3.8 mL), 5-bromo-*N1,N3*-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (**89**) (390 mg, 1.18 mmol) in dioxane (3.8 mL),  $CS_2CO_3$  (537 mg, 1.65 mmol), Xantphos (102 mg, 0.18 mmol) and  $Pd_2dba_3$  (54 mg, 0.06 mmol) were used. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 10:0 to 9.8:0.2 (v/v)).

The title compound (494 mg, 1.08 mmol, 92 %) was obtained as a yellow oil.

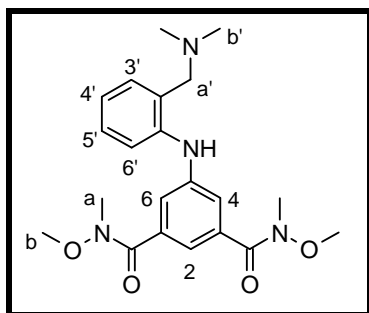
**TLC (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 9.8:0.2, v/v):**  $R_f$  = 0.1

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 8.84 (br s, 1H, NH); 7.45 (s, 3H,  $H_2$ ,  $H_4$ ,  $H_6$ ); 7.37 (dd,  $J$  = 8.1 Hz,  $J$  = 1.0 Hz, 1H,  $H_{6'}$ ); 7.21 (td,  $J$  = 7.6 Hz,  $J$  = 1.6 Hz, 1H,  $H_{4'}$ ); 7.13 (dd,  $J$  = 7.4 Hz,  $J$  = 1.5 Hz, 1H,  $H_{3'}$ ); 6.86 (td,  $J$  = 7.4 Hz,  $J$  = 1.2 Hz, 1H,  $H_{5'}$ ); 3.63 (s, 6H,  $H_b$ ); 3.58 (s, 2H,  $H_{a'}$ ); 3.38 (s, 6H,  $H_a$ ); 2.60-2.43 (M, 8H,  $H_{b'}$ ,  $H_{c'}$ ); 2.34 (s, 3H,  $H_{d'}$ ).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 169.3 (CO); 143.2 ( $C_{aro}$ ); 142.6 ( $C_{aro}$ ); 135.0 ( $C_{aro}$ ); 130.9 ( $C_{3'}$ ); 128.3 ( $C_{4'}$ ); 125.3 ( $C_{aro}$ ); 120.3 ( $C_{5'}$ ); 119.0 ( $C_2$ ); 118.7 ( $C_4$ ,  $C_6$ ); 115.5 ( $C_{6'}$ ); 62.0 ( $C_{a'}$ ); 61.2 ( $C_b$ ); 55.4 ( $C_{b'}$  or  $C_{c'}$ ); 52.5 ( $C_{b'}$  or  $C_{c'}$ ); 46.0 ( $C_{d'}$ ). 33.9 ( $C_a$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 456.3, Found: 456.2 [ $M+H$ ] $^+$ , 454.1 [ $M-H$ ] $^-$ .

\* **5-((2-[(Dimethylamino)methyl]phenyl)amino)-N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (124)**



$C_{21}H_{28}N_4O_4$   
Mw: 400.48 g/mol

To a solution of dimethyl[(2-nitrophenyl)methyl]amine (**110**) (400 mg, 2.22 mmol) in EtOH (40 mL) was added ammonium formate (980 mg, 15.54 mmol) and Pd/C 10 % (174 mg, 0.16 mmol). The mixture was stirred for 30 min at 40°C. The reaction mixture was filtered through a celite pad and the filtrate was evaporated. The residue was dissolved in DCM and washed with water. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. Because of the high instability of the compound, the residue was used directly without further purification in the next step.

Synthesized according to procedure F: the residue of 2-[(dimethylamino)methyl]aniline previously formed (**114**) (220 mg, 1.47 mmol) dissolved in dioxane (4.0 mL), 5-bromo-N1,N3-bis[2-(piperidin-1-yl)ethyl]benzene-1,3-dicarboxamide (**89**) (404 mg, 1.22 mmol) in dioxane (4.0 mL), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (557 mg, 1.71 mmol), Xantphos (106 mg, 0.18 mmol), and Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (56 mg, 0.06 mmol) were used. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 10:0 to 9.8:0.2 (v/v)).

The title compound (120 mg, 0.31 mmol, 26 %) was obtained as a yellow oil.

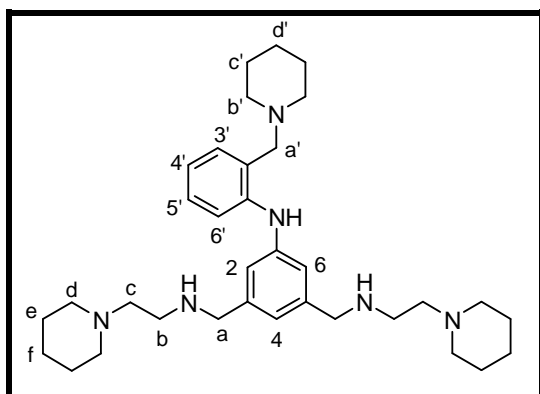
**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.8:0.2, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.1

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.41 (s, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>); 7.37 (s, 1H, H<sub>2</sub>); 7.33 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H, H<sub>6'</sub>); 7.15 (td, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 7.06 (dd, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, H<sub>3'</sub>); 6.80 (td, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H, H<sub>5'</sub>); 3.57 (s, 6H, H<sub>b</sub>); 3.43 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 3.31 (s, 6H, H<sub>a</sub>); 2.20 (s, 6H, H<sub>b'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 169.3 (CO); 143.3 (C<sub>aro</sub>); 142.6 (C<sub>aro</sub>); 134.9 (C<sub>aro</sub>); 130.6 (C<sub>3'</sub>); 128.3 (C<sub>4'</sub>); 126.3 (C<sub>aro</sub>); 120.3 (C<sub>5'</sub>); 118.8 (C<sub>2</sub>); 118.7 (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>); 115.5 (C<sub>6'</sub>); 63.4 (C<sub>a'</sub>); 61.2 (C<sub>b</sub>); 44.8 (C<sub>b'</sub>); 33.9 (C<sub>a</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 401.2, Found: 401.1 [M+H]<sup>+</sup>.

\* **3,5-Bis([(2-(piperidin-1-yl)ethyl)amino)methyl]-N-[2-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl]aniline (129)**



$C_{34}H_{54}N_6$   
Mw: 546.85 g/mol

The compound was synthesized according procedure G then C.

**Procedure G:** *N1,N3*-dimethoxy-*N1,N3*-dimethyl-5-([2-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl]amino)benzene-1,3-dicarboxamide (**121**) (100 mg, 0.23 mmol), LiAlH<sub>4</sub> in dry THF (1 M, 432 μL, 0.43 mmol), dry THF (2 mL) and KHSO<sub>4</sub> saturated solution (2 mL) were used. The residue was used without further purification in the next step because of its instability.

**Procedure C:** the previous residue of 5-([2-(piperidin-1-ylmethyl)phenyl]amino)benzene-1,3-dicarbaldehyde (**125**) (74 mg, 0.23 mmol), 1-piperidineethanamine (94 μL, 0.65 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (138 mg, 0.65 mmol), acetic acid (37 μL, 0.65 mmol), toluene (5 mL) and DCE (3 mL) were used. The imine was formed for 1 h and reduced for 15 h. The residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>) 9.5:0.5 to 9.3:0.7 (v/v)).

The title compound (10 mg, 0.02 mmol, 26 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.5:0.5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.1

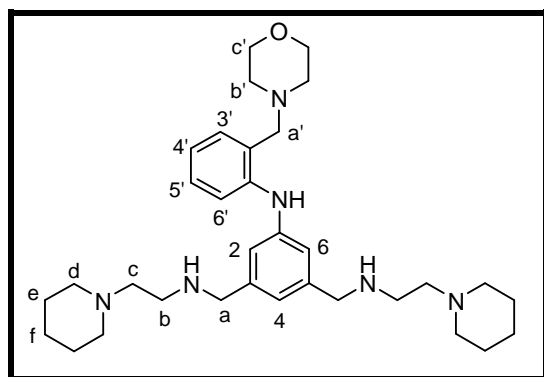
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.89 (br s, 1H, NH); 7.35 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, H<sub>6'</sub>); 7.17 (td, *J* = 7.6 Hz, *J* = 1.6 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 7.09 (dd, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H, H<sub>3'</sub>); 6.94 (d, *J* = 1.2 Hz, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>); 6.83-6.76 (M, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>5'</sub>); 3.78 (s, 4H, H<sub>a</sub>); 3.51 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.76 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H, H<sub>b</sub>); 2.52-2.35 (M, 16H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>b'</sub>, 2NH); 1.66-1.43 (M, 18H, H<sub>e</sub>, H<sub>f</sub>, H<sub>c'</sub>, H<sub>d'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 143.8 (C<sub>aro</sub>); 143.5 (C<sub>aro</sub>); 141.4 (C<sub>aro</sub>); 130.6 (C<sub>3'</sub>); 128.0 (C<sub>4'</sub>); 125.2 (C<sub>aro</sub>); 119.9 (C<sub>4</sub>); 119.0 (C<sub>5'</sub>); 116.2 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>); 114.8 (C<sub>6'</sub>); 63.0 (C<sub>a'</sub>); 58.3 (C<sub>c</sub>); 54.6 (C<sub>d</sub>, C<sub>b'</sub>); 53.9 (C<sub>a</sub>); 45.7 (C<sub>b</sub>); 26.3 (C<sub>c'</sub>); 25.9 (C<sub>e</sub>); 24.5 (C<sub>d'</sub>); 24.4 (C<sub>f</sub>).

**HR-MS:** *m/z* Calculated: 547.44827, Found: 547.44425 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>34</sub>H<sub>55</sub>N<sub>6</sub>.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 14.7 min, purity = 97 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 17.3 min, purity = 96 %.

\* ***N*-[2-(Morpholin-4-ylmethyl)phenyl]-3,5-bis([2-(piperidin-1-yl)ethyl]amino)methyl)aniline (130)**



C<sub>33</sub>H<sub>52</sub>N<sub>6</sub>O  
Mw: 548.82 g/mol

The compound was synthesized according procedure G then C.

**Procedure G:** *N1,N3*-dimethoxy-*N1,N3*-dimethyl-5-([2-(morpholin-4-ylmethyl)phenyl]amino)benzene-1,3-dicarboxamide (**122**) (160 mg, 0.36 mmol), LiAlH<sub>4</sub> in THF (1 M, 689 μL, 0.69 mmol), THF (3.0 mL) and KHSO<sub>4</sub> saturated solution (3.2 mL) were used. The residue was used without further purification in the next step because of its instability.

**Procedure C:** the previous residue 5-([2-(morpholine-4-ylmethyl)phenyl]amino)benzene-1,3-dicarbaldehyde (**126**) (70 mg, 0.22 mmol), 1-piperidineethanamine (93 μL, 0.65 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (137 mg, 0.65 mmol), acetic acid (37 μL, 0.65 mmol), toluene (5 mL) and DCE (3 mL) were used. The imine was



formed for 1 h and reduced for 15 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>) 10:0 to 9:1 (v/v)).

The title compound (15 mg, 0.03 mmol, 14 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.4

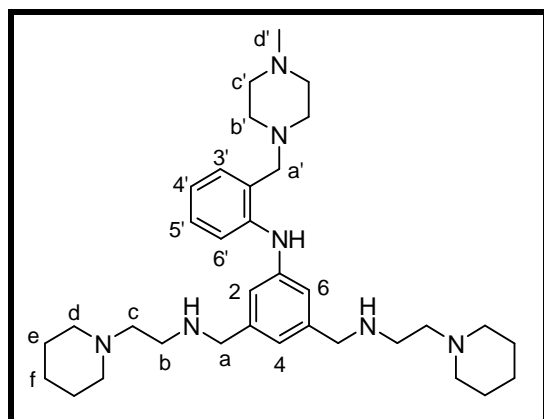
**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.38 (br s, 1H, NH); 7.35 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H<sub>6'</sub>); 7.20 (td, *J* = 6.7 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 7.11 (dd, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H, H<sub>3'</sub>); 6.94 (d, *J* = 0.9 Hz, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>); 6.85-6.78 (M, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>); 3.80-3.74 (M, 8H, H<sub>a</sub>, H<sub>c'</sub>); 3.57 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.75 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H, H<sub>b</sub>); 2.52-2.45 (M, 8H, H<sub>c</sub>, H<sub>b'</sub>); 2.38 (br s, 8H, H<sub>d</sub>); 2.21 (br s, 2H, NH); 1.57 (m, 8H, H<sub>e</sub>); 1.44 (m, 4H, H<sub>f</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 143.7 (C<sub>aro</sub>); 143.2 (C<sub>aro</sub>); 141.8 (C<sub>aro</sub>); 131.0 (C<sub>3'</sub>); 128.4 (C<sub>4'</sub>); 124.1 (C<sub>aro</sub>); 120.2 (C<sub>4</sub>); 119.3 (C<sub>5'</sub>); 116.3 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>); 115.1 (C<sub>6'</sub>); 67.2 (C<sub>c'</sub>); 62.5 (C<sub>a'</sub>); 58.5 (C<sub>c</sub>); 54.7 (C<sub>d</sub>); 54.0 (C<sub>a</sub>); 53.1 (C<sub>b'</sub>); 46.0 (C<sub>b</sub>); 26.0 (C<sub>e</sub>); 24.4 (C<sub>f</sub>).

**HR-MS:** m/z Calculated: 549.42754, Found: 549.42489 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>33</sub>H<sub>53</sub>N<sub>6</sub>O.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 14.4 min, purity = 96 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 16.7 min, purity = 97 %.

\* ***N*-(2-[(4-Methylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl)-3,5-bis([(2-(piperidin-1-yl)ethyl)amino)methyl]aniline (131)**



C<sub>34</sub>H<sub>55</sub>N<sub>7</sub>  
Mw: 561.86 g/mol

The compound was synthesized according procedure G then C.

**Procedure G:** N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethyl-5-((2-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl)amino)benzene-1,3-dicarboxamide (**123**) (200 mg, 0.44 mmol), LiAlH<sub>4</sub> in THF (1 M, 836 μL, 0.84 mmol), THF (3.7 mL) and KHSO<sub>4</sub> saturated solution (3.9 mL) were used. The residue was used without further purification in the next step because of its instability.

**Procedure C:** the previous residue of 5-((2-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl)amino)benzene-1,3-dicarbaldehyde (**127**) (70 mg, 0.21 mmol), 1-piperidineethanamine (89 μL, 0.62 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (132 mg, 0.62 mmol), acetic acid (36 μL, 0.62 mmol), toluene (5 mL) and DCE (3 mL) were used. The imine was formed for 1 h and reduced for 15 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>) 10:0 to 9:1 (v/v)).

The title compound (12 mg, 0.02 mmol, 10 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.4

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.56 (br s, 1H, NH); 7.34 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 0.8 Hz, 1H, H<sub>6'</sub>); 7.19 (td, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 7.11 (dd, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H, H<sub>3'</sub>); 6.97 (d, *J* = 1.2 Hz, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>); 6.93 (t, *J* =

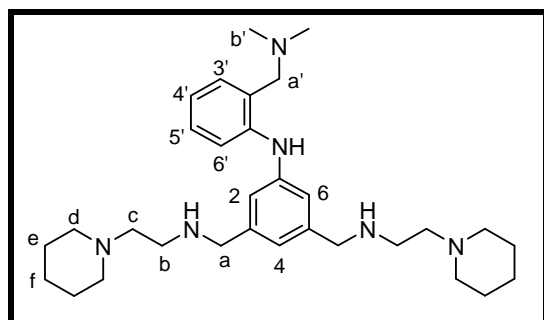
1.1 Hz, 1H, H<sub>4</sub>); 6.82 (td,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 1.0$  Hz, 1H, H<sub>5'</sub>); 3.82 (s, 4H, H<sub>a</sub>); 3.68 (br s, 2H, NH); 3.56 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.87 (t,  $J = 6.4$  Hz, 4H, H<sub>b</sub>); 2.68-2.48 (M, 20H, H<sub>b</sub>, H<sub>c</sub>, H<sub>b'</sub>, H<sub>c'</sub>); 2.40 (s, 3H, H<sub>d'</sub>); 1.65 (m, 8H, H<sub>e</sub>); 1.47 (m, 4H, H<sub>f</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 143.6 (C<sub>aro</sub>); 143.3 (C<sub>aro</sub>); 140.3 (C<sub>aro</sub>); 130.9 (C<sub>3'</sub>); 128.3 (C<sub>4'</sub>); 124.8 (C<sub>aro</sub>); 120.1 (C<sub>4</sub>); 119.6 (C<sub>5'</sub>); 116.4 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>); 115.2 (C<sub>6'</sub>); 62.0 (C<sub>a'</sub>); 57.4 (C<sub>c</sub>); 55.3 (C<sub>b'</sub> or C<sub>c'</sub>); 54.4 (C<sub>d</sub>); 53.4 (C<sub>b'</sub> or C<sub>c'</sub>); 52.3 (C<sub>a</sub>); 45.8 (C<sub>d'</sub>); 44.9 (C<sub>b</sub>); 25.2 (C<sub>e'</sub>); 23.9 (C<sub>f'</sub>).

**HR-MS:** m/z Calculated: 562.45917, Found: 562.45673 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>34</sub>H<sub>56</sub>N<sub>7</sub>.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 14.4 min, purity = 94 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 16.9 min, purity = 95 %.

\* ***N*-(2-[(Dimethylamino)methyl]phenyl)-3,5-bis([2-(piperidin-1-yl)ethyl]amino)methyl)aniline (132)**



C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>N<sub>6</sub>  
Mw: 506.78 g/mol

The compound was synthesized according procedure G then C.

**Procedure G:** 5-((2-[(dimethylamino)methyl]phenyl)amino)-N1,N3-dimethoxy-N1,N3-dimethylbenzene-1,3-dicarboxamide (**124**) (120 mg, 0.30 mmol), LiAlH<sub>4</sub> in THF (1 M, 570  $\mu$ L, 0.57 mmol), THF (2.5 mL) and KHSO<sub>4</sub> saturated solution (2.2 mL) were used. The residue was used without further purification in the next step because of its instability.

**Procedure C:** the previous residue of 5-((2-[(dimethylamino)methyl]phenyl)amino)benzene-1,3-dicarbaldehyde (**128**) (70 mg, 0.25 mmol), 1-piperidineethanamine (107  $\mu$ L, 0.74 mmol), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (158 mg, 0.74 mmol), acetic acid (43  $\mu$ L, 0.74 mmol), toluene (5 mL) and DCE (3.5 mL) were used. The imine was formed for 1 h and reduced for 15 h. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>) 10:0 to 9:1 (v/v)).

The title compound (10 mg, 0.02 mmol, 8 %) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 5:5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.49 (br s, 1H, NH); 7.35 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H<sub>6'</sub>); 7.18 (td,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 7.11 (dd,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 1.3$  Hz, 1H, H<sub>3'</sub>); 6.97 (d,  $J = 1.1$  Hz, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>); 6.85-6.78 (M, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>5'</sub>); 3.78 (s, 4H, H<sub>a</sub>); 3.45 (s, 2H, H<sub>a'</sub>); 2.77 (t,  $J = 6.4$  Hz, 4H, H<sub>b</sub>); 2.51 (t,  $J = 6.1$  Hz, 4H, H<sub>c</sub>); 2.40 (br s, 8H, H<sub>d</sub>); 2.30-2.25 (M, 8H, 2NH, H<sub>b'</sub>); 1.58 (m, 8H, H<sub>e</sub>); 1.44 (m, 4H, H<sub>f</sub>).

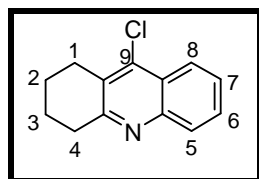
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 143.7 (C<sub>aro</sub>); 143.5 (C<sub>aro</sub>); 141.4 (C<sub>aro</sub>); 130.5 (C<sub>3'</sub>); 128.1 (C<sub>4'</sub>); 125.9 (C<sub>aro</sub>); 120.0 (C<sub>4</sub>); 119.2 (C<sub>5'</sub>); 116.2 (C<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>); 115.2 (C<sub>6'</sub>); 63.6 (C<sub>a'</sub>); 58.3 (C<sub>c</sub>); 54.6 (C<sub>d</sub>); 53.9 (C<sub>a</sub>); 45.7 (C<sub>b</sub>); 44.9 (C<sub>b'</sub>); 25.8 (C<sub>e'</sub>); 24.3 (C<sub>f'</sub>).

**HR-MS:** m/z Calculated: 507.41697, Found: 507.41539 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>31</sub>H<sub>51</sub>N<sub>6</sub>.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 14.3 min, purity = 91 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 16.5 min, purity = 90 %.

## 8. Synthesis of multitarget compounds

### \* 9-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridine (134)



$C_{13}H_{12}NO$   
Mw: 271.70 g/mol

To a solution of 2-aminobenzoic acid (**133**) (2.02 g, 14.71 mmol) in cyclohexanone (1.52 mL, 14.71 mmol) was added  $POCl_3$  (5 mL, 53.80 mmol) dropwise. The mixture was refluxed for 2 h. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in  $CHCl_3$  and washed with saturated  $NaHCO_3$  solution. The organic layer was dried over  $MgSO_4$  and evaporated. The residue was purified by column chromatography (eluent: DCM/MeOH, 10:0 to 9.5:0.5 (v/v))

The title compound (3.18 g, 14.64 mmol, 99 % yield) was obtained as a red powder.

**TLC (DCM/MeOH, 9:1, v/v):**  $R_f = 0.3$

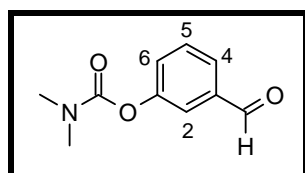
**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 8.09 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H,  $H_5$ ); 7.94 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H,  $H_8$ ); 7.62 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H,  $H_7$ ); 7.48 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $H_6$ ); 3.08 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H,  $H_4$ ); 2.94 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H,  $H_1$ ); 1.90 (m, 4H,  $H_2, H_3$ ).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 159.5 ( $C_{aro}$ ); 146.7 ( $C_{aro}$ ); 141.4 ( $C_{aro}$ ); 129.3 ( $C_8$ ); 128.9 ( $C_{aro}$ ); 128.7 ( $C_5$ ); 126.5 ( $C_7$ ); 125.4 ( $C_{aro}$ ); 123.7 ( $C_6$ ); 34.2 ( $C_4$ ); 27.5 ( $C_1$ ); 22.6 ( $C_2, C_3$ ).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated : 218.1, Found: 218.2  $[M+H]^+$ .

**Melting Point:** 68.1°C (Lit.: 67-69°C)<sup>301</sup>

### \* (3-Formylphenyl)-N,N-dimethylcarbamate (136)



$C_{10}H_{11}NO_3$   
Mw: 193.20 g/mol

To a solution of dimethylcarbamoyl chloride (3.74 g, 34.8 mmol) in pyridine (45 mL) was added 3-hydroxybenzaldehyde (**135**) (3.54 g, 29.0 mmol). The reaction mixture was heated for 3 h at 90°C. Water (300 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3 x 250 mL). The combined organic layer was washed with 1 M NaOH solution (250 mL) and brine (250 mL). The organic layer was dried over  $MgSO_4$  and evaporated. The compound was used without further purification in the next step.

The title compound (4.48 g, 23.19 mmol, 80 % yield) was obtained as a yellow oil.

**TLC (DCM/MeOH, 9.2:0.2, v/v):**  $R_f = 0.5$

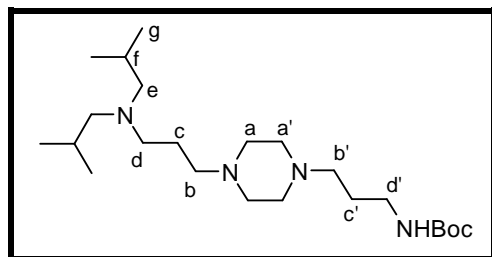
**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 9.99 (s, 1H, CHO); 7.71 (dt,  $J = 8.1$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, 1H,  $H_4$ ); 7.64 (m, 1H,  $H_2$ ); 7.52 (t,  $J = 8.1$  Hz, 1H,  $H_5$ ); 7.40 (ddd,  $J = 8.1$  Hz,  $J = 2.3$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, 1H,  $H_6$ ); 3.12 (s, 3H,  $NCH_3$ ); 3.02 (s, 3H,  $NCH_3$ ).

<sup>301</sup> R. S. Keri et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, 21, 4559-4569

**$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 191.3 (CHO); 154.2 (CO); 152.1 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 137.5 ( $\text{C}_{\text{aro}}$ ); 129.8 ( $\text{C}_5$ ); 127.9 ( $\text{C}_6$ ); 126.4 ( $\text{C}_4$ ); 122.3 ( $\text{C}_2$ ); 36.6 ( $\text{NCH}_3$ ); 36.3 ( $\text{NCH}_3$ ).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated : 194.1, Found: 194.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

\* ***tert*-Butyl-*N*-[3-[4-[3-(diisobutylamino)propyl]piperazin-1-yl]propyl]carbamate (137)**



$\text{C}_{23}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_2$

Mw: 412.66 g/mol

To a solution of *tert*-butyl-*N*-[3-[4-(3-aminopropyl)piperazin-1-yl]propyl]carbamate (**18**) (1.00 g, 3.33 mmol) in DCM (50 mL) was added isobutyraldehyde (0.90 mL, 9.99 mmol). The reaction mixture was cooled to 0°C and  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  (2.12 g, 9.99 mmol) was added. After 3 d of stirring, 25 mL of 1 M NaOH solution was added and the reaction mixture was stirred for 15 min. The mixture was extracted with DCM (2 x 20 mL). The combined organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated. The residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH( $\text{NH}_3$ ), 10:0 to 9.6:0.4 (v/v)).

The title compound (0.80 g, 1.94 mmol, 58 % yield) was obtained as a colourless oil.

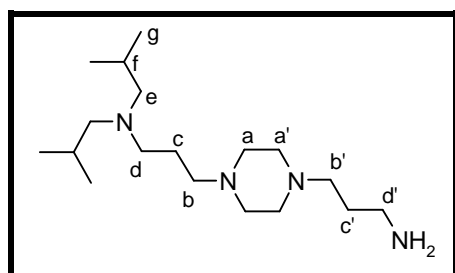
**TLC (Acetone/ $\text{NH}_4\text{OH}$ , 9:1, v/v):**  $R_f = 0.8$

**$^1\text{H}$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 5.49 (br s, 1H, NH); 3.18 (m, 2H,  $\text{H}_{d'}$ ); 2.50-2.30 (M, 14H,  $\text{H}_a$ ,  $\text{H}_{a'}$ ,  $\text{H}_b$ ,  $\text{H}_{b'}$ ,  $\text{H}_d$ ); 2.03 (d,  $J = 7.2$  Hz, 4H,  $\text{H}_e$ ); 1.70-1.50 (M, 6H,  $\text{H}_c$ ,  $\text{H}_{c'}$ ,  $\text{H}_f$ ); 1.44 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 0.85 (d,  $J = 6.5$  Hz, 12H,  $\text{H}_g$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $\text{CDCl}_3$ ):** 156.1 (CO); 78.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 63.9 ( $\text{C}_e$ ); 56.8 ( $\text{C}_b$ ,  $\text{C}_{b'}$ ); 53.2 ( $\text{C}_a$ ,  $\text{C}_{a'}$ ,  $\text{C}_d$ ); 40.0 ( $\text{C}_{d'}$ ); 28.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 26.5 ( $\text{C}_f$ ); 26.3 ( $\text{C}_{c'}$ ); 24.4 ( $\text{C}_c$ ); 20.9 ( $\text{C}_g$ ).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 413.4, Found 413.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 313.2.1  $[\text{M}+\text{H}-\text{Boc}]^+$ .

\* ***3*-(4-[3-[bis(2-methylpropyl)amino]propyl]piperazin-1-yl)propan-1-amine (138)**



$\text{C}_{18}\text{H}_{40}\text{N}_4$

Mw: 312.55 g/mol

*tert*-Butyl-*N*-[3-[4-[3-(diisobutylamino)propyl]piperazin-1-yl]propyl]carbamate (**137**) (1.84 g, 4.46 mmol) was dissolved in a 3 M HCl dioxane solution (45 mL). The reaction mixture was stirred for 4 h. The resulting precipitate was collected by filtration. The solid was dissolved in MeOH( $\text{NH}_3$ ) and stirred at 20°C for 16 h. The solvent was evaporated. The residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH( $\text{NH}_3$ ), 10:0 to 9.5:0.5 (v/v)).

The title compound (1.32 g, 4.24 mmol, 95 %) was obtained as a colourless oil.

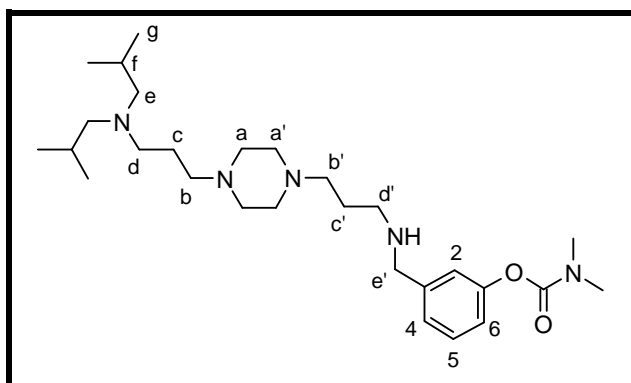
**TLC (Acetone/NH<sub>4</sub>OH, 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.5

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CD<sub>3</sub>OD):** 3.05 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H<sub>d'</sub>); 3.00-2.60 (M, 18H, H<sub>a</sub>, H<sub>a'</sub>, H<sub>b</sub>, H<sub>b'</sub>, H<sub>d</sub>, H<sub>e</sub>); 2.10-1.80 (M, 6H, H<sub>c</sub>, H<sub>c'</sub>, H<sub>f</sub>); 1.02 (d, *J* = 6.5 Hz, 12H, H<sub>g</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CD<sub>3</sub>OD):** 61.1 (C<sub>e</sub>); 53.8 (C<sub>b</sub>, C<sub>b'</sub>); 53.5 (C<sub>a</sub>, C<sub>a'</sub>); 50.7 (C<sub>d</sub>); 37.6 (C<sub>d'</sub>); 24.2 (C<sub>i</sub>); 22.5 (C<sub>c</sub> or C<sub>c'</sub>); 21.3 (C<sub>c</sub> or C<sub>c'</sub>); 19.5 (C<sub>g</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated : 313.3, Found: 313.2 [M+H]<sup>+</sup>.

\* **[3-[[3-[4-[3-(Diisobutylamino)propyl]piperazin-1-yl]propylamino]methyl]phenyl]-N,N-dimethylcarbamate (MAG)**



C<sub>28</sub>H<sub>51</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>

Mw: 489.75 g/mol

To a solution of 3-(4-(3-[bis(2-methylpropyl)amino]propyl)piperazin-1-yl)propan-1-amine (**138**) (500 mg, 1.60 mmol) and (3-formylphenyl)-N,N-dimethylcarbamate (**136**) (340 mg, 1.76 mmol) in MeOH (5.6 mL) was added a small quantity of molecular sieves. The reaction mixture was stirred for 5 h at 20°C. The reaction mixture was cooled to 0°C and NaBH<sub>4</sub> (390 mg, 10.40 mmol) was added portionwise. After 2 d, the reaction mixture was quenched with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (5 mL). The mixture was filtered through a celite pad. The pad was rinsed with DCM. The layers were separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The combined organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.8:0.2 (v/v)).

The title compound (600 mg, 1.22 mmol, 76 % yield) was obtained as a yellow oil.

**TLC (Acetone/NH<sub>4</sub>OH, 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.8

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 7.28 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7.14 (dt, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 7.09 (m, 1H, H<sub>2</sub>); 7.00 (ddd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 2.1 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, H<sub>4</sub>); 3.79 (s, 2H, H<sub>e'</sub>); 3.10 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>); 3.02 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>); 2.67 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H<sub>d'</sub>); 2.60-2.20 (M, 14H, H<sub>a</sub>, H<sub>a'</sub>, H<sub>b</sub>, H<sub>b'</sub>, H<sub>d</sub>); 2.03 (d, *J* = 7.2 Hz, 4H, H<sub>e</sub>); 1.80-1.50 (M, 7H, H<sub>c</sub>, H<sub>c'</sub>, H<sub>f</sub>, NH); 0.86 (d, *J* = 6.2 Hz, 12H, H<sub>g</sub>).

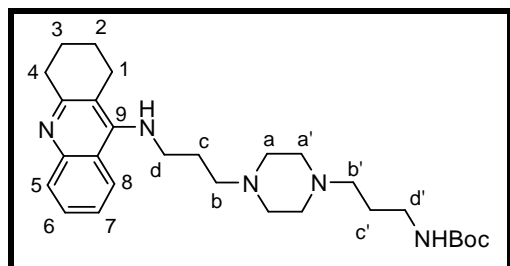
**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 154.9 (CO); 151.6 (C<sub>1</sub>); 142.0 (C<sub>3</sub>); 129.0 (C<sub>5</sub>); 124.7 (C<sub>6</sub>); 121.2 (C<sub>2</sub>); 120.1 (C<sub>4</sub>); 63.9 (C<sub>e</sub>); 57.0 (C<sub>b</sub> or C<sub>b'</sub>); 56.8 (C<sub>b</sub> or C<sub>b'</sub>); 53.3 (C<sub>a</sub>, C<sub>a'</sub>, C<sub>d</sub>, C<sub>e'</sub>); 48.1 (C<sub>d'</sub>); 36.6 (NCH<sub>3</sub>); 36.4 (NCH<sub>3</sub>); 27.0 (C<sub>c'</sub>); 26.5 (C<sub>f</sub>); 24.5 (C<sub>c</sub>); 20.9 (C<sub>g</sub>).

**LC-MS (ESI) m/z** Calculated: 490.4, Found: 490.2 [M+H]<sup>+</sup>.

**HR-MS:** m/z Calculated: 490.41155, Found: 490.41124 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>28</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub>N<sub>5</sub>.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 8.4 min, purity = 98 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 13.0 min, purity = 99 %.

\* ***tert*-Butyl-*N*-[3-(4-(3-[(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino]propyl)piperazin-1-yl)propyl]carbamate (**139**)**



$C_{28}H_{43}N_5O_2$

Mw: 481.57 g/mol

To an oven-dried flask and under nitrogen atmosphere, were placed 9-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridine (**134**) (0.50 g, 2.30 mmol),  $Cs_2CO_3$  (1.05 g, 3.22 mmol) in dioxane (7.45 mL). The mixture was deoxygenated by passing a stream of nitrogen through it. Xantphos (0.20 g, 0.35 mmol) and  $Pd_2dba_3$  (0.11 g, 0.12 mmol) were added. Then *tert*-butyl *N*-[3-(4-(3-aminopropyl)piperazin-1-yl)propyl]carbamate (0.83 mg, 2.76 mmol) dissolved in dioxane (7.5 mL) was added to the mixture. The reaction mixture was stirred for 24 h. The solution was filtered through a celite pad and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (eluent DCM/MeOH 10:0 to 9:1 then DCM/MeOH( $NH_3$ ) 10:0 to 9.6:0.4).

The title compound (1.00 g, 2.08 mmol, 90 % yield) was obtained as a yellow oil.

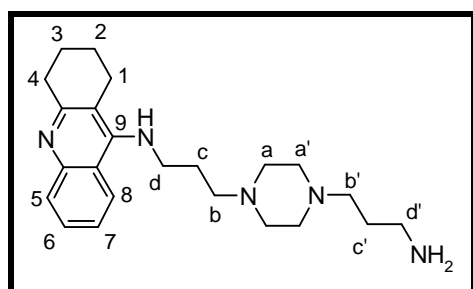
**TLC (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 9.5:0.5, v/v):** Rf = 0.5

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 7.95 (dd,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 1.1$  Hz, 1H,  $H_5$ ); 7.82 (dd,  $J = 8.6$  Hz,  $J = 0.9$  Hz, 1H,  $H_8$ ); 7.45 (m, 1H,  $H_7$ ); 7.24 (m, 1H,  $H_6$ ); 5.53 (br t,  $J = 5.2$  Hz, 1H, NHBoc); 5.06 (br t,  $J = 5.4$  Hz, 1H, NH); 3.48 (m, 2H,  $H_d$ ); 3.12 (m, 2H,  $H_{d'}$ ); 2.98 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $H_a$ ); 2.66 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $H_1$ ); 2.55-2.32 (M, 12H,  $H_a, H_{a'}, H_b, H_{b'}$ ); 1.85-1.72 (M, 6H,  $H_2, H_3, H_c$ ); 1.59 (m, 2H,  $H_{c'}$ ); 1.35 (s, 9H,  $C(CH_3)_3$ ).

**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ):** 158.4 ( $C_{aro}$ ); 156.0 (CO); 151.0 ( $C_{aro}$ ); 147.5 ( $C_{aro}$ ); 128.7 ( $C_1$ ); 128.0 ( $C_2$ ); 123.3 ( $C_3$ ); 123.0 ( $C_4$ ); 120.3 ( $C_{aro}$ ); 115.9 ( $C_{aro}$ ); 78.7 ( $C(CH_3)_3$ ); 57.0 ( $C_b, C_{b'}$ ); 53.2 ( $C_a, C_{a'}$ ); 48.9 ( $C_d$ ); 39.8 ( $C_{d'}$ ); 34.0 ( $C_4$ ); 28.4 ( $C(CH_3)_3$ ); 27.2 ( $C_c$ ); 26.4 ( $C_{c'}$ ); 25.7 ( $C_1$ ); 22.9 ( $C_2, C_3$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated:** 482.4, Found: 482.4 [ $M+H$ ] $^+$ , 382.2 [ $M+H-Boc$ ] $^+$ .

\* ***N*-[3-(4-(3-Aminopropyl)piperazin-1-yl)propyl]-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (**140**)**



$C_{23}H_{35}N_5$

Mw: 381.57 g/mol

*tert*-Butyl *N*-[3-(4-(3-[(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino]propyl)piperazin-1-yl)propyl]carbamate (**139**) (90 mg, 0.19 mmol) was dissolved in dioxane saturated with  $HCl_g$  (5 mL). The reaction mixture was stirred for 16 h. The solvent was evaporated. The residue was dissolved in MeOH( $NH_3$ ) and stirred for 2 h. The solvent was evaporated. The residue was dissolved in 15 mL of DCM and washed with saturated  $NaHCO_3$  solution (3 x 10 mL). The organic layer was dried over  $MgSO_4$  and evaporated. The residue was purified by column chromatography (eluent DCM/MeOH( $NH_3$ ) 9.4:0.6 (v/v)).

The title compound (70 mg, 0.18 mmol, 98 % yield) was obtained as a yellow oil.

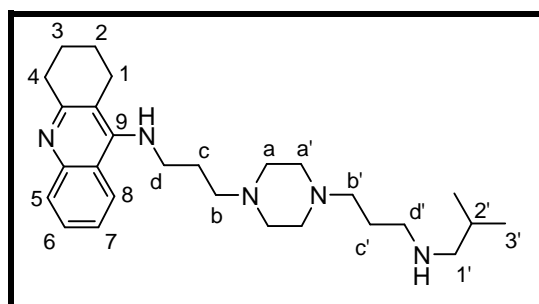
**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9:1, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.01 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 0.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7.87 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 0.9 Hz, 1H, H<sub>8</sub>); 7.51 (ddd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 6.8 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1H, H<sub>7</sub>); 7.30 (ddd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 6.8 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 5.13 (br s, 1H, NH); 3.55 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H<sub>d</sub>); 3.04 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H<sub>4</sub>); 2.71 (m, 4H, H<sub>d'</sub>, H<sub>1</sub>); 2.65-2.37 (M, 12H, H<sub>a</sub>, H<sub>a'</sub>, H<sub>b</sub>, H<sub>b'</sub>); 1.91-1.79 (M, 8H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>c</sub>, NH<sub>2</sub>); 1.64 (m, 2H, H<sub>c'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 158.4 (C<sub>aro</sub>); 151.1 (C<sub>aro</sub>); 147.5 (C<sub>aro</sub>); 128.7 (C<sub>1</sub>); 128.1 (C<sub>2</sub>); 123.4 (C<sub>3</sub>); 123.0 (C<sub>4</sub>); 120.3 (C<sub>aro</sub>); 115.9 (C<sub>aro</sub>); 57.0 (C<sub>b</sub>, C<sub>b'</sub>); 53.4 (C<sub>a</sub>, C<sub>a'</sub>); 49.0 (C<sub>d</sub>); 40.8 (C<sub>d'</sub>); 34.0 (C<sub>4</sub>); 30.5 (C<sub>c'</sub>); 27.2 (C<sub>c</sub>); 25.7 (C<sub>1</sub>); 22.9 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 382.3, Found: 382.2 [M+H]<sup>+</sup>.

\* ***N*-[3-(4-(3-[(2-Methylpropyl)amino]propyl)piperazin-1-yl)propyl]-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (141)**



C<sub>27</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>  
Mw: 437.68 g/mol

To a stirred solution of *N*-(3-[4-(3-aminopropyl)piperazin-1-yl]propyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (**140**) (100 mg, 0.26 mmol) in DCE (5 mL) was added isobutyraldehyde (0.04 mL, 0.40 mmol). The reaction mixture was stirred for 5 h. NaBH<sub>4</sub> (15 mg, 0.40 mmol) was added and the mixture was stirred for 15 h. 10 mL of saturated NaHCO<sub>3</sub> solution was added. The mixture was stirred for 1 h. 5 mL of DCM was added and the layers were separated. The organic layer was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (2 x 10 mL). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated.

The title compound was used without further purification in the next step.

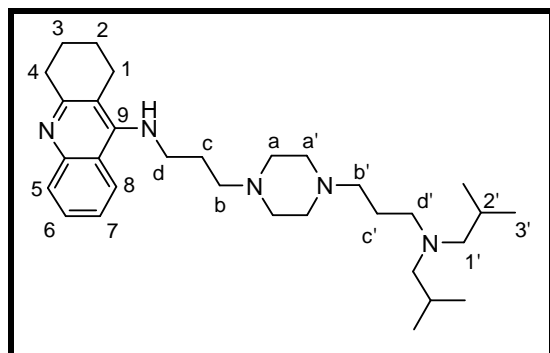
**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.8:0.2, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.5

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.03 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7.90 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 0.9 Hz, 1H, H<sub>8</sub>); 7.54 (ddd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 6.8 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H, H<sub>7</sub>); 7.33 (ddd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 6.8 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 5.14 (br s, 1H, NH); 3.57 (m, 2H, H<sub>d</sub>); 3.05 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H<sub>4</sub>); 2.74 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, H<sub>1</sub>); 2.65 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H<sub>d'</sub>); 2.56-2.40 (M, 14H, H<sub>a</sub>, H<sub>a'</sub>, H<sub>b</sub>, H<sub>b'</sub>, H<sub>1'</sub>); 1.94-1.66 (M, 10H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>c</sub>, H<sub>c'</sub>, H<sub>2'</sub>, NH); 0.92 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, H<sub>3'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 158.5 (C<sub>aro</sub>); 151.1 (C<sub>aro</sub>); 147.6 (C<sub>aro</sub>); 128.8 (C<sub>1</sub>); 128.1 (C<sub>2</sub>); 123.4 (C<sub>3</sub>); 123.0 (C<sub>4</sub>); 120.3 (C<sub>aro</sub>); 116.0 (C<sub>aro</sub>); 58.2 (C<sub>1'</sub>); 57.4 (C<sub>b</sub>, C<sub>b'</sub>); 53.5 (C<sub>a</sub>, C<sub>a'</sub>); 49.0 (C<sub>d</sub>, C<sub>d'</sub>); 34.1 (C<sub>4</sub>); 28.5 (C<sub>2'</sub>); 27.2 (C<sub>c</sub>, C<sub>c'</sub>); 25.7 (C<sub>1</sub>); 23.0 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>); 20.7 (C<sub>3'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z*** Calculated: 438.4, Found: 438.3 [M+H]<sup>+</sup>.

\* ***N*-[3-(4-(3-[(Bis(2-methylpropyl)amino)propyl]piperazin-1-yl)propyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (RPEL)**



$C_{31}H_{51}N_5$   
Mw: 493.79 g/mol

The compound was synthesized according two different procedures.

In a oven-dried flask and under a  $N_2$  atmosphere, were placed 9-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridine (**134**) (257 mg, 1.12 mmol), (+/-) BINAP (167 mg, 0.27 mmol),  $Cs_2CO_3$  (546 mg, 1.68 mmol),  $Pd_2dba_3$  (162 mg, 0.68 mmol) and dry 1,4-dioxane (3 mL). *N*-[3-[4-(3-aminopropyl)piperazin-1-yl]propyl]-*N*-isobutyl-2-methyl-propan-1-amine (**138**) (349 mg, 2.07 mmol) in dry dioxane (3 mL) was added and the mixture was stirred at 90°C for 12 h. The solution was filtered through a celite pad and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH( $NH_3$ ) 9.5:5 (v/v)).

The tittle compound (419 mg, 0.84 mmol, 75 % yield) was obtained as a pale brown oil.

To a solution of *N*-(3-[4-(3-aminopropyl)piperazin-1-yl]propyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (28 mg, 0.07 mmol) (**140**) dissolved in DCM (2 mL) was added isobutyraldehyde (20  $\mu$ L, 0.22 mmol). The mixture was stirred for 15 h at 20°C.  $NaBH(OAc)_3$  (47 mg, 0.22 mmol) was added and the reaction was stirred for 15 h. A saturated solution of  $NaHCO_3$  was added and the mixture was stirred for 1 h. The organic layer was washed twice with saturated  $NaHCO_3$  solution. The organic layer was dried over  $MgSO_4$ , filtrated and evaporated. The residue was purified by column chromatography (eluent: DCM/MeOH( $NH_3$ ) 9.5:0.5 (v/v)).

The title compound (18 mg, 0.04 mmol, 50 % yield) was obtained as a colorless oil.

**TLC (DCM/MeOH( $NH_3$ ), 9.5:0.5, v/v):** Rf = 0.3

**$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm, MeOD):** 8.45 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H,  $H_5$ ); 7.90-7.61 (M, 2H,  $H_7$ ,  $H_8$ ); 7.64 (ddd,  $J$  = 8.6 Hz,  $J$  = 6.7 Hz,  $J$  = 1.1 Hz, 1H,  $H_6$ ); 4.14 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2H,  $H_d$ ); 4.10-3.60 (M, 8H,  $H_a$ ,  $H_{a'}$ ); 3.55-3.35 (M, 6H,  $H_b$ ,  $H_{b'}$ ,  $H_{d'}$ ); 3.12-3.06 (M, 6H,  $H_4$ ,  $H_{1'}$ ); 2.80 (m, 2H,  $H_1$ ); 2.47-2.33 (M, 4H,  $H_c$ ,  $H_{c'}$ ); 2.20 (m,  $J$  = 6.6 Hz, 2H,  $H_2$ ); 2.05-1.95 (M, 4H,  $H_2$ ,  $H_3$ ); 1.09 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 12H,  $H_3$ ).

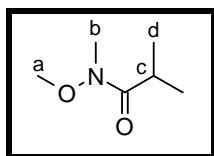
**$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm, MeOD):** 156.5 ( $C_{aro}$ ); 150.9 ( $C_{aro}$ ); 138.2 ( $C_{aro}$ ); 132.8 ( $C_7$ ); 125.5 ( $C_6$ ); 124.9 ( $C_5$ ); 118.8 ( $C_8$ ); 115.9 ( $C_{aro}$ ); 112.2 ( $C_{aro}$ ); 61.1 ( $C_{1'}$ ); 53.6 ( $C_{b'}$ ); 51.2 ( $C_{d'}$ ); 48.7 ( $C_{a'}$ ); 44.3 ( $C_d$ ); 28.1 ( $C_4$ ); 24.7 ( $C_c$  or  $C_{c'}$ ); 24.0 ( $C_1$ ,  $C_{2'}$ ); 21.6 ( $C_2$  or  $C_3$ ); 20.4 ( $C_2$  or  $C_3$ ); 19.4 ( $C_{3'}$ ); 18.1 ( $C_c$  or  $C_{c'}$ ).

**LC-MS (ESI)  $m/z$**  Calculated: 494.4, Found: 494.4 [ $M+H$ ] $^+$ .

**HR-MS:**  $m/z$  Calculated: 494.42172, Found: 494.41990 [ $M+H$ ] $^+$  =  $C_{31}H_{52}N_5$ .

**Purity:**  $C_4$  column:  $t_r$  = 16.7 min, purity = 95 %;  $C_{18}$  column:  $t_r$  = 16.4 min, purity = 99 %.



\* ***N*-Methoxy-*N*,2-dimethylpropanamide**

$C_6H_{13}NO_2$   
Mw: 131.17 g/mol

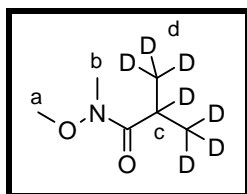
To a stirred solution of isobutyric acid (530  $\mu$ L, 5.68 mmol) in DCM (11 mL) was added *N*-methylmorpholine (4.06 mL, 36.9 mmol), EDC.HCl (1.40 g, 7.38 mmol), HOBT (1.0 g, 7.38 mmol) and *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride (1.16 g, 11.90 mmol). The mixture was stirred for 15 h. 5 mL of DCM were added to the reaction mixture and the organic layer was washed with saturated  $NaHCO_3$  solution (2 x 10 mL), HCl 1 M solution (2 x 10 mL) and brine (1 x 10 mL).

The organic layer was used without evaporation for the next step.

$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ): 3.69 (s, 3H,  $H_b$ ); 3.18 (s, 3H,  $H_a$ ); 2.96 (m, 1H,  $H_c$ ); 1.12 (d,  $J = 6.8$  Hz, 6H,  $H_d$ ).

$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ): 178.4 (CO); 61.4 ( $C_b$ ); 32.3 ( $C_a$ ); 29.8 ( $C_c$ ); 19.1 ( $C_d$ ).

LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated: 132.10, Found: 131.9  $[M+H]^+$ .

\* ***N*-Methoxy-2-( $^2H_3$ )methyl-*N*-methyl( $^2H_4$ )propanamide (143)**

$C_6H_6D_7NO_2$   
Mw: 138.21 g/mol

To a stirred solution of 2-( $^2H_3$ )methyl( $^2H_4$ )propanoic acid (**141**) (93  $\mu$ L, 1.00 mmol) in DCM (3.8 mL) was added *N*-méthylmorpholine (0.715 mL, 6.50 mmol), EDC.HCl (249 mg, 1.30 mmol), HOBT.H<sub>2</sub>O (175 mg, 1.30 mmol) and *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride (204 mg, 2.10 mmol). The mixture was stirred for 15 h. 5 mL of DCM were added to the reaction mixture and the organic layer was washed with saturated  $NaHCO_3$  solution (2 x 5 mL), HCl 1 M solution (2 x 5 mL) and brine (1 x 5 mL).

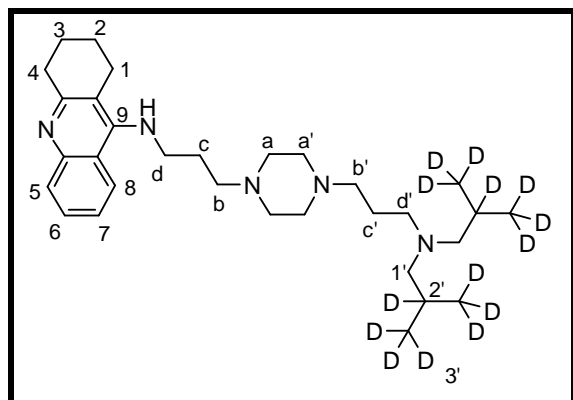
The organic layer was used without evaporation or purification for the next step.

$^1H$  NMR (300 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ): 3.70 (s, 3H,  $H_b$ ); 3.19 (s, 3H,  $H_a$ ).

$^{13}C$  NMR (75 MHz),  $\delta$  (ppm,  $CDCl_3$ ): 178.3 (CO); 61.4 ( $C_b$ ); 32.3 ( $C_a$ ); 29.1 ( $C_c$ ); 18.3 ( $C_d$ ).

LC-MS (ESI)  $m/z$  Calculated: 139.2, Found: 139.8  $[M+H]^+$ .

\* ***N*-[3-(4-(3-[Bis(2-methylpropyl)amino]propyl)piperazin-1-yl)propyl]-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (RPEL-d<sub>14</sub>)**



C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>D<sub>14</sub>N<sub>5</sub>  
Mw: 507.86 g/mol

To a solution of *N*-methoxy-2-(<sup>2</sup>H<sub>3</sub>)methyl-*N*-methyl(<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)propanamide (**143**) in DCM (5 mL, 1.00 mmol) was added LiAlH<sub>4</sub> (0.9 mL, 0.9 mmol). The mixture was stirred for 1 h. Saturated KHSO<sub>4</sub> solution (4.2 mL) was added dropwise. 5 mL of DCM were added and the organic layer was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (2 x 5 mL), HCl 1 M solution (2 x 5 mL) and brine (1 x 5 mL). The organic layer was dried and filtered.

To the organic layer was added *N*-(3-[4-(3-aminopropyl)piperazin-1-yl]propyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine (**140**) (80 mg, 0.21 mmol). The mixture was stirred for 1 h and NaBH(OAc)<sub>3</sub> (190 mg, 0.90 mmol) was added. The mixture was stirred for 15 h. 5 mL of saturated NaHCO<sub>3</sub> solution was added and the mixture was stirred for 1 h. The layers were separated and the organic layer was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (2 x 5 mL). The organic layer was dried and evaporated. The residue was purified by flash chromatography (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>) 10:0 to 9.5:0.5 (v/v)).

The title compound (36 mg, 0.70 mmol, 34 % yield) was obtained as a colourless oil.

**TLC (DCM/MeOH(NH<sub>3</sub>), 9.5:0.5, v/v):** R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 8.04 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 0.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>); 7.90 (dd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 0.7 Hz, 1H, H<sub>8</sub>); 7.54 (ddd, *J* = 8.2 Hz, *J* = 6.8 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H, H<sub>7</sub>); 7.32 (ddd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 6.8 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 5.27 (br s, 1H, NH); 3.59 (m, 2H, H<sub>d</sub>); 3.07 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, H<sub>a</sub>); 2.73 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, H<sub>1</sub>); 2.57-2.40 (M, 14H, H<sub>a</sub>, H<sub>a'</sub>, H<sub>b</sub>, H<sub>b'</sub>, H<sub>d'</sub>); 2.04 (s, 4H, H<sub>e'</sub>); 1.96-1.82 (M, 6H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>c</sub>); 0.92 (m, 2H, H<sub>c'</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (75 MHz), δ (ppm, CDCl<sub>3</sub>):** 158.3 (C<sub>aro</sub>); 151.2 (C<sub>aro</sub>); 147.3 (C<sub>aro</sub>); 128.6 (C<sub>1</sub>); 128.2 (C<sub>2</sub>); 123.4 (C<sub>3</sub>); 123.1 (C<sub>4</sub>); 120.2 (C<sub>aro</sub>); 115.8 (C<sub>aro</sub>); 63.7 (C<sub>1'</sub>); 57.4 (C<sub>b</sub>, C<sub>b'</sub>); 53.5 (C<sub>a</sub>, C<sub>a'</sub>); 49.2 (C<sub>d</sub>, C<sub>d'</sub>); 33.9 (C<sub>4</sub>); 27.2 (C<sub>c</sub>, C<sub>2'</sub>); 25.8 (C<sub>1</sub>); 22.9 (C<sub>c'</sub>); 20.4 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>); 19.4 (C<sub>3'</sub>).

**LC-MS (ESI) *m/z* Calculated:** 508.50, Found: 508.4 [M+H]<sup>+</sup>, 254.8[(M+2H)/2]<sup>+</sup>.

**HR-MS:** *m/z* Calculated: 508.50960, Found: 508.50793 [M+H]<sup>+</sup> = C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>D<sub>14</sub>N<sub>5</sub>.

**Purity:** C<sub>4</sub> column: t<sub>r</sub> = 16.4 min, purity = 96 %; C<sub>18</sub> column: t<sub>r</sub> = 20.0 min, purity = 95 %.

## ***B. Biological evaluation***

### **1. Cell Culture and Treatment**

The human neuroblastoma cell line SKNSH-SYSY (SY5Y) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10 % fetal calf serum (PAA), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 1 mM non-essential amino acids, and penicillin/streptomycin (Invitrogen), in a 5 % CO<sub>2</sub> humidified incubator at 37°C. The human APP695 cDNA was subcloned into eukaryotic expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen), allowing for G418 antibiotic selection of stable clones. This APP cDNA was transfected into SY5Y cells using the ethylenimine polymer ExGen 500 (Euromedex) according to the manufacturer's instructions. SY5Y cells stably expressing the APP695 were selected with Geneticin G418 (Invitrogen), and one clone named SY5Y-APP<sup>wt</sup> was used here.

For treatment, SY5Y-APP<sup>wt</sup> cells were plated onto 12-well plates (Falcon) 24 h before drug exposure, and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10 % fetal calf serum (PAA), 2 mM L-glutamine (Invitrogen), 1 mM non-essential amino acids (Invitrogen), 50 units/mL penicillin/streptomycin (Invitrogen), and 200 µg of Geneticin G418 (Invitrogen), under 5 % CO<sub>2</sub> at 37°C. Cells were exposed to drugs at the indicated concentrations for 24 h. After treatment, the conditioned medium was collected, spun at 200 g to eliminate the cell debris and frozen at -80°C for Aβ<sub>1-42</sub> and Aβ<sub>1-40</sub> quantification. Treated SY5Y-APP<sup>wt</sup> cells were collected in 50 µL of Laemmli lysis buffer, sonicated for 5 min, and stored at -80°C until use. Total protein quantification of extracted samples was performed by using the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol.

### **2. Cytotoxicity assay**

SY5Y cells were seeded at 2000 cells per well onto 96-well plates in DMEM medium. Cells were starved for 24 h to obtain synchronous cultures, and were then incubated in culture medium that contained various concentrations of test compounds, each dissolved in less than 0.1 % DMSO. After 72 h of incubation, cell growth was estimated by the colorimetric MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide) assay.

### **3. Western Blot Analysis**

Samples were heated at 85°C for 2 min with reducing agent (Life Technologies), and equal quantities of total proteins (20 µg/lane) were resolved in NuPAGE Novex 16 % Tris-Tricine precast gels (Life Technologies). After electrophoresis, the proteins were transferred onto 0.2 µM PVDF membranes (Life Technologies) for 1 h at 20°C using the liquid transfer system (Life Technologies). Membranes were blocked with 5 % skim milk in TNT (15 mM Tris buffer pH 8.4, 140 mM NaCl, 0.05 % Tween-20) for 1 h at 20°C. After washing three times, the membranes were incubated with APP<sup>Cter</sup>-C17 rabbit antiserum diluted 1:4000 in TNT overnight at 4°C. APP<sup>Cter</sup>-C17 was raised against the last 17 amino acids of the human APP sequence. To develop the immunoreaction, the blots were incubated with peroxidase-conjugated purified mouse monoclonal anti-rabbit IgG (Sigma A 9452, mAb clone), 1:10 000 in TNT-M, for 1 h at 20°C, and developed with SuperSignal West PicoChemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). Membranes were scanned with a LAS-4000 mini Image System. AICD fragment (8 kDa) and CTF $\alpha$  (12 kDa) were detected. Images were obtained with a time exposure from 10 to 320 s. Each image was opened with the Adobe Photo Shop CS2 (version 9.0.2) computer program, a compose containing all WB bands was created for analysis. Band quantification was performed by using the ImageJ 1.37v computer program. Each band was transformed in a plot, and the area under the curve was calculated. Results were expressed as arbitrary units of optical density. Membranes were then rinsed for 30 min at 20°C and reprobated with a goat

polyclonal antibody against  $\alpha$ -actin, Histone H3, or neuron specific enolase (1:1000; Santa Cruz Biotechnology). In vitro results are shown as the concentrations of compound able to double ( $C_2$ ) or multiply 10-fold ( $C_{10}$ ) the quantity of AICD or CFT $\alpha$  quantified by ImageJ.

#### 4. Secreted A $\beta_{1-38}$ , A $\beta_{1-40}$ , A $\beta_{1-42}$ , and sAPP $\alpha$ Quantification

Conditioned medium was used to determine the secreted A $\beta_{1-38}$ , A $\beta_{1-40}$ , and A $\beta_{1-42}$  concentrations, using the human A $\beta_{(1-40)}$  and A $\beta_{(1-38)}$  assay kits (IBL) and the Life Technologies beta-amyloid (1-42) ELISA kit (Innogenetics). Each sample was loaded in duplicate onto a 96 well plate. Experiments were done in triplicate. Results expressed in nanograms per milliliter were compared to control conditions arbitrarily given an average value of 100 %. Results are presented as IC<sub>50</sub>, the concentration that allows to decrease to 50 % the basal quantity of secreted A $\beta$  peptide 1-38, 1-40, and 1-42.

#### 5. STD NMR experiments

Samples used for the STD NMR experiments were prepared using 0.01 M phosphate buffer saline (NaCl 0.138 M, KCl 0.0027 M) in D<sub>2</sub>O, p97/VCP in PBS buffer, the appropriate ligand at a concentration of 10 nM in D<sub>2</sub>O, TCEP at a concentration of 5 mM in D<sub>2</sub>O and if necessary adenosine 5'-( $\beta,\gamma$ -imido)triphosphate lithium salt hydrate at a concentration of 100 nM in D<sub>2</sub>O. The NMR tubes were prepared by adding 4  $\mu$ L of the ligand solution, 20  $\mu$ L of TCEP, the appropriate volume of protein and the volume was completed to 200  $\mu$ L with the PBS buffer to a 3 mm NMR tube.

NMR were performed at 298 K on Bruker Avance I 500 MHz equipped with TXI 5 mm probe. STD experiments were recorded using pulse program stddiffgp19, with 7 200 scans using relaxation delay of 2 s. The off-resonance pulse of the reference experiment was applied at a frequency of 5 500 Hz. The frequency of the on-resonance pulse of the STD experiment was adapted depending on the studied compound. Watergate experiments were recorded using pulse program p3919gp, with 160 scans using relaxation delay of 1 s.

### C. LC-MRM

#### 1. Brain extraction

The dilutions in mice brains were carried out following this procedure: brains were defrosted and crushed in Eppendorfs. 50 mg of brain were weighted in Eppendorfs from Grinding Kit GE Healthcare. 500  $\mu$ L of HCl 1 % was added and the mixture was crushed until obtaining a solution. The appropriate quantity of internal standard was added. The Eppendorfs were centrifuged for 10 min at 4°C at 14 000 tr/min. 450  $\mu$ L of the solution recovered and placed on PP tubes of 5 mL. 4.5 mL of ACN at -20°C was added. Tubes were stirred for 30 s and placed 1 h at -20°C. The tubes were centrifuged for 10 min at 4°C at 4 000 tr/min. The final solution was put in 5 mL PP tubes and the solvent was evaporated under N<sub>2</sub> at 50°C. The residue was dissolved in CAN and evaporated. The final residue was dissolved in 200  $\mu$ L of MeOH, filtrated and placed in PP vials for analysis.

#### 2. Analysis

LC-MS/MS analysis was performed on a UFLC-XR device (Shimadzu) coupled to a QTRAP® 5500 MS/MS hybrid system triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (AB Sciex, Foster City, CA, USA) equipped with a Turbo VTM ion source. Instrument control, data acquisition and processing were performed using the associated Analyst 1.5.2 software. The RPLC separation was carried out on a ACE 3 C18 column (100x2.1 mm, 3  $\mu$ m, 100 Å) with guard cartridge from AIT-France. The injection volume was 2  $\mu$ L.

Elution was performed at a flow rate of 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  with water-formic acid 0.1 % as eluent A and Methanol-formic acid 0.1 % as eluent B, employing a 1 min plateau with 0 % B and a linear gradient from 0 % B to 50 % B in 5 min, followed by a 1 min plateau with 50 % B. Then, column re-equilibration was performed for 1 min. The injection duty cycle was 9 min, taking into account the column equilibration time.

MS analysis was carried out in positive ionization mode using an ion spray voltage of 5000 V. The nebulizer and the curtain gas flows were set at 30 psi using nitrogen. The Turbo VTM ion source was set at 500°C with the auxiliary gas flow (air) set at 50 psi.

The following MRM (Multiple Reaction Monitoring) transitions were monitored with a dwell time of 200 ms:

RPEL 88: 494.5/365.3 and 494.5/184.2

RPEL 88- $\text{d}_{14}$  (deuterated Internal Standard): 508.5/365.3 and 508.5/184.2.

The collision energy was 43 eV for all these transitions.

## **Bibliographie**

1. Forman, M. S.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y., Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat. Med.*, **2004**, 10, 1055-1063.
2. Taylor, J. P.; Hardy, J.; Fischbeck, K. H., Toxic Proteins in Neurodegenerative Disease. *Science*, **2002**, 296, 1991-1995.
3. Shastry, B. S., Neurodegenerative disorders of protein aggregation. *Neurochem. Int.*, **2003**, 43, 1-7.
4. Ross, C. A.; Poirier, M. A., Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.*, **2004**, 10, S10-S17.
5. Brettschneider, J.; Tredici, K. D.; Lee, V. M. Y.; Trojanowski, J. Q., Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2015**, 16, 109-120.
6. Maurer, K.; Volk, S.; Gerbaldo, H., Auguste D and Alzheimer's disease. *The Lancet*, **1997**, 349, 1546-1549.
7. Association France Alzheimer, Alzheimer - Comprendre la maladie. <http://www.francealzheimer.org/comprendre-la-maladie> (28/05/2015)
8. Alzheimer.org, Alzheimer's and dementia. [http://www.alz.org/alzheimers\\_disease\\_1973.asp](http://www.alz.org/alzheimers_disease_1973.asp) (28/05/2015)
9. Förstl, H.; Kurz, A., Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur. Arch. Psyc. Clin. N.*, **1999**, 249, 288-290.
10. Almkvist, O., Neuropsychological features of early Alzheimer's disease: preclinical and clinical stages. *Acta Neurol. Scand.*, **1996**, 94, 63-71.
11. Braak, H.; Braak, E., Frequency of Stages of Alzheimer-Related Lesions in Different Age Categories. *Neurobiol. Aging*, **1997**, 18, 351-357.
12. Cacabelos, R., Diagnosis of Alzheimer's disease: defining genetic profiles (genotype vs phenotype). *Acta Neurol. Scand.*, **1996**, 94, 72-84.
13. Alzheimer's Disease International *World Alzheimer Report 2009*; **2009**.
14. Goldgaber, D.; Lerman, M.; McBride, O.; Saffiotti, U.; Gajdusek, D., Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science*, **1987**, 235, 877-880.
15. Vingtdeux, V.; Sergeant, N.; Buee, L., Potential contribution of exosomes to the prion-like propagation of lesions in Alzheimer's disease. *Front. Physiol.*, **2012**, 3, 1-16.
16. Querfurth, H. W.; LaFerla, F. M., Alzheimer's Disease. *New Engl. J. Med.*, **2010**, 362, 329-344.
17. Sisodia, S. S.; Price, D. L., Role of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *FASEB J.*, **1995**, 9, 366-70.
18. Checler, F.; Alves da Costa, C.; Dumanchin-Njock, C.; Lopez-Perez, E.; Marambaud, P.; Paitel, E.; Petit, A.; Vincent, B., Métabolisme du précurseur du peptide amyloïde et présénilines. *Med. Sci.*, **2002**, 18, 117-124.
19. Burdick, D.; Soreghan, B.; Kwon, M.; Kosmoski, J.; Knauer, M.; Henschen, A.; Yates, J.; Cotman, C.; Glabe, C., Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 546-554.
20. Gandy, S., The role of cerebral amyloid  $\beta$  accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.*, **2005**, 115, 1121-1129.
21. Karran, E.; Mercken, M.; Strooper, B. D., The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2011**, 10, 698-712.
22. Saito, T.; Suemoto, T.; Brouwers, N.; Slegers, K.; Funamoto, S.; Mihira, N.; Matsuba, Y.; Yamada, K.; Nilsson, P.; Takano, J.; Nishimura, M.; Iwata, N.; Van Broeckhoven, C.; Ihara, Y.; Saido, T. C., Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A[ $\beta$ ]<sub>43</sub>. *Nat. Neurosci.*, **2011**, 14, 1023-1032.
23. Jucker, M.; Walker, L. C., Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Ann. Neurol.*, **2011**, 70, 532-540.

24. Mazanetz, M. P.; Fischer, P. M., Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2007**, 6, 464-479.
25. Wang, J.-Z.; Liu, F., Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Prog. Neurobiol.*, **2008**, 85, 148-175.
26. Ittner, L. M.; Götz, J., Amyloid- $\beta$  and tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2011**, 12, 67-72.
27. Cummings, J. L., Alzheimer's Disease. *New Engl. J. Med.*, **2004**, 351, 56-67.
28. Gotz, J.; Streffer, J. R.; David, D.; Schild, A.; Hoerndli, F.; Pennanen, L.; Kurosinski, P.; Chen, F., Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. *Mol. Psy.*, **2004**, 9, 664-683.
29. Rapoport, M.; Dawson, H. N.; Binder, L. I.; Vitek, M. P.; Ferreira, A., Tau is essential to  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 6364-6369.
30. Roberson, E. D.; Scarce-Levie, K.; Palop, J. J.; Yan, F.; Cheng, I. H.; Wu, T.; Gerstein, H.; Yu, G.-Q.; Mucke, L., Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid  $\beta$ -Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Science*, **2007**, 316, 750-754.
31. Ittner, L. M.; Ke, Y. D.; Delerue, F.; Bi, M.; Gladbach, A.; van Eersel, J.; Wölfing, H.; Chieng, B. C.; Christie, M. J.; Napier, I. A.; Eckert, A.; Staufienbiel, M.; Hardeman, E.; Götz, J., Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- $\beta$  Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models. *Cell*, **2010**, 142, 387-397.
32. Rhein, V.; Song, X.; Wiesner, A.; Ittner, L. M.; Baysang, G.; Meier, F.; Ozmen, L.; Bluethmann, H.; Dröse, S.; Brandt, U.; Savaskan, E.; Czech, C.; Götz, J.; Eckert, A., Amyloid- $\beta$  and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, 106, 20057-20062.
33. Snyder, E. M.; Nong, Y.; Almeida, C. G.; Paul, S.; Moran, T.; Choi, E. Y.; Nairn, A. C.; Salter, M. W.; Lombroso, P. J.; Gouras, G. K.; Greengard, P., Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- $\beta$ . *Nat. Neurosci.*, **2005**, 8, 1051-1058.
34. Hsieh, H.; Boehm, J.; Sato, C.; Iwatsubo, T.; Tomita, T.; Sisodia, S.; Malinow, R., AMPAR Removal Underlies A $\beta$ -Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss. *Neuron*, **2006**, 52, 831-843.
35. Kar, S.; Slowikowski, S. P. M.; Westaway, D.; Mount, H. T. J., Interactions between  $\beta$ -amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J. Psychiatry Neurosci.*, **2004**, 29, 427-441.
36. Selkoe, D. J., Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science*, **2002**, 298, 789-791.
37. Castellani, R.; Hirai, K.; Aliev, G.; Drew, K. L.; Nunomura, A.; Takeda, A.; Cash, A. D.; Obrenovich, M. E.; Perry, G.; Smith, M. A., Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.*, **2002**, 70, 357-360.
38. Lin, M. T.; Beal, M. F., Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, **2006**, 443, 787-795.
39. Reddy, P. H.; Beal, M. F., Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.*, **2008**, 14, 45-53.
40. Heppner, F. L.; Ransohoff, R. M.; Becher, B., Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2015**, 16, 358-372.
41. Eikelenboom, P.; Bate, C.; Van Gool, W. A.; Hoozemans, J. J. M.; Rozemuller, J. M.; Veerhuis, R.; Williams, A., Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. *Glia*, **2002**, 40, 232-239.
42. Heneka, M. T.; Carson, M. J.; Khoury, J. E.; Landreth, G. E.; Brosseron, F.; Feinstein, D. L.; Jacobs, A. H.; Wyss-Coray, T.; Vitorica, J.; Ransohoff, R. M.; Herrup, K.; Frautschy, S. A.; Finsen, B.; Brown, G. C.; Verkhratsky, A.; Yamanaka, K.; Koistinaho, J.; Latz, E.; Halle, A.; Petzold, G. C.; Town, T.; Morgan, D.; Shinohara, M. L.; Perry, V. H.; Holmes, C.; Bazan, N. G.; Brooks, D. J.; Hunot, S.; Joseph, B.; Deigendesch, N.; Garaschuk, O.; Boddeke, E.; Dinarello, C. A.; Breitner, J. C.; Cole, G. M.; Golenbock, D. T.; Kummer, M. P., Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*, **2015**, 14, 388-405.
43. Heneka, M.; O'Banion, M. K.; Terwel, D.; Kummer, M., Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.*, **2010**, 117, 919-947.



44. Hensley, K., Neuroinflammation in Alzheimer's disease: mechanisms, pathologic consequences, and potential for therapeutic manipulation. *J. Alzheimers Dis.*, **2010**, 21, 1-14.
45. Rogers, S. L.; Doody, R. S.; Pratt, R. D.; Leni, J. R., Long-term efficacy and safety of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease: final analysis of a US multicentre open-label study. *Eur. Neuropsychopharm.*, **2000**, 10, 195-203.
46. Marcusson, J.; Bullock, R.; Gauthier, S.; Kurz, A.; Schwalen, S., Galantamine demonstrates efficacy and safety in elderly patients with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, **2003**, 17 S3, S86-S91.
47. Rösler, M.; Bayer, T.; Anand, R.; Cicin-Sain, A.; Gauthier, S.; Agid, Y.; Dal-Bianco, P.; Stähelin, H. B.; Hartman, R.; Gharabawi, M., Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial. *Brit. Med. J.*, **1999**, 318, 633-640.
48. Racchi, M.; Mazzucchelli, M.; Porrello, E.; Lanni, C.; Govoni, S., Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacol. Res.*, **2004**, 50, 441-451.
49. Zangara, A., The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Be.*, **2003**, 75, 675-686.
50. Ashani, Y.; Peggins Iii, J. O.; Doctor, B. P., Mechanism of inhibition of cholinesterases by huperzine A. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **1992**, 184, 719-726.
51. Parsons, C. G.; Danysz, W.; Quack, G., Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor antagonist—a review of preclinical data. *Neuropharmacology*, **1999**, 38, 735-767.
52. Lord, T. R.; Garner, J. E., Effects of music on Alzheimer patients. *Percept. Motor Skill*, **1993**, 76, 451-455.
53. Anand, R.; Gill, K. D.; Mahdi, A. A., Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*, **2014**, 76, 27–50.
54. Bhattacharya, S.; Maelicke, A.; Montag, D., Nasal Application of the Galantamine Pro-drug Memogain Slows Down Plaque Deposition and Ameliorates Behavior in 5X Familial Alzheimer's Disease Mice. *J. Alzheimers Dis.*, **2015**, 46, DOI: 10.3233/JAD-142421
55. Maelicke, A.; Hoeffle-Maas, A.; Ludwig, J.; Maus, A.; Samochocki, M.; Jordis, U.; Koepke, A. E., Memogain is a Galantamine Pro-drug having Dramatically Reduced Adverse Effects and Enhanced Efficacy. *J. Mol. Neurosci.*, **2010**, 40, 135-137.
56. Baakman, A. C.; Klaassen, E.; Kay, D.; Maelicke, A.; Groeneveld, G. J., Effect on memory and attention of two doses of memogain, a prodrug of galantamine, in healthy subjects. *Alzheimers Dement.*, **2014**, 10, P449-P450.
57. Bhattacharya, S.; Montag, D., Acetylcholinesterase inhibitor modifications: a promising strategy to delay the progression of Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, **2015**, 10, 43-45.
58. Moss, D. E.; Berlanga, P.; Hagan, M. M.; Sandoval, H.; Ishida, C., Methanesulfonyl fluoride (MSF): a double-blind, placebo-controlled study of safety and efficacy in the treatment of senile dementia of the Alzheimer type. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, **1999**, 13, 20-25.
59. Moss, D. E.; Fariello, R. G.; Sahlmann, J.; Sumaya, I.; Pericle, F.; Braglia, E., A randomized phase I study of methanesulfonyl fluoride, an irreversible cholinesterase inhibitor, for the treatment of Alzheimer's disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **2013**, 75, 1231-1239.
60. Mangialasche, F.; Solomon, A.; Winblad, B.; Mecocci, P.; Kivipelto, M., Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol.*, **2010**, 9, 702-716.
61. Hock, C.; Maddalena, A.; Heuse, r. I.; Naber, D.; Oertel, W.; von der Kammer, H.; Wienrich, M.; Raschig, A.; Deng, M.; Growdon, J.; Nitsch, R. M., Treatment with the selective muscarinic agonist talsaclidine decreases cerebrospinal fluid levels of total amyloid beta-peptide in patients with Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2000**, 920, 285-291.
62. Dunbar, G. C.; Inglis, F.; Kuchibhatla, R.; Sharma, T.; Tomlinson, M.; Wamsley, J., Effect of ispronicline, a neuronal nicotinic acetylcholine receptor partial agonist, in subjects with age associated memory impairment (AAMI). *J. Psychopharmacol.*, **2007**, 21, 171-178.
63. Braudeau, J.; Delatour, B.; Duchon, A.; Pereira, P. L.; Dauphinot, L.; de Chaumont, F.; Olivo-Marin, J.-C.; Dodd, R.; Héroult, Y.; Potier, M.-C., Specific targeting of the GABA-A receptor  $\alpha 5$  subtype by a selective

- inverse agonist restores cognitive deficits in Down syndrome mice. *J. Psychopharmacol.*, **2011**, 25, 1030-1042.
64. Potter, A. S.; Dunbar, G.; Mazzulla, E.; Hosford, D.; Newhouse, P. A., AZD3480, a Novel Nicotinic Receptor Agonist, for the Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Adults. *Biol. Psychiat.*, **2014**, 75, 207-214.
65. Dunbar, G. C.; Kuchibhatla, R. V.; Lee, G.; Group, f. t. T.-A. C. S., A randomized double-blind study comparing 25 and 50 mg TC-1734 (AZD3480) with placebo, in older subjects with age-associated memory impairment. *J. Psychopharmacol.*, **2011**, 25, 1020-1029.
66. Barten, D.; Albright, C., Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*, **2008**, 37, 171-186.
67. Engel, T.; Goñi-Oliver, P.; Lucas, J. J.; Avila, J.; Hernández, F., Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3 $\beta$  overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J. Neurochem.*, **2006**, 99, 1445-1455.
68. Chen, G.; Huang, L.-D.; Jiang, Y.-M.; Manji, H. K., The Mood-Stabilizing Agent Valproate Inhibits the Activity of Glycogen Synthase Kinase-3. *J. Neurochem.*, **1999**, 72, 1327-1330.
69. del Ser, T.; Steinwachs, K. C.; Gertz, H. J.; Andres, M. V.; Gomez-Carrillo, B.; Medina, M.; Vericat, J. A.; Redondo, P.; Fleet, D.; Leon, T., Treatment of Alzheimer's disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: a pilot study. *J. Alzheimers Dis.*, **2013**, 33, 205-15.
70. Tolosa, E.; Litvan, I.; Höglinger, G. U.; Burn, D.; Lees, A.; Andrés, M. V.; Gómez-Carrillo, B.; León, T.; del Ser, T.; for the, T. I., A phase 2 trial of the GSK-3 inhibitor tideglusib in progressive supranuclear palsy. *Movement Disord.*, **2014**, 29, 470-478.
71. Zhang, B.; Maiti, A.; Shively, S.; Lakhani, F.; McDonald-Jones, G.; Bruce, J.; Lee, E. B.; Xie, S. X.; Joyce, S.; Li, C.; Toleikis, P. M.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q., Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, 227-231.
72. Erez, H.; Shemesh, O. A.; Spira, M. E., Rescue of tau-induced synaptic transmission pathology by paclitaxel. *Front. Cell. Neurosci.*, **2014**, 8, 34.
73. Congdon, E. E.; Wu, J. W.; Myeku, N.; Figueroa, Y. H.; Herman, M.; Marinec, P. S.; Gestwicki, J. E.; Dickey, C. A.; Yu, W. H.; Duff, K. E., Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy in vitro and in vivo. *Autophagy*, **2012**, 8, 609-622.
74. Pfaffendorf, M.; Bruning, T. A.; Batink, H. D.; Van Zwieten, P. A., The interaction between methylene blue and the cholinergic system. *Brit. J. Pharmacol.*, **1997**, 122, 95-98.
75. Atamna, H.; Nguyen, A.; Schultz, C.; Boyle, K.; Newberry, J.; Kato, H.; Ames, B. N., Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways. *FASEB J.*, **2008**, 22, 703-712.
76. Wischik, C. M.; Bentham, P.; Wischik, D. J.; Seng, K. M., Tau aggregation inhibitor (TAI) therapy with rember™ arrests disease progression in mild and moderate Alzheimer's disease over 50 weeks. *Alzheimers Dement.*, **2008**, 4, T167.
77. Ghezzi, L.; Scarpini, E.; Galimberti, D., Disease-modifying drugs in Alzheimer's disease. *Drug Des. Dev. Ther.*, **2013**, 7, 1471-1479.
78. Dickey, C. A.; Kamal, A.; Lundgren, K.; Klosak, N.; Bailey, R. M.; Dunmore, J.; Ash, P.; Shoraka, S.; Zlatkovic, J.; Eckman, C. B.; Patterson, C.; Dickson, D. W.; Nahman, N. S., Jr.; Hutton, M.; Burrows, F.; Petrucelli, L., The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *J. Clin. Invest.*, **2007**, 117, 648-658.
79. Giommarelli, C.; Zuco, V.; Favini, E.; Pisano, C.; Dal Piaz, F.; Tommasi, N.; Zunino, F., The enhancement of antiproliferative and proapoptotic activity of HDAC inhibitors by curcumin is mediated by Hsp90 inhibition. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2010**, 67, 995-1004.
80. Ma, Q.-L.; Zuo, X.; Yang, F.; Ubeda, O. J.; Gant, D. J.; Alaverdyan, M.; Teng, E.; Hu, S.; Chen, P.-P.; Maiti, P.; Teter, B.; Cole, G. M.; Frautschy, S. A., Curcumin Suppresses Soluble Tau Dimers and Corrects Molecular Chaperone, Synaptic, and Behavioral Deficits in Aged Human Tau Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288, 4056-4065.

81. Zhao, H.; Michaelis, M. L.; Blagg, B. S. J., Hsp90 Modulation for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Adv. Pharmacol.*, **2012**, 64, 1-25.
82. Blair, L. J.; Zhang, B.; Dickey, C. A., Potential synergy between tau aggregation inhibitors and tau chaperone modulators. *Alzheimers Res. Ther.*, **2013**, 5, 41.
83. Boimel, M.; Grigoriadis, N.; Lourbopoulos, A.; Haber, E.; Abramsky, O.; Rosenmann, H., Efficacy and safety of immunization with phosphorylated tau against neurofibrillary tangles in mice. *Exp. Neurol.*, **2010**, 224, 472-485.
84. Chai, X.; Wu, S.; Murray, T. K.; Kinley, R.; Cella, C. V.; Sims, H.; Buckner, N.; Hanmer, J.; Davies, P.; O'Neill, M. J.; Hutton, M. L.; Citron, M., Passive Immunization with Anti-Tau Antibodies in Two Transgenic Models: Reduction of tau pathology and delay of disease progression. *J. Biol. Chem.*, **2011**, 286, 34457-34467.
85. Boutajangout, A.; Ingadottir, J.; Davies, P.; Sigurdsson, E. M., Passive immunization targeting pathological phospho-tau protein in a mouse model reduces functional decline and clears tau aggregates from the brain. *J. Neurochem.*, **2011**, 118, 658-667.
86. Pedersen, J. T.; Sigurdsson, E. M., Tau immunotherapy for Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.*, **2015**, 21, 394-402.
87. Smith, A.; Giunta, B.; Bickford, P. C.; Fountain, M.; Tan, J.; Shytle, R. D., Nanolipidic particles improve the bioavailability and  $\alpha$ -secretase inducing ability of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for the treatment of Alzheimer's disease. *Int. J. Pharm.*, **2010**, 389, 207-212.
88. Wobst, H. J.; Sharma, A.; Diamond, M. I.; Wanker, E. E.; Bieschke, J., The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate prevents the aggregation of tau protein into toxic oligomers at substoichiometric ratios. *FEBS Lett.*, **2015**, 589, 77-83.
89. Imbimbo, B. P., Why did tarenflurbil fail in Alzheimer's disease? , *J. Alzheimers Dis.*, **2009**, 17, 757-760.
90. Imbimbo, B. P.; Panza, F.; Frisardi, V.; Solfrizzi, V.; D'Onofrio, G.; Logroscino, G.; Seripa, D.; Pilotto, A., Therapeutic intervention for Alzheimer's disease with  $\gamma$ -secretase inhibitors: still a viable option? , *Expert Opin. Investig. Drugs*, **2011**, 20, 325-341.
91. May, P. C.; Willis, B. A.; Lowe, S. L.; Dean, R. A.; Monk, S. A.; Cocke, P. J.; Audia, J. E.; Boggs, L. N.; Borders, A. R.; Brier, R. A.; Calligaro, D. O.; Day, T. A.; Ereshefsky, L.; Erickson, J. A.; Gevorkyan, H.; Gonzales, C. R.; James, D. E.; Jhee, S. S.; Komjathy, S. F.; Li, L.; Lindstrom, T. D.; Mathes, B. M.; Martényi, F.; Sheehan, S. M.; Stout, S. L.; Timm, D. E.; Vaught, G. M.; Watson, B. M.; Winneroski, L. L.; Yang, Z.; Mergott, D. J., The Potent BACE1 Inhibitor LY2886721 Elicits Robust Central A $\beta$  Pharmacodynamic Responses in Mice, Dogs, and Humans. *J. Neurosci.*, **2015**, 35, 1199-1210.
92. Lahiri, D. K.; Maloney, B.; Long, J. M.; Greig, N. H., Lessons from a BACE1 inhibitor trial: Off-site but not off base. *Alzheimers Dement.*, **2014**, 10, S411-S419.
93. Aisen, P. S.; Gauthier, S.; Ferris, S. H.; Saumier, D.; Haine, D.; Garceau, D.; Duong, A.; Suhy, J.; Oh, J.; Lau, W. C.; Sampalis, J., Tramiprosate in mild-to-moderate Alzheimer's disease - a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre study (the Alphase Study). *Arch. Med. Sci.*, **2011**, 7, 102-111.
94. Caltagirone, C.; Ferrannini, L.; Marchionni, N.; Nappi, G.; Scapagnini, G.; Trabucchi, M., The potential protective effect of tramiprosate (homotaurine) against Alzheimer's disease: a review. *Aging Clin. Exp. Res.*, **2012**, 24, 580-587.
95. Saumier, D.; Duong, A.; Haine, D.; Garceau, D.; Sampalis, J., Domain-specific cognitive effects of tramiprosate in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: ADAS-cog subscale results from the Alphase study. *J. Nutr. Health Aging*, **2009**, 13, 808-812.
96. Gauthier, S.; Aisen, P. S.; Ferris, S. H.; Saumier, D.; Duong, A.; Haine, D.; Garceau, D.; Suhy, J.; Oh, J.; Lau, W.; Sampalis, J., Effect of tramiprosate in patients with mild-to-moderate alzheimer's disease: Exploratory analyses of the MRI sub-group of the alphase study. *J. Nutr. Health Aging*, **2009**, 13, 550-557.
97. Santa-Maria, I.; Hernandez, F.; Del Rio, J.; Moreno, F.; Avila, J., Tramiprosate, a drug of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, promotes an abnormal aggregation of tau. *Mol. Neurodegener.*, **2007**, 2, 17.

98. Orgogozo, J. M.; Gilman, S.; Dartigues, J. F.; Laurent, B.; Puel, M.; Kirby, L. C.; Jouanny, P.; Dubois, B.; Eisner, L.; Flitman, S.; Michel, B. F.; Boada, M.; Frank, A.; Hock, C., Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology*, **2003**, *61*, 46-54.
99. Sperling, R.; Salloway, S.; Brooks, D. J.; Tampieri, D.; Barakos, J.; Fox, N. C.; Raskind, M.; Sabbagh, M.; Honig, L. S.; Porsteinsson, A. P.; Lieberburg, I.; Arrighi, H. M.; Morris, K. A.; Lu, Y.; Liu, E.; Gregg, K. M.; Brashear, H. R.; Kinney, G. G.; Black, R.; Grundman, M., Amyloid-related imaging abnormalities in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a retrospective analysis. *Lancet Neurol.*, **2012**, *11*, 241-249.
100. Imbimbo, B. P.; Ottonello, S.; Frisardi, V.; Solfrizzi, V.; Greco, A.; Seripa, D.; Pilotto, A.; Panza, F., Solanezumab for the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, **2012**, *8*, 135-149.
101. Bohrmann, B.; Baumann, K.; Benz, J.; Gerber, F.; Huber, W.; Knoflach, F.; Messer, J.; Oroszlan, K.; Rauchenberger, R.; Richter, W. F.; Rothe, C.; Urban, M.; Bardroff, M.; Winter, M.; Nordstedt, C.; Loetscher, H., Gantenerumab: a novel human anti-Abeta antibody demonstrates sustained cerebral amyloid-beta binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid-beta. *J. Alzheimers Dis.*, **2012**, *28*, 49-69.
102. Jindal, H.; Bhatt, B.; Sk, S.; Singh Malik, J., Alzheimer disease immunotherapeutics: Then and now. *Hum. Vaccin. Immunother.*, **2014**, *10*, 2741-2743.
103. Farina, N.; Isaac, M. G.; Clark, A. R.; Rusted, J.; Tabet, N., Vitamin E for Alzheimer's dementia and mild cognitive impairment. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2012**, *11*.
104. Petersen, R. C.; Thomas, R. G.; Grundman, M.; Bennett, D.; Doody, R.; Ferris, S.; Galasko, D.; Jin, S.; Kaye, J.; Levey, A.; Pfeiffer, E.; Sano, M.; van Dyck, C. H.; Thal, L. J., Vitamin E and Donepezil for the Treatment of Mild Cognitive Impairment. *New Engl. J. Med.*, **2005**, *352*, 2379-2388.
105. Dysken, M. W.; Guarino, P. D.; Vertrees, J. E.; Asthana, S.; Sano, M.; Llorente, M.; Pallaki, M.; Love, S.; Schellenberg, G. D.; McCarten, J. R.; Malphurs, J.; Prieto, S.; Chen, P.; Loreck, D. J.; Carney, S.; Trapp, G.; Bakshi, R. S.; Mintzer, J. E.; Heidebrink, J. L.; Vidal-Cardona, A.; Arroyo, L. M.; Cruz, A. R.; Kowall, N. W.; Chopra, M. P.; Craft, S.; Thielke, S.; Turvey, C. L.; Woodman, C.; Monnell, K. A.; Gordon, K.; Tomaska, J.; Vatassery, G., Vitamin E and memantine in Alzheimer's disease: Clinical trial methods and baseline data. *Alzheimers Dement.*, **2013**, *10*, 36-44.
106. Lee, J.; Boo, J. H.; Ryu, H., The failure of mitochondria leads to neurodegeneration: Do mitochondria need a jump start? , *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2009**, *61*, 1316-1323.
107. Kelso, G. F.; Porteous, C. M.; Coulter, C. V.; Hughes, G.; Porteous, W. K.; Ledgerwood, E. C.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P., Selective Targeting of a Redox-active Ubiquinone to Mitochondria within Cells: Antioxidant and antiapoptotic properties. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 4588-4596.
108. McManus, M. J.; Murphy, M. P.; Franklin, J. L., The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ prevents loss of spatial memory retention and early neuropathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, **2011**, *31*, 15703-15715.
109. Breitner, J. C.; Baker, L. D.; Montine, T. J.; Meinert, C. L.; Lyketsos, C. G.; Ashe, K. H.; Brandt, J.; Craft, S.; Evans, D. E.; Green, R. C.; Ismail, M. S.; Martin, B. K.; Mullan, M. J.; Sabbagh, M.; Tariot, P. N., Extended results of the Alzheimer's disease anti-inflammatory prevention trial. *Alzheimers Dement.*, **2011**, *7*, 402-411.
110. Muñoz-Torrero, D., Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.*, **2008**, *15*, 2433-2455.
111. Anighoro, A.; Bajorath, J.; Rastelli, G., Polypharmacology: Challenges and Opportunities in Drug Discovery. *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, 7874-7887.
112. De Ferrari, G. V.; Canales, M. A.; Shin, I.; Weiner, L. M.; Silman, I.; Inestrosa, N. C., A Structural Motif of Acetylcholinesterase That Promotes Amyloid  $\beta$ -Peptide Fibril Formation<sup>†</sup>. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 10447-10457.
113. Rees, T. M.; Brimijoin, S., The role of acetylcholinesterase in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Drugs Today*, **2003**, *39*, 75-83.
114. Tang, H.; Zhao, L.-Z.; Zhao, H.-T.; Huang, S.-L.; Zhong, S.-M.; Qin, J.-K.; Chen, Z.-F.; Huang, Z.-S.; Liang, H., Hybrids of oxoisoaporphine-tacrine congeners: Novel acetylcholinesterase and acetylcholinesterase-induced  $\beta$ -amyloid aggregation inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, *46*, 4970-4979.

115. Özturan Özer, E.; Unsal Tan, O.; Ozadali, K.; Küçükkılınc, T.; Balkan, A.; Uçar, G., Synthesis, molecular modeling and evaluation of novel N'-2-(4-benzylpiperidin-/piperazin-1-yl)acylhydrazone derivatives as dual inhibitors for cholinesterases and A $\beta$  aggregation. *Bioorg. Med. Chem Lett.*, **2013**, 23, 440-443.
116. Catto, M.; Berezin, A. A.; Lo Re, D.; Loizou, G.; Demetriades, M.; De Stradis, A.; Campagna, F.; Koutentis, P. A.; Carotti, A., Design, synthesis and biological evaluation of benzo[e][1,2,4]triazin-7(1H)-one and [1,2,4]-triazino[5,6,1-jk]carbazol-6-one derivatives as dual inhibitors of beta-amyloid aggregation and acetyl/butyryl cholinesterase. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 58, 84-97.
117. Guzior, N.; ckowska, A. W.; Panek, D.; Malawska, B., Recent Development of Multifunctional Agents as Potential Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr. Med. Chem.*, **2015**, 22, 373-404.
118. Yan, J.-W.; Li, Y.-P.; Ye, W.-J.; Chen, S.-B.; Hou, J.-Q.; Tan, J.-H.; Ou, T.-M.; Li, D.; Gu, L.-Q.; Huang, Z.-S., Design, synthesis and evaluation of isaindigotone derivatives as dual inhibitors for acetylcholinesterase and amyloid beta aggregation. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 2527-2534.
119. Brunhofer, G.; Fallarero, A.; Karlsson, D.; Batista-Gonzalez, A.; Shinde, P.; Gopi Mohan, C.; Vuorela, P., Exploration of natural compounds as sources of new bifunctional scaffolds targeting cholinesterases and beta amyloid aggregation: The case of chelerythrine. *Bioorgan. Med. Chem.*, **2012**, 20, 6669-6679.
120. Bag, S.; Ghosh, S.; Tulsan, R.; Sood, A.; Zhou, W.; Schifone, C.; Foster, M.; LeVine Iii, H.; Török, B.; Török, M., Design, synthesis and biological activity of multifunctional  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl scaffolds for Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem Lett.*, **2013**, 23, 2614-2618.
121. Fernández-Bachiller, M. I.; Pérez, C.; Monjas, L.; Rademann, J.; Rodríguez-Franco, M. I., New Tacrine-4-Oxo-4H-chromene Hybrids as Multifunctional Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease, with Cholinergic, Antioxidant, and  $\beta$ -Amyloid-Reducing Properties. *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 1303-1317.
122. Galdeano, C.; Viayna, E.; Sola, I.; Formosa, X.; Camps, P.; Badia, A.; Clos, M. V.; Relat, J.; Ratia, M.; Bartolini, M.; Mancini, F.; Andrisano, V.; Salmona, M.; Minguillón, C.; González-Muñoz, G. C.; Rodríguez-Franco, M. I.; Bidon-Chanal, A.; Luque, F. J.; Muñoz-Torrero, D., Huprine-Tacrine Heterodimers as Anti-Amyloidogenic Compounds of Potential Interest against Alzheimer's and Prion Diseases. *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 661-669.
123. Peng, D.-Y.; Sun, Q.; Zhu, X.-L.; Lin, H.-Y.; Chen, Q.; Yu, N.-X.; Yang, W.-C.; Yang, G.-F., Design, synthesis, and bioevaluation of benzamides: Novel acetylcholinesterase inhibitors with multi-functions on butylcholinesterase, A $\beta$  aggregation, and  $\beta$ -secretase. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 6739-6750.
124. Mohamed, T.; Yeung, J. C. K.; Vasefi, M. S.; Beazely, M. A.; Rao, P. P. N., Development and evaluation of multifunctional agents for potential treatment of Alzheimer's disease: Application to a pyrimidine-2,4-diamine template. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, 22, 4707-4712.
125. Bolea, I.; Juárez-Jiménez, J.; de los Ríos, C.; Chioua, M.; Pouplana, R.; Luque, F. J.; Unzeta, M.; Marco-Contelles, J.; Samadi, A., Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Modeling of Donepezil and N-[(5-(Benzyloxy)-1-methyl-1H-indol-2-yl)methyl]-N-methylprop-2-yn-1-amine Hybrids as New Multipotent Cholinesterase/Monoamine Oxidase Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.*, **2011**, 54, 8251-8270.
126. Lu, C.; Zhou, Q.; Yan, J.; Du, Z.; Huang, L.; Li, X., A novel series of tacrine-selegiline hybrids with cholinesterase and monoamine oxidase inhibition activities for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2013**, 62, 745-753.
127. Sun, Y.; Chen, J.; Chen, X.; Huang, L.; Li, X., Inhibition of cholinesterase and monoamine oxidase-B activity by Tacrine-Homoisoflavonoid hybrids. *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, 21, 7406-7417.
128. Mishra, N.; Sasmal, D., Development of selective and reversible pyrazoline based MAO-B inhibitors: Virtual screening, synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, 21, 1969-1973.
129. Su, T.; Xie, S.; Wei, H.; Yan, J.; Huang, L.; Li, X., Synthesis and biological evaluation of berberine-thiophenyl hybrids as multi-functional agents: Inhibition of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and A $\beta$  aggregation and antioxidant activity. *Bioorgan. Med. Chem.*, **2013**, 21, 5830-5840.
130. Luo, W.; Li, Y.-P.; He, Y.; Huang, S.-L.; Li, D.; Gu, L.-Q.; Huang, Z.-S., Synthesis and evaluation of heterobivalent tacrine derivatives as potential multi-functional anti-Alzheimer agents. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, 46, 2609-2616.

131. Luo, Z.; Sheng, J.; Sun, Y.; Lu, C.; Yan, J.; Liu, A.; Luo, H.-b.; Huang, L.; Li, X., Synthesis and Evaluation of Multi-Target-Directed Ligands against Alzheimer's Disease Based on the Fusion of Donepezil and Ebselen. *J. Med. Chem.*, **2013**, 56, 9089-9099.
132. Yanovsky, I.; Finkin-Groner, E.; Zaikin, A.; Lerman, L.; Shalom, H.; Zeeli, S.; Weill, T.; Ginsburg, I.; Nudelman, A.; Weinstock, M., Carbamate Derivatives of Indolines as Cholinesterase Inhibitors and Antioxidants for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 10700-10715.
133. Fang, L.; Gou, S.; Liu, X.; Cao, F.; Cheng, L., Design, synthesis and anti-Alzheimer properties of dimethylaminomethyl-substituted curcumin derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, 24, 40-43.
134. Lecoutey, C.; Hedou, D.; Freret, T.; Giannoni, P.; Gaven, F.; Since, M.; Bouet, V.; Ballandonne, C.; Corvaisier, S.; Malzert Fréon, A.; Mignani, S.; Cresteil, T.; Boulouard, M.; Claeysen, S.; Rochais, C.; Dallemagne, P., Design of donecopride, a dual serotonin subtype 4 receptor agonist/acetylcholinesterase inhibitor with potential interest for Alzheimer's disease treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2014**, 111, E3825-E3830.
135. Golde, T.; Estus, S.; Younkin, L.; Selkoe, D.; Younkin, S., Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science*, **1992**, 255, 728-730.
136. Vingtdeux, V.; Hamdane, M.; Bégard, S.; Loyens, A.; Delacourte, A.; Beauvillain, J.-C.; Buée, L.; Marambaud, P.; Sergeant, N., Intracellular pH regulates amyloid precursor protein intracellular domain accumulation. *Neurobiol. Dis.*, **2007**, 25, 686-696.
137. De Kimpe, L.; van Haastert, E.; Kaminari, A.; Zwart, R.; Rutjes, H.; Hoozemans, J. M.; Scheper, W., Intracellular accumulation of aggregated pyroglutamate amyloid beta: convergence of aging and A $\beta$  pathology at the lysosome. *AGE*, **2013**, 35, 673-687.
138. Schrader-Fischer, G.; Paganetti, P. A., Effect of alkalizing agents on the processing of the  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Brain Res.*, **1996**, 716, 91-100.
139. Kanazirska, M. V.; Fuchs, P. M.; Chen, L.; Lal, S.; Verma, J.; Vassilev, P. M., Beneficial effects of lysosome-modulating and other pharmacological and nanocarrier agents on amyloid-beta-treated cells. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2012**, 13, 2761-2767.
140. Nogalska, A.; D'Agostino, C.; Engel, W. K.; Askanas, V., Sodium phenylbutyrate reverses lysosomal dysfunction and decreases amyloid- $\beta$ 42 in an in vitro-model of inclusion-body myositis. *Neurobiol. Dis.*, **2014**, 65, 93-101.
141. Aikawa, M., High-Resolution Autoradiography of Malarial Parasites Treated with (3)H-Chloroquine. *Am. J. Pathol.*, **1972**, 67, 277-284.
142. Sullivan, D. J.; Matile, H.; Ridley, R. G.; Goldberg, D. E., A Common Mechanism for Blockade of Heme Polymerization by Antimalarial Quinolines. *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 31103-31107.
143. Vingtdeux, V.; Hamdane, M.; Loyens, A.; Gelé, P.; Drobeck, H.; Bégard, S.; Galas, M.-C.; Delacourte, A.; Beauvillain, J.-C.; Buée, L.; Sergeant, N., Alkalizing Drugs Induce Accumulation of Amyloid Precursor Protein By-products in Luminal Vesicles of Multivesicular Bodies. *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 18197-18205.
144. Melnyk, P.; Leroux, V.; Sergheraert, C.; Grellier, P., Design, synthesis and in vitro antimalarial activity of an acylhydrazone library. *Bioorg. Med. Chem Lett.*, **2006**, 16, 31-35.
145. Klingenstein, R.; Melnyk, P.; Leliveld, S. R.; Ryckebusch, A.; Korth, C., Similar Structure-Activity Relationships of Quinoline Derivatives for Antiprion and Antimalarial Effects. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 5300-5308.
146. Ryckebusch, A.; Debreu-Fontaine, M.-A.; Mouray, E.; Grellier, P.; Sergheraert, C.; Melnyk, P., Synthesis and antimalarial evaluation of new N1-(7-chloro-4-quinoly)-1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine derivatives. *Bioorg. Med. Chem Lett.*, **2005**, 15, 297-302.
147. Deprez-Poulain, R.; Melnyk, P., 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine libraries: from the discovery of classical chloroquine-like antimalarials to the identification of new targets. *Comb. Chem. High. T. Scr.*, **2005**, 8, 39-48.
148. Delarue-Cochin, S.; Paunescu, E.; Maes, L.; Mouray, E.; Sergheraert, C.; Grellier, P.; Melnyk, P., Synthesis and antimalarial activity of new analogues of amodiaquine. *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, 43, 252-260.

149. Păunescu, E.; Susplugas, S.; Boll, E.; Varga, R.; Mouray, E.; Grosu, I.; Grellier, P.; Melnyk, P., Replacement of the 4' -Hydroxy Group of Amodiaquine and Amopyroquine by Aromatic and Aliphatic Substituents: Synthesis and Antimalarial Activity. *ChemMedChem*, **2009**, *4*, 549-561.
150. Oyama, F.; Murakami, N.; Ihara, Y., Chloroquine myopathy suggests that tau is degraded in lysosomes: implication for the formation of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Neurosci. Res.*, **1998**, *31*, 1-8.
151. Vingtdeux, V.; Hamdane, M.; Gompel, M.; Bégard, S.; Drobecq, H.; Ghestem, A.; Grosjean, M.-E.; Kostanjevecki, V.; Grognet, P.; Vanmechelen, E.; Buée, L.; Delacourte, A.; Sergeant, N., Phosphorylation of amyloid precursor carboxy-terminal fragments enhances their processing by a gamma-secretase-dependent mechanism. *Neurobiol. Dis.*, **2005**, *20*, 625-637.
152. Melnyk, P.; Vingtdeux, V.; Burlet, S.; Eddarkaoui, S.; Grosjean, M.-E.; Larchanché, P.-E.; Hochart, G.; Sergheraert, C.; Estrella, C.; Barrier, M.; Poix, V.; Plancq, P.; Lannoo, C.; Hamdane, M.; Delacourte, A.; Verwaerde, P.; Buée, L.; Sergeant, N., Chloroquine and Chloroquinoline Derivatives as Models for the Design of Modulators of Amyloid Peptide Precursor Metabolism. *ACS Chem. Neurosci.*, **2015**, *6*, 559-569.
153. Sergeant, N.; Delacourte, A.; Melnyk, P.; Buée, L., Use Of 1,4-Bis (3-aminoalkyl) Piperazine Derivatives In The Treatment Of Neurodegenerative Diseases. WO/2006/051489, **2006**.
154. Delacourte, A.; Melnyk, P.; Burlet, S.; Lefur, N., New heterocycle compounds and uses thereof for the prevention or treatment of diseases involving formation of amyloid plaques and/or where a dysfunction of the app metabolism occurs. US/2012/0283256, **2012**.
155. Morris, R., Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Meth.*, **1984**, *11*, 47-60.
156. Leslie, B. J.; Hergenrother, P. J., Identification of the cellular targets of bioactive small organic molecules using affinity reagents. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 1347-1360.
157. Dorman, G.; Prestwich, G. D., Benzophenone Photophores in Biochemistry. *Biochemistry*, **1994**, *33*, 5661-5673.
158. Chaurand, P.; Luetzenkirchen, F.; Spengler, B., Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, **1999**, *10*, 91-103.
159. Dormán, G.; Prestwich, G. D., Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends Biotechnol.*, **2000**, *18*, 64-77.
160. Meyer, H.; Weihl, C. C., The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis. *J. Cell Sci.*, **2014**, *127*, 3877-3883.
161. Young, J. C.; Moarefi, I.; Hartl, F. U., Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J. Cell Biol.*, **2001**, *154*, 267-273.
162. Prince, T.; Shao, J.; Matts, R. L.; Hartson, S. D., Evidence for chaperone heterocomplexes containing both Hsp90 and VCP. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **2005**, *331*, 1331-1337.
163. Kakizuka, A., Roles of VCP in human neurodegenerative disorders. *Biochem. Soc. T.*, **2008**, *36*, 105-108.
164. Dolan, P. J.; Jin, Y. N.; Hwang, W.; Johnson, G. V. W., Decreases in valosin-containing protein result in increased levels of tau phosphorylated at Ser262/356. *FEBS Lett.*, **2011**, *585*, 3424-3429.
165. Schmidt, W. E.; Mutt, V.; Carlquist, M.; Kratzin, H.; Conlon, J. M.; Creutzfeldt, W., Valosin: isolation and characterization of a novel peptide from porcine intestine. *FEBS Lett.*, **1985**, *191*, 264-268.
166. Koller, K. J.; Brownstein, M. J., Use of a cDNA clone to identify a supposed precursor protein containing valosin. *Nature*, **1987**, *325*, 542-545.
167. Yamanaka, K.; Sasagawa, Y.; Ogura, T., Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. *BBA-Mol. Cell Res.*, **2012**, *1823*, 130-137.
168. Hirabayashi, M.; Inoue, K.; Tanaka, K.; Nakadate, K.; Ohsawa, Y.; Kamei, Y.; Popiel, A. H.; Sinohara, A.; Iwamatsu, A.; Kimura, Y.; Uchiyama, Y.; Hori, S.; Kakizuka, A., VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ.*, **2001**, *8*, 977-984.

169. Moir, D.; Stewart, S. E.; Osmond, B. C.; Botstein, D., Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: Isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics*, **1982**, 100, 547-563.
170. Hoyle, J.; Tan, K. H.; Fisher, E. M. C., Mapping the valosin-containing protein (VCP) gene on human Chromosome 9 and mouse Chromosome 4, and a likely pseudogene on the mouse X Chromosome. *Mamm. Genome*, **1997**, 8, 778-780.
171. Niwa, H.; Ewens, C. A.; Tsang, C.; Yeung, H. O.; Zhang, X.; Freemont, P. S., The Role of the N-Domain in the ATPase Activity of the Mammalian AAA ATPase p97/VCP. *J. Biol. Chem.*, **2012**, 287, 8561-8570.
172. DeLaBarre, B.; Brunger, A. T., Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2003**, 10, 856-863.
173. Meyer, H.; Bug, M.; Bremer, S., Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat. Cell Biol.*, **2012**, 14, 117-123.
174. Huyton, T.; Pye, V. E.; Briggs, L. C.; Flynn, T. C.; Beuron, F.; Kondo, H.; Ma, J.; Zhang, X.; Freemont, P. S., The crystal structure of murine p97/VCP at 3.6 Å. *J. Struct. Biol.*, **2003**, 144, 337-348.
175. Wang, Q.; Song, C.; Li, C.-C. H., Hexamerization of p97-VCP is promoted by ATP binding to the D1 domain and required for ATPase and biological activities. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **2003**, 300, 253-260.
176. Bays, N. W.; Hampton, R. Y., Cdc48-Ufd1-Npl4: Stuck in the Middle with Ub. *Curr. t Biol.*, **2002**, 12, R366-R371.
177. Rouiller, I.; DeLaBarre, B.; May, A. P.; Weis, W. I.; Brunger, A. T.; Milligan, R. A.; Wilson-Kubalek, E. M., Conformational changes of the multifunction p97 AAA ATPase during its ATPase cycle. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2002**, 9, 950-957.
178. Zhang, X.; Shaw, A.; Bates, P. A.; Newman, R. H.; Gowen, B.; Orlova, E.; Gorman, M. A.; Kondo, H.; Dokurno, P.; Lally, J.; Leonard, G.; Meyer, H.; van Heel, M.; Freemont, P. S., Structure of the AAA ATPase p97. *Mol. Cell*, **2000**, 6, 1473-1484.
179. Erzberger, J. P.; Berger, J. M., Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annu. Rev. Bioph. Biom.*, **2006**, 35, 93-114.
180. Sheng, C. W. Protein-protein interactions that mediate the role of AAA-ATPase p97/VCP/Cdc48 in protein aggregation and degradation. Nanyang Technological University, **2013**.
181. Wang, Q.; Song, C.; Li, C.-C. H., Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions. *J. Struct. Biol.*, **2004**, 146, 44-57.
182. Vij, N., AAA ATPase p97/VCP: cellular functions, disease and therapeutic potential. *J. Cell. Mol. Med.*, **2008**, 12, 2511-2518.
183. Woodman, P. G., p97, a protein coping with multiple identities. *J. Cell Sci.*, **2003**, 116, 4283-4290.
184. Hänzelmann, P.; Buchberger, A.; Schindelin, H., Hierarchical Binding of Cofactors to the AAA ATPase p97. *Structure*, **2011**, 19, 833-843.
185. Chia, W. S.; Chia, D. X.; Rao, F.; Bar Nun, S.; Geifman Shochat, S., ATP Binding to p97/VCP D1 Domain Regulates Selective Recruitment of Adaptors to Its Proximal N-Domain. *PLoS One*, **2012**, 7, e50490.
186. Uchiyama, K.; Jokitalo, E.; Lindman, M.; Jackman, M.; Kano, F.; Murata, M.; Zhang, X.; Kondo, H., The localization and phosphorylation of p47 are important for Golgi disassembly-assembly during the cell cycle. *J. Cell Biol.*, **2003**, 161, 1067-79.
187. Uchiyama, K.; Totsukawa, G.; Puhka, M.; Kaneko, Y.; Jokitalo, E.; Dreveny, I.; Beuron, F.; Zhang, X.; Freemont, P.; Kondo, H., p37 Is a p97 Adaptor Required for Golgi and ER Biogenesis in Interphase and at the End of Mitosis. *Dev. Cell*, **2006**, 11, 803-816.
188. Nagahama, M.; Ohnishi, M.; Kawate, Y.; Matsui, T.; Miyake, H.; Yuasa, K.; Tani, K.; Tagaya, M.; Tsuji, A., UBXD1 is a VCP-interacting protein that is involved in ER-associated degradation. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **2009**, 382, 303-308.
189. Uchiyama, K.; Jokitalo, E.; Kano, F.; Murata, M.; Zhang, X.; Canas, B.; Newman, R.; Rabouille, C.; Pappin, D.; Freemont, P.; Kondo, H., VCIP135, a novel essential factor for p97/p47-mediated membrane fusion, is required for Golgi and ER assembly in vivo. *J. Cell Biol.*, **2002**, 159, 855-866.



190. Tsou, W.-L.; Ouyang, M.; Hosking, R. R.; Sutton, J. R.; Blount, J. R.; Burr, A. A.; Todi, S. V., The deubiquitinase ataxin-3 requires Rad23 and DnaJ-1 for its neuroprotective role in *Drosophila melanogaster*. *Neurobiol. Dis.*, **2015**, *82*, 12-21.
191. Zhong, X.; Shen, Y.; Ballar, P.; Apostolou, A.; Agami, R.; Fang, S., AAA ATPase p97/Valosin-containing Protein Interacts with gp78, a Ubiquitin Ligase for Endoplasmic Reticulum-associated Degradation. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 45676-45684.
192. Lilley, B. N.; Ploegh, H. L., Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 14296-14301.
193. Meerang, M.; Ritz, D.; Paliwal, S.; Garajova, Z.; Bosshard, M.; Mailand, N.; Janscak, P.; Hubscher, U.; Meyer, H.; Ramadan, K., The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.*, **2011**, *13*, 1376-1382.
194. Stolz, A.; Hilt, W.; Buchberger, A.; Wolf, D. H., Cdc48: a power machine in protein degradation. *Trends Biochem. Sci.*, **2011**, *36*, 515-523.
195. Rape, M.; Hoppe, T.; Gorr, I.; Kalocay, M.; Richly, H.; Jentsch, S., Mobilization of Processed, Membrane-Tethered SPT23 Transcription Factor by CDC48UFD1/NPL4, a Ubiquitin-Selective Chaperone. *Cell*, **2001**, *107*, 667-677.
196. Beskow, A.; Grimberg, K. B.; Bott, L. C.; Salomons, F. A.; Dantuma, N. P.; Young, P., A Conserved Unfoldase Activity for the p97 AAA-ATPase in Proteasomal Degradation. *J. Mol. Biol.*, **2009**, *394*, 732-746.
197. Wang, Q.; Li, L.; Ye, Y., Inhibition of p97-dependent Protein Degradation by Eeyarestatin I. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 7445-7454.
198. Wang, Q.; Li, L.; Ye, Y., Regulation of retrotranslocation by p97-associated deubiquitinating enzyme ataxin-3. *J. Cell Biol.*, **2006**, *174*, 963-971.
199. Ernst, R.; Mueller, B.; Ploegh, H. L.; Schlieker, C., The Otubain YOD1 Is a Deubiquitinating Enzyme that Associates with p97 to Facilitate Protein Dislocation from the ER. *Mol. Cell*, **2009**, *36*, 28-38.
200. Kobayashi, T.; Manno, A.; Kakizuka, A., Involvement of valosin-containing protein (VCP)/p97 in the formation and clearance of abnormal protein aggregates. *Genes Cells*, **2007**, *12*, 889-901.
201. Duennwald, M. L.; Lindquist, S., Impaired ERAD and ER stress are early and specific events in polyglutamine toxicity. *Gene Dev*, **2008**, *22*, 3308-3319.
202. Ye, Y.; Meyer, H. H.; Rapoport, T. A., The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature*, **2001**, *414*, 652-656.
203. Heo, J.-M.; Livnat-Levanon, N.; Taylor, E. B.; Jones, K. T.; Dephoure, N.; Ring, J.; Xie, J.; Brodsky, J. L.; Madeo, F.; Gygi, S. P.; Ashrafi, K.; Glickman, M. H.; Rutter, J., A Stress-Responsive System for Mitochondrial Protein Degradation. *Mol. Cell*, **2010**, *40*, 465-480.
204. Ju, J.-S.; Weihi, C. C., p97/VCP at the intersection of the autophagy and the ubiquitin proteasome system. *Autophagy*, **2010**, *6*, 283-285.
205. Xie, Z.; Klionsky, D. J., Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.*, **2007**, *9*, 1102-1109.
206. Tresse, E.; Salomons, F. A.; Vesa, J.; Bott, L. C.; Kimonis, V.; Yao, T.-P.; Dantuma, N. P.; Taylor, J. P., VCP/p97 is essential for maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD. *Autophagy*, **2010**, *6*, 217-227.
207. Wang, Y.; Ballar, P.; Zhong, Y.; Zhang, X.; Liu, C.; Zhang, Y.-J.; Monteiro, M. J.; Li, J.; Fang, S., SVIP Induces Localization of p97/VCP to the Plasma and Lysosomal Membranes and Regulates Autophagy. *PLoS One*, **2011**, *6*, e24478.
208. Seguin, S. J.; Morelli, F. F.; Vinet, J.; Amore, D.; De Biasi, S.; Poletti, A.; Rubinsztein, D. C.; Carra, S., Inhibition of autophagy, lysosome and VCP function impairs stress granule assembly. *Cell Death Differ.*, **2014**, *21*, 1838-1851.
209. Ramanathan, H. N.; Ye, Y., The p97 ATPase associates with EEA1 to regulate the size of early endosomes. *Cell Res.*, **2012**, *22*, 346-359.

210. Kirchner, P.; Bug, M.; Meyer, H., Ubiquitination of the N-terminal Region of Caveolin-1 Regulates Endosomal Sorting by the VCP/p97 AAA-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288, 7363-7372.
211. Watts, G. D.; Wymer, J.; Kovach, M. J.; Mehta, S. G.; Mumm, S.; Darvish, D.; Pestronk, A.; Whyte, M. P.; Kimonis, V. E., Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nature genetics*, **2004**, 36, 377-81.
212. Franz, A.; Ackermann, L.; Hoppe, T., Create and preserve: Proteostasis in development and aging is governed by Cdc48/p97/VCP. *BBA-Mol. Cell Res.*, **2014**, 1843, 205-215.
213. Kimonis, V. E.; Fulchiero, E.; Vesa, J.; Watts, G., VCP disease associated with myopathy, Paget disease of bone and frontotemporal dementia: Review of a unique disorder. *BBA-Mol. Basis Dis.*, **2008**, 1782, 744-748.
214. Gu, J.-M.; Ke, Y.-H.; Yue, H.; Liu, Y.-J.; Zhang, Z.; Zhang, H.; Hu, W.-W.; Wang, C.; He, J.-W.; Hu, Y.-Q.; Li, M.; Fu, W.-Z.; Zhang, Z.-L., A novel VCP mutation as the cause of atypical IBMPFD in a Chinese family. *Bone*, **2013**, 52, 9-16.
215. Zhang, X.; Gui, L.; Zhang, X.; Bulfer, S. L.; Sanghez, V.; Wong, D. E.; Lee, Y.; Lehmann, L.; Lee, J. S.; Shih, P.-Y.; Lin, H. J.; Iacovino, M.; Weihl, C. C.; Arkin, M. R.; Wang, Y.; Chou, T.-F., Altered cofactor regulation with disease-associated p97/VCP mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, 112, E1705-E1714.
216. Tang, W. K.; Li, D.; Li, C. C.; Esser, L.; Dai, R.; Guo, L.; Xia, D., A novel ATP-dependent conformation in p97 N-D1 fragment revealed by crystal structures of disease-related mutants. *EMBO J.*, **2010**, 29, 2217-2229.
217. Tang, W. K.; Xia, D., Structural and functional deviations in disease-associated p97 mutants. *J. Struct. Biol.*, **2012**, 179, 83-92.
218. Abramzon, Y.; Johnson, J. O.; Scholz, S. W.; Taylor, J. P.; Brunetti, M.; Calvo, A.; Mandrioli, J.; Benatar, M.; Mora, G.; Restagno, G.; Chiò, A.; Traynor, B. J., Valosin-containing protein (VCP) mutations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging*, **2012**, 33, 2231.e1-2231.e6.
219. Koppers, M.; van Blitterswijk, M. M.; Vlam, L.; Rowicka, P. A.; van Vught, P. W. J.; Groen, E. J. N.; Spliet, W. G. M.; Engelen-Lee, J.; Schelhaas, H. J.; de Visser, M.; van der Kooij, A. J.; van der Pol, W. L.; Pasterkamp, R. J.; Veldink, J. H.; van den Berg, L. H., VCP mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging*, **2012**, 33, 837.e7-837.e13.
220. Johnson, J. O.; Mandrioli, J.; Benatar, M.; Abramzon, Y.; Van Deerlin, V. M.; Trojanowski, J. Q.; Gibbs, J. R.; Brunetti, M.; Gronka, S.; Wu, J.; Ding, J.; McCluskey, L.; Martinez-Lage, M.; Falcone, D.; Hernandez, D. G.; Arepalli, S.; Chong, S.; Schymick, J. C.; Rothstein, J.; Landi, F.; Wang, Y.-D.; Calvo, A.; Mora, G.; Sabatelli, M.; Monsurro, M. R.; Battistini, S.; Salvi, F.; Spataro, R.; Sola, P.; Borghero, G.; Galassi, G.; Scholz, S. W.; Taylor, J. P.; Restagno, G.; Chiò, A.; Traynor, B. J., Exome Sequencing Reveals VCP Mutations as a Cause of Familial ALS. *Neuron*, **2010**, 68, 857-864.
221. Mori, F.; Tanji, K.; Toyoshima, Y.; Sasaki, H.; Yoshida, M.; Kakita, A.; Takahashi, H.; Wakabayashi, K., Valosin-containing protein immunoreactivity in tauopathies, synucleinopathies, polyglutamine diseases and intranuclear inclusion body disease. *Neuropathology*, **2013**, doi: 10.1111/neup.12050.
222. Tsujimoto, Y.; Tomita, Y.; Hoshida, Y.; Kono, T.; Oka, T.; Yamamoto, S.; Nonomura, N.; Okuyama, A.; Aozasa, K., Elevated Expression of Valosin-Containing Protein (p97) Is Associated with Poor Prognosis of Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.*, **2004**, 10, 3007-3012.
223. Yamamoto, S.; Tomita, Y.; Hoshida, Y.; Iizuka, N.; Monden, M.; Yamamoto, S.; Iuchi, K.; Aozasa, K., Expression Level of Valosin-Containing Protein (p97) Is Correlated With Progression and Prognosis of Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.*, **2004**, 11, 697-704.
224. Valle, C. W.; Min, T.; Bodas, M.; Mazur, S.; Begum, S.; Tang, D.; Vij, N., Critical Role of VCP/p97 in the Pathogenesis and Progression of Non-Small Cell Lung Carcinoma. *PLoS One*, **2011**, 6, e29073.
225. Yamamoto, S.; Tomita, Y.; Hoshida, Y.; Nagano, H.; Dono, K.; Umeshita, K.; Sakon, M.; Ishikawa, O.; Ohigashi, H.; Nakamori, S.; Monden, M.; Aozasa, K., Increased Expression of Valosin-Containing Protein (p97) is Associated With Lymph Node Metastasis and Prognosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.*, **2004**, 11, 165-172.
226. Laguë, M.-N.; Romieu-Mourez, R.; Bonneil, É.; Boyer, A.; Pouletty, N.; Mes-Masson, A.-M.; Thibault, P.; Nadeau, M.-È.; Boerboom, D., Proteomic Profiling of a Mouse Model for Ovarian Granulosa Cell Tumor

- Identifies VCP as a Highly Sensitive Serum Tumor Marker in Several Human Cancers. *PLoS One*, **2012**, *7*, e42470.
227. Bertram, C.; von Neuhoff, N.; Skawran, B.; Steinemann, D.; Schlegelberger, B.; Hass, R., The differentiation/retrodifferentiation program of human U937 leukemia cells is accompanied by changes of VCP/p97. *BMC Cell Biol.*, **2008**, *9*, 12.
228. Chou, T.-F.; Brown, S. J.; Minond, D.; Nordin, B. E.; Li, K.; Jones, A. C.; Chase, P.; Porubsky, P. R.; Stoltz, B. M.; Schoenen, F. J.; Patricelli, M. P.; Hodder, P.; Rosen, H.; Deshaies, R. J., Reversible inhibitor of p97, DBeQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4834-4839.
229. Chou, T.-F.; Li, K.; Frankowski, K. J.; Schoenen, F. J.; Deshaies, R. J., Structure–Activity Relationship Study Reveals ML240 and ML241 as Potent and Selective Inhibitors of p97 ATPase. *ChemMedChem*, **2013**, *8*, 297-312.
230. Wang, Q.; Shinkre, B. A.; Lee, J.-g.; Weniger, M. A.; Liu, Y.; Chen, W.; Wiestner, A.; Trenkle, W. C.; Ye, Y., The ERAD Inhibitor Eeyarestatin I Is a Bifunctional Compound with a Membrane-Binding Domain and a p97/VCP Inhibitory Group. *PLoS One*, **2010**, *5*, e15479.
231. Bursavich, M. G.; Parker, D. P.; Willardsen, J. A.; Gao, Z.-H.; Davis, T.; Ostanin, K.; Robinson, R.; Peterson, A.; Cimbora, D. M.; Zhu, J.-F.; Richards, B., 2-Anilino-4-aryl-1,3-thiazole inhibitors of valosin-containing protein (VCP or p97). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 1677-1679.
232. Polucci, P.; Magnaghi, P.; Angiolini, M.; Asa, D.; Avanzi, N.; Badari, A.; Bertrand, J.; Casale, E.; Cauteruccio, S.; Cirila, A.; Cozzi, L.; Galvani, A.; Jackson, P. K.; Liu, Y.; Magnuson, S.; Malgesini, B.; Nuvoloni, S.; Orrenius, C.; Sirtori, F. R.; Riceputi, L.; Rizzi, S.; Trucchi, B.; O'Brien, T.; Isacchi, A.; Donati, D.; D'Alessio, R., Alkylsulfanyl-1,2,4-triazoles, a New Class of Allosteric Valosine Containing Protein Inhibitors. Synthesis and Structure–Activity Relationships. *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 437-450.
233. Magnaghi, P.; D'Alessio, R.; Valsasina, B.; Avanzi, N.; Rizzi, S.; Asa, D.; Gasparri, F.; Cozzi, L.; Cucchi, U.; Orrenius, C.; Polucci, P.; Ballinari, D.; Perrera, C.; Leone, A.; Cervi, G.; Casale, E.; Xiao, Y.; Wong, C.; Anderson, D. J.; Galvani, A.; Donati, D.; O'Brien, T.; Jackson, P. K.; Isacchi, A., Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death. *Nat. Chem. Biol.*, **2013**, *9*, 548-556.
234. Cervi, G.; Magnaghi, P.; Asa, D.; Avanzi, N.; Badari, A.; Borghi, D.; Caruso, M.; Cirila, A.; Cozzi, L.; Felder, E.; Galvani, A.; Gasparri, F.; Lomolino, A.; Magnuson, S.; Malgesini, B.; Motto, I.; Pasi, M.; Rizzi, S.; Salom, B.; Sorrentino, G.; Troiani, S.; Valsasina, B.; O'Brien, T.; Isacchi, A.; Donati, D.; D'Alessio, R., Discovery of 2-(Cyclohexylmethylamino)pyrimidines as a New Class of Reversible Valosine Containing Protein Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, 10443-10454.
235. Yi, P.; Higa, A.; Taouji, S.; Bexiga, M. G.; Marza, E.; Arma, D.; Castain, C.; Le Bail, B.; Simpson, J. C.; Rosenbaum, J.; Balabaud, C.; Bioulac-Sage, P.; Blanc, J.-F.; Chevet, E., Sorafenib-Mediated Targeting of the AAA+ ATPase p97/VCP Leads to Disruption of the Secretory Pathway, Endoplasmic Reticulum Stress, and Hepatocellular Cancer Cell Death. *Mol. Cancer Ther.*, **2012**, *11*, 2610-2620.
236. Nalbandian, A.; Llewellyn, K. J.; Nguyen, C.; Yazdi, P. G.; Kimonis, V. E., Rapamycin and Chloroquine: The *In Vitro* and *In Vivo* Effects of Autophagy-Modifying Drugs Show Promising Results in Valosin Containing Protein Multisystem Proteinopathy. *PLoS One*, **2015**, *10*, e0122888.
237. Ikeda, H. O.; Sasaoka, N.; Koike, M.; Nakano, N.; Muraoka, Y.; Toda, Y.; Fuchigami, T.; Shudo, T.; Iwata, A.; Hori, S.; Yoshimura, N.; Kakizuka, A., Novel VCP modulators mitigate major pathologies of rd10, a mouse model of retinitis pigmentosa. *Sci. Rep.*, **2014**, *4*.
238. Trugnan, G.; Fontanges, P.; Delautier, D.; Ait-Slimane, T., FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM...new techniques for a colourful life. *M S-Med. Sc.*, **2004**, *20*, 1027-34.
239. Broussard, J. A.; Rappaz, B.; Webb, D. J.; Brown, C. M., Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. *Nat. Protoc.*, **2013**, *8*, 265-281.
240. Fielding, L., NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2003**, *3*, 39-53.
241. Ciulli, A., Biophysical screening for the discovery of small-molecule ligands. *Method. Mol. Biol.*, **2013**, *1008*, 357-388.

242. Cooper, M. A., Optical biosensors in drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2002**, 1, 515-528.
243. Baaske, P.; Wienken, C. J.; Reineck, P.; Duhr, S.; Braun, D., Optical Thermophoresis for Quantifying the Buffer Dependence of Aptamer Binding. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2010**, 49, 2238-2241.
244. Jerabek-Willemsen, M.; André, T.; Wanner, R.; Roth, H. M.; Duhr, S.; Baaske, P.; Breitsprecher, D., MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J. Mol. Struct.*, **2014**, 1077, 101-113.
245. Jerabek-Willemsen, M.; Wienken, C. J.; Braun, D.; Baaske, P.; Duhr, S., Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. *Assay Drug Dev. Techn.*, **2011**, 9, 342-353.
246. nanotemper-technologies, MicroScale Thermophoresis (MST). <http://www.nanotemper-technologies.com/technologies/mst-technology/> (02/07/2015)
247. Leavitt, S.; Freire, E., Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, **2001**, 11, 560-566.
248. Freyer, M. W.; Lewis, E. A., Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. In *Methods in Cell Biology*, Dr. John, J. C.; Dr. H. William Detrich, III, Eds. Academic Press: **2008**; Vol. 84, Chapter 4, pp 79-113.
249. Ryckebusch, A.; Deprez-Poulain, R.; Debreu-Fontaine, M.-A.; Vandaele, R.; Mouray, E.; Grellier, P.; Sergheraert, C., Synthesis and antimalarial evaluation of new 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 3783-3787.
250. Ryckebusch, A.; Deprez-Poulain, R.; Maes, L.; Debreu-Fontaine, M.-A.; Mouray, E.; Grellier, P.; Sergheraert, C., Synthesis and in Vitro and in Vivo Antimalarial Activity of N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine Derivatives. *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 542-557.
251. Melnyk, P.; Carato, P.; Bulet, S.; Nguyen, E.; Verwaerde, P.; Sergeant, N.; Estrella, C., New n-substituted carboline compounds usable for the treatment of neurodegenerative diseases. WO/2014/207241, **2014**.
252. Mayer, M.; Meyer, B., Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 1784-1788.
253. Viegas, A.; Manso, J. o.; Nobrega, F. L.; Cabrita, E. J., Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. *J. Chem. Educ.*, **2011**, 88, 990-994.
254. Gozalbes, R.; Mosulén, S.; Ortí, L.; Rodríguez-Díaz, J.; Carbajo, R. J.; Melnyk, P.; Pineda-Lucena, A., Hit identification of novel heparanase inhibitors by structure- and ligand-based approaches. *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, 21, 1944-1951.
255. Wang, Y.-S.; Liu, D.; Wyss, D. F., Competition STD NMR for the detection of high-affinity ligands and NMR-based screening. *Magn. Reson. Chem.*, **2004**, 42, 485-489.
256. Lancelot, N.; Piotto, M.; Theret, I.; Lesur, B.; Hennig, P., Applications of NMR screening techniques to the pharmaceutical target Checkpoint kinase 1. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **2014**, 93, 125-135.
257. Chou, T.-F.; Bulfer, S. L.; Weihl, C. C.; Li, K.; Lis, L. G.; Walters, M. A.; Schoenen, F. J.; Lin, H. J.; Deshaies, R. J.; Arkin, M. R., Specific Inhibition of p97/VCP ATPase and Kinetic Analysis Demonstrate Interaction between D1 and D2 ATPase Domains. *J. Mol. Biol.*, **2014**, 426, 2886-2899.
258. Dreveny, I.; Kondo, H.; Uchiyama, K.; Shaw, A.; Zhang, X.; Freemont, P. S., Structural basis of the interaction between the AAA ATPase p97/VCP and its adaptor protein p47. *EMBO J.*, **2004**, 23, 1030-1039.
259. Chimenti, M. S.; Bulfer, S. L.; Neitz, R. J.; Renslo, A. R.; Jacobson, M. P.; James, T. L.; Arkin, M. R.; Kelly, M. J. S., A Fragment-Based Ligand Screen Against Part of a Large Protein Machine: The ND1 Domains of the AAA+ ATPase p97/VCP. *J. Biomol. Screen.*, **2015**, 788-800.
260. Sbardella, G.; Mai, A.; Artico, M.; Loddo, R.; Setzu, M. G.; La Colla, P., Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of novel 3-(1H-pyrrol-1-yl)-2-oxazolidinone analogues of PNU-100480. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 1537-1541.
261. Wang, Z., Clauson-Kaas Reaction. In *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, Inc.: **2010**; Chapter 146.
262. Clauson-Kaas, N.; Elming, N., The Preparation of Pyrroles from Furans., *Acta Chem. Scand.*, **1952**, 6, 867-874.

263. Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D., Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 3849-3862.
264. Denoyelle, S.; Chen, T.; Chen, L.; Wang, Y.; Klosi, E.; Halperin, J. A.; Aktas, B. H.; Chorev, M., In vitro inhibition of translation initiation by N,N'-diarylureas—potential anti-cancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, 22, 402-409.
265. Hughes, D. L.; Reamer, R. A.; Bergan, J. J.; Grabowski, E. J. J., A mechanistic study of the Mitsunobu esterification reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 6487-6491.
266. Camp, D.; Jenkins, I. D., The mechanism of the Mitsunobu esterification reaction. Part I. The involvement of phosphoranes and oxyphosphonium salts. *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 3045-3049.
267. Grochowski, E.; Hilton, B. D.; Kupper, R. J.; Michejda, C. J., Mechanism of the triphenylphosphine and diethyl azodicarboxylate induced dehydration reactions (Mitsunobu reaction). The central role of pentavalent phosphorus intermediates. *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, 104, 6876-6877.
268. Ram, S.; Ehrenkauf, R. E., A general procedure for mild and rapid reduction of aliphatic and aromatic nitro compounds using ammonium formate as a catalytic hydrogen transfer agent. *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 3415-3418.
269. Chen, Y.; Feng, Y.; Xu, B.; Lv, B.; Dong, J.; Seed, B.; Hadd, M., Glucose transport inhibitors and methods of use. US/2007/0275907, **2007**.
270. Kochi, J. K., The Mechanism of the Sandmeyer and Meerwein Reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 2942-2948.
271. Hodgson, H. H., The Sandmeyer Reaction. *Chem. Rev.*, **1947**, 40, 251-277.
272. Paunescu, E.; Susplugas, S.; Boll, E.; Varga, R. A.; Mouray, E.; Grellier, P.; Melnyk, P., Synthesis and antimalarial activity of new amino analogues of amodiaquine. *Med. Chem.*, **2008**, 4, 407-425.
273. Le Fur, N.; Hochart, G.; Larchanche, P. E.; Melnyk, P., Buchwald reaction as the key step for the synthesis of metabolically more stable analogs of amodiaquine. *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, 46, 3052-3057.
274. Paul, F.; Patt, J.; Hartwig, J. F., Palladium-catalyzed formation of carbon-nitrogen bonds. Reaction intermediates and catalyst improvements in the hetero cross-coupling of aryl halides and tin amides. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 5969-5970.
275. Miyaura, N.; Suzuki, A., Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 2457-2483.
276. Suzuki, A., Recent advances in the cross-coupling reactions of organoboron derivatives with organic electrophiles, 1995–1998. *J. Organometallic Chem.*, **1999**, 576, 147-168.
277. Bhatt, R.; Gong, B.; Hong, F.; Jenkins, S.; Klein, J.; Kohm, C.; Tulinsky, J., For uses such as inhibiting the activity of lysophosphatidic acid acyltransferase beta and/or inhibiting the proliferation of a cell (e.g., tumor cell). US20040204386 A1, **2004**.
278. Norman, M. H.; Hurt, C. R.; Chen, N.; Fotsch, C. H.; Han, N.; Jenkins, T. J.; Liu, L.; Moreno, O. A., Pyrrolo(3,2-d)pyrimidine derivatives; neuropeptide  $\gamma$  and corticotropin releasing factor modulators; dietetics; antidiabetic, antiinflammatory, and antitumor agents. US6187777 B1, **2001**.
279. Hitchcock, S. A.; Pennington, L. D., Structure–Brain Exposure Relationships. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 7559-7583.
280. Lewis, R. J.; Francis, C. A.; Lehr, R. E.; LeRoy Blank, C., Synthesis and Neurotoxic Potential of Racemic and Chiral Dihydroxytetrahydroquinoline Derivatives. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 5345-5352.
281. Watson, W., Work Up of Borane Reductions of Amides and Imides. *What's New in Process Chemistry?*, **2008**, 23, 1.
282. Peng, L.; Wirz, J.; Goeldner, M., Synthesis and Characterization of Photolabile Compounds Releasing Noracetylcholine in the Microsecond Time Range. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **1997**, 36, 398-400.
283. Kim, S.; Oh, C. H.; Ko, J. S.; Ahn, K. H.; Kim, Y. J., Zinc-modified cyanoborohydride as a selective reducing agent. *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 1927-1932.

284. Kimura, M.; Komatsu, H.; Ogura, H.; Sawada, K., Comparison of donepezil and memantine for protective effect against amyloid-beta(1–42) toxicity in rat septal neurons. *Neurosci. Lett.*, **2005**, 391, 17-21.
285. Kimura, M.; Akasofu, S.; Ogura, H.; Sawada, K., Protective effect of donepezil against A $\beta$ (1-40) neurotoxicity in rat septal neurons. *Brain Res.*, **2005**, 1047, 72-84.
286. Conti, E.; Galimberti, G.; Tremolizzo, L.; Masetto, A.; Cereda, D.; Zanchi, C.; Piazza, F.; Casati, M.; Isella, V.; Appollonio, I.; Ferrarese, C., Cholinesterase inhibitor use is associated with increased plasma levels of anti-A $\beta$  1–42 antibodies in Alzheimer's disease patients. *Neurosci. Lett.*, **2010**, 486, 193-196.
287. Shafferman, A.; Kronman, C.; Flashner, Y.; Leitner, M.; Grosfeld, H.; Ordentlich, A.; Gozes, Y.; Cohen, S.; Ariel, N.; Barak, D., Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 17640-17648.
288. Hu, M.-K., Synthesis and in-vitro anticancer evaluation of bistacrine congeners. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2001**, 53, 83-88.
289. Bolognesi, M. L.; Banzi, R.; Bartolini, M.; Cavalli, A.; Tarozzi, A.; Andrisano, V.; Minarini, A.; Rosini, M.; Tumiatti, V.; Bergamini, C.; Fato, R.; Lenaz, G.; Hrelia, P.; Cattaneo, A.; Recanatini, M.; Melchiorre, C., Novel Class of Quinone-Bearing Polyamines as Multi-Target-Directed Ligands To Combat Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 4882-4897.
290. Jiang, P.; Mizushima, N., LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods*, **2015**, 75, 13-18.
291. Asanuma, K.; Tanida, I.; Shirato, I.; Ueno, T.; Takahara, H.; Nishitani, T.; Kominami, E.; Tomino, Y., MAP-LC3, a promising autophagosomal marker, is processed during the differentiation and recovery of podocytes from PAN nephrosis. *FASEB J.*, **2003**, 17, 1165-1167.
292. Inoue, K.; Rispoli, J.; Kaphzan, H.; Klann, E.; Chen, E.; Kim, J.; Komatsu, M.; Abeliovich, A., Macroautophagy deficiency mediates age-dependent neurodegeneration through a phospho-tau pathway. *Mol. Neurodegener.*, **2012**, 7, 48.
293. Nassif, M.; Hetz, C., Autophagy impairment: a crossroad between neurodegeneration and tauopathies. *BMC Biol.*, **2012**, 10, 78.
294. Langui, D.; Lachapelle, F.; Duyckaerts, C., Animal models of neurodegenerative diseases. *Med. Sci.*, **2007**, 23, 180-6.
295. Belarbi, K.; Schindowski, K.; Burnouf, S.; Caillierez, R.; Grosjean, M. E.; Demeyer, D.; Hamdane, M.; Sergeant, N.; Blum, D.; Buee, L., Early Tau pathology involving the septo-hippocampal pathway in a Tau transgenic model: relevance to Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.*, **2009**, 6, 152-7.
296. Troquier, L.; Caillierez, R.; Burnouf, S.; Fernandez-Gomez, F. J.; Grosjean, M. E.; Zommer, N.; Sergeant, N.; Schraen-Maschke, S.; Blum, D.; Buee, L., Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THY Tau22 mouse model: a suitable therapeutic approach. *Curr. Alzheimer Res.*, **2012**, 9, 397-405.
297. Bower, J. D.; Stephens, F. F., The action of hydrazine on benzoxazolones. *J. Chem. Soc.*, **1951**, 325-328.
298. Bonilha, J. B. S.; Tedesco, A. C.; Nogueira, L. C.; Diamantino, M. T. R. S.; Carreiro, J. C., Further Evidence for the Triplet Mechanism in the Photosubstitution of Nitroaryl Ethers in Alkaline Medium. *Tetrahedron*, **1993**, 49, 3053-3064.
299. Nikam, S. S.; Scott, I. L.; Sherer, B. A.; Wise, L. D., Bicyclic cyclohexylamines and their use as NMDA receptor antagonists. WO/2001/094321, **2004**.
300. Naimi-Jamal, M. R.; Mokhtari, J.; Dekamin, M. G.; Kaupp, G., Sodium Tetraalkoxyborates: Intermediates for the Quantitative Reduction of Aldehydes and Ketones to Alcohols through Ball Milling with NaBH<sub>4</sub>. *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 2009, 3567-3572.
301. Keri, R. S.; Quintanova, C.; Marques, S. M.; Esteves, A. R.; Cardoso, S. M.; Santos, M. A., Design, synthesis and neuroprotective evaluation of novel tacrine–benzothiazole hybrids as multi-targeted compounds against Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, 21, 4559-4569.