# Conceptions, synthèses et évaluations biologiques de nouveaux réactivateurs de l'Acétylcholinestérase inhibée par des neurotoxiques organophosphorés

Anissa Braïki

▶ **To cite this version:**

Anissa Braïki. Conceptions, synthèses et évaluations biologiques de nouveaux réactivateurs de l'Acétylcholinestérase inhibée par des neurotoxiques organophosphorés. Chimie thérapeutique. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR043 . tel-04198611

**HAL Id: tel-04198611**

**https://theses.hal.science/tel-04198611**

Submitted on 7 Sep 2023

**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.

# THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité : Chimie Organique**

**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

# Conceptions, synthèses et évaluations biologiques de nouveaux réactivateurs de l'acétylcholinestérase inhibée par des neurotoxiques organophosphorés

# Designs, syntheses and biological evaluations of new reactivators for acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents


**Présentée et soutenue par**
**Anissa BRAÏKI**


| **Thèse soutenue publiquement le 8 Juin 2018 devant le jury composé de** | | |
|---|---|---|
| Pr. Yves QUENEAU | Professeur, Directeur de Recherche (DR1) - INSA Lyon | Rapporteur |
| Dr. Fanny ROUSSI | Directeur de Recherche (DR2) - Institut de Chimie des Substances Naturelles | Rapporteur |
| Pr. Sylvain ROUTIER | Professeur - Université d'Orléans | Examinateur |
| Pr. Zrinka KOVARIK | Permanent Scientific Adviser - Institute for Medical Research and Occupational Health – Zagreb - Croatia | Examinateur |
| Dr. Julien LEGROS | Chargé de Recherche CNRS - Université de Rouen Normandie | Examinateur |
| Dr. José DIAS | Chercheur en Biochimie et Biologie Structurale - Institut de Recherche Biomédicale des Armées | Membre invité |
| Pr. Pierre-Yves RENARD | Professeur - Université de Rouen Normandie | Directeur de thèse |
| Dr. Ludovic JEAN | Maître de Conférence (HDR) - Université de Rouen Normandie | Co-directeur de thèse |


**Thèse dirigée par le Pr. Pierre-Yves RENARD et le Dr. Ludovic JEAN, Université de Rouen Normandie Laboratoire COBRA - UMR CNRS 6014**


UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 508 NC Normande de Chimie

Laboratoire Cobra — Chimie organique, Bioorganique, Réactivité et Analyse.

# THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité : Chimie Organique**

**Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie**

## Conceptions, synthèses et évaluations biologiques de nouveaux réactivateurs de l'acétylcholinestérase inhibée par des neurotoxiques organophosphorés

## Designs, syntheses and biological evaluations of new reactivators for acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents


**Présentée et soutenue par**

**Anissa BRAÏKI**


| **Thèse soutenue publiquement le 8 Juin 2018 devant le jury composé de** | | |
|---|---|---|
| Pr. Yves QUENEAU | Professeur, Directeur de Recherche (DR1) - INSA Lyon | Rapporteur |
| Dr. Fanny ROUSSI | Directeur de Recherche (DR2) - Institut de Chimie des Substances Naturelles | Rapporteur |
| Pr. Sylvain ROUTIER | Professeur - Université d'Orléans | Examinateur |
| Pr. Zrinka KOVARIK | Permanent Scientific Adviser - Institute for Medical Research and Occupational Health – Zagreb - Croatia | Examinateur |
| Dr. Julien LEGROS | Chargé de Recherche CNRS - Université de Rouen Normandie | Examinateur |
| Dr. José DIAS | Chercheur en Biochimie et Biologie Structurale - Institut de Recherche Biomédicale des Armées | Membre invité |
| Pr. Pierre-Yves RENARD | Professeur - Université de Rouen Normandie | Directeur de thèse |
| Dr. Ludovic JEAN | Maître de Conférence (HDR) - Université de Rouen Normandie | Co-directeur de thèse |

**Thèse dirigée par le Pr. Pierre-Yves RENARD et le Dr. Ludovic JEAN, Université de Rouen Normandie Laboratoire COBRA - UMR CNRS 6014**

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 508 NC Normande de Chimie

Laboratoire Cobra Chimie organique, Bioorganique, Réactivité et Analyse.

# REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse ont été financés par la Direction Générale de l'Armement à laquelle j'adresse mes premiers remerciements.

Mes plus sincères remerciements vont au Pr. Pierre-Yves Renard et au Dr. Ludovic Jean, directeurs de cette thèse, pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe et de m'avoir encadrée durant ces trois années. J'ai beaucoup appris en vous côtoyant, merci pour votre gentillesse, votre patience et la grande autonomie que vous m'avez octroyée. Vous m'avez confié de nombreux projets ambitieux et passionnants et vous n'avez pas hésité à me faire participer à de nombreux congrès, ni à me faire former aux évaluations biologiques auprès de nos collaborateurs en France et en Croatie. Merci d'avoir cru en moi.

Je souhaite également adresser mes remerciements à l'ensemble des collaborateurs de ce projet, c'est-à-dire l'équipe du Dr. Florian Nachon et notamment Dr. José Dias et Dr. Guilhem Calas, l'équipe du Dr. Martin Weik ainsi que l'équipe du Pr. Zrinka Kovarik et du Dr Rachid Baati. Merci aux biologistes pour leur travail acharné et d'avoir accepté de me former à l'aspect biologique du projet. Je vous souhaite à tous une bonne continuation et un succès retentissant dans vos recherches.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury de vous être déplacé de très loin et de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

J'exprime aussi ma reconnaissance envers toutes les personnes ayant participé de près ou de loin au projet ainsi que les doctorants et les permanents côtoyés à l'IRCOF.

Un grand merci à Laetitia, Emilie et Albert, pour leur analyse et leur aide indispensable ! Je vous en suis grandement reconnaissante.

Une pensée émue pour Kathleen, Sovy, Morgane, Pierrick, Romain, Olivier, Mehdi, Dorra, Pierre et à tous ceux que j'ai oublié mais qui se reconnaitront. Merci d'avoir été présent aux jours heureux et aux jours sombres. Loïc, mon P'ti Mille, tu resteras le meilleur stagiaire que j'ai pu encadrer. Sérieux, responsable, impliqué, tu as toujours suivi mes directives, tu n'étais ni têtu, ni orgueilleux. Je te souhaite plein de réussite pour la suite. Je crois en toi !

Merci à la Mama de m'avoir soutenue depuis toujours. Tu m'as appris à penser aux autres avant soi-même, à allier ambition et générosité, choses que les nouvelles générations ne connaissent pas. Tu m'as appris à me débrouiller - toi la reine du système D ! - à vivre de manière autonome sans ne rien devoir à personne. Tu ne comprenais pas ce que je faisais – non, une thèse, ce n'est pas un stage ! – mais tu voyais que ça me tenait à cœur. Tu es mon exemple, je chéris tes paroles, ta clairvoyance et tes conseils avisés. A mon père, parti trop tôt, qui n'a pas pu voir ce que la petite « Nanouss » est devenue. Tant de choses que j'aurais aimé te dire avant que tu retournes auprès du Créateur, le destin en a malheureusement décidé autrement. Aux restes de ma famille, qui n'ont pas trop compris ce que je faisais ! Vous avez eu les mots pour m'encourager à votre façon.

A la famille Tulasne, pour tous les moments passés ensembles, les messages, les petites attentions. Je n'aurais pu rêver d'une meilleure future belle-famille que la vôtre !

Enfin, merci à toi, Nicolas Tulasne, Gardien de mon Bonheur. Les mots me manquent pour te remercier à ta juste valeur. Ton sourire, ta joie de vivre, ton humour frelaté, ton optimisme à toute épreuve sont le miel de mon cœur. Nous avons survécu malgré la distance, et, nous voilà, ensemble, à l'aube de nos 7 ans, aussi transis qu'au premier jour, emplis de rêves et de projets. Soleil de mes nuits, Lune de mes jours, mon âme est tienne.

Enfin, à mon Toshiba, mes deux Asus et aux deux disques durs morts au combat.

*« Parfois, la seule façon de réussir, c'est de poursuivre même si le corps et l'esprit protestent. »*

Stephen King, La ligne verte

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS ..... 11

ABREVIATIONS ..... 23

INTRODUCTION & OBJECTIFS ..... 29

CHAPITRE 1 : L'EMPOISONNEMENT AUX NOPS, UNE PROBLEMATIQUE TOUJOURS D'ACTUALITE ..... 41

I. Les neurotoxiques organophosphorés ..... 43

I.1. Généralités ..... 43

I.2. Les pesticides organophosphorés ..... 44

I.3. Les neurotoxiques de guerre ..... 46

I.4. Substituts de NOPs, une alternative viable pour la recherche. ..... 48

II. Les Cholinestérases, cibles de choix des neurotoxiques organophosphorés ..... 51

II.1. L'acétylcholinestérase, une enzyme clef de l'influx nerveux ..... 51

II.1.1. Rôle de l'acétylcholinestérase ..... 51

II.1.2. Considérations structurales de l'AChE ..... 52

II.1.2.1. Le site catalytique ..... 54

II.1.2.2. La gorge aromatique hydrophobe ..... 54

II.1.2.3. Le site périphérique ..... 55

II.2. La butyrylcholinestérase, une enzyme non-spécifique ..... 55

II.2.1. Rôles biologiques ..... 55

II.2.2. Considérations structurales de la BChE ..... 57

II.3. L'inhibition de l'AChE et conséquences dramatiques ..... 58

II.3.1. Un mécanisme d'inhibition irréversible ..... 59

II.3.2. Une inhibition aux lourdes conséquences ..... 62

II.3.2.1. La phase cholinergique aiguë ..... 62

II.3.2.2. Le syndrome intermédiaire ..... 63

II.3.2.3. Le syndrome neurotoxique retardé ..... 63

II.4. Les contre-mesures médicales existantes : un arsenal imparfait ..... 63

II.4.1. La prophylaxie ..... 64

II.4.1.1. Les prétraitements neuroprotecteurs chimiques ..... 64

II.4.1.2. Les bioépurateurs ..... 65

*II.4.1.2.1. Principe des bioépurateurs* ..... 65
*II.4.1.2.2. Bioépurateurs stœchiométriques* ..... 66
*II.4.1.2.3. Bioépurateurs pseudo-catalytiques* ..... 68
*II.4.1.2.4. Bioépurateurs catalytiques* ..... 68
II.4.2. Traitements pharmacologiques d'urgence ..... 70
III. La réactivation de l'acétylcholinestérase empoisonnée ..... 72
III.1. Mécanisme de la réactivation ..... 73
III.2. Les réactivateurs actuels ..... 74
III.2.1. Historique ..... 74
III.2.2. Efficacité des réactivateurs de référence ..... 76
III.2.2.1. Réactivation *in vitro* ..... 76
III.2.2.2. Relations structure-activité ..... 77
III.2.2.3. Réactivation *in vivo* ..... 79
III.2.2.4. Autres effets pharmacologiques ..... 80
III.2.2.5. Pharmacocinétique des pyridiniums oximes ..... 81
III.2.2.6. Stabilité des pyridiniums oximes en milieux aqueux et métabolisation ..... 82
III.2.3. Les limites des réactivateurs de référence ..... 84
III.2.3.1. Toxicité ..... 84
III.2.3.2. Affinité versus inhibition ..... 85
III.2.3.3. Phénomène de recapture ..... 85
III.2.3.4. Passage de la barrière hématoencéphalique ..... 88
III.3. Cahier des charges des nouveaux réactivateurs ..... 89
IV. Développement de nouveaux réactivateurs de l'AChE empoisonnée – Etat de l'art ..... 89
IV.1. Développement de nouveaux réactivateurs chargés ..... 89
IV.1.1. Les réactivateurs mono-chargés ..... 90
IV.1.1.1. Les pyridiniums aldoximes ..... 90
*IV.1.1.1.1. Influence de la position de l'oxime sur le cycle* ..... 90
*IV.1.1.1.2. Influence du groupement de l'azote quaternaire* ..... 91
*IV.1.1.1.2.a. Incorporation de chaînes alkoxy* ..... 91
*IV.1.1.1.2.b. Incorporation de chaînes aliphatiques et d'aromatiques simples* ..... 93
*IV.1.1.1.3. Influence de la fonctionnalisation sur le cycle et sur l'oxime* ..... 95
*IV.1.1.1.4. Vers une forme prodrogue du 2-PAM : la pro-PAM* ..... 96
IV.1.1.2. Autres réactivateurs mono-chargés ..... 96
IV.1.2. Les réactivateurs bi-chargés ..... 101

IV.1.2.1. Les bis-pyridiniums aldoximes et leurs dérivés ..... 101
*IV.1.2.1.1. Bis-pyridiniums aldoximes comportant un espaceur alkyle* ..... *101*
*IV.1.2.1.2. Bis-pyridiniums aldoximes dont l'espaceur comprenant un hétéroatome* ..... *103*
*IV.1.2.1.3. Bis-pyridiniums avec un espaceur rigide* ..... *104*
IV.1.2.2. Bis-pyridiniums céto-oximes ..... 106
IV.1.2.3. Autres réactivateurs bis-chargés ..... 107
IV.1.3. Vectorisation des réactivateurs chargés ..... 108
IV.1.3.1. Nanoparticules ..... 108
IV.1.3.2. Bio-conjugaisons ..... 109
IV.2. Vers un passage passif de la BHE : développement de fonctions réactivatrices non-chargées ..... 110
IV.2.1. Les pyridines aldoximes et leurs analogues ..... 110
IV.2.2. Les $\alpha$-oxo-oximes et leurs analogues ..... 116
IV.2.3. Les amidines oximes ..... 120
IV.2.4. Les imidazoles oximes ..... 121
IV.2.5. Autres hétérocycles carboximes ..... 124
IV.3. Fonctions réactivatrices sans oxime ..... 125
IV.3.1. Hydroxylamine, hydrazone et guanylhydrazone ..... 125
IV.3.2. Les bases de Mannich et apparentées ..... 126
IV.3.3. Autres réactivateurs issus d'évaluation *in silico* ..... 129
IV.4. Conclusions sur les avancées de la recherche ..... 130

CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT DE REACTIVATEURS NON-CHARGES INCORPORANT UNE MORPHOLINE, UNE DIETHYLAMINE OU UNE TETRAHYDROSISOQUINOLEINE EN LIGAND DU SITE PERIPHERIQUE ..... 135

I. Introduction ..... 137
I.1. Travaux préalables ..... 137
I.2. Objectifs ..... 140
II. Synthèse des réactivateurs non-chargés ..... 141
II.1. Analyse rétrosynthétique ..... 142
II.2. Synthèse du fragment 4a ..... 143
II.3. Synthèse du GM113 ..... 144
II.4. Synthèse du GM415 ..... 146
II.5. Synthèse du RM048 ..... 147
II.6. Synthèse du JR595 ..... 148

II.7. Synthèse du CG193 ..... 150
III. Evaluations biologiques des réactivateurs ..... 151
III.1. Evaluations *in vitro* ..... 151
III.1.1. Evaluation des propriétés physico-chimiques des réactivateurs ..... 151
III.1.2. Inhibition des ChEs natives et étude cristallographique ..... 155
III.1.3. Réactivation des ChEs inhibées par des NOPs ..... 157
III.1.4. Cytotoxicité ..... 158
III.1.5. Interaction avec les récepteurs nicotiniques de type $\alpha 7$ ..... 159
III.2. Evaluations *ex vivo* – Bioépurateurs pseudo-catalytiques ..... 161
III.3. Evaluations *in vivo* ..... 162
III.3.1. Pharmacocinétique et indice de protection du RM048 ..... 162
III.3.2. Pharmacocinétique et distribution dans les tissus du JR595 ..... 165
III.3.3. Apport de l'encapsulation : le cas du GM415 ..... 166
IV. Conclusion du Chapitre 2 ..... 168

CHAPITRE 3 : CONCEPTIONS, SYNTHESES ET EVALUATIONS BIOLOGIQUES DE REACTIVATEURS NON-CHARGES INCORPORANT UNE AMINE CYCLIQUE EN TANT QUE LIGAND DU SITE PERIPHERIQUE ..... 173

I. Introduction ..... 175
II. Incorporation de dérivés des carbamazépines ..... 176
II.1. Conception *in silico* ..... 177
II.2. Synthèse des réactivateurs inspirés des carbamazépines ..... 182
II.2.1. Voie de synthèse classique – synthèse des amines libres ..... 182
II.2.2. Voie de synthèse convergente ..... 184
III. Incorporation d'analogues simplifiés de la PIQ ..... 188
III.1. Conception *in silico* ..... 188
III.2. Aspect synthétique ..... 190
III.2.1. Synthèses des réactivateurs 92 et 93 ..... 190
III.2.1.1. Synthèse du 92 ..... 190
III.2.1.2. Synthèse du 93 ..... 191
III.2.2. Synthèses des molécules 90 et 91 ..... 192
III.2.2.1. Synthèse du réactivateur 90 ..... 192
III.2.2.2. Synthèse du réactivateur 91 ..... 193
III.3. Evaluations *in vitro* ..... 194
III.3.1. Passage de la BHE *in vitro* ..... 194

III.3.2. Réactivation des *h*AChEs *in vitro* ... 195
IV. Incorporation d'amines cycliques ... 196
IV.1. Conception *in silico* ... 198
IV.2. Synthèses des réactivateurs ... 200
IV.2.1. Synthèse des dérivées de l'azépane ... 200
IV.2.1.1. Synthèse du réactivateur 111 ... 200
IV.2.1.2. Synthèse du composé 112 ... 200
IV.2.2. Synthèse des dérivées de l'azocane ... 201
IV.2.2.1. Synthèse du composé 113 ... 201
IV.2.2.2. Synthèse du composé 114 ... 202
IV.2.3. Synthèses des dérivés des 4-amino et 3-aminopipéridines ... 203
IV.2.3.1. Synthèses des réactivateurs incorporant le motif 4-aminopipéridine ... 203
*IV.2.3.1.1. Synthèse du réactivateur 115* ... *203*
*IV.2.3.1.2. Synthèse du réactivateur 116* ... *204*
IV.2.3.2. Synthèse des réactivateurs incorporant le motif 3-aminopipéridine ... 205
*IV.2.3.2.3. Synthèse du réactivateur 117* ... *205*
*IV.2.3.2.4. Synthèse du réactivateur 118* ... *206*
IV.3. Evaluations biologiques ... 207
IV.3.1. Passage de la BHE *in vitro* ... 207
IV.3.2. Réactivation des *h*AChEs in vitro ... 208
V. Incorporation de pipérazines *N*-substituées ... 211
V.1. Conception *in silico* ... 211
V.2. Synthèses des réactivateurs comportant un motif pipérazine *N*-substituée ... 214
V.2.1. Synthèses des réactivateurs portant un motif pipérazine *N*-alkylée ... 214
V.2.1.1. Synthèse des réactivateurs incorporant la *N*-méthyle pipérazine (146-147) ... 215
*V.2.1.1.1. Synthèse du réactivateur 146* ... *215*
*V.2.1.1.2. Synthèse du réactivateur 147* ... *215*
V.2.1.2. Synthèse des réactivateurs portant le motif *N*-éthylpipérazine (148-149) ... 216
*V.2.1.2.1. Synthèse du réactivateur 148* ... *216*
*V.2.1.2.2. Synthèse du réactivateur 149* ... *217*
V.2.2. Synthèses des réactivateurs portant un motif *N*-aryl pipérazine ... 218
V.2.2.1. Synthèse des réactivateurs incorporant la -phényl pipérazine (150-151) ... 218
*V.2.2.1.1. Synthèse du réactivateur 150* ... *218*
*V.2.2.1.2. Synthèse du réactivateur 151* ... *219*

V.2.2.2. Synthèses des réactivateurs portant le motif *N*-benzylpipérazine (152-153) ..... 220
*V.2.2.2.1. Synthèse du réactivateur 153* ..... *220*
*V.2.2.2.2. Synthèse du réactivateur 152* ..... *222*
V.2.2.3. Synthèse des réactivateurs portant le motif *N*-(diphenyl)methylpipérazine (154-155) ..... 223
*V.2.2.3.1. Synthèse du réactivateur 154* ..... *223*
*V.2.2.3.2. Synthèse du réactivateur 155* ..... *224*
V.2.3. Synthèses des réactivateurs portant une pipérazine *N*-hétérocyclique ..... 225
V.2.3.1. Synthèse des réactivateurs portant le motif *N*-(2-pyridin)pipérazine (156-157) ..... 225
*V.2.3.1.1. Synthèse du réactivateur 156* ..... *225*
*V.2.3.1.2. Synthèse du réactivateur 157* ..... *226*
V.2.3.2. Synthèse des réactivateurs portant un motif *N*-(2-pyrimidin)pipérazine (158-159) ..... 227
*V.2.3.2.1. Synthèse du réactivateur 158* ..... *227*
*V.2.3.2.2. Synthèse du réactivateur 159* ..... *228*
V.3. Evaluations biologiques des réactivateurs incorporant une pipérazine ..... 229
V.3.1. Evaluations *in vitro* ..... 229
V.3.1.1. Passage de la BHE *in vitro* ..... 229
V.3.1.2. Réactivation de l'*h*AChE inhibée par différents NOPs ..... 230
V.3.1.3. Effet sur les récepteurs nicotiniques ..... 234
V.3.2. Evaluations *in vivo* ..... 235
VI. Conclusion du chapitre 3 ..... 236

CHAPITRE 4 : VERS UN PASSAGE ACTIF DE LA BHE – SYNTHESE DE REACTIVATEURS COMPORTANT UN MOTIF CARBOHYDRATE ..... 243

I. Introduction ..... 245
II. Conception *in silico* de réactivateurs incorporant un motif carbohydrate ..... 246
III. Synthèses des réactivateurs incorporant un motif carbohydrate ..... 248
III.1. Synthèses des réactivateurs de première génération ..... 248
III.1.1. Analyse rétrosynthétique ..... 248
III.1.2. Synthèse du PW094 ..... 249
III.1.3. Synthèse du PW150 ..... 250
III.2. Synthèses des réactivateurs de seconde génération ..... 251
III.2.1. Analyse rétrosynthétique ..... 251
III.2.2. Synthèse du PW205 ..... 252
III.2.3. Synthèse du PW208 ..... 253

IV. Evaluations biologiques des réactivateurs incorporant un motif carbohydrate ..... 256
IV.1. Evaluations *in vitro* des PW094 et PW150 ..... 256
IV.2. Evaluations *in vitro* des PW205 et PW208 ..... 256
IV.3. Evaluation *in vivo* du PW208 ..... 257
V. Vers une version améliorée du PW208 ..... 258
V.1. Conception *in silico* ..... 258
V.2. Synthèses de la molécule 230 ..... 259
V.2.1. Analyse rétrosynthétique ..... 259
V.2.2. Voie A : couplage de Buchwald-Hartwig ..... 261
V.2.3. Voie B : couplage peptidique ..... 263
VI. Conclusion du chapitre 4 ..... 264

CHAPITRE 5 : DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES FONCTIONS REACTIVATRICES NON CHARGEES ..... 269

I. Introduction ..... 271
II. Les thiadiazoles aldoximes ..... 274
II.1. Conception *in silico* ..... 274
II.2. Synthèse du 1,2,3-thiadiazole aldoxime incorporant une morpholine - 254 ..... 277
II.2.1. Rétrosynthèse ..... 277
II.2.2. Synthèse du fragment A ..... 278
II.3. Synthèses des 1,3,4-thiadiazole aldoximes 250 à 253 ..... 279
II.3.1. Rétrosynthèses ..... 279
II.3.2. Voie A – synthèse de la molécule 232 ..... 280
II.3.3. Voie B ..... 281
II.3.3.1. Synthèses des fragments C' ..... 282
II.3.3.2. Synthèse de l'acide carboxylique 270 ..... 282
II.3.3.3. Couplage des fragments C' avec l'acide methoxy acétique 271 ..... 283
II.3.3.4. Couplage des fragments C' avec l'acide benzyloxy acétique 275 ..... 284
II.3.3.5. Couplage des fragments C' avec l'acide acetoxy acétique 276 ..... 285
III. Le naphtaldoxime – une découverte inattendue ouvrant un large champ de possibilités ..... 287
IV. Conclusion du chapitre 5 ..... 289

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ..... 293

PARTIE EXPERIMENTALE ..... 303

BIBLIOGRAPHIE ..... 447

PUBLICATIONS ..... 503

# ABREVIATIONS

| | |
|---|---|
| %React max | Pourcentage de réactivation maximal |
| Å | Ångström ($10^{-10}$ m) |
| Ac | Acétyl |
| ACh | Acétylcholine |
| AChE | Acétylcholinestérase |
| ACN | Acétonitrile |
| AcOH | Acide Acétique |
| ADOC | 4-amino-2- (diethylaminomethyl)phenol |
| ADQ | Amodiaquine |
| Ala | Alanine |
| APTS | Acide paratoluene sulfonique |
| Asn | Aspargine |
| Asp | Aspartate |
| ATC | Acetylthiocholine |
| AUC | Air sous la courbe |
| AUCM | Air sous la courbe dérivée |
| BChE | Butyrylcholinestérase |
| BHE/ BBB | Barrière hémato-hencephalique / blood brain barrier |
| BIMP | Bis(isopropylmethyl)Phosphonate (analogue du srain) |
| BINAP | 2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl |
| Bn | Benzyl |
| Boc | Di-tert-butyl dicarbonate |
| BPMP | Bis(pinacolylmethyl)Phosphonate (analogue du soman) |
| BSA | Bovine Serum Albumine |
| CaE | Carboxylesterase |
| CAT1 | Cationic amino acid transporters 1 |
| CCM/TLC | Chromatographie sur couche mince |
| CDI | 1,1′-Carbonyldiimidazole |
| Ch | Choline |
| ChE | Cholinesterase |
| CHO | Chinese Hamster ovocyte / Ovocyte de hamster chinois |
| CNS-MPO | Centrale nervus system multiparameter optimization |
| CNT2 | Concentrative nucleoside transporter 2 |
| CVX | O-butyl-(2-(diethylamino)ethyl) methylphosphonothioate - VX chinois |
| DAM | Diacetylmonooxime |
| Dba | Dibenzylideneacetone |
| DCE | Dicholoréthane |
| DCM | Dichorométhane |
| DCNP | Diethylcyanophosphonate |
| DCP | Diethylchlorophosphate |
| DDT | Dichlorodiphényltrichloroéthane |
| DFP | Diisopropylfluorophosphate |

| | |
|---|---|
| DFT | Density functional theory |
| Dh | Diamètre hydrolique |
| DIBAL-H | Diisobutylaluminium hydride |
| DIC | *N*,*N*'-Diisopropylcarbodiimide |
| DIEA | Diethylamine |
| DIPEA | *N*,*N*-Diisopropylethylamine |
| DMAPA | *N*,*N*-Dimethylaminopropylamine |
| DMF | *N*,*N*-Diméthylformamide |
| DMP | Dess martin's periodonate – réactif de Dess Martin |
| DMPU | 1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1*H*)-pyrimidinone |
| DMSO | Dimethyl sulfoxyde |
| DTNB | 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) |
| EDC | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide |
| *ee*AChE | Acétylcholinestérase d'*Electrophorus Electricus* |
| EEDQ | *N*-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline |
| Et | Ethyle |
| EtOH | Ethanol |
| FAS | Fasiculine A |
| GA | Tabun |
| $GABA_A$ | Recepteur γ-aminobutyric acid |
| GB | Sarin |
| GD | Soman |
| GF | Cyclosarin |
| Gln | Glutamine |
| Glu | Glutamate |
| Gly | Glycine |
| *h*AChE | Acétylcholinestérase *Humaine* |
| HATU | 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium-3-oxide hexafluorophosphate |
| HBA | Hydrogene bond acceptor / accepteur de liaison hydrogène |
| HDB | Hydrogene bond donor / donneur de liaison hydrogène |
| HI-6 | Asoxime |
| His | Histidine |
| Hobt | N-Hydroxybenzotriazole |
| HPLC | High presure liquide chromatographie / Chromatographie liquide en haute pression |
| $IC_{50}$ | Concentration mediane d'inhibition |
| IdP | Indice de poly-dispersion |
| IM | Intramusulaire |
| IP | Intraperitonéal |
| IV | Intraveneuse |
| $k_{cat}$ | Taux de roulement d'une enzyme (turnover catalytique) |
| $K_D$ | Constante de dissociation |
| $k_i$ | Constante cinétique d'inibition |
| $K_m$ | Constante de dissociation associé au bioépurateur catalytique |
| $k_{obs}$ | Constante cinétique observée à une concentration |
| $k_r$ | Constante cinétique de réactivation |

| | |
|---|---|
| $k_{r2}$ | Efficacité de réactivation |
| LAH | Lithiumaluminium hydride / hydrure de lithiumaluminium |
| LAT1 | Human L-type amino acid transporter 1 |
| $LCT_{50}$ | Concentration létale mediane par inhalation où 50 |
| $LD_{50}$ | Dose lethal mediane |
| LDLo | Dose minimale létale |
| LogD | Distribution coefficient |
| LogP | Partition coefficient |
| LüH-6 | Obidoxime |
| *m* | *Meta* |
| *m*AChE | Acétylcholinestérase de *Souris (mouse)* |
| mAChR | Recepteurs muscarinique de l'acétycholine |
| Me | Methyl |
| MeOH | Methanol |
| MINA | Monoisonitrosoacetone |
| MMB-4 | Méthoxime |
| MOM | Méthoxyméthyle |
| MRT | Mean residence time / temps de résidence moyen |
| Ms | Mesyle |
| MS | Molecular sieve / tamis moléculaire |
| MW | Molecular Weight / Masse moléculaire |
| nAChER | Recepteur nicotinique de l'Achetylcholine |
| NCMP | Nitrophenyl Cyclohexyl Methyl Phosphonate (analogue du cyclosarin) |
| Nd | Non déterminé |
| NEDPA | 4-Nitrophenyl Ethyl Dimethyl phosphoramidate (analogue du tabun) |
| NEMP | 4-Nitrophenyl Ethyl Methyl Phosphonate (analogue du VX) |
| NIMP/INMP | Nitrophenyl Isopropyl Methyl Phosphonate (analogue du sarin) |
| NMDA | Récepteurs *N*-Methyl D-Aspartate |
| NMP | N-Methyl-2-pyrrolidone |
| NOP | Neurotoxique organophosphoré |
| NTE | Neuropathy Target Esterase |
| Nu | Nucléophile |
| *o* | *Ortho* |
| OIAC | Organisation pour l'interdiction des armes chimiques |
| OP | Organophosphoré |
| OPH | Organophosphate hydrolase |
| OPIDN | OP-Induced Deleyed Neuropathy - Neuropathie retardée induite par les OPs |
| OX | Oxime |
| *p* | *Para* |
| PAM | N-methylpyriridinium aldoxime |
| PAMPA | Parallel artificial membrane permeability assay |
| PAS | Peripheral anionic site / site périphérique |
| PBS | Phosphate buffer salin / tampon phosphate |
| PC | Percultannée |
| Pe | Permeabilité |

| | |
|---|---|
| Ph | Phényle |
| pH | Potentiel Hydrogène |
| Phe | Phenylalanine |
| PhX | (2-(diisopropylamino)ethyl) O-ethyl phenylphosphonothioate (analogue du VX) |
| PI | Protecting index / indice de protection |
| PIMP | Phthalimidyl Isopropyl Methyl Phosphonate |
| PIQ | Phenyl tetrahydroisoquinoléine |
| POX | Paroxonase |
| PSA | Topological polar surface / surface polaire |
| PTE | Phosphotriesterases |
| Py | Pyridine |
| Pym | Pyrimidine |
| PZ | Potentiel Zeta |
| QM/MM | Quantum mechanics/molecular mechanics |
| QOL | Quality of Life |
| r | Recombinante |
| RA | Relative activity / activité relative |
| RB | Rotative bond / liaison rotative |
| RMN/NMR | Resonnance magnétique nucléaire / Nuclear Magnetic Resonnance |
| rt | Room temperature |
| SAR | Structure -activity relationship / relation structure-activitée |
| Ser | Serine |
| SFC | Supercritique flash chromatography |
| SLN | Solid Lipid nanoparticules |
| SNC / CNS | Système nerveux central / central nervous system |
| $t_{½}$ | Temps de demi-vie |
| TBAF | Tetra-*n*-butylammonium fluoride |
| TBDMS | Tertbutyldimethylsilyle |
| TBDPS | Tertbutyldiphenylsilyle |
| *t*-Bu | *Tert*-butyl |
| *Tc* | *Torpedo Califonica* |
| TEA | Triethylamine |
| TEEP | Tétraéthyle pyrophosphate |
| TEMP | 3,5,6-Trichloro-2-pyridinyl Ethyl Methyl Phosphonate |
| TEP | Triéthyle phosphate |
| Tf | Triflate |
| TFA | Acide trifluoroacétique |
| THF | Tetrahydrofurane |
| TIMP | 3,5,6-Trichloro-2-pyridinyl Isopropyl Methyl Phosphonate |
| TIQ | Tetrahydroisoquinoléine |
| $t_{max}$ | Temps au but duquel le maximum est atteint |
| TMB-4 | Trimedoxime |
| Trp | Triptophane |
| Ts | Tosyle |
| Tyr | Tyrosine |

| | |
|---|---|
| UV | Ultra-violet |
| Val | Valine |
| $V_d$ | Volume de distribution |
| VE | (2-(diethylamino)ethyl) O-ethyl ethylphosphonothioate |
| VG | (2-(diethylamino)ethyl) O,O-diethyl phosphorothioate - Amiton |
| VM | (2-(diethylamino)ethyl) O-ethyl O-methyl phosphorothioate |
| VR | (2-(diethylamino)ethyl) O-isobutyl methylphosphonothioate -VX russe |
| VX | (2-(diisopropylamino)ethyl) O-ethyl methylphosphonothioate |
| Xantphos | 4,5-Bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthene |
| Vis | Visible |

# INTRODUCTION & OBJECTIFS

Le triéthyle phosphate (TEP -**Figure 1**), synthétisé par Franz Anton Voegeli en 1848, est le premier composé organophosphoré (OP) reporté dans la littérature.[1] Cette découverte a été rapidement occultée par celle de Philipe de Clermont et Wladimir Moschnin qui, en 1854, ont synthétisé le tétraéthyle pyrophosphate (TEEP -**Figure 1**), qui s'est avéré être le premier inhibiteur organophosphoré de cholinestérases.[2] Bien que de nombreux autres OPs aient été synthétisés par la suite, leur véritable essor n'a eu lieu qu'au 20ème siècle en Allemagne. En 1932, Willy Lange et Gerda von Krueger ont décrit la synthèse des diméthyl- et diéthyl- phosphorofluoridate (**Figure 1**) ainsi que les effets nocifs liés à leur inhalation.[3]

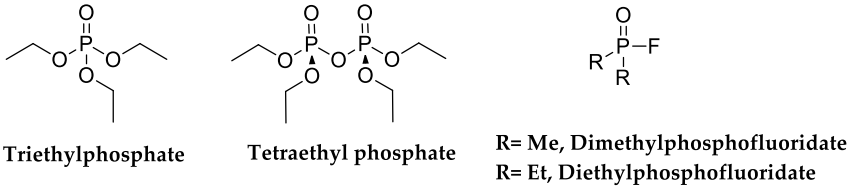



***Figure 1.*** *Premiers organophosphorés synthétisés*

L'industrie phytosanitaire allemande décela alors le potentiel des OPs en tant qu'insecticides - avec comme objectif de rendre le III° Reich moins dépendant des importations alimentaires-[4] au travers des travaux de Gerhart Schrader (I.G. Farben, division Bayer – **Figure 2**) qui découvrit le Tabun (GA) en 1936.[5] Cette molécule incolore et inodore se révéla extrêmement toxique : non contente de détruire les parasites, cette substance s'est avérée mortelle pour un grand nombre de mammifères.

Sous l'égide de l'armée allemande, Schrader poursuivit ses recherches : plus de 2 000 OPs furent alors synthétisés incluant le paraoxon, le parathion, le Sarin (GB), le soman (GD) et le cyclosarin (GF). L'armée du gouvernement national socialiste allemand étudia leur utilisation en tant qu'arme chimique sans pour autant les utiliser à grande échelle lors de la Seconde Guerre Mondiale et ce, malgré leur potentiel de destruction supérieur à celle des armes chimiques de l'époque (phosgène, gaz moutarde, ypérite…) et malgré la production de 12 000 tonnes de Tabun[6] entre 1942 et 1945 (usine de Duhernfurth – **Figure 2**).

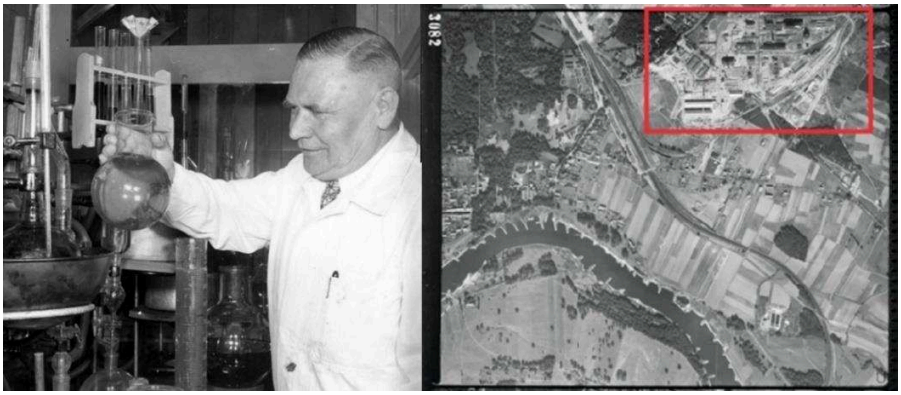


***Figure 2.*** *A droite, Gerhart Schrader au sein de son laboratoire à I.G. Farben[7] ; à gauche vue aérienne de l'usine de Duhernfurth en Pologne où furent produit à grande échelle le Tabun[4]*

Suite à ce conflit mondial et dans un contexte de guerre froide, la recherche à des fins militaires se poursuivit au sein des puissances mondiales avec le développement du VX par les britanniques[8] (qui fut ensuite produit en masse par les américains), du VR (ou VX russe) et des Novichoks par les soviétiques.[9] Parallèlement, l'industrie phytosanitaire poursuivit son effort de recherche et de nombreux OP toxiques pour les insectes, mais « moins » toxiques pour les humains furent développés dont le malathion aux Etats-Unis.[10]

L'utilisation avérée de ces agents en tant qu'armes chimiques n'arrivera qu'à partir des années 80. En effet, lors du conflit Iran-Irak (1980-1988), l'armée irakienne utilisa le tabun, le sarin et le cyclosarin contre les troupes iraniennes (**Figure 3**), entre 1984 et 1988, mais aussi contre des populations civiles notamment en mars 1988 à Halabja.[11] Lors de la guerre du Golfe (1990-1991), les forces américaines furent exposés au Sarin et au cyclosarin lors de la destruction des munitions irakiennes à Khamisiyah et Muhammadiyat.[12] A la suite de la défaite de l'Irak en février 1991, une insurrection au sein de la population eut lieu en mars 1991, écrasée rapidement par le régime en place par l'emploi de 10 à 32 bombes au sarin dans les régions Najaf et Kerbala.[12]

***Figure 3.*** *Soldat iranien équipé d'un masque à gaz lors de la guerre Iran-Irak*[13]

Devant la menace représentée par ces agents ainsi que leur prolifération, un traité international de désarmement fut signé à Paris en 1993 (Convention sur l'interdiction des armes chimiques, entrée en vigueur en 1997).[14] Ce premier traité multilatéral interdit la mise au point, la fabrication, le stockage et l'usage de toute arme chimique comme arme de destruction massive. Elle encourage et vérifie la destruction des stocks existants des pays qui ont ratifié ce traité (192 pays actuellement) *via* l'Organisation pour l'interdiction des armes chimiques (OIAC). Au 1er janvier 2018, Israël n'a toujours pas ratifié ce traité malgré son statut de signataire ; l'Egypte, la Palestine, le Soudan du Sud ainsi que la Corée du Nord ne l'ont toujours pas signé.

Malgré ce traité, certains OPs furent utilisés lors d'attaques terroristes ou de répression de population civiles. A partir de fin 1993 à 1994, la secte Aum Shinrikyō (« Vérité suprême D'Aum »), dirigée par

Shoko Ashara, produisit illégalement du VX et du sarin à des fins d'assassinat. En 1994 à Matsumoto, 12 litres de sarin (≈ 94 moles) furent libérés (8 morts, 600 blessés) et en 1995, environs 11 litres (≈ 88 moles) sont relâchés dans 5 rames de métro à l'heure de pointe (12 morts, 5 500 blessés, **Figure 4**).[15,16]

***Figure 4.*** *Attentat au gaz sarin dans le métro de Tokyo (1995)*[17,18]

Plus récemment, la guerre civile syrienne (2011 à aujourd'hui) fut et est encore le théâtre de nombreuses attaques au sarin par le régime syrien - signataire de la convention sur l'interdiction des armes chimiques depuis 2013 - sur ses populations civiles de 2012 à 2017 notamment en août 2013 lors du massacre de Ghouta[19] (502 à 1 845 morts, 3 600 à 9 924 blessés) et en avril 2017 lors du Massacre de Khan Cheikhoun[20] (37 à 200 morts, 400 à 557 blessés – **Figure 5**). Pour l'heure, aucun bilan humain global n'a été fait, pour des raisons évidentes, il faudra attendre la fin de ce sanglant conflit.

***Figure 5.*** *Les secouristes arrosent les victimes touchées par l'attaque au gaz sarin à Khan Cheikhoun (2017)*[21]

En Février 2017, un NOP fut utilisé à des fins d'assassinat politique. Kim Jong-Nam, demi-frère en exil du dirigeant actuel nord-coréen, reçut au visage du VX à l'aéroport de Kuala Lumpur en Malaisie ; il mourut des suites de ces projections après vingt minutes d'agonie (**Figure 6**).[22] Enfin, en mars 2018, Serguëi Skripal, un ex-agent double d'origine russe, et sa fille sont empoisonné au Novichok dans le sud du Royaume-Uni.[23]

***Figure 6.*** *Le déroulement de l'assassinat de Kim Jong-nam*[24]

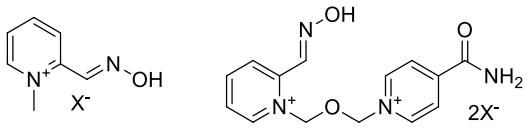
Aux risques avérés d'utilisation des OPs comme agent de guerre, s'ajoute la problématique de l'utilisation massive des OPs dans l'agriculture mondiale. L'emploi de ces agents hautement biocides sans précaution dans le domaine phytosanitaire est un enjeu majeur de santé publique : il provoquerait plus de 300 000 cas d'empoisonnement aigües ou chroniques dans le monde, dont 168 000 cas de suicide, essentiellement dans les pays en voie de développement (Asie, Afrique et Moyen-Orient).[25–27] Du fait de la sélectivité limitée des OPs entre les espèces ciblées et non-ciblées[25], mais aussi leur présence avérée dans l'environnement[28] (air, eau, sol, aliment), leur utilisation est décriée et de plus en plus réglementée,

leur effets à long terme étant méconnus. En France, seuls 10 OPs restent autorisés pour un usage phytosanitaire.[29]

Le mécanisme d'action principal des OPs ainsi que les suites occasionnées par une intoxication aiguë sont bien connus de nos jours. En effets, les neurotoxiques organophosphorés (NOPs) sont des inhibiteurs irréversibles de l'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme ayant un rôle clef dans la transmission de l'influx nerveux dans les systèmes nerveux central et périphérique. En présence d'OPs, cette estérase est inactivée via la phosphylation irréversible de la sérine catalytique provoquant un large éventail de manifestations cliniques allant des convulsions à la mort par arrêt respiratoire.

A l'heure actuelle, un empoisonnement aux NOPs est contré par l'administration d'un cocktail de 3 composés : l'atropine (antagoniste des récepteurs muscariniques) permettant de lutter contre les symptômes cholinergiques, un dérivé des benzodiazépines comme le diazépam traitant les convulsions et ayant des propriétés anxiolytiques et enfin, un « réactivateur », composé en général à base d'un nucléophile de type oxime, qui permet de régénérer l'activité catalytique de l'AChE en déphosphylant la sérine de l'enzyme.[30]

De nombreux travaux de recherche sur les réactivateurs ont été menés depuis le développement des NOPs. En 1956, une première famille de réactivateurs est développée : les pyridiniums aldoximes avec comme figure de proue le pralidoxime (2-PAM, **Figure 7**).[31] Après plus de 70 ans de recherche, les réactivateurs les plus efficaces sont toujours des dérivés de pyridiniums aldoximes, notamment les bis-pyridiniums aldoximes dont fait partie l'asoxime[32] (HI-6 – publiée en 1966 - **Figure 7**).



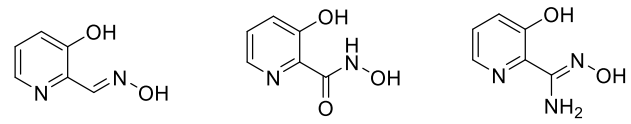

**2-PAM** **HI-6**

***Figure 7.*** *Structure du 2-PAM et du HI-6*

Cependant ces réactivateurs présentent de nombreuses limitations, dont leur très faible capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique (du fait de leur charge permanente) et à réactiver efficacement les AChEs inhibées par les NOPs dans le système nerveux central (SNC). Par ailleurs, leur efficacité est très dépendante de la nature du NOP utilisé, et il n'existe pas, aujourd'hui, de réactivateur universel. Dans ce contexte, le développement de nouveaux réactivateurs efficaces est un réel défi.[33]

En collaboration avec les équipes du Dr. Florian Nachon (Institut de recherche biomédicale des Armées, IRBA, à Brétigny/Orge), Dr. Rachid Baati (Université de Strasbourg) et du Dr. Martin Weik (IBS Grenoble), notre laboratoire travaille depuis une dizaine d'année sur le développement de nouvelles fonctions réactivatrices et de nouveaux réactivateurs pour les cholinestérases inhibées par les NOPs.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence trois nouvelles fonctions non chargées (**Figure 8**) capables d'hydrolyser efficacement les NOPs.[34] Suite à ces résultats, afin de cibler les cholinestérases, et d'augmenter l'affinité de ces oximes pour cette enzyme une fois phosphylée, la fonction 3-hydroxypyridine aldoxime a été associée à un ligand du site périphérique de l'AChE pour accéder à des familles de réactivateurs originaux non-chargés présentant des capacités à réactiver les cholinestérases inhibées pour des composés organophosphorés (VX, Tabun et paraoxon) équivalentes et même supérieures à celle des mono- et bis pyridiniums aldoximes.[33,35–40]




**Pyridine aldoxime** **Hydroxamic acid** **Amidoxime**

***Figure 8.*** *α-nucléophiles développés au sein de l'équipe*

Dans la continuité de ces travaux, afin d'accéder à des composés possédant une meilleure biodisponibilité et des données pharmacocinétiques plus favorables que les premiers composés obtenus, l'objectif de cette thèse, financée par la Direction Générale de l'Armement (DGA), consiste à développer des réactivateurs non-chargés comprenant différents ligands aminés associés à une fonction réactivatrice (**Figure 9**). Ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'un programme ANR Astrid « ReCNS-AChE » 2013-2017 et d'un programme cogito PHC franco-croate 2015-2017.

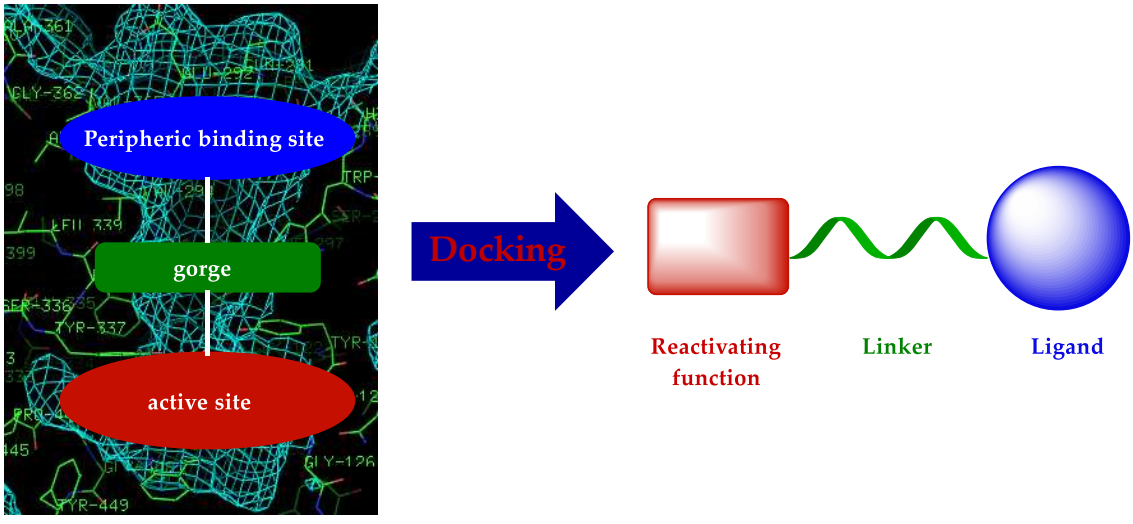



***Figure 9.*** *Principe des réactivateurs synthétisés au sein du laboratoire*

Ce manuscrit s'articulera autour de cinq chapitres. Le premier chapitre sera consacré aux NOPs, leur mécanisme d'inhibition de l'AChE, les différentes contre-mesures médicales existantes ainsi que l'état de l'art en matière de réactivateurs.

Le deuxième chapitre sera consacré à la synthèse et aux évaluations biologiques de réactivateurs non-chargés dérivés de la tétrahydroisoquinoléine, de la morpholine et de la diéthylamine en ligand du site périphérique déjà développés au sein du laboratoire (**Figure 10**).

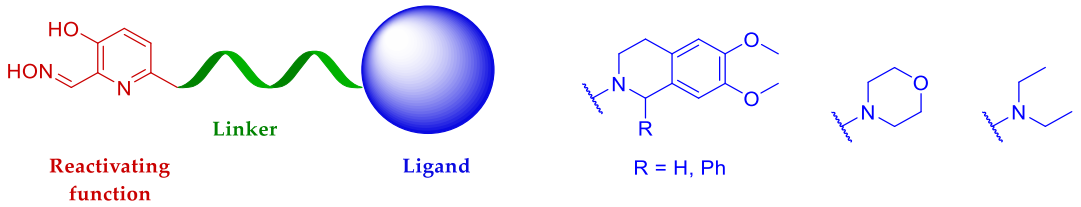



***Figure 10.*** *Structure générale des réactivateurs non-chargés resynthétisés*

Dans la continuité de ce chapitre 2, la conception de nouveaux réactivateurs incorporant différentes amines cycliques ainsi que leurs évaluations biologiques seront présentées en détail dans le chapitre 3 (**Figure 11**).

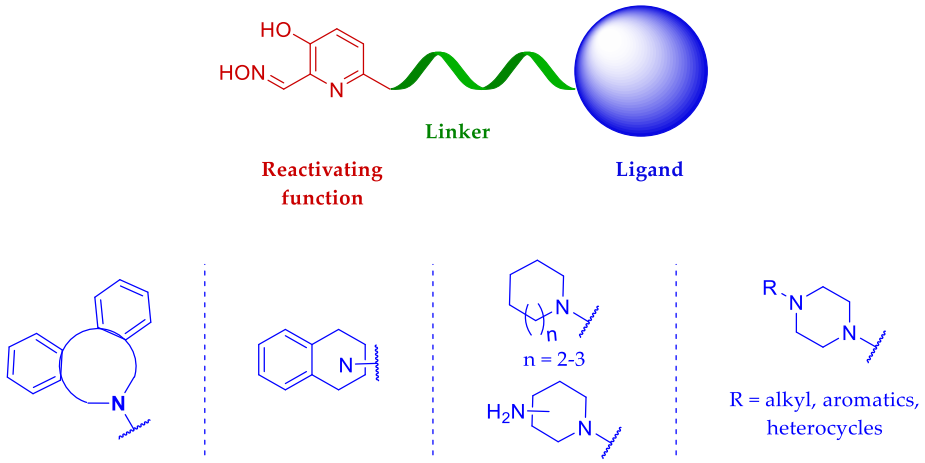



***Figure 11.*** *Structure générale des réactivateurs non-chargés incorporant différentes amines cycliques*

Nous aborderons ensuite dans le chapitre 4 l'élaboration et l'évaluation *in vivo* de réactivateurs non-chargés comportant un motif carbohydrate pour un passage actif de la BHE (**Figure 12**).

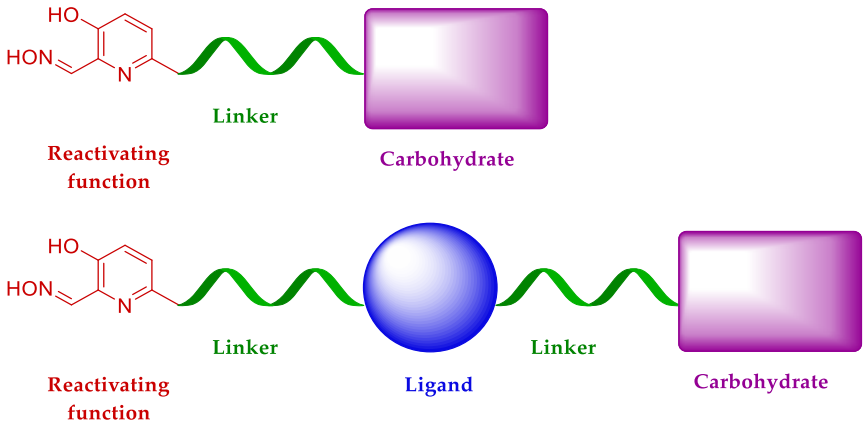



***Figure 12.*** *Structure générale des réactivateurs non-chargés pour un passage actif de la BHE*

Enfin, avant de conclure et d'énoncer les perspectives de ces travaux de recherche, un cinquième chapitre sera consacré au développement de nouveaux réactivateurs non-chargés incorporant de nouvelles fonctions réactivatrices notamment le thiadiazole-5-carboxaldoximes comme nouvelle fonction réactivatrice (**Figure 13**).

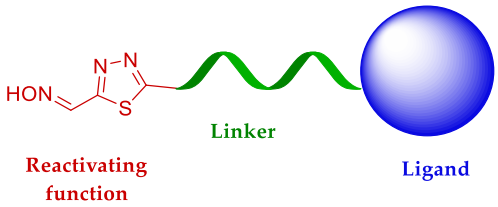


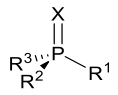

***Figure 13.*** *Structure générale des réactivateurs portant le thiadiazole-5-carboxaldoximes en tant que fonction réactivatrice*

# CHAPITRE 1 : L'EMPOISONNEMENT AUX NOPS, UNE PROBLEMATIQUE TOUJOURS D'ACTUALITE

# I. Les neurotoxiques organophosphorés

## I.1. Généralités

Les organophosphorés sont des molécules organiques contenant un phosphore pentavalent. Dérivés d'acide orthophosphorique ou thiophosphorique, ils comportent une structure commune : une liaison phosphoryle (P=O) ou thiophosphoryle (P=S), un groupe partant (CN, F, OR, SR …) et deux substituants de nature variable (alkoxy, alkyle, aryl, amine, thioalkyle) selon la classe du composé (**Figure 14**).



X = O, S
$R^1$ = alkoxy
$R^2$ = alkoxy, alkyl, aryl, amine, thioalkyl
$R^3$ = leaving group (F, OR, SR, CN ...)

***Figure 14.*** *Structure générale des organophosphorés*

Du fait de la grande diversité des structures, mais aussi de leur position relative sur l'atome de phosphore, il n'existe pas de classification universelle. Cependant, 13 grandes familles peuvent être mises en évidence (**Tableau 1**).

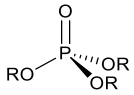
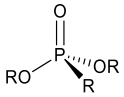
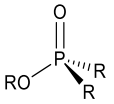
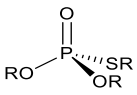
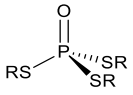
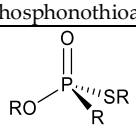
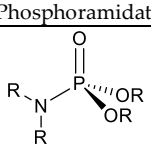
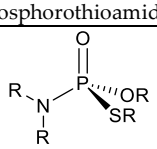
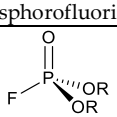
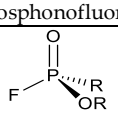
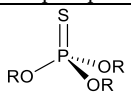
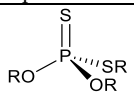
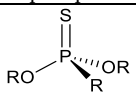
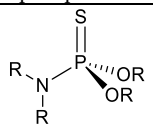
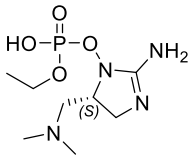
| **Phosphoryles (P=O)** | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Phosphate | Phosphonate | Phosphinate | Phosphorothioate s-substitué | Phosphorotrithioate |
|  |  |  |  |  |
| Phosphonothioate | Phosphoramidate | Phosphorothioamidate | Phosphorofluoridate | Phosphonofluoridate |
|  |  |  |  |  |
| **Thiophosphoryles (P=S)** | | | | |
| Thiophosphate | Phosphorodithioate | Thiophosphonate | Thiophosphoramidate | |
|  |  |  |  | |

***Tableau 1.*** *Structure générale des organophosphorés.*[41]

L'accès synthétique à ces composés a été possible grâce à la contribution de nombreux chimistes de renom (Alexander Williamson, Karl August Michaelis, Alexander Arbusov)[1] et a permis de synthétiser plusieurs milliers d'OPs depuis la fin du 19ème siècle. Seule une cyanotoxine, l'anatoxin-a(S), isolée en 1991 de la cyanobactérie *Anabaena flosaquae*, est d'origine naturelle (**Figure 15**).[42]



**Anatoxin-a(S)**

***Figure 15.*** *Structure de l'anatoxin-a(S)*

Les organophosphorés sont essentiellement utilisés en tant qu'agents neurotoxiques ou phytosanitaires. Cependant, de nombreuses industries (plasturgie, textile, électronique…) utilisent des OPs en tant que retardateur de flamme (en 2006, 20% étaient des OPs), d'agent plastifiant, anti-mousse, fluidifiant (**Figure 16**).[43] De manière plus anecdotique, certains OPs ont été utilisés en médecine vétérinaire (anthelminthique et ectoparasiticide)[41] et humaine notamment pour le traitement du glaucome ou de la bilharziose[44] (**Figure 16**).

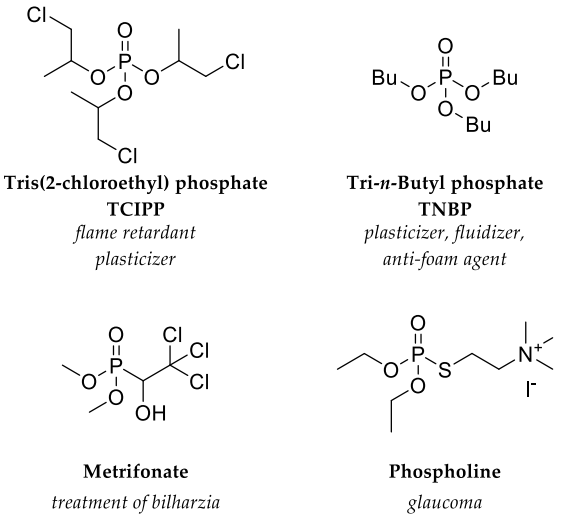



***Figure 16.*** *Applications diverses des OPs*

## I.2. Les pesticides organophosphorés

Le TEPP, synthétisé en 1834 par Philipe de Clermont et Wladimir Moschnin, est le premier OP à avoir été utilisé comme pesticide. Cependant sa forte toxicité et son instabilité ont conduit au développement d'autres composés au travers des recherches menées par Gerhard Schrader (Figure I.3). Ce n'est qu'à partir de 1950 que la production mondiale s'intensifia grâce à leur efficacité mais aussi en raison de la restriction d'usage, dès 1970, de nombreux organochlorés très utilisés comme le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT - **Figure 17**).[45]

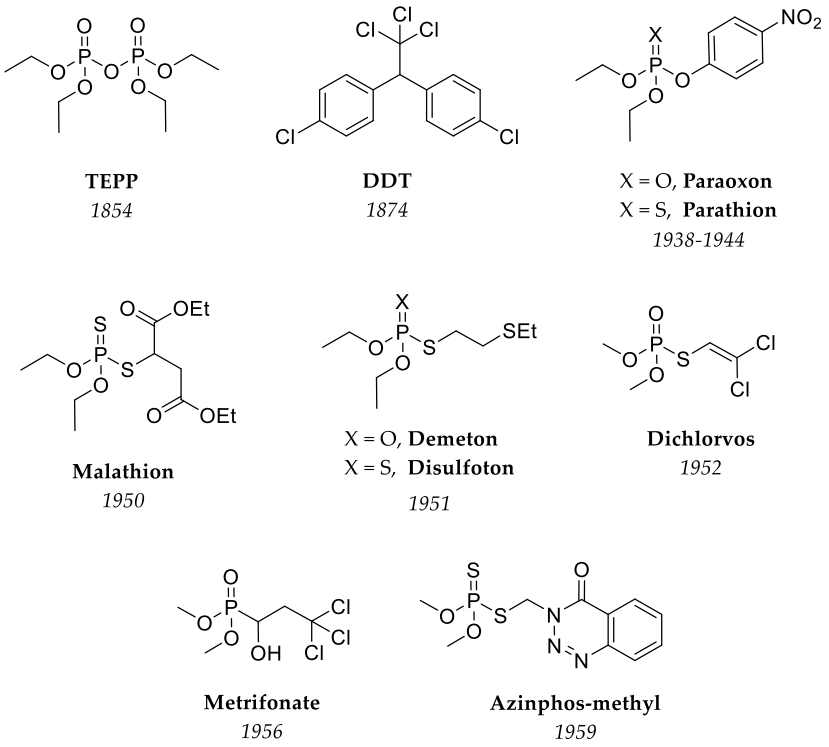



***Figure 17.*** *Exemples de pesticide OP synthétisés de 1850 à 1960, et structure du DTT.*

Bien moins persistants dans l'environnement que les organochlorés, les pesticides OPs ne sont pas sans danger. En raison de leur manque de sélectivité entre les espèces ciblées et non-ciblées[25], mais aussi de leur présence avérée - ainsi que celle de leurs métabolites - dans l'environnement[28] (air, eau, sol, aliment), leur usage est décrié et très réglementé, leur effets à long terme étant méconnus. Leur utilisation domestique et industrielle imprudente, mais aussi leur détournement à des fins de suicide provoqueraient plus de 300 000 intoxications chaque année.[25–27] A noter que ce chiffre est largement sous-estimé par manque de données épidémiologiques fiables.

Au sein de l'Europe, la mise sur le marché d'un pesticide est encadrée par l'Union Européenne depuis une directive de 1993 (CE n°1107/2009). Ainsi, la France, second consommateur de pesticides en Europe, n'autorise que dix pesticides OPs (**Figure 18**). Nonobstant les réglementations existantes concernant les résidus sur les denrées alimentaires (CE n° 396/2005 - limite maximale réglementaire - non cumulatif), il n'y a aucune disposition prise pour limiter les concentrations résiduelles dans l'air et les sols.

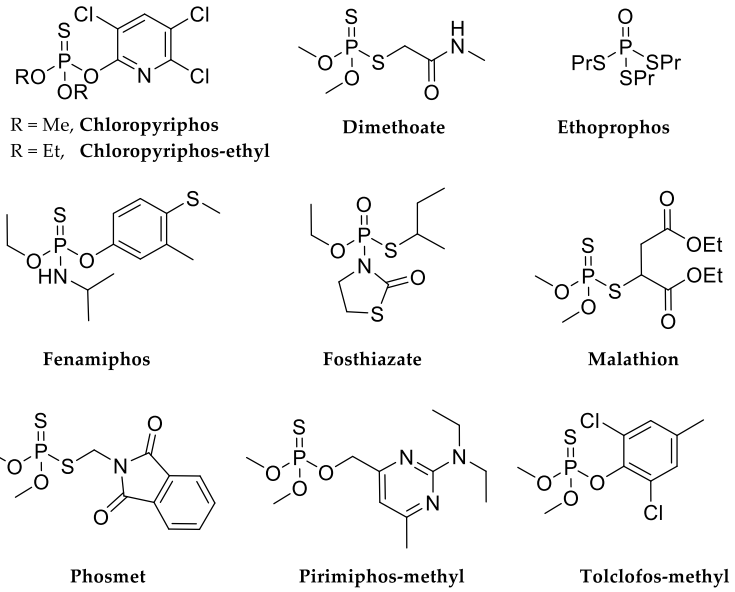



***Figure 18.*** *Structures des insecticides OPs autorisés en France*

## I.3. Les neurotoxiques de guerre

Toujours au travers des recherches menées par Gerhard Schrader puis par les puissances mondiales (USA, UK, URSS, Chine) durant la guerre froide, les NOPs sont classés en 3 familles : les agents G, les agents V et les agents « Novichok ».[46,47] Ils sont caractérisés par leur résistance à l'hydrolyse accrue en comparaison à celles des pesticides OPs.

Les agents G (G pour « German ») ont été développés entre 1936 et 1949 et sont bien connus dans le monde de par leur utilisation volontaire sur des populations lors de conflits armés et attentats (Iran-Irak, Japon, Syrie). On compte, parmi cette classe d'agents, le sarin (GB), le soman (GD), le cyclosarin (GF) et le Tabun (GA - **Figure 19**). Ils se présentent à température ambiante, sous la forme de liquide incolore, inodore, sans saveur et très volatil ce qui augmente le risque d'exposition par inhalation et par voie percutanée. Ils sont, cependant, peu persistants en raison de leur hydrolyse rapide dans l'environnement.

***Figure 19.*** *Structure des agents G*

Les agents V (V pour « Victory », « Venomous » ou « Viscious » selon les sources), ont été développés après 1950 et comptent parmi eux, le VX, le VG, le VR (VX russe),[48] le VE, le CVX (VX chinois) et le VM

(**Figure 20**). Peu de donnés sont disponibles sur ces agents à l'exception du VX. Ils se présentent sous la forme de liquides beaucoup moins volatils que les agents G, incolores, inodores et très persistants entraînant une contamination durable des surfaces (peau, vêtements, sols…).

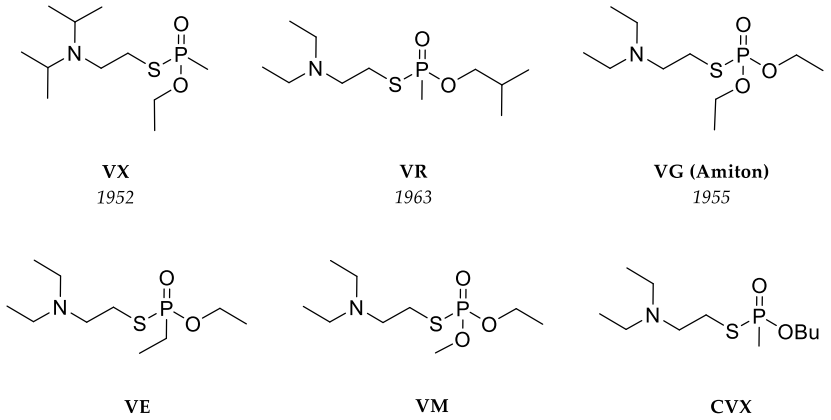



***Figure 20.*** *Structures des agents V*

Les Novichoks (« nouveau venu » en russe) ont été développés par les soviétiques dans un contexte de course à l'armement entre 1970 et 1990. L'objectif était d'avoir un arsenal chimique indétectable, plus sûr à manipuler, ne rentrant pas dans le cadre du traité d'interdiction des armes chimiques et ayant un pouvoir destructeur supérieur aux agents de guerre déjà connus (10 fois plus puissant que le VX). Ils se composeraient de deux composés compartimentés non toxiques qui, après mélange, généreraient le neurotoxique sous la forme d'une poudre fine facilement dispersable. Actuellement, les structures chimiques sont peu connues : les moins puissants ont été publiés en tant que pesticide. Quelques structures de NOP ont été décrites, dans la littérature par Vil Mirzayanov, un chimiste russe exilé aux Etats-Unis, qui aurait travaillé sur ces molécules (**Figure 21**).[47,49] Ce serait un agent de ce type qui aurait été utilisé lors de la tentative d'empoisonnement de l'ex agent double russe Sergei Skripal en mars 2018.[23,50]

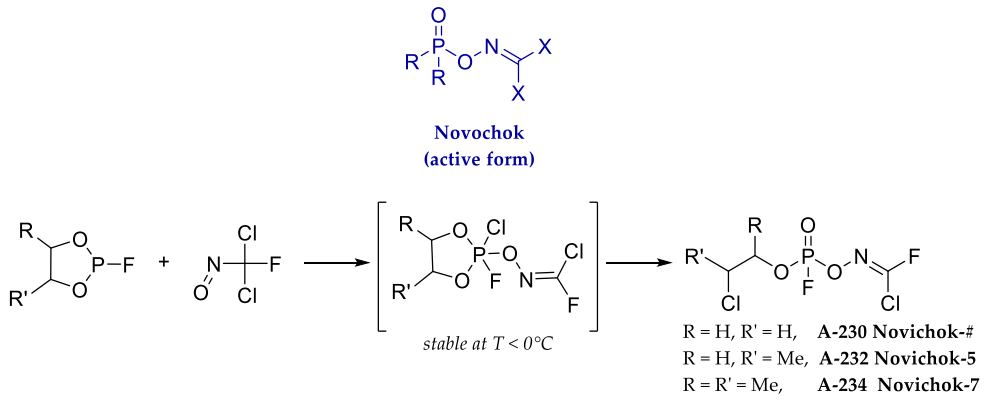



***Figure 21.*** *Structure générale des Novichoks et leur génération*[51]

Dans le **Tableau 2** sont résumés quelques caractéristiques de ces NOPs. Leurs propriétés physico-chimiques (volatilité pour certains et persistance pour d'autres) en font des composés extrêmement

dangereux. Si leurs synthèses sont relativement simples, leurs purifications et leurs manipulations sont extrêmement délicates et nécessitent un personnel qualifié, militaire ou assimilé, respectant les règles fixées par l'OIAC. Les synthèses des OPs ne sont autorisées uniquement qu'à des fins de recherche sur les contre-mesures médicales. L'ensemble des manipulations sur les NOPs, que j'exposerai ci-après, ont été réalisés par l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées (Brétigny-sur Orge, France) et par l'« Institute for Medical Research and Occupational Health » (Zagreb, Croatie).

| Agent | Volatilité à 25°C ($mg/m^3$) | $T_{1/2}$ à 20°C, pH = 7 (h) | $LD_{50}$ percutané (mg/kg) | $LCt_{50}$ inhalation ($mg.min/m^3$) |
|---|---|---|---|---|
| Tabun (GA) | 610 | 8.5 | 1.4 - 2.2 | 150 * |
| Sarin (GB) | 22 000 | 39 - 41 | 2.5 – 2.8 | 50 - 100 |
| Soman (GD) | 3 900 | 80 – 83 | 18 * | 70 * |
| VX | 10.5 | 1 000 | 0.086 * | 5 - 15 (aérosol) |

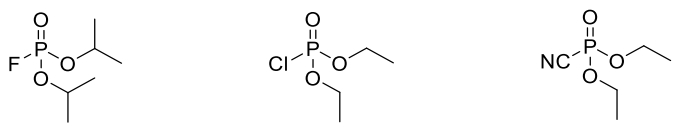
***Tableau 2.*** *Données physico-chimiques et toxicologiques sur l'Homme d'agent innervant ($LCt_{50}$ : concentration létale par inhalation ; * valeur exprimée comme LDLo : dose minimale létale)*[52]

Avec comme objectif de faciliter les recherches sur les contre-mesures médicales, plusieurs équipes ont travaillé sur l'élaboration de substituts possédant des toxicités comparables aux véritables OPs, mais présentant des propriétés physico-chimiques moins problématiques.

## I.4. Substituts de NOPs, une alternative viable pour la recherche.

Cette partie sera consacrée uniquement aux substituts liés à l'intoxication par les OPs sur l'AChE dans le cadre du développement de contre-mesures médicales (sont donc exclus les analogues chromophores, fluorophores, radiomarqués …).

Les organophosphates (pesticides) constituent une possibilité de premier choix dans l'étude des intoxications aux OPs comme le DFP (**D**iisopropyl**F**luoro**P**hosphate) - synthétisé par Gerhard Schrader entre 1938 et 1944 - qui est utilisé par un grand nombre de chercheurs en tant qu'analogue du sarin ainsi que le DCP (**D**iethyl**C**hloro**P**hosphate) mimant le soman et le DCNP (**D**iethyl**cyano**P**hosphonate), son analogue simulant le tabun (**Figure 22**).[53] Cependant ils se révèlent très toxiques sans pour autant donner les adduits identiques sur la sérine de l'AChE que les véritables toxiques, ni simuler la caractéristique même des NOPs, à savoir, leur pouvoir anticholinergique irréversible (Cf partie II de ce chapitre).




**DFP** **DCP** **DCNP**

***Figure 22.*** *Structures des substituts historiques*

D'autres pesticides peuvent être utilisés comme le Parathion mais, doivent d'abord être activés par le cytochrome P450 afin de générer le Paraoxon, métabolite actif, rendant le modèle moins viable *in vivo*.

Des substituts comme le BIMP (**B**is(**I**sopropyl**M**ethyl)**P**hosphonate - analogue du sarin - **Figure 23**) et le BPMP (**B**is(**P**inacolyl**M**ethyl)**P**hosphonate – analogue du soman - **Figure 23**) sont les premiers analogues reportés dans la littérature, et synthétisés par l'équipe de Masataka Nagao (investi lors de l'attentat de Tokyo dans l'analyse chimique des échantillons de sang des victimes).[54,55] Ils présentent une toxicité et une activité anticholinergique semblable à leurs homologues. Toutefois, le BIMP reste très toxique et ne peut pas être stocké (hydrolyse). En 2006 un autre analogue du sarin, le INMP ou NIMP (**I**sopropyl **N**itrophenyl **M**ethyl **P**hosphonate), est reporté dans la littérature comme beaucoup plus stable que le BIMP mais peu de données ont été rapportées.[56]

L'équipe de Charles Mioskowski décrit, en 2000, l'utilisation du PhX en tant qu'analogue du VX. Cette molécule présente une toxicité plus faible que son homologue mais son activité anticholinergique est moindre et réversible (**Figure 23**).[57,58]

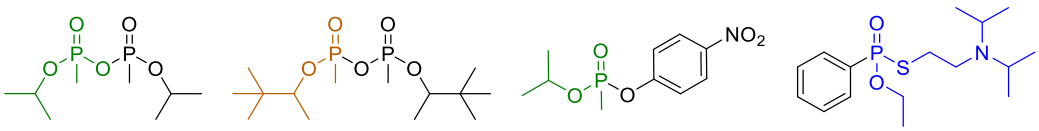



***Figure 23.*** *Structures des substituts de Nagao et de Mioskowski*

En 2012 et 2016, Chambers *et al.* ont publiés sept substituts du VX, sarin et cyclosarin : les NIMP (**N**itrophenyl **I**sopropyl **M**ethyl **P**hosphonate), PIMP (**P**hthalimidyl **I**sopropyl **M**ethyl **P**hosphonate), NEMP (4-**N**itrophenyl **E**thyl **M**ethyl **P**hosphonate), NEDPA (4-**N**itrophenyl **E**thyl **D**imethyl **P**hosphor**A**midate), NCMP (Nitrophenyl **C**yclohexyl **M**ethyl **P**hosphonate), TEMP (3,5,6-**T**richloro-2-pyridinyl **E**thyl **M**ethyl **P**hosphonate) et TIMP (3,5,6-**T**richloro-2-pyridinyl **I**sopropyl **M**ethyl **Ph**osphonate - **Figure 24**).[59,60] A l'exception du NEPDA, tous présentent des capacités inhibitrices équivalentes aux NOPs tout en étant non volatils donc plus faciles à manipuler.

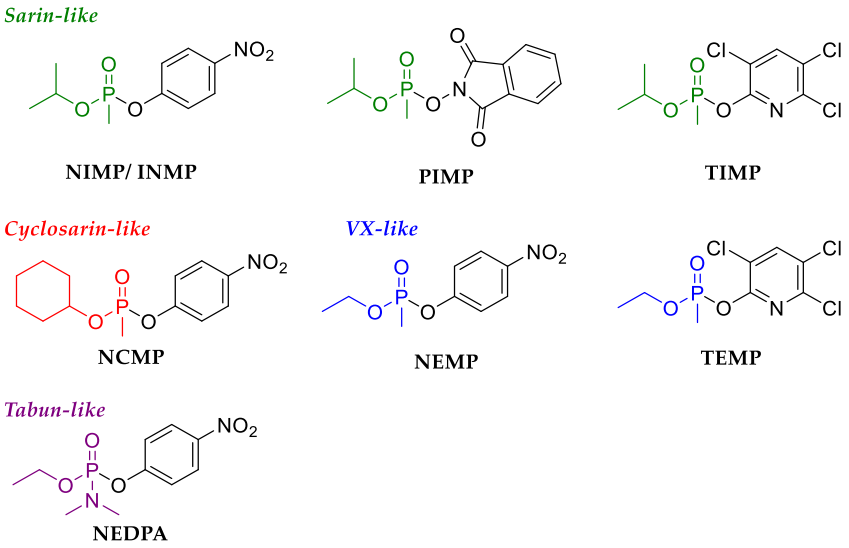



***Figure 24.*** *Structures des analogues de NOPs développés par Chambers*

La comparaison entre les différents substituts peut se faire par leur $IC_{50}$ ou par la constante bimoléculaire d'inhibition $k_i$ sur l'AChE. Celle-ci est plus pertinente car elle traduit l'affinité et la cinétique d'action des molécules, permettant ainsi de juger de la potentielle utilisation *in vivo*. En raison de la grande variété des tissus, des matrices utilisées mais aussi la méthode d'évaluation choisie ($IC_{50}$ ou $k_i$) ainsi que le manque de données (non publiées), il est très difficile de comparer les différents analogues (**Tableau 3**).

| Matrice / Substituts | Cerveau de rat | | AChE extraite d'erythrocytes | | Références |
|---|---|---|---|---|---|
| | $IC_{50}$ | $k_i$ | $IC_{50}$ | $k_i$ | |
| DFP (sarin) | - | 0.382 ± 0.086 | 150 * | 1.243 ± 0.153 | Coban 2016; Meek 2012; Ohta 2006 Niijima 1999; Worek 2004 |
| INMP (sarin) | - | - | 15 | - | |
| NIMP (sarin) | 22 ± 1 | 1.67 ± 0.08 | 43 | 0.942 ± 0.211 | |
| PIMP (sarin) | 36 ± 0.5 | 2.102 ± 0.149 | 35 | - | |
| TIMP (sarin) | - | 0.67 ± 0.081 | - | - | |
| BPMP (soman) | - | - | 480 * | - | |
| NCMP (cyclosarin) | - | 12.045 ± 0.174 | - | 6.027 ± 0.201 | |
| NEMP (VX) | 8 ± 0.2 | 3.976 ± 0.096 | 13 | 1.586 ± 0.214 | |
| TEMP (VX) | - | 2.967 ± 0.155 | - | - | |
| NEDPA (tabun) | 1 328 ± 61 | - | 2 274 | - | |

* ***AChE issue d'erythrocytes de boeuf***

| *OPs* | *$k_i$ (h-Erythrocyte)* |
|---|---|
| *Sarin* | *27* |
| *Soman* | *92* |
| *VX* | *120* |
| *Cyclosarin* | *490* |
| *Tabun* | *7.4* |

***Tableau 3.*** *Evaluation de la toxicité d'analogues de NOP ($k_i$ en $\mu M^{-1}min^{-1}$ ; $IC_{50}$ en nM ; h : humain)*[54,56,59–61]

Malgré leur faible $k_i$, les NIMP, PIMP, NEMP et NCMP peuvent constituer une bonne alternative à leur homologue NOPs. Par ailleurs, les NIMP, PIMP, NEDPA et NEMP ont été synthétisés au sein du laboratoire par le Dr. Catherine Gomez (post-doctorante, contrat avec l'IRBA), et présentent l'avantage de donner le même groupement phosphonyle sur la sérine de l'enzyme que leurs analogues.

## II. Les Cholinestérases, cibles de choix des neurotoxiques organophosphorés

Découvertes en 1932, les cholinestérases sont de la famille des $\alpha/\beta$ hydrolases à sérine, catalysant l'hydrolyse d'esters de choline (acétylcholine, butyrylcholine) en acide carboxylique et en choline.[62,63] Le système nerveux possède deux cholinestérases : l'acétylcholinestérase[64] (AChE, EC. 3.1.1.7) et la butyrylcholinestérase[65] (BChE, EC. 3.1.1.8). Elles se différencient par leur affinité avec leur substrat préférentiel et par leur localisation (**Tableau 4**). La numérotation des acides aminés, dans cette partie, correspond à celle de l'enzyme humaine (sauf indication contraire).

| Tissue | Masse de tissue (g) | BChE (mg) | AChE (mg) |
|---|---|---|---|
| Plasma | 3 500 | 16 | 0.003 |
| Foie | 1 400 - 1 500 | 13 | 0.10 |
| Peau | 4 000 - 5 000 | 7 | 0.77 |
| Muscle | 3 500 | 6 | 2.3 |
| Intestin grêle | 800 - 900 | 4 | 0.14 |
| Poumons | 400 | 3 | 0.06 |
| Cortex cérébral | 1 200 | 3 | 0.46 |
| Estomac | 300 | 1.8 | 0.05 |
| Rate | 150 - 200 | 1 | 0.05 |
| Rein | 130 - 160 | 1 | 0.02 |
| Cervelet | 150 | 0.8 | 0.25 |
| Cœur | 300 | 0.6 | 0.06 |
| Bulbe rachidien | 20 - 25 | 0.085 | 0.08 |
| Thyroïde | 20 | 0.0085 | 0.002 |
| Total | | 58 | 4.37 |

***Tableau 4.*** *Distribution de l'AChE et de la BChE dans le corps humain* [66]

### II.1. L'acétylcholinestérase, une enzyme clef de l'influx nerveux

#### II.1.1. Rôle de l'acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase se retrouve principalement à la surface des cellules érythrocytaires, au niveau des jonctions neuromusculaires et dans l'espace intersynaptique des neurones cérébraux.[67] Elle catalyse l'hydrolyse de l'acétylcholine (ACh), un neuromédiateur entrant en jeu dans la transmission de l'influx nerveux (**Figure 25**), synthétisé dans les synapses *via* l'acétyl-coenzyme A.[68] En effet, lorsqu'un potentiel d'action arrive au niveau de la membrane présynaptique, l'ACh est libérée (≈500 mM)[69] par un mécanisme d'exocytose. Cette molécule va alors se fixer sur les récepteurs muscariniques et nicotiniques (dits cholinergiques) présents au niveau de la membrane postsynaptique permettant ainsi la propagation de l'influx nerveux. Pour terminer ce phénomène, l'ACh est rapidement hydrolysée dans la fente synaptique par l'AChE en choline et acide acétique (acétate), ces derniers seront *a posteriori* (et en partie) récupérés et recyclés par le neurone présynaptique. Par ailleurs, l'AChE a une affinité presque exclusivement spécifique pour son substrat naturel (ACh) et son hydrolyse est très rapide : le taux de roulement (*turnover)* de l'enzyme est d'environ 25 000 molécules de neurotransmetteurs par seconde.[67]

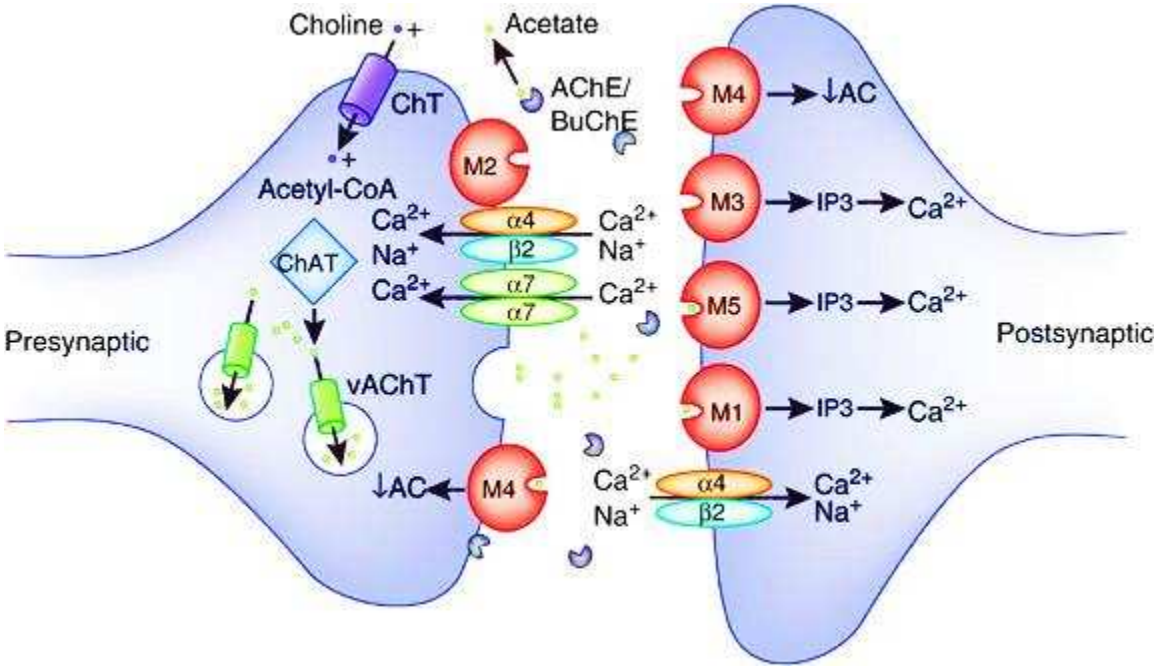



***Figure 25.*** *Représentation schématique de la transmission nerveuse (M : muscarinique ; α4-β2 et α7 : nicotinique)*[70]

Outre son activité catalytique, l'AChE est impliquée aussi dans la différentiation hématopoïétique, dans le développement musculaire, la croissance et le maintien des synapses et le dérèglement de son activité est une des conséquences observée de la maladie d'Alzheimer.[71]

### II.1.2. Considérations structurales de l'AChE

Sussman *et al.* ont résolu pour la première fois en 1991 la structure 3D de l'AChE avec l'étude de monocristaux de l'enzyme issus de *Torpedo Califonica* (*Tc*AchE – **Figure 26** - gauche).[72] Par la suite, les structures cristallographiques des AChEs d'autres espèces vertébrées (souris, drosophile, *Electrophorus Electricus*) ont également été décrites.[73–75] Quant à la structure cristallographique de l'AChE humaine, elle a été initialement obtenue sous la forme d'un complexe avec la toxine fasciculine-2 (FAS) qui la stabilise et permet sa cristallisation (**Figure 26** - droite).[76] L'ensemble de ces études ont permis de déterminer de façon précise la conformation de l'enzyme et son fonctionnement.

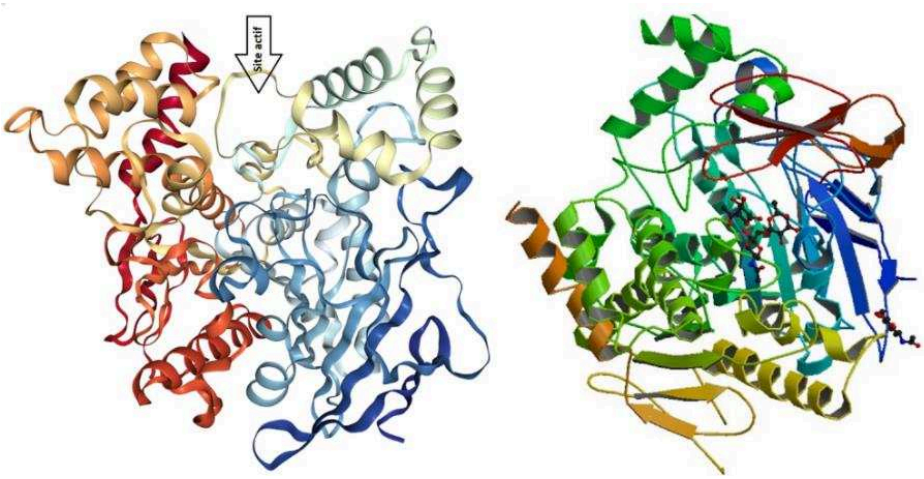



***Figure 26.*** *Structure tridimensionnelle de la TcAChE native (à gauche – code PDB 1EA5) et de la hAChE-FAS (à droite -code PDB 1B41)*

D'un point de vue structural, composée de 535 acides aminés, l'AChE est une enzyme ellipsoïdale (dimensions : 45 x 60 x 65 Å) composée d'un feuillet β mixte central et de 12 brins, entouré de 14 hélices $\alpha$. Taylor et Radić ont mis en évidence trois régions essentielles: le site catalytique (ou site d'acylation), le site périphérique et une gorge hydrophobe reliant les deux sites (**Figure 27**).[77]

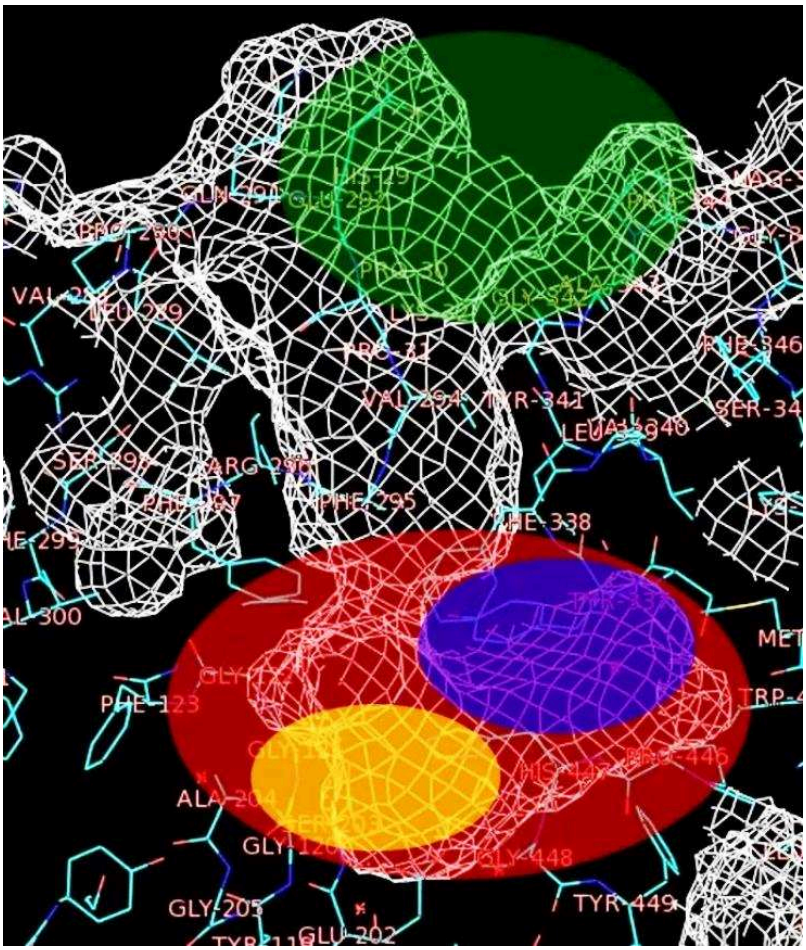



***Figure 27.*** *Représentation du site actif de la hAChE (En vert, le site périphérique ; en rouge, le site d'acylation. La gorge hydrophobe aromatique relie ces deux sites. En jaune, le site catalytique et en bleu, le site cation-π)*

### II.1.2.1. Le site catalytique

Le site catalytique de l'acétylcholinestérase comporte quatre sous-unités :

- Le site estérasique où se trouve la triade catalytique,
- Le trou oxyanionique qui active l'ester et stabilise de l'état de transition,
- La poche acyle qui stabilise la chaîne aliphatique,
- Le site cation-π dans lequel se fixe l'ammonium quaternaire de l'ACh.

Le site estérasique contient la triade catalytique, formée par trois résidus : une sérine (Ser203), une histidine (His447) et un glutamate (Glu334) responsable de l'hydrolyse du neurotransmetteur ACh. En effet, le système histidine-glutamate exacerbe la nucléophilie de la sérine qui va s'additionner sur l'ester du substrat, l'intermédiaire tétraédrique étant stabilisé par le trou oxyanionique. Après départ de la choline, l'intermédiaire acyle-enzyme obtenu est hydrolysé *via* l'intervention à nouveau de cette triade et d'une molécule d'eau pour régénérer la sérine et libérer de l'acide acétique (**Figure 28**).[78]

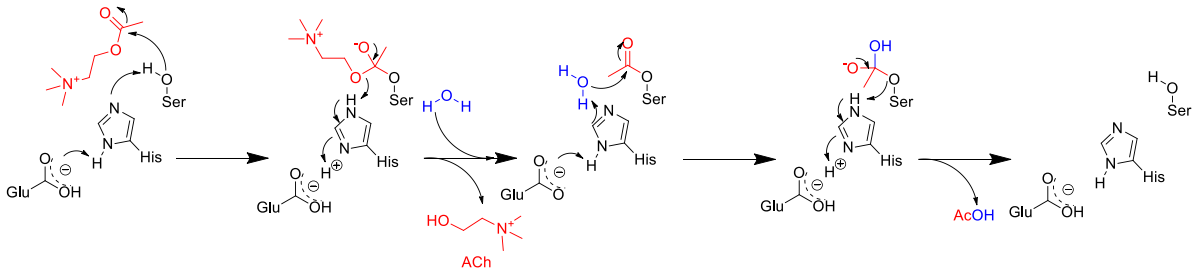



***Figure 28.*** *Hydrolyse de l'ACh par la triade catalytique de l'AChE – mécanisme simplifié*

Le trou oxyanionique - grâce à ses résidus glycines (Gly121 & 122) et alanine (Ala204) - permet l'activation de l'ester de l'ACh *via* des liaisons hydrogène entre l'amine et l'oxyanion, ainsi que la stabilisation de l'intermédiaire réactionnel tétraédrique.[79]

La poche acyle, constituée des résidus Trp236, Phe295 et Phe297, accueille la partie alkyle de l'ACh (méthyle) et la stabilise par interactions de Van der Waals.[80]

Enfin, le site cation-π, avec ses résidus aromatiques (Trp86, Tyr337, Phe338) oriente et stabilise le substrat vers le site d'acylation *via* des liaisons cation-π avec l'ammonium de l'ACh. [81]

### II.1.2.2. La gorge aromatique hydrophobe

La gorge hydrophobe est constituée essentiellement de résidus aromatiques (Phe, Tyr, Trp) soit 40% de la chaîne peptidique qui la compose.[82] Avec une profondeur de 20 Å et un diamètre moyen de 5 Å, cette gorge étroite relie le site catalytique au site périphérique et oriente les substrats.[82]

#### II.1.2.3. Le site périphérique

Le site périphérique ou « Peripheral Anionic Site » (PAS), dont la structure diffère très peu selon les espèces, se situe à l'entrée de la gorge aromatique hydrophobe et est majoritairement constitué de résidus aromatiques (Trp286, Tyr72, Tyr124, Tyr341) mais aussi de résidus non-aromatiques (Asp74, Glu285).[83] Ces résidus bénéficient d'une flexibilité et donnent une forte affinité pour différents types de ligands. En effet, des études de mutagénèse et structurales ainsi que des tests de liaison suivis par fluorescence ont démontré que le PAS assure une première liaison des ligands à l'enzyme *via* des interactions cation-π et π-π.[83,84]

Le site périphérique joue un rôle important lors de l'hydrolyse de l'ACh : il participe à une communication croisée avec le site d'acylation. Ce mécanisme est basé sur une interaction entre les résidus Trp286 et Trp86. En effet, lorsque le Trp286 interagit avec l'ammonium du substrat (cation-π), le Trp86 modifie sa position induisant des changements conformationnels de l'enzyme au niveau du site catalytique.[85] Cette régulation allostérique permet un contrôle de la vitesse d'hydrolyse en fonction de la concentration présente en l'acétylcholine : lorsque la quantité de substrat est faible, la vitesse d'hydrolyse augmente ; lorsque le substrat est présent en excès, l'enzyme est inhibée et la vitesse d'hydrolyse diminue.[86]

### II.2. La butyrylcholinestérase, une enzyme non-spécifique

Découverte en 1935,[86] la butyrylcholinestérase (BChE, EC 3.1.1.8) est une cholinestérase non-spécifique présente en faible concentration dans le SNC mais très abondante au niveau plasmique (4 mg/l soit 47 nM).[66] Cependant, il est à noter que tous les individus ne possèdent pas de BChE active sans aucunes conséquences sur leur viabilité.[87] On retrouve cette enzyme dans de nombreux tissus notamment dans le foie (**Tableau 4**). Elle est 10 à 13 fois plus abondante que l'AChE dans le corps humain.

#### II.2.1. Rôles biologiques

Cette enzyme n'étant pas exprimée chez certains individus, la BChE a longtemps été considérée comme non-essentielle (elle n'a pas de rôle neurologique critique) et des études sur ses rôles biologiques commencent à peine à émerger.

La BChE est une enzyme détoxifiante : elle est capable d'hydrolyser une grande variété d'esters naturels ou synthétiques (butyryl-, succinyl- et acétyl- choline mais aussi l'aspirine,[88] la cocaïne[89], l'héroïne[90]) et des médicaments comme le bambuténol[91] et le suxaméthonium[92].

En raison de son action non-spécifique, la BChE peut se substituer à l'AChE pour hydrolyser l'ACh. En effet, Lockridge *et al.* ont démontré que des souris knockout du gène de l'AChE (ayant un niveau normal de BChE) survivent sans AChE, mais décèdent lorsqu'elles sont traitées avec un inhibiteur spécifique (version oxygénée du chlorpyrifos, un pesticide OP).[93] Par ailleurs, dans des stades avancés de la maladie d'Alzheimer, la BChE est capable de prendre le relai de l'AChE.[94]

En outre, la BChE, tout comme l'AChE, est inhibée, de manière irréversible, par les NOPs. Elle peut donc piéger les NOPs mais aussi être utilisée comme bio-épurateur (Cf partie II).

Aussi, la BChE régule les taux de ghréline (**Figure 29**),[95,96] une hormone de 28 acides aminés (dont une serine estérifiée) impliquée dans la croissance, l'alimentation, mais aussi le comportement (mémoire, stress).[97]

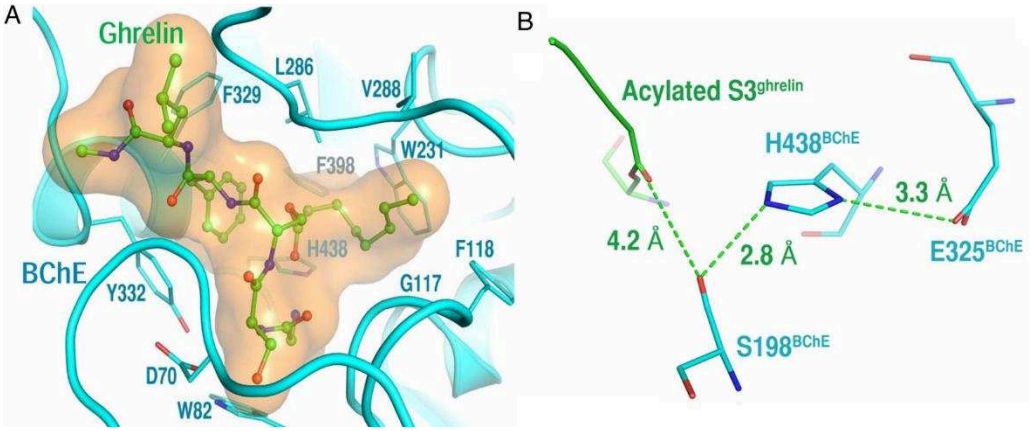



***Figure 29.*** *Simulation dynamique de la hBChE interagissant avec la ghréline.*[97]

Enfin, la BChE agirait comme « scavenger » de peptides riches en région polyproline, protégeant ainsi les cellules des interactions non-régulées.[98–100]

### II.2.2. Considérations structurales de la BChE

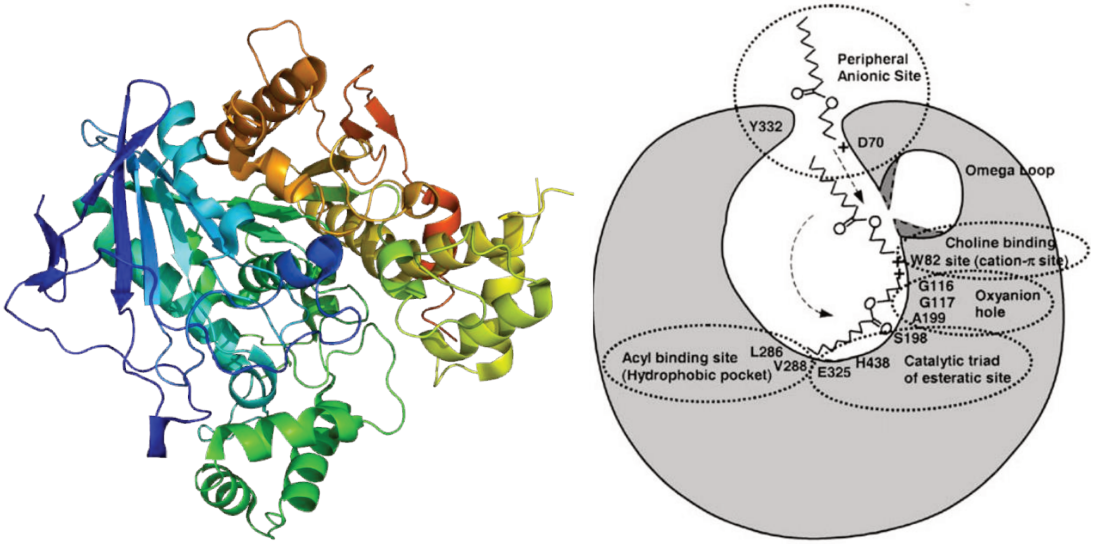



*Figure 30. Structure tridimensionnelle de la BChE (à gauche code pdb 1P0I) et schéma simplifié (à droite)*[101]

Constituée de 602 acides aminés (**Figure 30**), la BChE a une structure proche de l'AChE (54% d'homologie de séquence entre la *h*BChE et *Tc*AChE - **Figure 31**) ainsi que le même arrangement des ponts disulfures.[102] Aussi, son site actif comporte comme pour l'AChE un site catalytique, un site cation-π et une gorge de 20 Å de profondeur. Cependant, elle diffère par le volume de la poche catalytique (500 Å contre 300 Å pour l'AChE) mais aussi par la nature de certains résidus clefs.[65]

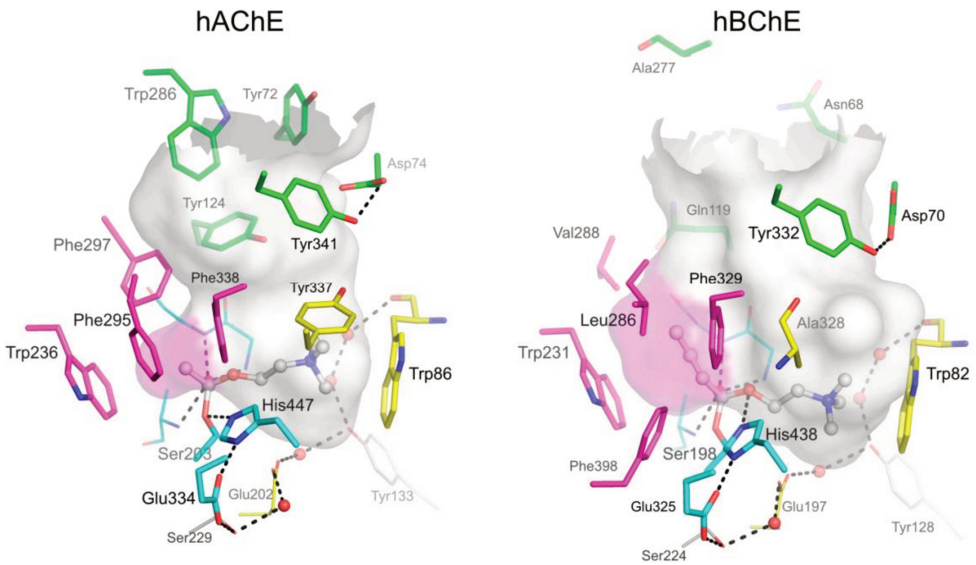



*Figure 31. Sites actifs de la hAChE (droite, pdb 4EY4) et de la hBChE (gauche, pdb 1P0I) en présence d'ACh et de BCh.*[103] *En magenta la poche Acyle, en cyan la triade catalytique et trou oxyanionique, en jaune le site cation–π, en vert le PAS, les sphères rouges représente les molécules d'eau.*

Au niveau du site catalytique, la triade comporte les mêmes résidus que pour l'AChE (Ser198, His438, et Glu325 pour la *h*BChE) ainsi que pour le trou oxyanionique avec deux glycines (Gly116, Gly117) et une alanine (Ala199). La différence se situe au niveau de la poche acyle. L'AChE possède deux résidus

aromatiques (Phe295 et Phe297) qui limitent le degré de liberté du substrat et lui confèrent un rôle plus spécifique tandis que, dans la BChE, ces résidus aromatiques sont remplacés par une leucine (Leu286) et une valine (Val288). Ces résidus aliphatiques permettent à la BChE d'accepter de plus grandes molécules et expliquent la plus faible sélectivité vis-à-vis des substrats.[104]

Au niveau de la gorge, six des quatorze résidus aromatiques qui délimitent la gorge du site actif de l'AChE sont remplacés par des résidus aliphatiques augmentant ainsi le volume du site actif de la BChE (200 Å). Ce remplacement est aussi responsable de la plus faible sélectivité de la BChE envers différents substrats.[105]

Enfin, des différences notables existent au niveau du site périphérique. En effet, les trois résidus aromatiques de la *h*AChE (Tyr72, Tyr124, Trp286) sont remplacés par deux résidus portant une fonction amide (Gln119, Asn68) et un résidu aliphatique (Val277) diminuant l'affinité de la BChE avec les ligands du site périphérique. Seuls deux résidus, l'Asp70 et la Tyr332 de la BChE interagissent avec l'ammonium quaternaire des esters de choline. Par ailleurs, l'architecture tridimensionnelle de la BChE est contrôlée par une liaison hydrogène entre ces deux acides aminés.[103,106,107]

### II.3. L'inhibition de l'AChE et conséquences dramatiques

Les NOPs sont principalement absorbés par inhalation et/ou par contact. Ces molécules hautement lipophiles traversent toutes les barrières biologiques et interagissent avec un certain nombre de récepteurs[108] dans les systèmes centraux et périphériques (**Figure 32**). Cependant, leur toxicité est essentiellement due à l'inhibition irréversible des cholinestérases et plus précisément de l'acétylcholinestérase à laquelle cette partie sera dédiée.

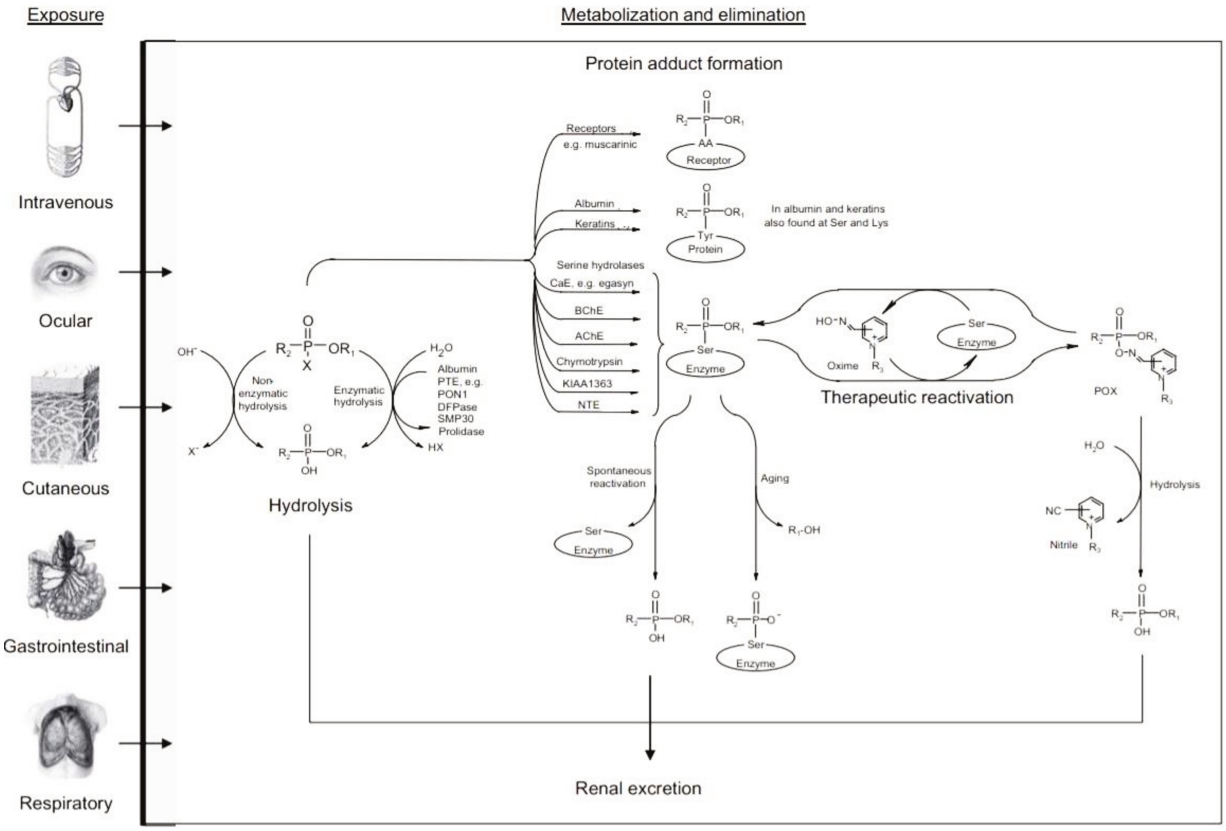



*Figure 32. Le devenir des NOPs dans l'organisme des mamifères*[52]

### II.3.1. Un mécanisme d'inhibition irréversible

Les NOPs interagissent semblablement avec l'enzyme que son substrat naturel. En effet, lors d'une exposition aux NOPs, un complexe de Michaelis-Menten se forme entre l'enzyme et l'organophosphoré, permettant à ce dernier d'atteindre le site actif. La sérine 203, dont la nucléophilie est exacerbée par l'action conjointe de l'histidine 447 et du glutamate 334, attaque le phosphore qui est électrophile. Après départ d'un groupement partant (X) porté par le phosphore, l'enzyme est phosphylée (**Figure 33**).[109]

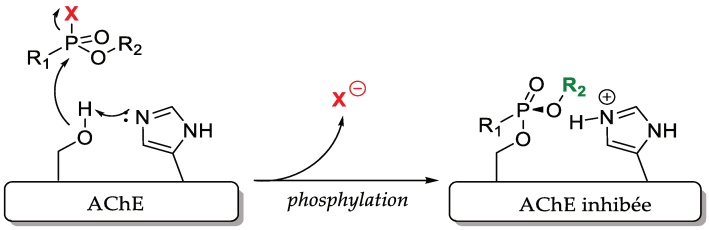



*Figure 33. Phosphylation de l'AChE*

Contrairement à l'enzyme acétylée par l'ACh, l'enzyme phosphylée est stable : l'enzyme est dite empoisonnée. La déphosphylation par une molécule d'eau est un processus très lent, beaucoup plus que la déacylation. En effet, l'eau n'est pas suffisamment nucléophile pour régénérer l'enzyme; et de plus, l'histidine 447 ne peut pas l'activer car l'attaque est, soit gênée par un encombrement stérique et

donc elle ne peut atteindre la molécule d'eau (cas du soman)[110], soit l'histidine 447 serait positionnée dans une conformation non favorable induite par la présence des groupements sur le phosphore (cas du VX et du Tabun).[111,112]

Cependant, un phénomène de réactivation spontanée peut se produire pour certains OPs et la vitesse dépend essentiellement du NOP utilisé (**Tableau 5**).[113–116] Mise à part le VX, le VR et les ethyl-, methylparaoxon, la réactivation spontanée est inexistante. Cette inhibition est donc considérée comme irréversible.

| OPs | Vieillissement t ½ (h) | Réactivation spontanée t ½ (h) |
|---|---|---|
| VX | 36,5 | 33,0 |
| Sarin | 3,0 | Inexistante |
| VR | 138,6 | 17,8 |
| Soman | 0,1 | Inexistante |
| Cyclosarin | 7,0 | Inexistante |
| Fenamiphos | 138,6 | Inexistante |
| Tabun | 19,3 | Inexistante |
| Methyl paraoxon | 3,7 | 0,7 |
| Ethyl paraoxon | 31,5 | 31,5 |
| DFP | 3,1 | Inexistante |

***Tableau 5.*** *Demi-vie des processus de réactivation spontanée et de vieillissement de l'OP-AChE (h-érythrocyte, conditions : 37°C, pH =7.4 ; valeurs exprimées initialement sous la forme de constantes cinétiques k de 1er ordre)* [61]

De plus, un second processus peut avoir lieu selon la nature de l'adduit OP-AChE. Grâce à l'assistance de l'histidine catalytique, le dérivé organophosphoré peut se dé-alkyler « spontanément », par perte de la seconde chaîne alkyle, ce qui produit un acide phosphonique, adduit extrêmement stable : c'est le phénomène dit de vieillissement (« aging » - **Figure 34**).[117] La stabilité finale de cet adduit est due au pont salin formé entre l'oxyanion de l'adduit dé-alkylé et le résidu His447 protoné mais aussi à l'oxyanion qui empêche l'approche de tout nucléophile chargé négativement par répulsion électrostatique.[112]

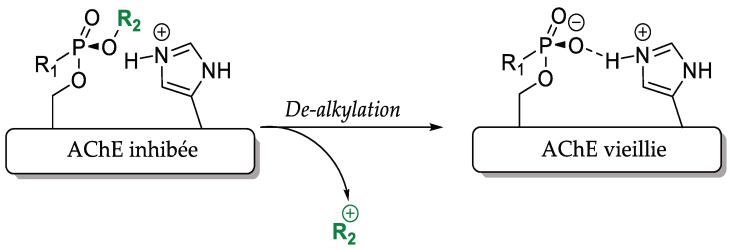



***Figure 34.*** *Vieillissement de l'AChE*

Comme pour la réactivation spontanée, la vitesse de vieillissement dépend de l'OP impliqué (**Tableau 5**). L'AChE inhibée par le soman est l'adduit où ce phénomène est le plus prononcé (t ½ = 6 min). Cette spécificité a été expliquée par une étude des cristaux de l'enzyme phosphylée conjointement à une étude de simulation dynamique QM/MM (mécanique quantique moléculaire). En Effet, Weik *et al.* ont réussi

à obtenir la structure cristalline par diffraction des rayons X de l'enzyme phosphylée soman-*Tc*AChE et l'ont comparée avec la structure des VX-*Tc*AChE et tabun-*m*AchE. La différence réside essentiellement dans le positionnement de l'histidine catalytique.[110] Dans le cas du VX-*Tc*AChE et tabun-*m*AChE, l'histidine catalytique change de position drastiquement afin de se stabiliser et d'éviter les interactions défavorables. Au contraire, dans le cas du soman-*Tc*AChE, l'histidine catalytique (His440- pour l'enzyme de torpille) n'est que très légèrement réorientée (~0.8 Å) sans qu'il n'y ait de perturbation au sein de la triade catalytique. Cette absence de changement conformationnel expliquerait la différence de cinétique observée lors du vieillissement.

Différents mécanismes ont été proposés mais l'étude QM/MM rapportée par l'équipe de Zhang n'en valide qu'un seul (**Figure 35**).[118] D'une part, le vieillissement est favorisé lorsque le Glu199 du site cation-$\pi$, vicinal à la gorge, est protoné ce qui est en accord avec les résultats de mutagénèses dirigées effectuées par l'équipe de Weik. Le mécanisme consiste, dans un premier temps en la scission de la liaison C$\alpha$-O ($E_{activation}$ = 14.5 kcal/mol). La charge du carbocation généré est distribuée sur C$\alpha$ et C$\beta$, le phosphonate obtenu est stabilisé par un pont salin avec l'histidine catalytique qui est légèrement décalée (1.08 ± 0.32 Å). Enfin, après migration du méthyle, le carbocation est hydrolysé pour donner le 2,3-diméthylbutan-2-ol en accord avec les données expérimentales rapportées dans la littérature.[119]

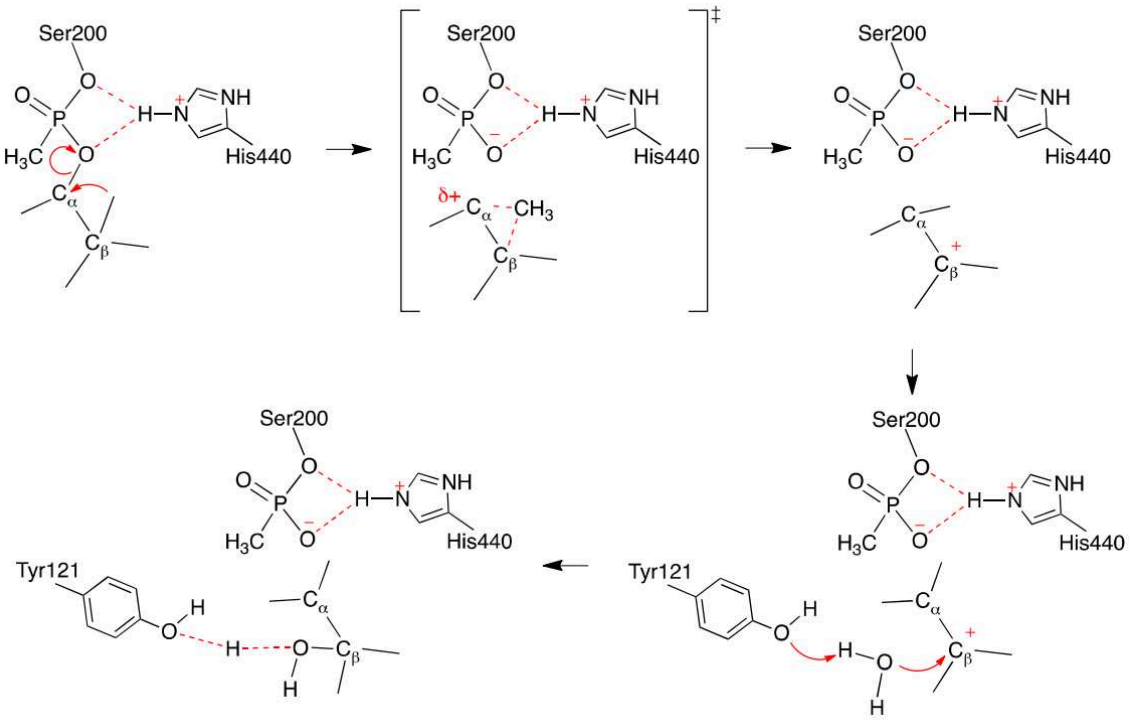



***Figure 35.*** *Mécanisme de vieillissement du soman-TcAChE*[118]

A ce jour, il n'existe aucun antidote capable de régénérer l'enzyme vieillie.[118,120] Par ailleurs, une étude QM/QQ et DFT a montré que l'utilisation d'agents alkylants de l'acide phosphonique pour inverser ce processus est impossible dans l'enzyme du fait d'une barrière d'activation beaucoup trop importante.[121]

Face à cette impasse, il est donc nécessaire d'agir avec des molécules efficaces avant que le vieillissement n'ait lieu.

### II.3.2. Une inhibition aux lourdes conséquences

On distingue trois phases après l'exposition : la phase cholinergique aiguë, le syndrome intermédiaire ainsi que le syndrome neurotoxique retardé. L'effet de l'exposition chronique aux NOPs ne sera pas traité du fait de l'absence de données épidémiologiques.

#### II.3.2.1. La phase cholinergique aiguë

L'empoisonnement de l'AChE entraîne une accumulation d'ACh, qui induit une sur-stimulation des récepteurs cholinergiques (nicotiniques et muscariniques – **Figure 36**) qui se généralise à l'ensemble du système nerveux. Immédiatement après l'exposition, trois types de symptômes cliniques peuvent alors se manifester de manière plus ou moins sévère suivant le degré d'intoxication : les symptômes muscariniques, nicotiniques et centraux.[5]

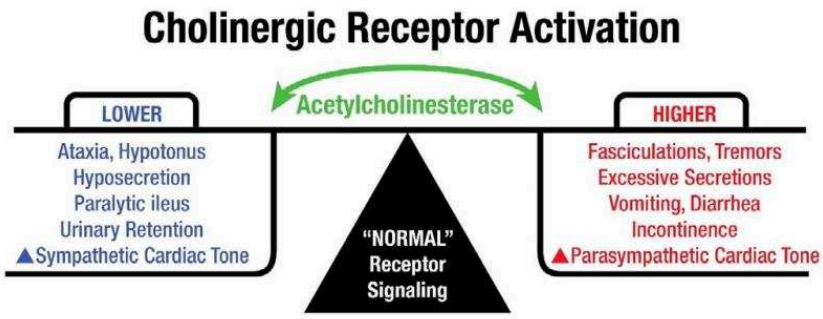



***Figure 36.*** *L'acétylcholinestérase et l'activation des récepteurs cholinergiques*[122]

Les symptômes muscariniques se traduisent par un myosis, une bradycardie, une hypersécrétion (bronchorrhée, sialorrhée, diarrhée), des vomissements, des bronchospasmes et une incontinence urinaire.

Les symptômes nicotiniques, apparaissant de manière plus tardive, associent une mydriase, une tachycardie, une bronchodilatation, de l'hypertension, des sueurs et une faiblesse musculaire (parésie puis paralysie).

Les symptômes centraux, découlant de la surexcitation neuronale, se caractérisent par un trouble du comportement (agitation, confusion, léthargie), des convulsions, et, dans les cas les plus graves, un coma, voire le décès.

### II.3.2.2. Le syndrome intermédiaire

Le syndrome intermédiaire (ou syndrome de type 2) concerne essentiellement les intoxications volontaires aux OPs. Il intervient 24 à 96 h après la phase cholinergique aiguë. Il se manifeste par une faiblesse marquée de la musculature squelettique proximale - incluant les muscles de la respiration et du cou – ainsi qu'une paralysie du nerf crânien. Sans prise en charge médicale adéquate, le décès est inévitable.[123] La pathogénèse de ce syndrome n'est pas connue avec certitude, cependant il s'agirait d'un blocage non-dépolarisant post-jonctionnel conséquence de la suractivité cholinergique.[5]

### II.3.2.3. Le syndrome neurotoxique retardé

Si l'individu suivit, celui-ci sera victime du syndrome neurotoxique retardé (OPIDN pour *OP-Induced Deleyed Neuropathy*). Dépendant de l'OP utilisé, ce syndrome survient 2 à 5 semaines après l'intoxication aiguë initiale.[124] Il s'agit d'une neuropathie sensitivomotrice distale à prédominance motrice : paresthésies des extrémités, ataxie et paralysie flasque des jambes évoluant secondairement vers une hypertonie spastique.[125] La récupération est partielle et lente, elle dépend de la sévérité du syndrome et ne concerne que les nerfs sensoriels. Ce syndrome n'est pas dû l'empoisonnement des AChEs mais à l'inhibition des Neuropathy Target Esterase (NTE).[126] En effet, cette enzyme hydrolyse la phosphatidylcholine, un phospholipide essentiel dans la constitution des membranes cellulaires (30% du poids sec du cerveau, 15 % du poids sec des nerfs).[127] L'accumulation de phosphatidylcholine provoque une altération de la sécrétion constitutive qui est nécessaire au bon fonctionnement cellulaire.

Face à ces syndromes graves, une prise en charge rapide est nécessaire et des contre-mesures médicales ont été développées.

## II.4. Les contre-mesures médicales existantes : un arsenal imparfait

Les conséquences d'une intoxication sont graves, d'où la nécessité d'utiliser des remèdes efficaces. Différents moyens ont donc été étudiés : la prophylaxie (enzymatique ou chimique), la décontamination, et les traitements pharmacologiques d'urgence (symptomatique et étiologique). Des méthodes de décontamination et de préventions de la pénétration des NOPs dans l'organisme (topiques, lotions) existent mais ne seront pas présentées dans ce manuscrit.

### II.4.1. La prophylaxie

La prophylaxie consiste en l'administration de substances dans le but d'empêcher le neurotoxique d'accéder à sa cible, ici l'AChE. Le prétraitement chimique consiste à administrer un ligand de la cible biologique à protéger tandis que le prétraitement enzymatique vise le piégeage du NOP avant qu'il n'atteigne sa cible (Bioscavengers - **Figure 37**).

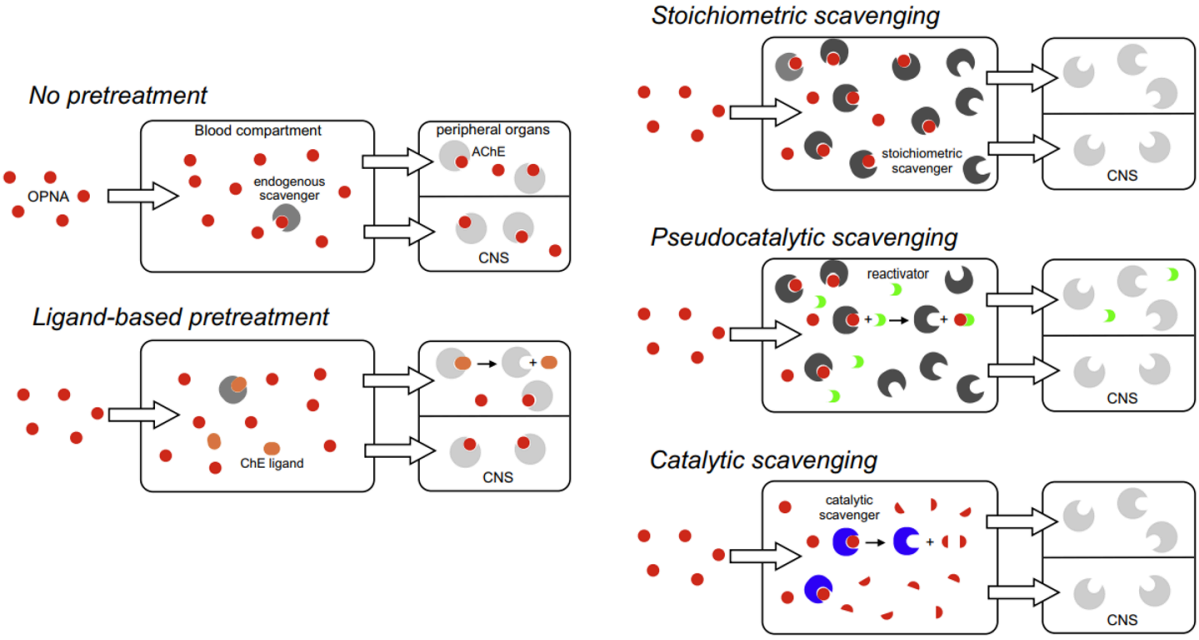



***Figure 37.*** *Les différentes méthodes de prophylaxie*[128]

#### II.4.1.1. Les prétraitements neuroprotecteurs chimiques

En cas de pré-alerte chimique par NOP, notamment dans le cadre militaire, une administration préventive d'inhibiteur de l'AChE est indiquée. Ces inhibiteurs réversibles vont protéger de manière provisoire la sérine du site actif de l'enzyme. La nature de ces inhibiteurs est variée, on distingue cependant les inhibiteurs covalents et non-covalents.

Initialement utilisé pour le traitement symptomatique de la myasthénie (une maladie neuromusculaire auto-immune), le bromure de pyridostigmine est actuellement utilisé dans les armées occidentales[129] dont l'Armée Française (Mestinon®, 30 mg toutes les 8 heures pendant 10 jours au maximum – **Figure 38**).[130] Cette molécule est un inhibiteur pseudo-irréversible de l'AChE : elle se lie à la serine catalytique et forme un carbamate hydrolysable par l'eau présente dans le site d'acylation.[131] Cependant, sa charge permanente ne permet pas son passage de BHE, elle n'agit que sur les AChE présentes dans le sang ou les jonctions neuro-musculaires (30% de protection) réduisant son effet protecteur contre les effets centraux des NOPs.[132] En outre, cette substance a de nombreux effets secondaires et est suspectée dans

le syndrome de la guerre du Golfe.[133,134] Par ailleurs, même si cette molécule ne passe pas la BHE, elle induit indirectement des troubles cognitifs.

Afin d'attendre le SNC, la pyridostigmine a été associée à d'autres substances anticholinergiques comme le trihexyphénidyle et benactyzine (PANPAL - **Figure 38**), cocktail utilisé par l'Armé Tchèque. Malheureusement, ces substances allongent la liste des effets secondaires (hallucination, dépendance…).[134,135] D'autres carbamates ont été étudiés seuls ou en associations avec d'autres anticholinergiques sans pour autant aboutir à une autorisation de mise sur le marché (**Figure 38**).[134,136]

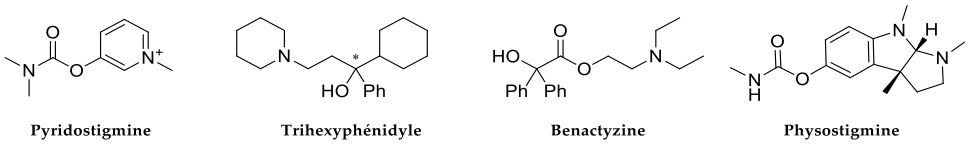



***Figure 38.*** *Structure des molécules PANPAL et de la physostigmine, un autre carbamate étudié.*

Certains médicaments utilisés dans le traitement de la maladie d'Alzheimer ont été testés en tant que neuroprotecteurs (**Figure 39**).[137–140] Capables de traverser la BHE, ces inhibiteurs de l'AChE sont non-covalents (sauf la Rivastigmine) et réversibles. Modulant aussi l'activité des récepteurs nicotiniques, la galantamine est le moins toxique de ces candidats et le plus prometteurs (capacité de protection prouvée sur les cobayes exposés à 2 $LD_{50}$ de soman et de sarin). Pourtant, son efficacité sur l'ensemble des NOPs mais aussi selon la voie d'exposition reste à prouver.[131,141,142]

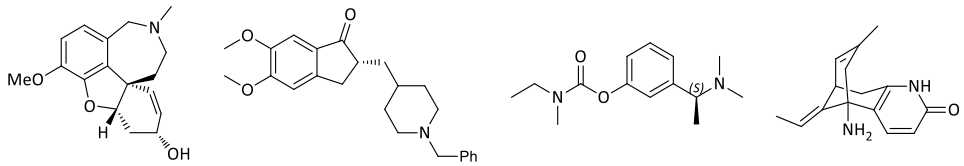



***Figure 39.*** *Structures des médicaments anti-Alzheimer testés comme neuroprotecteur des OPs*

Ces prétraitements neuroprotecteurs induisent de sérieux effets secondaires et nécessitent une expertise médicale pour le dosage (équilibre protection/inhibition), illustrant l'inadéquation de cette approche médicamenteuse préventive. Une approche alternative a donc été étudiée : les bioépurateurs (ou « bioscavengers » en anglais).

### II.4.1.2. Les bioépurateurs

#### *II.4.1.2.1. Principe des bioépurateurs*

De nombreuses enzymes et protéines participent aux défenses naturelles contre les NOPs.[143] Les bioépurateurs s'appuient sur ces propriétés : le principe consiste à piéger les NOPs dans le sang avant que ceux-ci n'atteignent l'AChE.

Des bioépurateurs naturels présents dans la peau, les tissus et le sang, détoxifient ou réagissent avec les NOP permettant une protection lors d'exposition faible. Par exemple, la *h*BChE du plasma (≈ 50 nM) est capable de piéger de nombreux NOPs, mais son taux d'expression est variable et elle peut même être silencieuse chez certains individus;[144] la carboxylesterase (CaE) présente dans différents tissus, atténue la toxicité des NOPs, mais elle n'est pas présente dans le plasma;[145,146] l'albumine plasmique est très abondante mais n'hydrolyse que très lentement les NOPs;[147] la paroxonase (PON) présente dans le plasma hydrolyse aussi un grand nombre de NOPs mais a une préférence stérique pour les moins toxiques.[148]

Face à ces limites, l'administration d'un bioépurteur exogène a été étudiée. Ces bioscavengers doivent produire une réaction rapide, irréversible et universelle à tous les NOPs. En outre, le bioscavenger doit protéger à hauteur d'au moins 5 x $LD_{50}$ et doit, autant que faire se peut, être non-toxique en l'absence de NOPs (pas de iatrogénèse ni de perturbation métabolique) .[128,134,149]

On distingue trois types de bioscavengers selon leur type de fonctionnement : stœchiométrique, pseudo-catalytique et catalytique.

#### *II.4.1.2.2. Bioépurateurs stœchiométriques*

Un bioscavenger stœchiométrique est une enzyme qui immobilise, voire hydrolyse une seule molécule de NOP avant d'être elle-même inhibée, nécessitant une administration massive d'enzymes dans l'organisme.

L'exemple le plus avancé est celui de la *h*BChE plasmatique, cette enzyme étant circulante et elle-même une cible privilégiée des NOPs. En effet, l'utilisation de cette enzyme a été examinée dans de nombreuses études sur de nombreuses espèces animales *in vitro* et *in vivo* mais aussi sur l'Homme (phase clinique I - NCT00333515, NCT00333528, NCT00744146).[66] Les résultats sont très prometteurs : en fonction des espèces et des agents de guerre utilisés, cette enzyme peut augmenter la $LD_{50}$ des NOPs d'un facteur allant jusqu'à 8 (**Tableau 6**).

| Espèce | NOP | | | *h*BChE (plasma) | | | Survie | Références |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Type | Voie | Dose (mg/kg) | Type | Voie | Dose (mg/kg) | | |
| *Guinea pig* | GD | SC | 0.165 (5,5 $LD_{50}$) | Pré | IM | Nd * | 10 / 10 | Saxena 2011 |
| *Guinea pig* | VX | SC | 0,072 (8 $LD_{50}$) | Pré | IM | Nd * | 8 / 10 | Saxena 2011 |
| *Guinea pig* | VX | PC | 0,740 (10 $LD_{50}$) | Post | IM | 24,2 | 4 / 4 | Mumford 2011 |
| *Cynomolgus Monkey* | GD | SC | 0.038 (5,5 $LD_{50}$) | Pré | IM | 28.2 | 4 / 6 | Lenz 2005 |

***Tableau 6.*** *Evaluations de la h-BChE placentaire dans différents organismes (IM : intramusculaire, SC : sous cutanée, PC : percutanée ; * dose protégeant de 8 x LD50 des NOPs)* [150–153]

Concernant l'étude d'innocuité sur l'Homme, l'administration de forte dose n'induit aucun effet secondaire. Cependant, l'accès à la *h*BChE en grande quantité n'est pas simple. Différentes sources de production notamment *via* l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés (butyrylcholinestérase humaine recombinante - r-*h*BChE)[154–160] ont été étudiées mais aucune n'est viable économiquement (**Tableau 7**), malgré le développement de méthode de purification très efficace comme l'Hupresin®[161,162] produite par la société CHEMFORASE.[163]

| Enzyme | Organisme | Quantité | Références |
|---|---|---|---|
| *h*BChE | Plasma humain | 3.5 mg/L | Grunwald 1997 |
| r-*h*BChE | Cellules CHO | 5-40 mg/L | Ilyushin 2013 |
| r-*h*BChE | Lait de chèvres transgéniques | 1-5 g /L | Huang 2007 |
| r-*h*BChE | Lait de souris transgéniques | 0.1-1.8 g /L | Huang 2007 |
| r-hBChE | Drosophile | 4 mg/L | Brazzolotto 2012 |
| r-hBChE (tétramérique) | Cellule CHO | 70 mg/L | Terekhov 2015 |
| r-*h*BChE | Vers à soie | 1.5-35 mg/L | Wei 2000 |
| r-*h*BChE | Riz transgénique | 1.6 mg/L | Corbin 2016 |

***Tableau 7.*** *Quelques exemples de production de hBChE recombinante.*[154–160]

De plus, la butyrylcholinestérase humaine recombinante (r-*h*BChE) a un temps de résidence beaucoup plus faible que l'*h*BChE issue du plasma. La stabilisation *via* des modifications sur l'enzyme (ajout de polyproline, PEGylation, polysialysation, conjugaison avec l'albumine)[156,164–167] et même l'encapsulation de l'enzyme[168] ont minimisé ce problème sans pour autant que le temps de résidence n'égale celui de la *h*BChE plasmique.

Afin de contourner ces problèmes, la possibilité d'accroître l'expression naturelle de l'enzyme *via* des thérapies géniques a été étudiée et une preuve de concept a été faite sur la souris.[169–171] Toutefois, les contraintes réglementaires et industrielles (production de vecteurs et de transgènes dans des conditions standardisées et contrôlées, évaluation précise du rapport bénéfice-risque) freinent cette recherche. Comme illustration de ce point, à ce jour, seuls deux médicaments fondés sur la thérapie génique sont sur le marché et ceux-ci sont indiqués dans le cadre de pathologies rares, non-traitable par la pharmacologie classique.[172,173]

L'AChE a aussi été envisagés comme bioscavenger du fait de sa réactivité quatre fois plus rapide que celle de la BChE avec les NOPs.[93,174–176] Cependant, son manque de stabilité dans le sang freine son développement. Afin d'augmenter cette stabilité, l'utilisation de nanoparticules permet le relargage de l'enzyme en continu dans le sang permettant des durées d'action allant jusqu'à plusieurs jours.[177,178]

Malgré ces avancées, ces deux bioépurateurs restent stœchiométriques. Si, la production de protéines recombinantes à partir d'animaux ou de plantes modifiés génétiquement a été grandement améliorée, le modèle économique reste inadéquat, d'où l'idée de les associer à des agents chimiques capables de les régénérer, voire de les modifier génétiquement pour un fonctionnement totalement catalytique.

#### *II.4.1.2.3. Bioépurateurs pseudo-catalytiques*

Un bioscavenger pseudo-catalytique hydrolyse une seule molécule de NOP mais cette enzyme est régénérée par la présence stœchiométrique d'un agent chimique (réactivateur). L'efficacité de ce système repose essentiellement sur la capacité de l'agent chimique à réactiver l'enzyme. L'utilisation de l'AChE en combinaison avec un réactivateur a été étudiée mais l'efficacité de ce système est limitée par le vieillissement de l'enzyme.[149] Ce problème a été contourné par le développement d'un mutant de l'AChE par l'équipe de Zrinka Kovarik.[179] Ce mutant utilisé en combinaison avec différents réactivateurs permet une meilleur protection contre le soman et le VX.[179]

Etant donné l'avancée de la *h*BChE comme bioscavenger, son utilisation en pseudo-catalytique se révèlerait d'un grand intérêt, notamment pour limiter les quantités à injecter. Malheureusement, les réactivateurs de l'AChE ne sont pas aussi efficaces pour la BChE en raison des différences structurales présentes au niveau du site actif des deux enzymes (Cf Partie II.2.2).[180–182] Cependant, de nouvelles classes de réactivateurs spécifiques ou duaux (agissant sur l'AChE et la BChE) émergent au travers des travaux de différentes équipes dont la nôtre.[38,179,183–185] Malgré cela, le développement d'un bioscavenger totalement catalytique est nécessaire, mais n'est pas encore abouti.

#### *II.4.1.2.4. Bioépurateurs catalytiques*

Un Bioscavenger catalytique est un système biologique (enzyme ou anticorps monoclonal « catalytique ») qui hydrolyse un grand nombre de molécules de NOPs. De ce fait, pour un équivalent molaire, le bioscavenger catalytique donnerait une protection bien supérieure à celle d'un bioscavenger stœchiométrique. En raison d'une plus faible dose à injecter, le développement de bioépurateurs catalytiques pourrait s'avérer être une technologie moins coûteuse.

L'efficacité d'un bioscavenger catalytique est étudiée au travers de deux facteurs :

- Le taux de roulement (turnover catalytique) $k_{cat}$ : c'est le nombre de conversions de molécules de substrat (ici les NOPs) catalysées par site catalytique en une seconde ; plus $k_{cat}$ est grand, plus la réaction est rapide.

- La constante de Michaelis-Menten $K_m$ traduisant l'affinité du substrat avec l'enzyme : plus $K_m$ est faible, plus l'enzyme a une forte affinité avec le substrat.

On exprime l'efficacité catalytique par le ratio $\frac{kcat}{Km}$ : plus ce ratio est important, plus l'enzyme est efficace. Trois familles ont été étudiées et modifiées génétiquement pour cette application : les cholinestérases (ChEs), les paraoxonase (PONs) et les Phosphotriesterases (PTEs - **Tableau 8**).[52,128,134,149]

La plus importante classe d'enzymes efficaces contre les NOPs caractérisées à ce jour est celle des phosphotriestérases (PTEs). Les phosphotriestérases sont des enzymes bactériennes extrêmement efficaces mais naturellement absente de l'organisme humain.[186,187] Des études de mutations de PTEs ont été développées permettant une hydrolyse très rapide des agents les plus toxiques.[187–190] En outre des études *in vitro* et *in vivo* en pré- et post-exposition ont démontré leur efficacité.[191–193] Cependant, elles peuvent provoquer une iatrogénèse. Pour pallier ce problème, l'enzyme a été encapsulée ou modifiée chimiquement pour limiter ainsi les réactions immunitaires tout en améliorant la stabilité de ces enzymes et leur cycle de vie biologique.[115,178,194]

Idéalement, afin d'éviter les problèmes de iatrogénèse, utiliser une enzyme déjà présente dans l'organisme serait plus adéquat. Naturellement, les cholinesterases (ChEs) ont aussi été étudiées. Entre 1995 et 2006, plus de 60 mutants différents de l'AChE et de BChE ont été obtenus. Seul le G117H (mutant de la BChE) affiche une efficacité améliorée avec un $k_{cat}$ de l'ordre de la minute mais elle reste sujette au vieillissement.[52,195–197] En outre, ce mutant n'est pas complètement « auto-régénérant » : la déphosylation de l'enzyme est lente. Pour permettre cette « auto-régénération » *via* la déstabilisation de la phosphylsérine, des mutations génétiques consistant au transfert de la boucle de liaison acyle de la BChE du cochon sur l'humaine ont été effectuées, sans pour autant afficher une efficacité globale intéressante.[149]

La PON-1 est une enzyme produite dans le foie que l'on retrouve dans le sang ayant des capacités d'hydrolyse octroyant une véritable protection face aux OPs dont le paraoxon (dont elle tire son nom).[198] Néanmoins ses capacités d'hydrolyse sont moins bonnes pour les agents les plus toxiques. [199,200] Certains mutants ont permis de contourner cette limite sans pour autant arriver à un bioscavenger universel.[200,201] En revanche, l'expression, la stabilité ainsi que la purification de ces enzymes rendent la production aux normes GMP très difficile.[202–205] La thérapie génique permettant leur expression dans l'organisme pourrait être utilisée à condition de surmonter les questions éthiques.[206]

Dans le **Tableau 8** sont résumés les efficacités catalytiques des enzymes abordées dans ce paragraphe.

| Enzymes / NOPs | *h*PON1 (Q192) | rPON1 (IIG1) | *h*BChE (G117H) | *P. diminuta* PTE | *P. diminuta* PTE (H257Y/L303T) |
|---|---|---|---|---|---|
| Paraoxon | $6.8 \times 10^5$ | - | $5.7 \times 10^3$ | $2 \times 10^9$ | Nd |
| DFP | $4 \times 10^4$ | - | $5.2 \times 10^3$ | $5.8 \times 10^8$ | $4.5 \times 10^7$ |
| Tabun | - | $2.6 \times 10^6$ | - | - | - |
| Sarin | $9.1 \times 10^5$ | $9.5 \times 10^6$ | $1.6 \times 10^2$ | $4.8 \times 10^6$ | $1.2 \times 10^8$ |
| Soman | $2.6 \times 10^6$ | $6.4 \times 10^7$ | - | $6 \times 10^5$ | $3 \times 10^6$ |
| Cyclosarin | - | $8.4 \times 10^7$ | - | $5 \times 10^3$ | $4.8 \times 10^3$ |
| VX | Nd | $1.43\ 10^2$ | $1.5 \times 10^3$ | $4 \times 10^4$ | - |

***Tableau 8.*** *Efficacité catalytique ($k_{cat}/K_m$, $M^{-1}\ min^{-1}$) de différentes enzymes naturelles et mutantes sur différents NOPs (P. : Pseudomonas)*[52]

Outre les enzymes, les anticorps monoclonaux catalytiques ou « abzyme » (contraction des mots enzyme et anticorps en anglais) ont aussi été étudiés pour leur application en tant que bioscavenger catalytique. Le principe consiste à immobiliser les OPs et à les hydrolyser. Cependant, leur activité catalytique est extrêmement lente et leur spécificité est trop restreinte pour un usage médical pratique malgré leur production devenue plus aisée à notre époque.[52,149,207]

Pour conclure, il n'existe pas actuellement de mesure préventive efficace d'où la nécessité d'utiliser des traitements pharmacologiques d'urgence.

### II.4.2. Traitements pharmacologiques d'urgence

En cas d'absence ou d'échec du prétraitement, il est nécessaire d'appliquer un traitement pharmacologique afin de lutter contre les symptômes dus à l'intoxication et réactiver l'AChE empoisonnée. Le traitement conventionnel consiste en l'administration conjointe d'atropine, de Diazépam (ou Avizafone, sa prodrogue) et d'un réactivateur de l'AChE.[30] Par ailleurs, l'Armée Française a développé une version d'auto traitement initialement destiné aux combattants (à disposition depuis 2015 dans le milieu médical).[208] Fabriquée par la Pharmacie Centrale des Armées (Ineurope®), cette version consiste en un auto-injecteur bi-compartimenté (molécules lyophilisées d'un côté, eau dans un second compartiment - **Figure 40**).[209] L'injection se fait par voie intramusculaire renouvelable 1 fois avant prise en charge médicale. Ce cocktail de molécules permet un traitement symptomatique partiel mais aussi étiologique. Il doit être administré le plus rapidement possible.

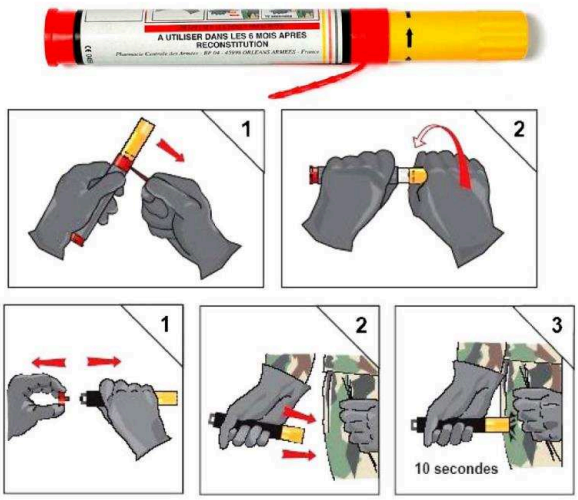



***Figure 40.*** *Seringue Ineurope® et son mode d'emploi*[209]

L'atropine, un alcaloïde tropanique (**Figure 41**), est un antagoniste cholinergique qui agit en se fixant aux récepteurs muscariniques de l'AChE du SNC. Elle permet de limiter certains symptômes muscariniques, à savoir la bradycardie, les hypersécrétions, les vomissements ainsi que les bronchospasmes.[210] L'effet de l'atropine n'est que partiel : même si elle stimule la respiration, la neurotransmission musculaire n'est pas rétablie. En effet, l'atropine ne se lie pas efficacement aux récepteurs nicotiniques. Mais, administrée à de fortes doses (jusqu'à obtention des signes d'atropinisation adéquate), elle provoque un effet nicotinique antagoniste.[211]

Le diazépam (ou l'Avizafone sa prodrogue - **Figure 41**), est une benzodiazépine, il limite les symptômes centraux, et permet de lutter contre les convulsions découlant de la surexcitation neuronale.[212] En effet, les benzodiazépines sont des agonistes allostériques des récepteurs $GABA_A$, capables de bloquer l'influx nerveux. Malheureusement, un état de mal réfractaire dû à la désactivation des récepteurs $GABA_A$ peut advenir. En parallèle de cette désactivation, le nombre et l'activité des récepteurs *N*-Methyl D-Aspartate (NMDA) augmentent, perpétuant la suractivité neuronale. L'administration en suplément de Kétamine, seul antagoniste de ce récepteur à être autorisé sur le marché, peut bloquer l'influx nerveux et donc les crises.[213–218] Cependant cette adminstration supplémentaire de kétamine doit être faite sous contrôle médical, car le dosage est très délicat, et les effets secondaires potentiels nombreux.

Le réactivateur va régénérer l'AChE inhibée en libérant sa sérine phosphylée par les NOPs. Trois réactivateurs sont utilisés dans le monde : la pralidoxime (mondialement utilisée par plusieurs pays dont la France, le Japon le Royaume-Uni et les Etats-Unis), l'obidoxime (Allemagne, Norvège, Finlande, Pays-Bas), et l'asoxime ou HI-6 (République Tchèque, Slovaquie, Suède, Canada - **Figure 41**).[219–221]

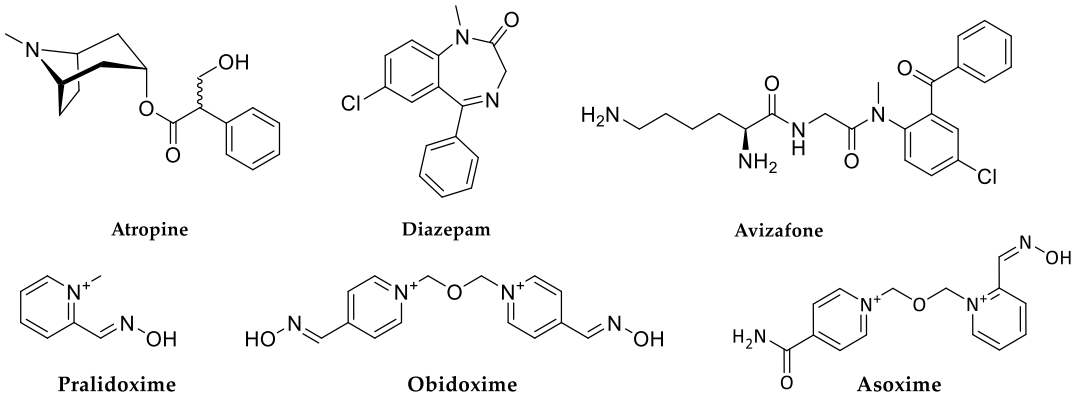



*Figure 41. Structures des remèdes d'urgences*

Les réactivateurs seront présentés en détail dans la partie suivante. Toutefois, il est important de noter dès à présent que ces réactivateurs ont de nombreux inconvénients dont leur spectre d'action étroit : il n'existe pas de molécule universelle pour le traitement des intoxications à tous les NOPs.

L'arsenal des contre-mesures reste donc très imparfait d'où la nécessité de développer de nouveaux réactivateurs originaux.

## III. La réactivation de l'acétylcholinestérase empoisonnée

L'inhibition de l'AChE par les NOPs entraîne de nombreux effets graves et les moyens actuels ne permettent pas de contrer de manière efficace les conséquences de cet empoisonnement. L'action sur l'enzyme inhibée est donc essentielle, l'utilisation d'un nucléophile fort – le réactivateur - permet la déphosphylation de la sérine catalytique régénérant ainsi l'enzyme. La structure du réactivateur comprend généralement une fonction aldoxime. D'autres fonctions ont aussi été développées. Cette partie aura donc comme objectif de présenter les réactivateurs de référence ainsi que leurs limites.

Différents paramètres peuvent permettre de caractériser l'efficacité des réactivateurs, les premiers, plus faciles à déterminer étant leurs paramètres cinétiques de réactivation de l'enzyme *in vitro* (**III.1**). Nous verrons que pour l'évaluation de leur activité *in vivo*, il est possible de définir un « indice de protection » (« Protecting Index » - PI - $PI = \frac{LD_{50\,(OP+réactivateur)}}{LD_{50\,(OP)}}$). Cette valeur est assez délicate à manier, car elle dépend de différents paramètres, dont l'espèce animale sur laquelle elle est déterminée, mais aussi la formulation du réactivateur, le toxique utilisé lui-même (OP ou simulant), le mode d'administration, mais surtout le cocktail utilisé, car cet indice est parfois calculé pour le réactivateur seul, parfois en présence d'une ou deux autres molécules pharmacologiquement actives (en particulier l'atropine, à différentes concentrations, et le diazépam). De plus, le taux de survie ne prend pas non plus en compte la « qualité de vie » des animaux ayant survécu, l'état des survivants pouvant être très variable suivant la contre-mesure médicale administrée, et ce paramètre n'est que très rarement précisé

dans les publications. Nous donnerons donc, lorsque cette donnée est disponible, cet indice de protection, tout en restant prudent sur son interprétation.

### III.1. Mécanisme de la réactivation

Le processus de réactivation de l'acétylcholinestérase par les oximes a été longtemps étudié et est bien connu de nos jours.[33] Cette réactivation de l'AChE se fait en deux étapes. D'abord, un complexe Mickaelis-Menten se forme entre l'AChE phosphylée ([EP]) et le réactivateur. Ensuite, l'oxime (sous la forme d'oximate à pH physiologique) s'additionne sur le résidu phosphylé et une élimination subséquente permet de libérer la sérine de la triade catalytique (**Figure 42**).

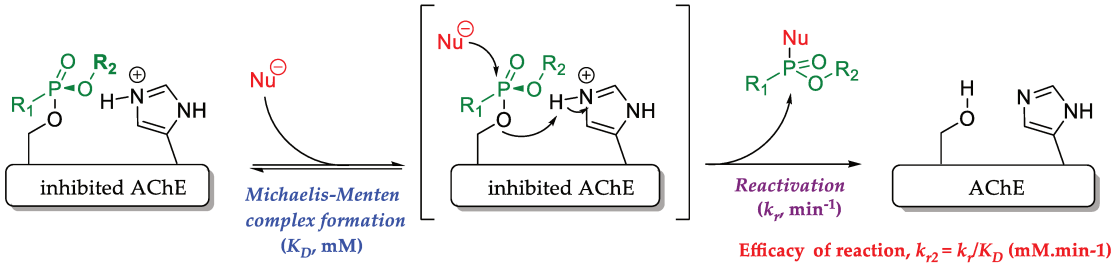



*Figure 42. La réactivation de l'AChE - un mécanisme en deux étapes (Nu : oxime)*

Contrairement à une réaction chimique classique, la réactivation ne se compare pas en termes de taux de réactivation en un temps imparti ; il est nécessaire d'étudier la cinétique de manière approfondie pour avoir de véritables éléments de comparaison entre les différents réactivateurs (**Figure 43**).

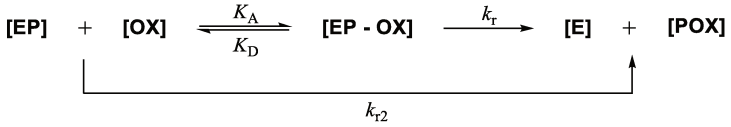



*Figure 43. Equation cinétique simplifiée de la réactivation ([EP] : enzyme phosphylée ; [OX] : oxime ; [POX] : résidu phosphyloxime ; [E] : enzyme native)*[222]

Cette réactivation est caractérisée par deux constantes cinétiques, dépendant notamment de l'OP incriminé. La constante $K_D$, exprimée en concentration molaire, correspond à la constante de dissociation du complexe [EP - OX]. Plus cette constante est faible, plus l'enzyme phosphylée a une forte affinité envers l'oxime. La constante $k_r$, exprimée en min$^{-1}$, est la constante de vitesse de la réaction de déplacement de l'adduit phosphyle par l'oxime. Plus cette constante est forte, plus la réaction est rapide.

Dans le cas d'une réactivation complète et lorsque [OX] >> [EP]$_0$, une constante $k_{obs}$ de pseudo-ordre 1 peut alors être définie. $k_{obs}$ est la constante de vitesse de réactivation observée à une concentration d'oxime donnée (**Figure 44**).[61,222,223]

$$k_{obs} = \frac{k_r\,[OX]}{K_D + [OX]}$$

*Figure 44. Equation de pseudo-ordre 1 lorsque [OX] >> $[EP]_0$*

Dans le cas où [OX] << $K_D$, cette équation se simplifie pour donner une constante d'ordre 2, $k_{r2}$ qui traduit *in fine* l'efficacité de l'oxime. Plus cette constante est importante, plus le réactivateur est efficace pour un OP donné (**Figure 45**).

$$k_{r2} = \frac{k_r}{K_D}$$

*Figure 45. Equation simplifiée d'ordre 2 lorsque [OX] << $K_D$*

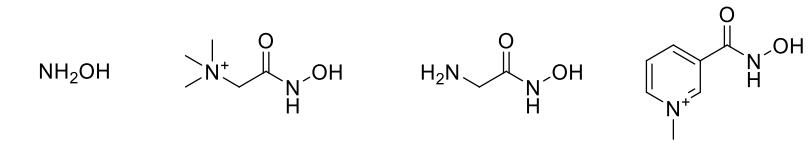
Les trois constantes présentées ci-dessus ($K_D$, $k_r$ et $k_{r2}$) sont importantes pour déterminer le potentiel des réactivateurs de l'AChE empoisonnée, et serviront dans la suite de cette thèse d'élément de comparaison des différents réactivateurs, si elles sont disponibles. Pour les réactivateurs les plus connus, les données cinétiques ont été recalculées par l'équipe du Dr. Florian Nachon afin de disposer d'un point de comparaison défini et précis.

Cependant, il est difficile de comparer les valeurs de ces constantes d'un laboratoire à l'autre. En effet, lors des tests de réactivation *in vitro*, la valeur de $k_{r2}$ peut varier en fonction de l'origine, de la séquence exacte (séquences tronquées ou enzymes plus ou moins glycosylées), du mode de préparation et de la méthode de purification de l'AChE. De plus, lors des tests de réactivation *in vivo*, les études sont réalisées sur différentes espèces et avec des protocoles différents, rendant épineuse la comparaison des données obtenues entre elles, et, *a fortiori*, l'extrapolation à l'homme. De plus, ces cinétiques de réactivation peuvent se complexifier si l'on tient compte de l'ensemble des réactions possibles au niveau de l'enzyme : l'oxime phosphylée est elle-même un neurotoxique organophosphoré, elle peut re-phosphorylée l'enzyme, ou une enzyme proche. Il s'agit du phénomène dit de recapture (**III.2.3.3**). Elle peut également, ce qui est plutôt favorable, hydrolyser directement des NOPs circulants. Enfin, l'ensemble des données cinétiques doivent également tenir compte de la réaction de vieillissement de l'enzyme, elle-même liée au NOP utilisé.

## III.2. Les réactivateurs actuels

### III.2.1. Historique

La première molécule identifiée pour sa capacité réactivatrice fut sans nul doute l'hydroxylamine ainsi que les acides hydroxamiques étudiés par Irwin Wilson en 1951 (**Figure 46**).[224,225] Malgré leur caractère nucléophile supérieur à l'eau, la cinétique de réactivation ne permettait pas un usage pragmatique de ces molécules. En 1955, un grand nombre de pyridiniums aldoximes dont la pralidoxime (2-PAM) furent synthétisés.[224,226–229]



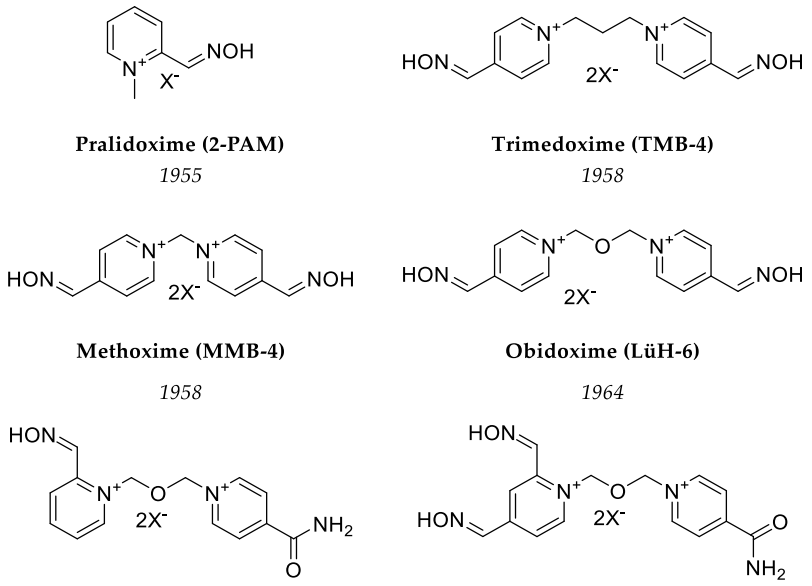
hydroxylamine | Betaine hydroxamic acid | Glycine hydroxamic acid | pyridinium hydroxamic acid

***Figure 46.*** *Molécules synthétisées par Wilson avant la découverte de la 2-PAM*

Entre 1956 et 1958, la découverte de l'affinité spécifique des dérivés d'azotes quaternaires (en particulier les pyridiniums) pour l'AChE combinée à l'efficacité des oximes en tant que $\alpha$-nucléophile (molécule comportant deux hétéroatomes liés directement l'un à l'autre et possédant chacun au moins une paire d'électrons libres induisant une répulsion électronique, exacerbant la nucléophilie du composé) ont conduit au développement des cétoximes et des aldoximes.[230–233]

En 1956, au Japon, la 2-PAM fut utilisée sur l'homme lors d'empoisonnements accidentels au parathion.[234]

Les efforts de recherche se concentrèrent alors sur le développement de réactivateurs plus efficaces que la 2-PAM : les bis-pyridiniums aldoxime (**Figure 47**). En 1958, furent respectivement rapportées les synthèses du trimedoxime (TMB-4 – E. Pziomek) et son analogue le méthoxime (MMB-4 – F. Hobbiger).[235–237] L'obidoxime (LüH-6) est le réactivateur le plus utilisé en Europe, synthétisé par A. Lüttringghaus en 1964, dont l'efficacité a été étudiée sur des patients empoisonnés par des pesticides.[238] Par la suite, de nombreuses oximes ont été synthétisées donnant naissance à deux bis-pyridiniums non symétriques : le HI-6 en 1968 et le HLö-7 en 1986.[239,240]



**Pralidoxime (2-PAM)** *1955*

**Trimedoxime (TMB-4)** *1958*

**Methoxime (MMB-4)** *1958*

**Obidoxime (LüH-6)** *1964*

**Asoxime (HI-6)** *1968*

**HLö-7** *1986*

***Figure 47.*** *Structures des réactivateurs historiques*

Parallèlement à cet essor des bis-pyridiniums aldoximes, de 1979 à 1988, d'autres aldoximes portées par des hétérocycles ou des $\alpha$-oxo-oximes ont été décrites (**Figure 48**) mais n'ont pas été développées plus avant en raison de leurs faibles capacités de réactivation.[241–249]

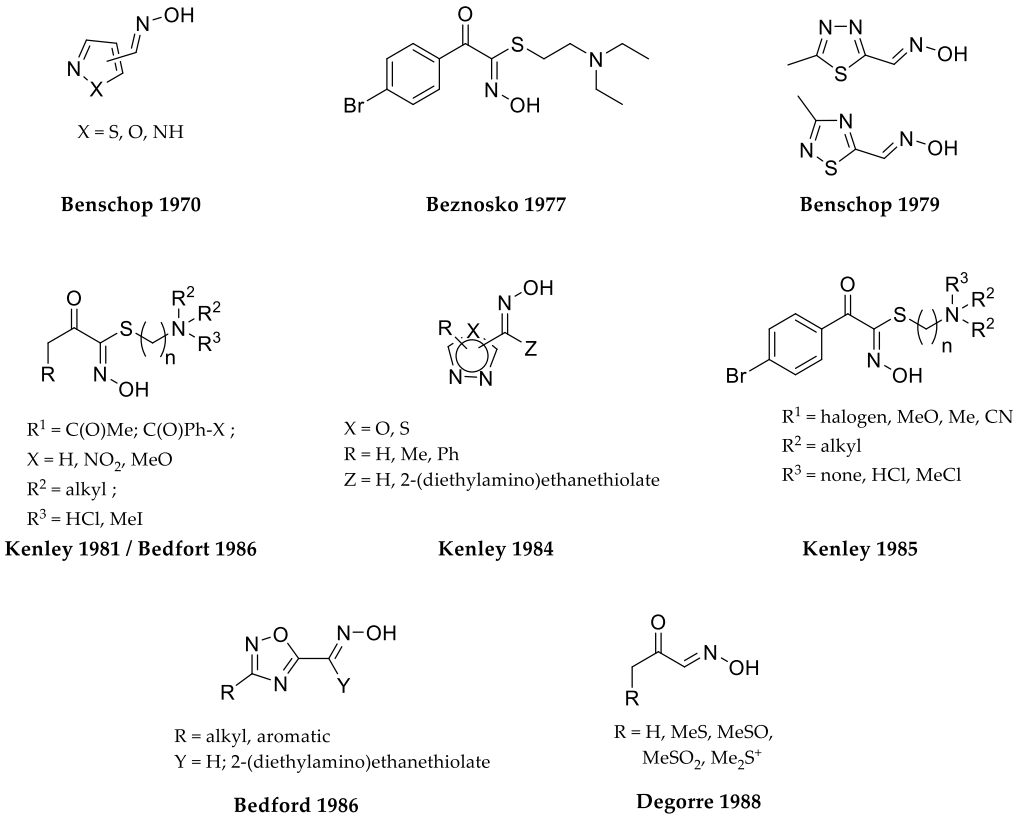



***Figure 48.*** *Structures des réactivateurs développés avant 1990 mais abandonnés*

Les dérivés de pyridiniums aldoximes ont longtemps été les réactivateurs les plus efficients *in vitro* et *in vivo*, mais présentent un certain nombre de limites qui seront abordées dans la partie suivante.

## III.2.2. Efficacité des réactivateurs de référence

### III.2.2.1. Réactivation *in vitro*

Afin d'évaluer leur capacité de réactivation, l'équipe de Franz Worek a testé ces oximes *in vitro* sur l'acétylcholinestérase inhibée par différents agents V et G (**Tableau 9**).[250,251]

| *Oxime* | *Agent* | $K_D$ *(µM)* | $k_r$ *(min$^{-1}$)* | $k_{r2}$ *(mM$^{-1}$ min$^{-1}$)* |
|---|---|---|---|---|
| 2-PAM | VX | 28,1 | 0,215 | 7,7 |
| | Sarin | 27,6 | 0,25 | 9,1 |
| | Tabun | 706 | 0,01 | 0,01 |
| | Cyclosarin | 3159 | 0,182 | 0,06 |
| Obidoxime | VX | 27,4 | 0,893 | 32,6 |
| | Sarin | 31,3 | 0,937 | 29,9 |
| | Tabun | 203 | 0,046 | 0,23 |
| | Cyclosarin | 582 | 0,39 | 0,68 |
| HI-6 | VX | 11,5 | 0,242 | 21,04 |
| | Sarin | 50,1 | 0,677 | 13,51 |
| | Tabun | Ø | Ø | Ø |
| | Cyclosarin | 123 | 2,75 | 22,41 |
| HLö-7 | VX | 7,8 | 0,49 | 62,8 |
| | Sarin | 24,2 | 0,849 | 35,1 |
| | Tabun | 106,5 | 0,02 | 0,19 |
| | Cyclosarin | 17,9 | 1,663 | 92,9 |
| TMB-4 | VX | Ø | Ø | Ø |
| | Sarin | ND | ND | ND |
| | Tabun | 111 | 0,1 | 0,9 |
| | Cyclosarin | 343 | 0,21 | 0,62 |
| MMB-4 | VX | 241,9 | 0,328 | 1,36 |
| | Sarin | 78,4 | 0,18 | 2,3 |
| | Tabun | 1252 | 0,011 | 0,008 |
| | Cyclosarin | 370,6 | 0,85 | 2,29 |

***Tableau 9.*** *Constantes cinétiques des réactivateurs de référence obtenues lors de la réactivation in vitro de l'hAChE inhibée par différents NOPs (Ø : pas de réactivation ; bleu : Worek et al, 2012 ; en noir : Worek et al. 2007)*[250,251]

De ces données, plusieurs observations peuvent être faites :

- Aucune de ces oximes n'est à large spectre : aucune n'est capable de réactiver l'ensemble des NOPs testés et la cinétique varie fortement selon le NOP utilisé ;
- La réactivation du Tabun-*h*AChE est très faible voire inexistante pour toutes les oximes testées ;
- TMB-4 est le plus efficace de la série pour le Tabun-*h*AChE mais aucune réactivation n'est observée pour le VX ou le Sarin ;
- La 2-PAM est la moins efficace des oximes présentées en comparaison avec les autres oximes ;
- Les oximes les plus efficientes sont l'obidoxime, le HI-6, le MMB-4 et le HLö-7 (l'obidoxime est d'ailleurs celle utilisée par les armées allemandes, car elle présente, malgré une efficacité encore limitée sur le tabun, le spectre le plus large).

Ces données corrèlent avec les résultats *in vivo*, sauf exception.

### III.2.2.2. Relations structure-activité

L'efficacité dépend de la réactivité de l'oxime et de son interaction avec l'enzyme inhibée. D'autres facteurs entrent en compte dans ce processus.

L'oximate est l'espèce active lors du processus de déphosphylation. De ce fait, il est important que le p*K*a de l'oxime soit compatible avec le pH physiologique. Toutefois, l'oxime ne doit pas être totalement

déprotonée : le coût énergétique de désolvatation de l'oximate est trop important rendant la réactivation moins favorable. Les résultats expérimentaux ont montré que la gamme idéale de p*K*a pour l'oximate se situe entre 7.3 et 8.[33,252]

Aussi de récentes études suggèrent que deux résidus jouent un rôle important lors de la réactivation :

- L'histidine catalytique (His447) assistée par une molécule d'eau permet la déprotonation de l'oxime et donc l'augmentation de sa nucléophilie (**Figure 49**- gauche);[253–255]
- Le glutamate 202 (résidu du site cation-π) stabilise l'adduit phosphylé (dans le cas du sarin) dans une conformation qui permet l'approche de l'oxime (**Figure 49** - droite).[256]

L'importance du résidu Glu202 a été rationalisée par des études computationnelles.[257,258] L'AChE n'est donc pas caractérisée par une triade catalytique mais par un quatuor de résidus (Ser203, His337, Glu334 et 202). Le rôle des deux glutamates dans le voisinage de Ser203 est d'égale importance. La réactivation peut se produire avec l'oxime entrant dans le site actif dans ses deux états de protonation. Mais l'occurrence de la réactivation dépend de l'état de protonation du quatuor, et en particulier du Glu202. Le modèle suivant d'états protoniques est nécessaire pour la réactivation : oxime déprotonée, His447 doublement protonée, Glu202 protoné et Glu334 non protoné.

Enfin, les résidus du site périphérique et les bis-pyridiniums interagissent *via* des interactions de type π-π et cation-π, améliorant ainsi l'affinité de ces réactivateurs pour l'enzyme phosphylée (**Figure 49**).[259]

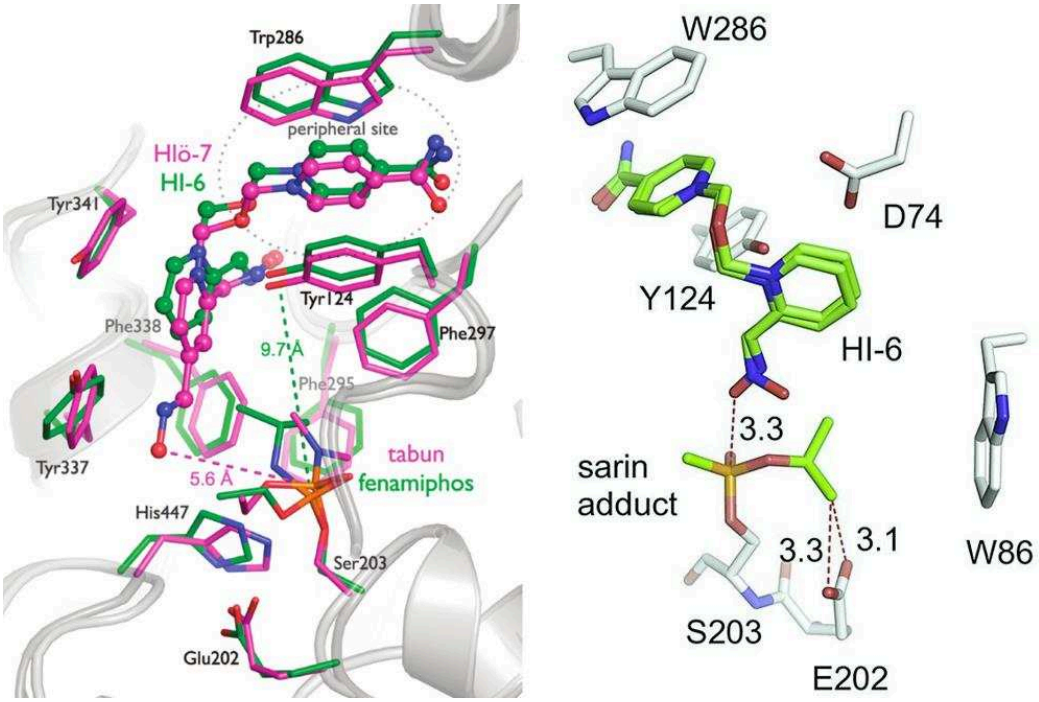



***Figure 49.*** *A gauche, vu du site actif du HLö-7-tabun-mAChE (en magenta) et du HI-6-fenamiphos-mAchE(en vert);[33] A droite, conformation du HI-6-sarin-mAChE illustrant l'approche de l'oxime[256]*

### III.2.2.3. Réactivation *in vivo*

Concernant les évaluations *in vivo*, il n'y a pas de consensus à ce sujet, beaucoup de paramètres rentrent en compte et les études ne sont pas normalisées. De ce fait, il existe différents moyens d'estimer l'efficacité *in vivo*.

Toutefois, Wilhelm et coll. ont publié en 2014 une étude menée sur le cochon d'Inde (*guinea pig*).[260] Cette étude permet véritablement de comparer ces pyridiniums oximes sur un large panel de NOPs. Les paramètres pris en compte sont la survie aux NOPs, l'évaluation de qualité de vie et l'activité cholinergique relative dans le sang ($RA_{AChE}$). Tous ces paramètres sont mesurés 24 h après l'exposition aux différents NOPs (dose injectée en IM correspondant à la $LD_{85}$). La dose d'oxime injectée est équimolaire à celle des NOPs à l'exception du TMB-4 du fait de sa toxicité intrinsèque.

Concernant le test de survie à t + 24h (**Figure 50**), le MMB-4, le HLö-7 et le HI-6 se démarque par un effet notable sur la létalité de manière homogène selon le NOP utilisé. A l'exception du cyclosarin, l'obidoxime reste relativement efficace. *A contrario*, le TMB-4 est très peu efficace, à l'exception d'une intoxication par le tabun, ce qui correspond aux observations faites *in vitro*. La 2-PAM a un effet sur la mortalité très hétérogène ce qui confirme l'obsolescence de son utilisation. Il est à noter qu'aucune de ces oximes n'a eu d'impact lors de l'exposition au soman lors de cette étude (données non-illustrées).

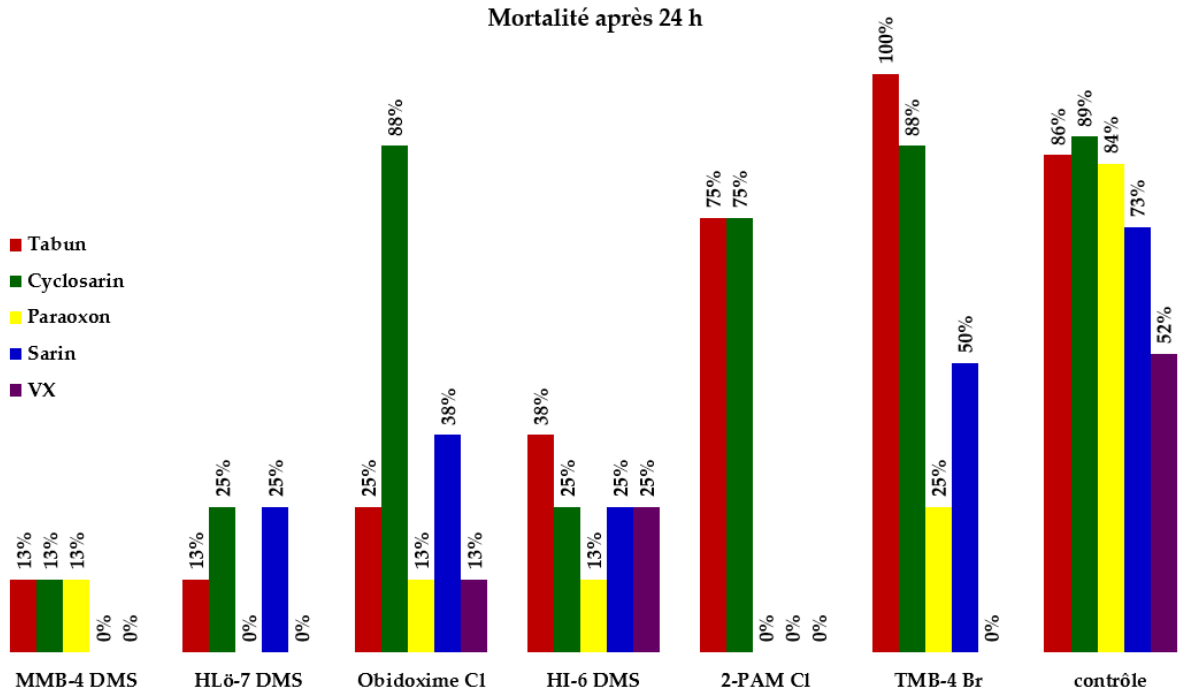



***Figure 50.*** *Taux de moralité des cobayes au bout de 24 h*

Afin d'étudier l'état clinique des cobayes (*guinea pigs*), l'évaluation de la « qualité de vie » a été mesurée (« Quality of Life assessement » - QOL - **Figure 51** - gauche). Cet indice permet une évaluation clinique objective : plus l'indice est important plus les symptômes cliniques d'intoxication observés sont graves.

Le MMB-4, le HI-6, le HLö-7 et l'obidoxime protègent le mieux des symptômes de neurotoxicité et la 2-PAM a une protection partielle dépendant de l'OP. Enfin, le TMB-4 offre une protection très incomplète voire nulle. Ces protections peuvent être directement corrélées à l'activité cholinergique résiduelle, et donc aux pourcentages des cholinestérases inhibées $RA_{Ache}$ (**Figure 51** - droite). En effet, le MMB-4, le HI-6, le HLö-7 et l'obidoxime permettent une réactivation notable de l'AChE dans le sang par rapport à l'absence de traitement (contrôle) traduite par une faible inhibition résiduelle de l'activité cholinergique.

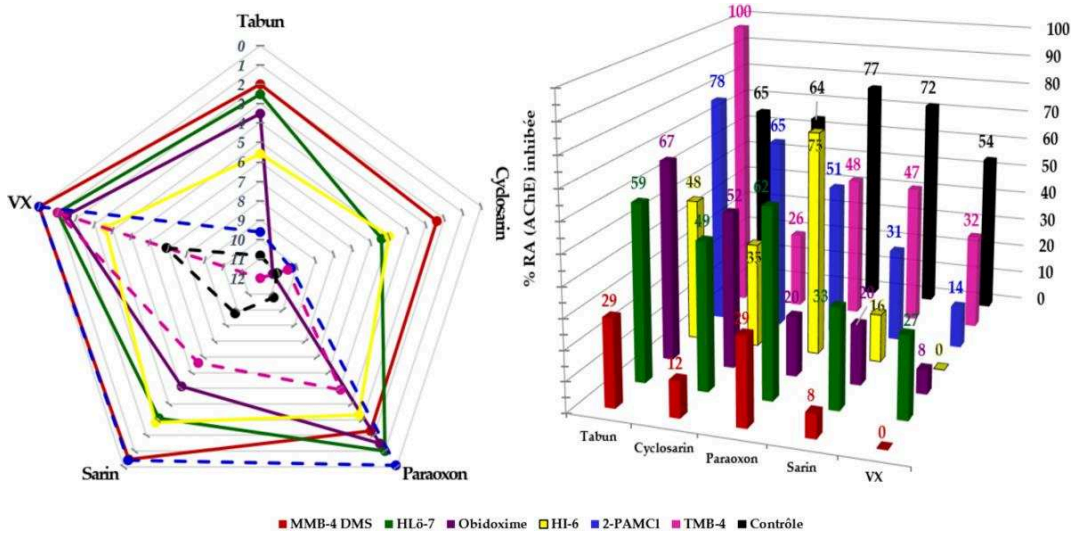



***Figure 51.*** *Indice d'évaluation de qualité de vie à +24 h (à gauche) – Pourcentage d'inhibition de l'activité relative de l'AChE dans le sang à +24h (à droite)*

Au-delà de la réactivation des AChEs, les oximes ont des effets pharmacologiques directs qui seront abordées dans la partie suivante.

### III.2.2.4. Autres effets pharmacologiques

Certaines études *in vivo* montrent que l'effet antidote des oximes ne peut s'expliquer uniquement par la réactivation de l'AChE.[261–263] Par exemple, lors de l'évaluation du HI-6 sur des primates empoisonnés par du soman,[264,265] il n'y a pas ou peu de réactivation. Cependant un effet pharmacologique positif a été observé, effet dont le mécanisme est donc indépendant de la réactivation. Afin de mieux comprendre ce phénomène, Melchers et coll. ont démontré lors d'une étude *in vivo* et *in vitro* sur l'hippocampe du rat, que le HI-6 aurait un effet direct sur l'activité des récepteurs GABA du CNS.[266]

De nombreuses études mettent en exergue l'effet des oximes sur le système nerveux (**Tableau 10**).[265]

| Processus / cibles | Effets | Sources |
|---|---|---|
| Synthèse des neurotransmetteurs | Inhibition | Clement 1979 |
| Libération des neurotransmetteurs | Altération | Clement 1979 ; Kloog 1986 ; Van Helden 1996 ; Melchers 1991 ; Kloog 1986 ; Aas 1996. |
| Récepteurs post-synaptiques | Inhibition des récepteurs nicotiniques | Lundy 1979 ; Kirsch 1981; Su 1983; Alkondon 1988. |
| | Inhibition des récepteurs muscariniques | Kuhnen-Clausen 1983 ; Amitai 1980 ; Valdes 1985 ; Reithmann 1991. |
| | Modulation allostérique des récepteurs muscariniques | Kloog 1985 ; Henis 1989 ; Ellis 1992; Tucek 1995 ; Reithmann 1991. |
| Récupération de la choline | Inhibition | Clement 1979. |
| Récepteurs pré-synaptiques | Inhibition des récepteurs nicotiniques | Kuhnen-Clausen 1983 ; Øydvin 2005. |
| | Inhibition des récepteurs muscariniques | Kirsch 1981 ; Øydvin 2005. |

***Tableau 10.*** *Exemple d'effet pharmacologique des pyridiniums oximes autres que la réactivation de l'AChE* [267–284]

Outre leurs effets sur le système nerveux, les oximes pourraient participer à l'hydrolyse des NOPs, elles ont des effets anticonvulsifs et stimulent la respiration.[221,285]

### III.2.2.5. Pharmacocinétique des pyridiniums oximes

L'accès aux données pharmacocinétiques pour les réactivateurs est difficile dans la littérature ouverte cependant quelques résultats ont été publiés (**Tableau 11 - Tableau 12**).

| Oxime | 2-PAM Cl | | Obidoxime Cl | | HI-6 Cl | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Dose (mg/kg) | 12.5 | 13.2 | 2.5-10 | 3.5 + 0,45 $h^{-1}$ | 7 | 7 |
| Hommes | Volontaire | Patient | Volontaire | Patient | Volontaire | Patient |
| Injection | IM | IM | IM | IV | IM | IM |
| $t_{1/2}$ *a* | 9.4 | 9.6 | - | - | 12 | 15 |
| $t_{max}$ | 34.4 | 33.0 | 20 | - | 27 | 31 |
| $t_{1/2}$ *e* | 174.4 | 148.9 | 82,8 | 129 | 64 | 120 |
| Références | Jovanovi, 1989 | | Sidell, 1970 | Eyer, 2003 | Clement, 1995 | Kusic, 1991 |

***Tableau 11.*** *Quelques données pharmacocinétiques sur l'Homme ($t_{1/2a}$ : demi-vie d'absorption, $t_{1/2e}$ : demi-vie d'élimination ; $t_{max}$ : temps ou la concentration est maximale )*[285–289]

Le pic de concentration est atteint entre 20 et 30 minutes pour ces trois oximes. Cependant, la différence se situe au niveau de la vitesse d'élimination. En effet, le HI-6 est plus rapidement éliminé que l'obidoxime ou le 2-PAM. Dans le cas de patients réellement intoxiqués par des pesticides, la vitesse d'élimination est sensiblement allongée. Cela est dû au disfonctionnement du système rénal.[290] Concernant le MMB-4 et le HLö-7, il n'y a pas de données dans la littérature ouverte. Cependant, sur le cochon, l'élimination du MMB-4 est plus lente comparée au 2-PAM ($t_{1/2}$ e = 157.6 vs 86.8 min).[291] Cependant, cette vitesse d'élimination rapide nécessite une administration répétée de l'oxime afin de contrer la persistance de certains NOPs.[223]

A partir des volumes apparents (ratio entre la quantité de la substance active administré et la concentration réellement présente dans le compartiment étudié - **Tableau 12**), la distribution des pyridiniums aldoximes est bien connue et est très réduite : elle se fait essentiellement dans le liquide extracellulaire, à l'exception du 2-PAM qui est capable de pénétrer les hématies (processus lent dont le temps de demi vie est de 4.5 h).[292]

Dans le cas d'intoxication aigüe, le volume de distribution apparente change. Ce changement notable peut être expliqué par l'interaction des oximes avec les glycosaminoglycanes (présents dans les tissus conjonctifs) par liaisons ioniques, créant un « sous-compartimentement », ralentissant le relargage des oximes dans le système circulatoire.[293–295] En effet, dans le cas d'un patient empoisonné au parathion, traité 12 jours à l'obidoxime et décédé 15 jours après l'intoxication, la concentration de l'oxime était 100 fois plus importante dans les cartilages que dans le plasma.[290]

| **Oxime** | **2-PAM** | | **Obidoxime** | | **HI-6** | | **HLö-7** | **MMB-4** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Espèce | Homme volontaire | Homme intoxiqué | Homme volontaire | Homme intoxiqué | Homme volontaire | Chien | Chien | Cochon |
| $Vd_{ss}$ ($l\,kg^{-1}$) | 0,7 | 2,77 | 0,17 | 0,85 | 0,25 | 0,25 | 0,26 | 0,361 |
| Références | Sidell, 1972 | Willems, 1992 | Sidell, 1972 | Bentur, 1993 | Clement, 1995 | Spöhrer, 1994 | Spöhrer, 1994 | Woodard, 1991 |

***Tableau 12.*** *Volume de distribution apparent des pyridinium aldoximes( Vd ss : volume de distribution à l'état stable)*[289–291,296–299]

Enfin ces oximes traversent peu ou pas la BHE.[220,223,290,300–302] En effet, les concentrations cérébrales détectées sont très faibles comparées aux concentrations plasmiques et ne suffissent pas à une réactivation des AChEs du SNC. Ce point sera présenté de manière détaillée dans la partie III.2.3.4.

### III.2.2.6. Stabilité des pyridiniums oximes en milieux aqueux et métabolisation

Concernant la stabilité, il est nécessaire que la molécule ne se dégrade pas en solution mais aussi que les produits de dégradation ne soient pas toxiques.

Deux mécanismes pH-dépendant de dégradation sont connus pour les pyridiniums oximes[290]:

- à pH < 3, l'oxime s'hydrolyse en aldéhyde et hydroxylamine ;
- à pH > 4, la dégradation de l'oxime en nitrile peut être observée donnant différents adduits dont l'acide cyanhydrique.

Selon les oximes, d'autres processus peuvent s'ajouter à ces deux mécanismes (Figure I.). L'exemple du HLö-7 est détaillé ci-dessous (**Figure 52**).[303]

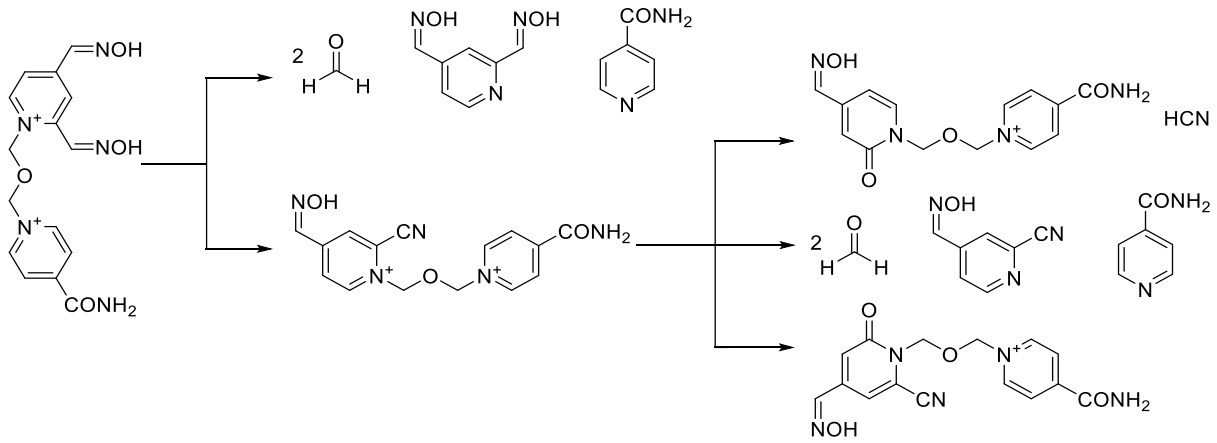


*Figure 52. Dégradation du HLö-7*

La stabilité physico-chimique de différentes oximes est présentée dans différentes études, permettant d'avoir une durée maximale de conservation (**Tableau 13**).[239,290,303–310] Le HLö-7, malgré de très bonnes capacités de réactivation présente une très mauvaise stabilité. C'est l'une des raisons qui ont conduit à son abandon pour une application humaine. Le HI-6 suivant la même dégradation reste plus stable. Le MMB-4 est beaucoup plus instable que son analogue, le TMB-4, à cause du caractère acide des protons du pont méthylène.[311] Enfin l'obidoxime et la 2-PAM sont les molécules les plus stables de la série.

| Oximes | Concentration (%) | T(°C) | t 90% (ans) | Références |
|---|---|---|---|---|
| 2-PAM Cl | 50 | 25 | 3,4 | Ellin, 1982 |
| 2-PAM Cl injecteur | 30 | 25 | 10 | Schroeder 1989 |
| TMB-4 Br | 11,4 | 25 | 14 | Rubnov 1999 |
| MMB-4 | 12 | 40 | 2 | Clark 2014 |
| Obidoxime Cl | 25 | 25 | 38 | Rubnov 1999 |
| HI-6-Cl | 37 | 25 | 0,055 | Eyer 1988 |
| HI-6 Cl injecteur | 13 | 25 | 0,148 | Eyer 2007 |
| HLö-7 DMS | 52 | 25 | 0,02 | Eyer 1992 |

*Tableau 13. Durée de conservation des pyridiniums aldoximes correspondant à 10% de dégradation.*[239,290,303–310]

La stabilité en milieu aqueux influence directement la voie de métabolisation de ces molécules dans le corps. En effet, le processus de métabolisation est essentiellement abiotique. De ce fait, les adduits de dégradation sont retrouvés dans les excrétions (urines essentiellement et fèces à moindre mesure – **Tableau 14**).

| Oximes | Espèce | Injection | % récupération | Métabolites détectés | Sources |
|---|---|---|---|---|---|
| 2-PAM | Rat | IM | 80-90 | N-methyl-2-cyanopyridine<br>N-methylpyridinone, thiocyanate | Enander, 1962 |
| | Homme | IV | 90 | N-methyl-2-cyanopyridine | Garrigue, 1990 |
| Obidoxime | Homme | IV | 70 | ND | Sidell, 1972 |
| MMB-4 | Lapin | IM | 83-87 | Acide isonicotinique<br>4-pyridine aldoxime | Lusiak, 2013 |
| TMB-4 | Homme | IM | 80 | ND | Eyer, 2007 |
| HI-6 | Rat | IV | 57 | pyridinones (20%) | Lightenstein, 1987 |
| | Chien | IV | 70 | pyridinones (5%); acide carboxylique (5%)<br>isonicotinamide (3%); acide isonicotinique (1%) | Eyer, 2007<br>Spöhrer, 1994 |
| HLö-7 | Chien | IM | 78 | ND | Spöhrer, 1994 |

***Tableau 14.*** *Pourcentage de récupération dans les urines des pyridiniums aldoximes ainsi que les métabolites identifiés*[290,294,296,312–315]

Ces adduits restent moins toxiques que les réactivateurs natifs (**III.2.3.1**). De plus, la quantité de thiocyanate ou d'acide cyanhydrique détectée ne pose pas de problème toxicologique majeur.[294]

L'ensemble des données de réactivation, de pharmacocinétique et de stabilité démontrent que les réactivateurs les plus performants sont l'obidoxime, le HI-6 et le MMB-4. L'obidoxime est utilisé en Allemagne, en Norvège, en Finlande et aux Pays-Bas. Le MMB-4 est actuellement évalué aux Etats-Unis en vue du remplacement du 2-PAM. Enfin le HI-6 - utilisé au Canada, en Suède, en République Tchèque et en Slovaquie – est en cours d'homologation en France à la place du 2-PAM. Etonnamment, Israël utilise le TMB-4 malgré une faible efficacité.[219,220]

### III.2.3. Les limites des réactivateurs de référence

Il n'existe pas, à ce jour, de réactivateur universellement efficace. L'utilisation d'une combinaison d'oximes a été envisagée (HI-6 + oblidoxime, HI-6 + TMB-4) dont les résultats sont parfois positifs.[316–320] Néanmoins, l'ensemble de la communauté scientifique s'accorde sur le caractère provisoire de cette alternative en attendant l'émergence de réactivateurs à large spectre.

Bien qu'utilisés à ce jour sur l'Homme, les pyridiniums aldoximes souffrent de nombreuses autres imperfections qu'il est important de relever : une toxicité intrinsèque non négligeable, une réactivation incomplète avec la génération de phosphyloximes toxiques et un passage de la BHE problématique.

#### III.2.3.1. Toxicité

L'action des oximes dépend du NOP incriminé mais aussi de sa concentration étroitement liée à sa toxicité intrinsèque. La $LD_{50}$ a donc été naturellement évaluée sur différentes espèces dont le cochon d'Inde -*guinea pig*- et la souris (**Tableau 15**). Le TMB-4 est le plus toxique de la série avec une $LD_{50}$ de 102 $mg.mg^{-1}$ (soit 0.23 $mmol.kg^{-1}$). L'obidoxime a une $LD_{50}$ non négligeable et, à forte dose, cette

molécule est hépatotoxique.[11] *A contrario*, le HI-6 est le moins toxique. A noter que la $LD_{50}$ en injection IV est, en général, doublée par rapport à l'injection IM.[290]

| Oximes | TMB-4 | LüH-6 | 2-PAM | MMB-4 | HI-6 |
|---|---|---|---|---|---|
| $LD_{50}$ ($mg.kg^{-1}$) | 102 | 188 | 263 | 441 | 671 |
| $LD_{50}$ ($mmol.kg^{-1}$) | 0.23 | 0.523 | 1.52 | 1.34 | 1.87 |

***Tableau 15.*** *Dose létale des pyridinium aldoxime de référence par injection IM sur la souris*[321–323]

L'intoxication aux oximes est, en grande partie, identique à l'intoxication aux NOPs.[322,324] Il est donc nécessaire de déterminer l'indice thérapeutique (ratio entre la $LD_{50}$ et l'$EC_{50}$ de l'oxime propre à chaque NOP – **Tableau 16**) afin qu'il y ait une balance bénéfice/risque favorable. Une seule étude présente quelques valeurs sur le *guinea pig*.[325] Plus cet indice est important, plus la fenêtre thérapeutique est importante. Seule le MMB-4 semble avoir des indices thérapeutiques adéquats contrairement au 2-PAM et à l'obidoxime.

| Oxime | 2-PAM | LüH-6 | MMB-4 |
|---|---|---|---|
| $LD_{50}$ IM $mg.kg^{-1}$ | 179 | 79 | 679 |
| VR | **0.3** | Ø | 89 |
| VX | 13 | **5.5** | 142 |

***Tableau 16.*** *Indice thérapeutique d'oximes chargée lors de l'exposition percutanée des guinea pigs au VR et VX* [325]

Outre cette toxicité intrinsèque non négligeable, l'affinité de ces molécules envers la cible est un réel pivot de l'efficacité mais peut provoquer un phénomène d'inhibition indésirable de l'AChE.

### III.2.3.2. Affinité versus inhibition

La première étape de la réactivation consiste en la formation du complexe de Michaelis-Menten. Ce complexe est régi par une constante de dissociation directement liée à l'affinité de l'enzyme (phosphylée) avec l'oxime. Entre une enzyme phosphylée et native, les changements conformationnels sont très subtils.[326] L'affinité doit être suffisamment élevée afin d'éviter les actions non-spécifiques de l'oxime sur l'enzyme non phosphylée. Si l'on considère que l'oxime doit avoir un $K_D < 100$ µM pour être suffisamment affine envers l'AChE phosphylée, un trop faible $K_D$ peut provoquer une inhibition de l'AChE native.[223,327]

### III.2.3.3. Phénomène de recapture

La réactivation de l'AChE phosphylée par l'oxime conduit à la formation d'une phosphyloxime (POX). Cet intermédiaire dont la stabilité dépend à la fois du réactivateur et du NOP, est lui-même inhibiteur de l'AChE avec un potentiel anti-ChE équivalent voire supérieur aux NOPs natifs (les Novichoks sont

des dérivés phosphyloxime).[328] Ainsi, l'enzyme peut être, de nouveau, inhibée par cette phosphyloxime : c'est le phénomène de recapture (**Figure 53**).[226]

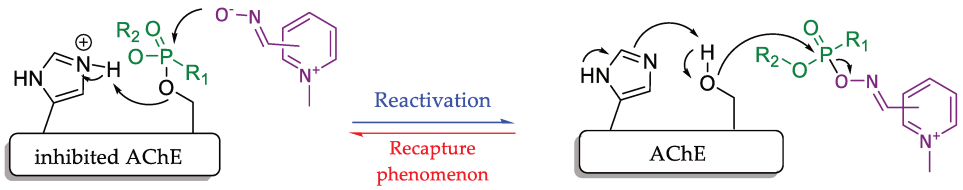



*Figure 53. Phénomène de recapture*

La réactivation n'est plus irréversible, un équilibre se met en place diminuant drastiquement l'efficacité des oximes. Ce phénomène de recapture est limité à moindre mesure par la dégradation de la phosphyloxime en nitrile et acide organophosphonique *via* une *β*-élimination de Beckman (**Figure 54**).[329]

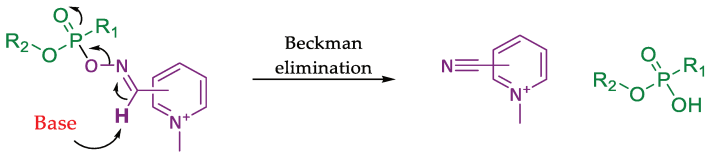



*Figure 54. Décomposition des POXs*

Certaines phosphyloximes de la pralidoxime ont été synthétisées et évaluées *in vitro* (**Tableau 17**).[329] Deux facteurs ont donc été mesurés : $t_{1/2}$ qui traduit le temps de demi-vie de dégradation du POX et $k_i$, la cinétique d'inhibition. Plus le temps de demi vie $t_{1/2}$ est important, plus le POX est stable ; plus la constante cinétique d'inhibition $k_i$ est élevée, plus le phénomène de recapture est important.

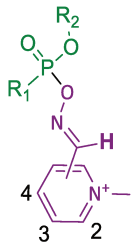
| *Structure* | *R₁* | *R₂* | *POX* | *NOP associé* | *Position Oxime* | *pKa oxime* | *$t_{1/2}$ (min)* | *$k_i$ r-mAchE ($.10^{-6}$ $M^{-1}Min^{-1}$)* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|  | Me | Et | EMP-PAM | VX | 2 | 8 | 0.70 | 1 940 |
| | | | | | 3 | 9.2 | 588 | 2.7 |
| | | | | | 4 | 8.6 | 62 | 382 |
| | Me | *i*Pr | IMP-PAM | Sarin | 2 | 8 | 1.05 | 1 420 |
| | | | | | 3 | 9.2 | - | - |
| | | | | | 4 | 8.6 | 75 | 110 |
| | Me | Pinacolyl | PMP-PAM | Soman | 2 | 8 | 1.5 | 1 570 |
| | | | | | 3 | 9.2 | - | - |
| | | | | | 4 | 8.6 | 112 | 237 |
| | $N(CH_3)_2$ | Et | EDMP-PAM | Tabun | 2 | 8 | 1.10 | 11 |
| | | | | | 3 | 9.2 | 139 | 0.16 |
| | | | | | 4 | 8.6 | 63 | 2.5 |
| | Et | Et | DEP-PAM | Paraoxon | 2 | 8 | 0.18 | 210 |
| | | | | | 3 | 9.2 | - | - |
| | | | | | 4 | 8.6 | 16 | 6.0 |

***Tableau 17.** Constantes cinétiques de décomposition des POXs et inhibition des AChE par les POXs*[329]

La stabilité du POX est directement liée à la position de l'oxime sur le pyridinium : la position *ortho* rend instable l'adduit tandis que pour les positions *meta* et *para* (à moindre mesure), le temps de demi-vie est 50 à 500 fois plus important. Ce phénomène est dû au caractère acide du proton au pied de l'oxime :

plus l'acidité est importante (forme de résonance, distante entre l'hydrogène et l'azote chargé), plus le POX est instable. La différence notable entre le *para* et le *meta* est expliquée par l'interaction entre l'azote chargé du pyridinium et le P=O rendant moins prompte l'abstraction du proton au pied de l'oxime (**Figure 55**).

Concernant l'inhibition, les POXs du 2-PAM ont un pouvoir inhibiteur de l'AChE 7 à 100 fois plus important que les NOPs.[329] Aussi, cette augmentation est observée à moindre mesure pour les POXs du 4-PAM. *A contrario*, les POXs du 3-PAM sont certes stables mais bien moins actifs que les NOPs (facteur 3 à 4). Cette différence est due à une combinaison entre le caractère acide de l'oxime (meilleur groupe partant) mais aussi par une meilleure complémentarité avec le site actifs (plus le POX est plan, plus les interactions sont efficaces - Figure 55).

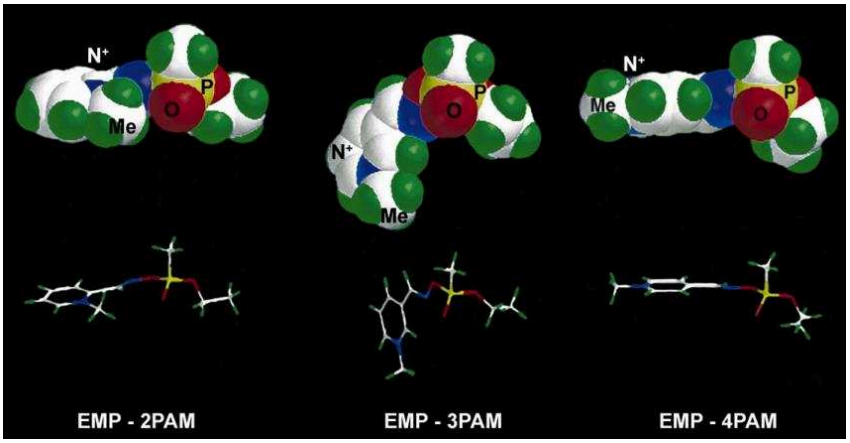



***Figure 55.*** *Structure 3D des phosphyloximes dérivés des PAMs* [329]

L'utilisation de phosphotriestérases - PON1 ou d'organophosphate hydrolase (OPH) - permettrait d'hydrolyser ces POXs améliorant ainsi la cinétique de réactivation de l'obidoxime dans le cas d'une inhibition au sarin, VX ou paraoxon ; il n'y a aucun effet positif sur la cinétique dans les cas du tabun, cyclosarin et VR (**Figure 56**).[330–333]

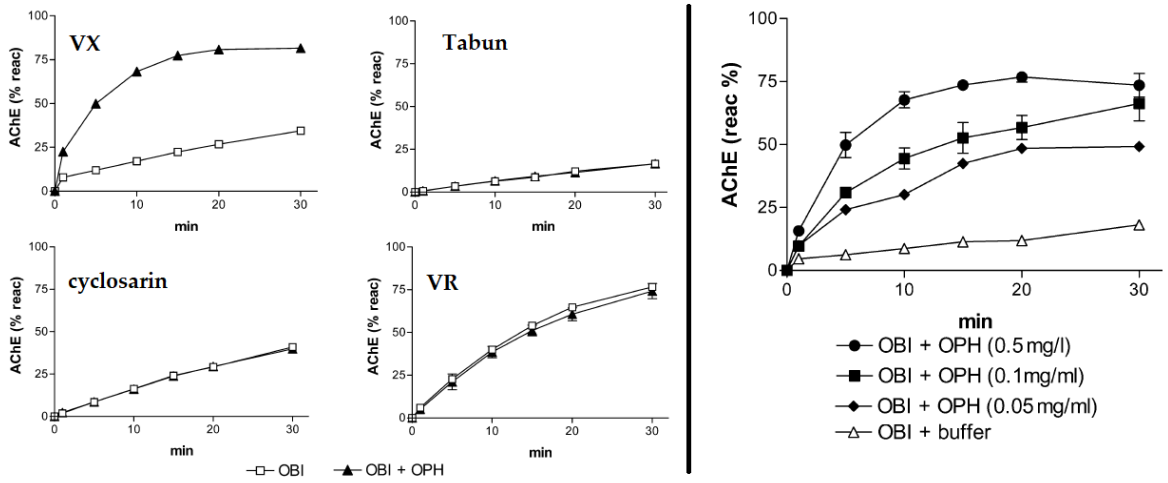



***Figure 56.*** *Effet de l'OPH (0.2 mg/mL à gauche – concentration variable à droite) sur les cinétique de réactivation des OP-hAChE par l'obidoxime (OBI dans le diagramme, 20 µM)* [330]

### III.2.3.4. Passage de la barrière hématoencéphalique

Les NOPs sont suffisamment lipophiles pour traverser l'ensemble des barrières biologiques dont la barrière hématoencéphalique (BHE). Cependant la distribution des pyridiniums aldoximes est mono-compartimentale et se fait essentiellement dans le plasma (**III.2.2.5**). Certes, la cause principale de décès lors d'une intoxication aux NOPs est directement corrélée à l'activité des AChEs périphériques mais les effets neurologiques à court terme (convulsions et épilepsie mortelle) et à long-terme sont loin d'être négligeables autant chez l'Homme que chez l'animal.[334–342] Des études sur les victimes directes et collatérales de l'attentat de Tokyo rapportent des troubles neurologiques évidents (déclin psychomoteur et de la mémoire) sept ans après l'attentat, et sans aucun lien avec un syndrome post-traumatique.[343–347]

Les caractéristiques intrinsèques des oximes chargées (présence de la charge ; *log P*) font que ces molécules passent peu ou pas la BHE. Ceci fait l'objet d'un farouche débat dans la littérature, les données étant contradictoires d'une étude à l'autre. Des études sur modèle animal ont montré que certaines oximes semblent passer au travers de la BHE rendue perméable par les NOPs, cependant ce transfert dépend de la dose injectée et la cinétique de transfert est lente et hétérogène (**Tableau 18**).[302]

| Oxime | LogP | Espèce | Dose injectée (mg/kg) | NOP | [Oxime] $_{plasma}$ | [Oxime] $_{CNS}$ | %[oxime] $_{CNS/plasma}$ | Sources |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2-PAM | -2.31 | Rat | 20 (IV) | Trichlorfon | 13.94 µg/mL | 0.86 µg/mL | 6 % | Firemark 1964 |
| | | Rat | 50 (IV) | Ø | 21.75 nM/mL | 2.83 nM/mL | 9.3 % | Sakura 2013 |
| | | Homme | ND (IV) | Sarin | 4 µg/ml | 0 | 0 % | Nagao 1997 |
| HI-6 | -3.39 | Rat | 100 (IM) | Soman | 87 µg/ml | 5.1 µg/ml | 5 % | Cassel 1997 |
| LüH-6 | -3.12 | Homme | ND (IV) | Parathion | 17µM | 4 µM | 20% | Eyers 2007 |
| | | Rongeur | - | - | - | - | 3-5% | Falb 1969 |

***Tableau 18.*** *Passage des oximes chargées au travers de la BHE* [290,300,348–353]

La nécessité pour les oximes de traverser la BHE est régulièrement sujet de débats.[300,302] Pour la survie, seul 5% des AChEs du CNS (notamment dans la zone ponto-médullaire) doivent être actives.[300,354] Il n'y a pas d'informations sur un plus long terme ni sur les séquelles neurologiques possibles. Cependant, l'encapsulation du 2-PAM et du HI-6, en vue de leur libération dans le cerveau de rongeurs exposés aux NOPs (Paraoxon, Soman), permet une réactivation des AChEs centrales et une amélioration de la survie constituant une preuve de concept concernant la nécessité d'agir au niveau central. [355,356]

### III.3. Cahier des charges des nouveaux réactivateurs

Les oximes de références, actuellement utilisées sur l'Homme, souffrent de nombreux inconvénients. Ces molécules - dont la toxicité intrinsèque ainsi que celle de leur adduit (phénomène de recapture) ne sont pas négligeables - ont une réactivation des AChEs hétérogènes selon le NOP utilisé et dans les différents tissus (peu ou pas de passage de la BHE). Il est donc essentiel de développer de nouveaux réactivateurs moins toxiques et à large spectre d'action. Worek et coll. ont donc proposé un cahier des charges de ces nouveaux réactivateurs dans leur publication « *Oximes in organophosphate poisoning : 60 years of hope and despair* ».[223]

Afin d'avoir un effet - ne serait-ce que partiel - les réactivateurs doivent présenter un $k_r > 1$ min$^{-1}$ et un $K_D < 100$ µM. Pour ce dernier critère, une affinité trop forte entraînerait une inhibition indésirable. Aussi, l'initiation de la thérapie, le dosage, la durée et la pharmacocinétique des oximes ainsi que leur capacité à entrer dans le CNS, sont des problématiques importantes en rapport avec la persistance des NOPs dans l'organisme. Un équilibre subtil entre l'ensemble de ces facteurs doit donc être trouvé.

## IV. Développement de nouveaux réactivateurs de l'AChE empoisonnée – Etat de l'art

Face aux nombreuses limitations des oximes de référence, différentes équipes de recherche se sont penchées sur le développement de nouveaux réactivateurs de l'AChE inhibée par les NOPs, plus efficaces et à plus large spectre d'action. Cette partie sera donc consacrée à l'état de l'art après plus de 70 ans de recherche. Cette partie sera focalisée sur les réactivateurs de l'AChE, cœur de ce sujet de ce doctorat. Je présenterai l'ensemble de ces travaux en trois axes : les oximes chargées, les oximes neutres et enfin les réactivateurs ne présentant pas d'oximes dans leur structure. Comme expliqué précédemment, la comparaison sera faite dans la mesure du possible, les méthodes et moyens d'évaluation différant d'un laboratoire à l'autre.

### IV.1. Développement de nouveaux réactivateurs chargés

Dans la continuité des mono- et bis-pyridiniums aldoximes de référence, un grand nombre de réactivateurs ont été synthétisés.[33] Afin de rendre l'analyse plus aisée, cette partie sera subdivisée suivant le nombre de charges permanentes portées par le réactivateur, en distinguant donc réactivateurs mono- et bi-chargés.

### IV.1.1. Les réactivateurs mono-chargés

Les réactivateurs décrits dans cette partie ont la particularité de présenter **une charge permanente** dans leur structure Cette charge permanente peut être sous la forme d'un pyridinium, d'un imidazolium ou d'un ammonium quaternaire phénylique.

#### IV.1.1.1. Les pyridiniums aldoximes

Dérivés de la 2-PAM, les mono-pyridiniums aldoximes partagent une structure commune représentée dans la **Figure 57**.

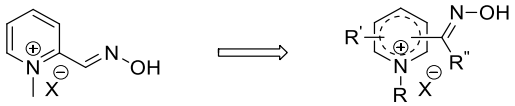



***Figure 57.*** *Structure générale des pyridiniums aldoximes.*

Quatre principales modifications ont été effectuées sur la 2-PAM : la position de l'oxime sur le cycle, la nature du groupement porté par l'azote du pyridinium, la fonctionnalisation du cycle pyridinium et enfin la fonctionnalisation de l'oxime. La variation du contre-anion, influant directement sur la stabilité de la molécule, ne sera pas développée. La forme prodrogue de la 2-PAM et ainsi que d'autres fonctions réactivatrices mono-chargées seront également présentées dans cette sous-partie.

##### *IV.1.1.1.1. Influence de la position de l'oxime sur le cycle*

Comme nous l'avons vu précédemment (**III.2.3.3**), la position de l'oxime sur le noyau pyridinium non-fonctionnalisé a d'importantes répercussion sur la capacité de réactivation de la molécule (**Tableau 19**).[357,358] La position de l'oxime influe sur le positionnement de la molécule dans le site actif, sur le p*K*a de l'oxime et sur le phénomène de recapture. De cela découle des potentiels de réactivation drastiquement différents traduits par une efficacité de réactivation : la 2-PAM est la plus efficace, suivi de la 4-PAM, la 3-PAM étant la moins efficace. Malheureusement, les constantes cinétiques de réactivation des 3- et 4-PAM ne sont pas disponibles dans la littérature. Cependant, afin d'avoir une idée de leur cinétique, une extrapolation à une transestérification peut être faite, mettant en évidence la différence de cinétique entre les régioisomères, et la tendance semble confirmer l'ordre d'efficacité 2-PAM > 4-PAM > 3-PAM.[359]

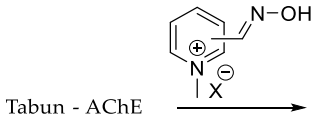
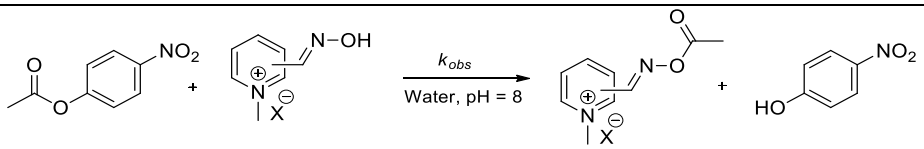
| Réactivateurs | 2-PAM | 3-PAM | 4-PAM | Références |
|---|---|---|---|---|
| p*Ka* | 8 | 9.2 | 8.6 | Ashani 2002 |
|  | | | | |
| Efficacité de réactivation (% de réactivation à t + 20 min, [PAM] 0.5 mg/ml) | 19.54 | 3.42 | 9.19 | Hoskovcová 2010 |
|  | | | | |
| $k_{obs}$ ($10^3$ $s^{-1}$) | 4.16 | 1.80 | 3.5 | Singh 2011 |

***Tableau 19.*** *Caractéristiques des 2-, 3- et 4-pralidoximes.*[329,358,359]

### *IV.1.1.1.2. Influence du groupement de l'azote quaternaire*

Afin d'améliorer le passage au travers de la BHE, et d'augmenter l'affinité du pyridinium aldoxime pour l'enzyme phosphylée, la modulation du groupement porté par l'azote de la pyridine a été étudiée avec comme objectif l'augmentation des capacités réactivatrices des pyridiniums oximes (**Figure 58**).

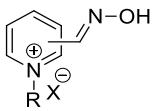



***Figure 58.*** *Modulation du groupement R des mono-pyridiniums aldoximes*

#### *IV.1.1.1.2.a. Incorporation de chaînes alkoxy*

Dès 1964, l'incorporation d'une chaîne methoxy liée à l'azote de la pyridine a été décrit dans la littérature.[360,361] Bien que je n'ai pas pu avoir accès au texte complet de ces publications, il est fort probable que leur potentiel de réactivation soit égal ou inférieur à celle de la 2-PAM, l'affinité ne pouvant être augmentée de manière significative par ce genre de groupement.

Des travaux similaires ont été mené par Hagedorn et coll[362] - travaux partiellement repris récemment - consistant en l'incorporation de chaines éther d'alkyle et de benzoyle lipophiles afin d'améliorer le passage de la BHE.[363] Cependant, les constantes cinétiques ne sont pas décrites, seuls les taux de réactivation des OPs-*ee*-AChEs *in vitro* ont été rapportés. Dans le cas du sarin, les pourcentages de réactivation sont équivalents ou inferieurs à la 2-PAM et à l'obidoxime (**Figure 59**). Lorsque la longueur de chaîne est trop importante (plus de 8 unités méthylènes) et/ou l'oxime en *meta*, il n'y a plus aucune réactivation.

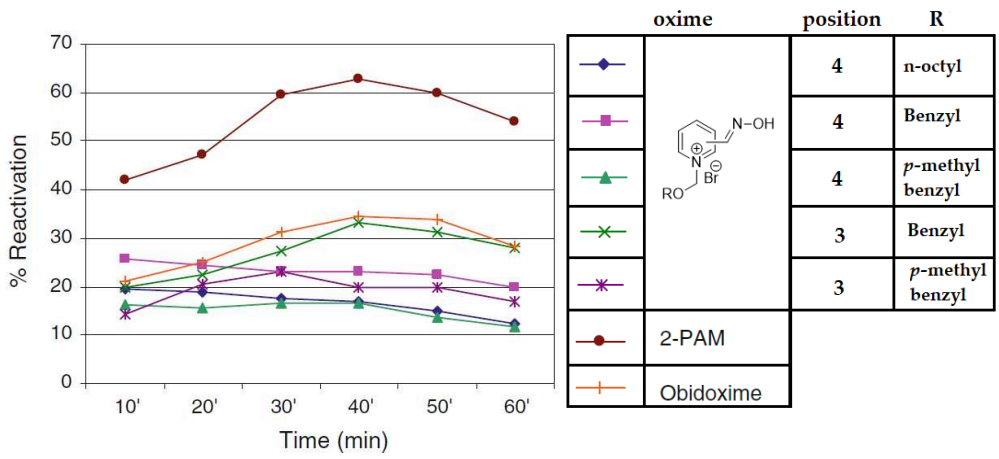



***Figure 59.*** *Pourcentage de réactivation du sarin-eeAChE par les N-alkoxyl et N-benzoxy pyridiniums aldoximes (1 mM)*[363]

Malgré ces résultats mitigés, De Koning et coll ainsi que Chambers et coll ont obtenu des résultats plus encourageants en ajoutant, d'une part, une chaîne alkyloxy plus longue, portant un dérivé aromatique susceptible d'interagir avec les résidus du site périphérique de l'enzyme, ou, d'autre part, portant directement un ligand connu du site périphérique (**Figure 60**). [364–367]

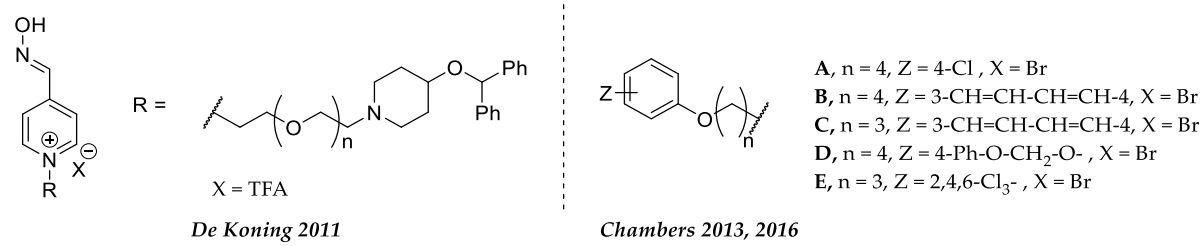



***Figure 60.*** *Réactivateurs mono-chargés de De Koning et Chambers respectivement*

Les molécules de De Koning ont été testées *in vitro* et possèdent des capacités de réactivation nettement supérieures à celle de la 2-PAM. La longueur de la chaîne alkoxy espaceur permettrait un meilleur positionnement de la fonction réactivatrice mais aussi du ligand du site périphérique (**Figure 61**).

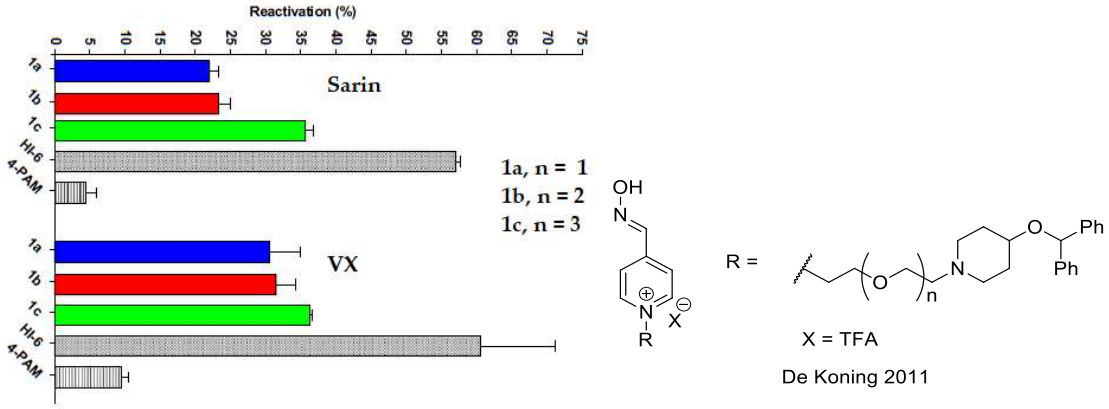



***Figure 61.*** *Réactivation in vitro des molécules de De Koning sur l'hAChE inhibée par le sarin et le VX respectivement*[364]

Ayant également observé de bien meilleures capacités de réactivation *in vitro*, Chambers et coll ont testé leur molécule *in vivo* sur le rat (**Figure 62**).[365–369] Celles-ci permettent une réactivation des ChEs du SNC

et une sensible augmentation de la survie à + 24 h, cependant le passage à travers la BHE n'a pas encore été formellement prouvé.

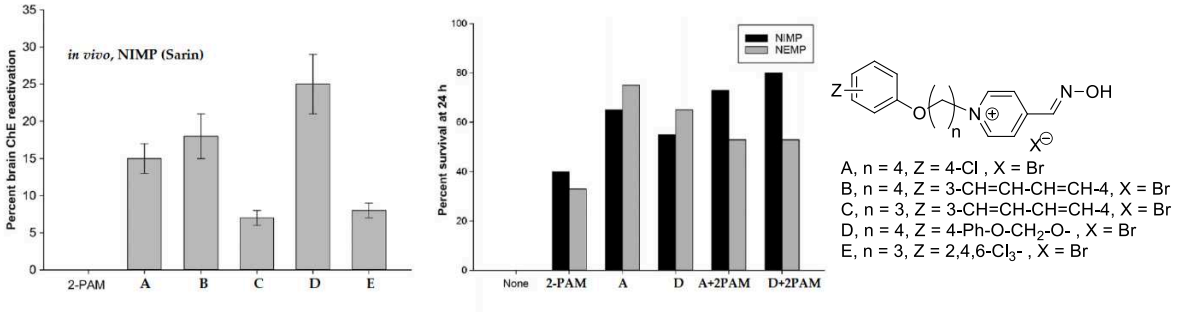



***Figure 62.*** *Réactivation des ChEs dans le cerveau de rat après exposition au NIMP (i.p.) suivi de l'oxime (100 µmol/kg, IM, à gauche) ; Survie des rats 24 h après exposition au NIMP (analogue du sarin) ou NEMP (analogue du VX) après traitement (146 µmol/kg, IM, à droite)*

Cette modification d'un réactivateur simple sur lequel un ligand pouvant interagir avec le site périphérique de l'enzyme est ajouté via un bras de liaison plus ou moins flexible, démontre clairement (comme nous le verrons avec la stratégie adoptée à la même période au laboratoire), que l'augmentation de l'affinité du réactivateur pour l'enzyme phosphylée, tout en conservant un maximum de flexibilité pour que l'oxime puisse atteindre la sérine phosphorylée, permet globalement d'améliorer leurs propriétés de réactivation.

### *IV.1.1.1.2.b. Incorporation de chaînes aliphatiques et d'aromatiques simples*

En 2006, Ohta et coll. ont rapporté la synthèse un grand nombre de ces mono-pyridiniums aldoximes portant des chaînes alkyles et/ou des aromatiques plus ou moins encombrés.[56] Ces molécules ont été testées sur la *h*AChE inhibée par l'INMP (analogue du sarin). Les auteurs ont choisi de traduire la capacité de réactivation par rapport à la 2-PAM afin de faciliter la comparaison entre ces 45 molécules (**Tableau 20**). Les taux de réactivation sont globalement inférieurs à la 2-PAM. Ce résultat peut être expliqué par la gêne stérique induite par ces groupements, diminuant l'affinité pour l'enzyme phosphylée, et donc la capacité réactivatrice du pyridinium aldoxime.

| R | X | 2-aldoxime | 3-aldoxime | 4-aldoxime |
|---|---|---|---|---|
| Me | Cl | 100 | - | - |
| Ethyl | I | 92 | 11 | 29 |
| *n*-butyl | Br | 58 | 8,4 | 30 |
| *n*-hexyl | Br | 39 | 11 | 43 |
| *n*-octyl | Br | 34 | 5,4 | 46 |
| *n*-decyl | Br | 23 | 3,6 | 59 |
| *n*-octadecyl | Br | Ø | Ø | Ø |
| Isoamyl | Br | 48 | Ø | Ø |
| 2-ethylhexyl | Br | - | Ø | 47 |
| Benzyl | Br | 39 | Ø | Ø |
| *p*-methylbenzyl | Br | 55 | 9 | 48 |
| *p*-*tert*-butylbenzyl | Br | 64 | 15 | 30 |
| 2-phenylethyl | Br | 5,3 | Ø | 44 |
| 3-phenylpropyl | Br | Ø | Ø | Ø |
| 4-phenylpropyl | Cl | Ø | 4,2 | 3,1 |

***Tableau 20.*** *Pourcentage de réactivation du NIMP-hAChE des différentes oximes normalisées à la 2-PAM*[56]

Ces résultats sont confirmés par les travaux de Kovarik et coll. qui ont synthétisé d'autres dérivés de la 4-PAM *N*-halogenobenzylé (cette position ayant été choisie pour que les groupement pointent vers la gorge de l'enzyme, et donc pour minimiser les gènes stériques induite par ces groupements encombrants).[370] Même si l'on considère que la 4-PAM est moins efficace que la 2-PAM, l'ajout de ces benzyles permet l'augmentation drastique du $K_D$ et donc de la réactivation (**Tableau 21**). Cependant, les efficacités de réactivation $k_{r2}$ restent très inférieures à celle de la 2-PAM. Cela peut être expliqué par le manque de flexibilité de ces molécules. En effet, la distance entre le pyridinium et l'aromatique est trop courte pour que les interactions entre l'aromatique et le site périphérique de l'enzyme soient productives. Cette même distance ne permet pas à l'oxime de se placer dans une position adéquate qui permettrait la substitution de la sérine sur le phosphore.

| **Oxime** | **R** | **p*Ka*** | $k_r$ **(min$^{-1}$)** | $K_D$ **(mM)** | $k_{r2}$ **(mM$^{-1}$ min$^{-1}$)** | **% réactivation$_{max}$ *(temps en h)*** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2-PAM | Me | 8 | 0.01 | 0.706 | 0.01 | - |
| 4-PAM | H | 8.55 | 0.0008 | 0.65 | 0.0012 | 30 *(23)* |
| 4-PAM | *p*-methylbenzyl | 8.60 | 0.0029 | 0.77 | 0.0038 | 80 *(20)* |
| 4-PAM | *p*-bromobenzyl | 8.55 | 0.0030 | 0.60 | 0.0050 | 80 *(16)* |
| 4-PAM | *p*-chlorobenzyl | 8.56 | 0.0032 | 0.90 | 0.0036 | 80 *(40)* |
| 4-PAM | *p*-nitrobenzyl | 8.48 | 0.0012 | 0.88 | 0.0014 | 40 *(25)* |

***Tableau 21.*** *Réactivation du tabun-hAChE des oximes synthétisées par Kovarik et coll*[370]

Dans la continuité de ces modifications, le greffage sur l'azote du pyridinium de différents groupements aromatiques, aliphatiques et hétérocycliques plus ou moins rigides et/ou encombrés a été décrit dès 1972 par Hagedorn et coll., étude qui a été reprise et complétée par d'autres équipes de recherche

indiennes en 2015 (**Figure 63**).[362,371–373] Cependant, comme nous allons le voir, ces molécules souffrent encore d'un manque d'affinité mais aussi d'une cinétique de réactivation faible.

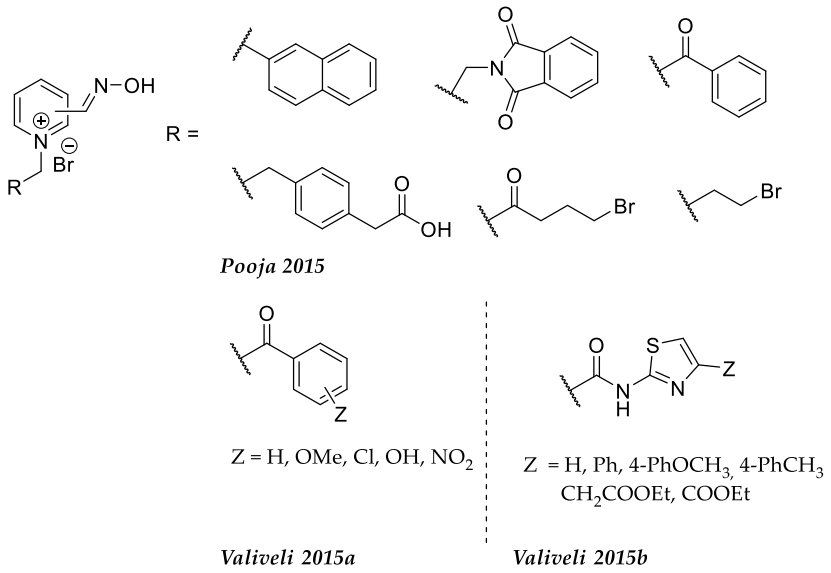



***Figure 63.*** *Structure des pyridiniums aldoximes synthétisées par Pooja et al. et par Valiveli et al.* [362,371–373]

### *IV.1.1.1.3. Influence de la fonctionnalisation sur le cycle et sur l'oxime*

Dès 1956 sont rapportées les premières fonctionnalisations du noyaux pyridinium au travers des recherches de Sara Ginsburg (**Figure 64**).[374] Différentes cétoximes et aldoximes ont été synthétisées mais aucune donnée de réactivation n'a été rapporté. Suite à cet exemple et dans le but d'augmenter la lipophilie, d'autres fonctionnalisations du cycle et de l'oxime ont été réalisées (fluoration du cycle chargé ou non et de l'oxime,[375,376] substitution de l'oxime par des groupements lipophiles plus ou moins attracteurs ou/et encombrés[374,377–379] –**Figure 64**). Cependant, malgré une augmentation conséquente du *log P*, les capacités de réactivation restent inférieures à celle de la 2-PAM. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que la nucléophilie, le p*K*a, ainsi que l'encombrement de l'oxime influent sur sa réactivité, nécessitant un compromis entre ces différents facteurs, et que cette stratégie de simple fonctionnalisation du cycle ou de l'oxime ne permettent pas d'atteindre un tel compromis.

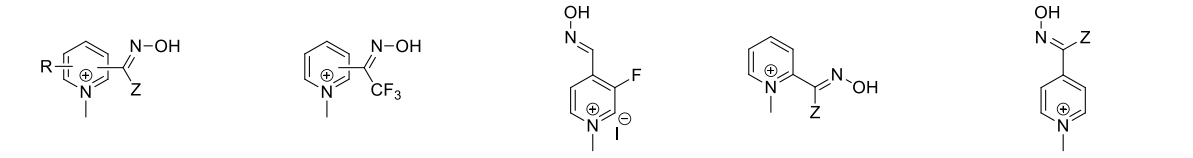



***Figure 64.*** *Fonctionnalisations des pyridiniums oximes rapportées dans la littérature*

#### *IV.1.1.1.4. Vers une forme prodrogue du 2-PAM : la pro-PAM*

Face à l'impossibilité d'augmenter la lipophilie *via* la fonctionnalisation de l'oxime ou du cycle pyridinium, tout en gardant une activité réactivatrice correcte, une version prodrogue de la 2-PAM a été développée et testée *in vivo* sur le *guinea pig*. Cette approche tire parti de la stratégie de vectorisation mise au point par Bodor consistant à synthétiser des dérivés dihydro pyridine susceptibles d'être oxydés en pyridinium une fois délivrés dans le cerveau.[380,381] L'administration de cette prodrogue permet une augmentation de l'activité cholinergique du SNC lors de l'exposition au DFP.[381,382] En effet, la charge étant amoindrie, la pro-PAM traverse plus facilement la BHE et est ensuite biotransformé *in situ* en 2-PAM. Bien qu'ingénieuse, cette solution comporte des désavantages : la synthèse du pro-2-PAM est délicate (génération d'acide cyanhydrique), mais surtout la molécule est instable en solution et in vivo (réoxydation) et, comme illustré dans la partie III, la 2-PAM n'est pas le réactivateur le plus efficace (**Figure 65**).

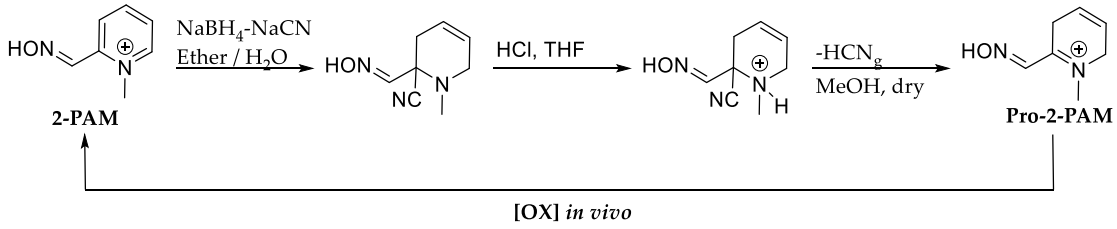



***Figure 65.*** *Synthèse du pro-2-PAM et conversion in vivo en 2-PAM*

### IV.1.1.2. Autres réactivateurs mono-chargés

D'autres oximes portées par des hétérocycles comme l'imidazole, les ammoniums phényliques et les nitrones ont été étudiés en remplacement du noyaux pyridinium, ainsi que des dérivés présentant plusieurs nucléophiles sur des pyridiniums. Nous exposerons, de manière succincte, les versions mono-chargées dans cette partie.

Radić et coll ont développé des réactivateurs chargés dérivés de l'Edrophonium, un inhibiteur connu de l'AChE, se fixant dans le site catalytique, l'objectif étant de tirer parti des interactions cation-π avec le site de liaison de l'ammonium de la choline (**Figure 66**).[185]

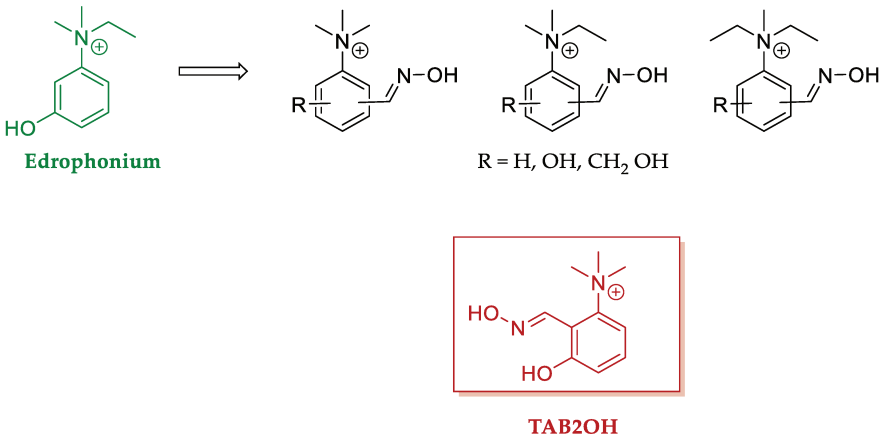


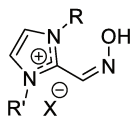

*Figure 66. Structure générale des oximes dérivées de l'edrophonium (lead en rouge)*

La capacité de réactivation de ces molécules est inférieure à la 2-PAM dans le cas de la *h*AChE phosphylée. Cela peut être expliqué par la faible affinité finalement obtenue avec l'enzyme inhibée (**Tableau 22**). Cependant, ces travaux n'ont pas été vains car le TAB2OH, meilleure molécule de cette famille, a la capacité de réactiver bien plus efficacement la *h*BChE inhibée par divers NOPs (à l'exception du sarin et du Tabun), et ce de façon intéressante, à la fois grâce à une amélioration de l'affinité pour l'enzyme phosphylée ($K_D$) et de la vitesse de réactivation ($k_r$) Son utilisation dans un système bioscavenger pseudo-catalytique pourrait dès lors être envisagée.

| Oxime | Enzyme | Paraoxon | | | Cyclosarin | | | Tabun | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $k_r$ | $K_D$ | $k_{r2}$ | $k_r$ | $K_D$ | $k_{r2}$ | $k_r$ | $K_D$ | $k_{r2}$ |
| TAB2OH | *h*BChE | 0.34 | 0.71 | 480 | 3.9 | 1 | 3700 | 0.00027 | 1.3 | 0.21 |
| 2-PAM | *h*BChE | 0.23 | 2.4 | 96 | 2.6 | 5.4 | 480 | 0.0011 | 1.2 | 0.91 |
| TAB2OH | *h*AChE | 0.47 | 12 | 41 | 0.44 | 36 | 12 | 0.0032 | 8.2 | 0.39 |
| 2-PAM | *h*AChE | 0.27 | 1.8 | 150 | 0.73 | 6.6 | 110 | 0.0058 | 1.6 | 3.8 |

***Tableau 22.** Réactivation in vitro des OP-hChEs par le TAB2OH et la 2-PAM ($k_r$ en $min^{-1}$ ; $K_D$ en mM et $k_{r2}$ en $M^{-1}.min^{-1}$)*

L'imidazolium a également été étudié en remplacement du noyau pyridinium, structurellement très proche (noyau aromatique appauvri, azote quaternaire …), tout en ayant un encombrement stérique plus faible, ce qui pourrait offrir un accès plus facile à la sérine phosphorylée. Un grand nombre d'analogues ont été synthétisés entre 1979 et 2017.[383–390] La structure générale est développée dans la **Figure 67**.



R or R' = alkyl, aryl, alkoxy, allyl

*Figure 67. Structure générale des imidazoliums oximes*

Cependant, aucun membre de cette famille n'a surpassé la 2-PAM lors des tests de réactivation. Aussi, malgré leur affinité avec l'AChE native, les indices de protection lors de l'administration en prétraitement sont inférieurs à ceux obtenus pour les réactivateurs de référence.[388,389]

En 2017, De Koning a incorporé au imidazolium oxime un ligand du site périphérique ainsi qu'un espaceur *via* une réaction multicomposante d'Ugi suivi d'une methylation de l'imidazole (**Figure 68**).[390]

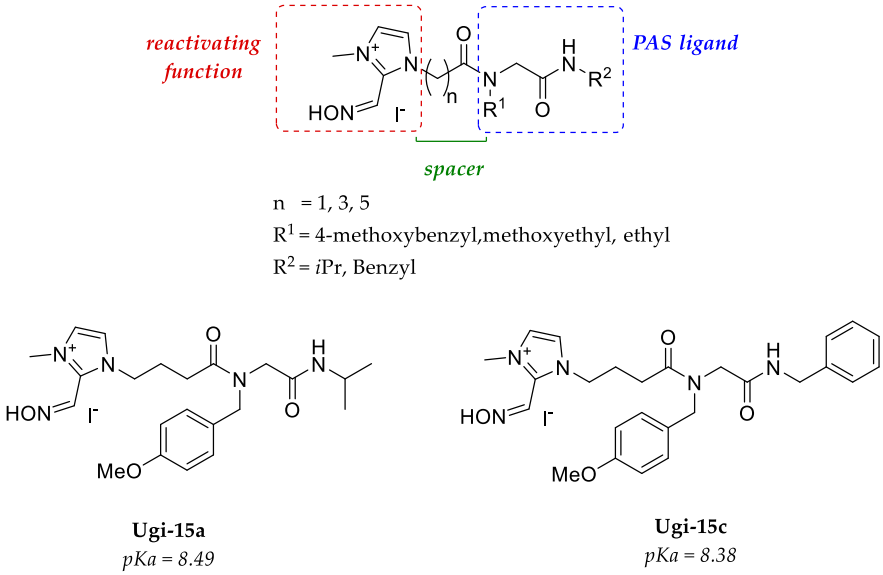



***Figure 68.*** *Imidazoliums oximes développées par De Koning*

Ces réactivateurs ont été évalués *in vitro* sur la *h*AChE issue d'érythrocytes (**Tableau 23**). Ces molécules agissent à large spectre contrairement au HI-6. L'apport d'un ligand de site périphérique permet d'améliorer les affinités envers l'enzyme inhibée au tabun ou au cyclosarin. Cependant le ligand utilisé ne permet pas de surpasser les affinités présentées par les oximes de référence dans le cas du sarin et du VX. Les vitesses de réactivation sont équivalentes voire inferieures à celles de la 2-PAM amoindrissant ainsi l'efficacité globale de ces molécules. Cependant, la molécule **Ugi-15c** restent plus efficace que la 2-PAM et l'obidoxime dans le cas du tabun et du cyclosarin. Dans le cas du VX et du sarin, ces molécules sont moins efficaces que la 2-PAM.

| *NOP* | *Constante cinétique* | *2-PAM* | *Obidoxime* | *HI-6* | *Ugi-15a* | *Ugi-15c* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Tabun | $k_r$ | 0.01 | 0.04 | Ø | 0.012 | 0.010 |
| | $K_D$ | 706 | 97.3 | Ø | 74.3 | 19.4 |
| | $k_{r2}$ | 0.014 | 0.41 | Ø | **0.168** | **0.536** |
| Sarin | $k_r$ | 0.250 | 0.937 | 0.677 | 0.139 | 0.167 |
| | $K_D$ | 27.6 | 31.3 | 50.1 | 98 | 66.1 |
| | $k_{r2}$ | 9.06 | 29.98 | 13.50 | 1.413 | 2.551 |
| Cyclosarin | $k_r$ | 0.182 | 0.395 | 1.3 | 0.106 | 0.182 |
| | $K_D$ | 3159.0 | 945.6 | 47.2 | 134.5 | 35.4 |
| | $k_{r2}$ | 0.06 | 0.42 | 27.55 | **0.800** | **5.156** |
| VX | $k_r$ | 0.215 | 0.893 | 0.242 | 0.168 | 0.138 |
| | $K_D$ | 28.1 | 27.4 | 11.5 | 115.9 | 52.0 |
| | $k_{r2}$ | 7.67 | 32.63 | 20.98 | 1.458 | 2.674 |

***Tableau 23.*** *Cinétique de réactivation des imidazoliums de De Koning in vitro sur la hAChE issue d'érythrocytes empoisonnée par différents NOPs ($k_r$ en $min^{-1}$ ; $K_D$ en µM ; $k_{r2}$ en $mM^{-1}$ $min^{-1}$)*[390]

Ces molécules ont été évaluées en combinaison avec l'atropine sur le rat exposé au sarin. Seule la molécule **Ugi-15c**, malgré sa toxicité intrinsèque, permet d'éviter les convulsions et une sensible amélioration de l'activité cholinergique résiduelle dans le cerveau, bien que l'activité résiduelle dans le sang soit relativement faible (**Figure 69**). Aucun indice de protection ni pharmacocinétique ne sont rapportés dans cette publication malgré les capacités intéressantes mise en évidence. A noter que des versions non-chargées de ces molécules ont été développés et seront présentés ultérieurement dans ce chapitre (**IV.2.4**).

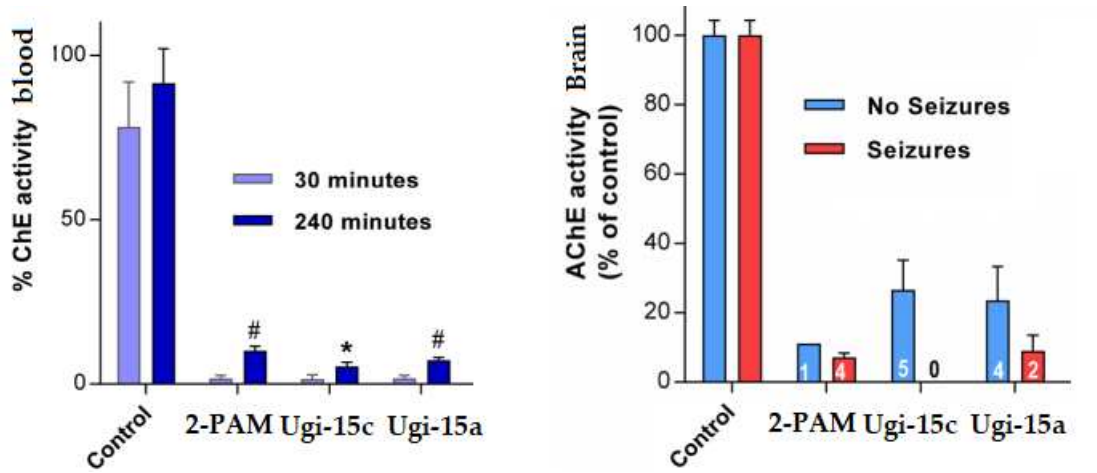



***Figure 69.*** *Activité cholinergique dans le sang des rats exposés au sarin (130 µg/kg SC) traités par les oximes (16µmol/kg IV + 3mg/kg en IM d'atropine + 1 min) 30 min et 4h après exposition (à gauche) – Activité cholinergique dans le cerveau des rats 4h après exposition au sarin (à droite)*

Enfin, Hosseini et coll. ont mené une étude de modélisation moléculaire dans le but d'investiguer l'utilisation des nitrones oximes (**Figure 70**) .[391] Les énergies de liaison calculées étaient supérieures à celles de la 2-PAM. Cependant, ces oximes testées sur la *h*AChE ont une capacité de réactivation inférieure à celle de la 2-PAM, illustrant l'importance de prendre un certain recul sur les études *in silico* qui ne prennent en compte que l'affinité, alors que la réactivation est un phénomène dynamique impliquant une réaction chimique au sein du site de liaison.

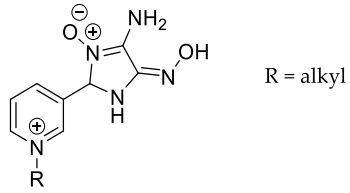



***Figure 70.*** *Structure des nitrones oximes décrites pas Hosseini et coll.*

Une autre stratégie décrite dans la littérature sur les oximes mono-chargées consiste à adjoindre plusieurs oximes sur une même molécule. Elle a été utilisée pour le développement des bis-pyridiniums essentiellement. Le greffage d'une seconde oxime en *para* sur la 2-PAM ne permet pas d'avoir une amélioration de la réactivation, du fait de la faible affinité de cette molécule envers l'AChE empoisonnée. Des hybrides poly-oximes de la 2-PAM ont aussi été rapportés dans la littérature par Amitai et coll en 2016 (**Figure 71**).[392] Les capacités de réactivation *in vitro* et *in vivo* sont équivalentes voire supérieures à celle de le 2-PAM. Cependant ces molécules sont moins efficaces que le HI-6. Les indices de protection obtenus avec ces oximes en préexposition aux agents G ainsi que leur capacité à inhiber de manière réversible l'AChE non phosphylée indiquent que ces substances pourraient être de bons candidats pour un traitement prophylactique. Ces bis-oximes présentent également une fonction acide hydroxamique, la présence de trois nucléophiles alpha susceptibles non seulement de réactiver l'enzyme phosphylée, mais aussi d'hydrolyser les neurotoxiques avant qu'ils n'atteignent leur cible, pourrait également expliquer leur indice de protection *in vivo* en préexposition.

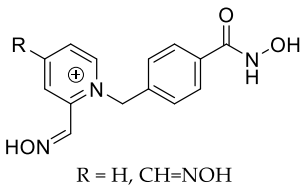



***Figure 71.*** *Hybrides synthétisés par Amitai et coll.*

Un autre exemple de bis-oxime mono-chargée a été rapporté dans la littérature par Oh et coll sur la 4-PAM (**Figure 72**).[393] Malheureusement, les capacités de réactivation de cette molécule sur l'*h*AChE inhibée sur le paraoxon et la DFP sont équivalentes à la 4-PAM. Cela signifie que l'ajout de ce motif n'ajoute aucune plus-value sur la molécule. Le fragment pipéridine aldoxime a été testé seul et souffre à la fois d'un manque d'affinité envers l'enzyme mais aussi une cinétique très lente de réaction sur la

sérine phosphorylée, le p*K*a de cette seconde oxime étant beaucoup trop élevée (≈ 11) pour que la réactivation soit efficace.

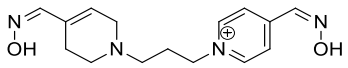


***Figure 72.*** *Bis-oxime mono-chargé de Oh et coll.*

### IV.1.2. Les réactivateurs bi-chargés

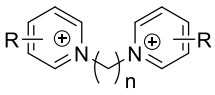
Etant donné l'efficacité des bis-pyridiniums aldoximes, comme le MMB-4 ou le HI-6, un effort intense de recherche a été fait sur ce motif afin d'optimiser leurs propriétés. Seront présentés dans cette sous partie, les bis-pyridiniums aldoximes, les bis-pyridiniums céto-oximes ainsi que les dimères d'autre fonctions chargées (succinctement pour ce dernier volet).

#### IV.1.2.1. Les bis-pyridiniums aldoximes et leurs dérivés

Depuis la découverte du TMB-4 et du MMB-4 dans les années 1950, un très grand nombre d'études ont été réalisées sur les bis-pyridiniums aldoximes. Comme précédemment pour les mono-pyridiniums aldoximes, de nombreuses modifications structurelles ont été effectuées. La majorité d'entre-elles consiste à faire varier le nombre et la position des oximes ainsi que la taille et la structure de l'espaceur.

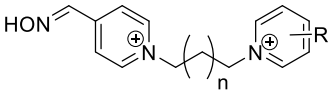
##### *IV.1.2.1.1. Bis-pyridiniums aldoximes comportant un espaceur alkyle*

L'influence de la variation de la longueur de la chaîne alkyle a été étudiée par plusieurs groupes de recherche entre 2003 et 2011 *via* la synthèse d'analogues du TMB-4 (**Figure 73**).[393–402]



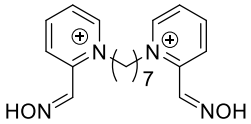
n = 2-9
R= 2-3-4-CH=NOH

***Pang 2003, Kuca 2004, Oh 2008***

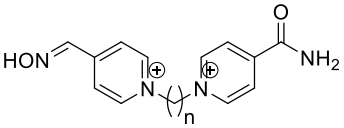


n = 1-5
R = 3-4-$CONH_2$, 4-CN, 4-Me, 4-tBu, 4-Ph, 4-$CH_2OH$, 4-COMe, 4-COOH, 4-COOEt, 4-$C(NH_2)NOH$

***Kuca 2003, 2005; Srinivas Rao 2006, Musilek, 2006, 2011***



**Ortho-7**



**K027, n = 3**
**K048, n = 4**

***Figure 73.*** *Structures des bis-pyridiniums séparés par une chaîne alkyle*

Les résultats obtenus montrent que la longueur de chaîne optimale dépend de la position des oximes sur les pyridinium bis oximes, mais aussi de la position du groupement R dans le cas des mono-oximes.[397,403,404] Cependant, il ressort de ces études que l'augmentation de la longueur chaîne, et donc de la lipophilie, ne permet pas d'améliorer le passage au travers la BHE, ni la réactivation. De l'ensemble de ces études, seules trois molécules – les K027 et K048 et l'Ortho-7 – présentent des capacités de réactivation des AChEs inhibées intéressantes (**Tableau 24**).

| *Oxime* | *Enzyme* | $k_r$ *(min$^{-1}$)* | $K_D$ *(µM)* | $k_{r2}$ *(mM$^{-1}$min$^{-1}$)* | *Sources* |
|---|---|---|---|---|---|
| K027 | tabun -*h*AChE | 0,032 | 85 | 0,376 | Čalić 2006 |
| K048 | | 0,074 | 110 | 0,673 | |
| TMB-4 | | 0,15 | 490 | 0,306 | |
| K027 | DFP-*ee*AChE | 0,1050 | 35,5 | 2,96 | Gupta 2014 |
| K048 | | 0,2500 | 275,4 | 0,91 | |
| TMB-4 | | 0,1000 | 10,0 | 10,00 | |
| K027 | paraoxon-*ee*AChE | 0,1000 | 40,0 | 2,50 | |
| K048 | | 0,093 | 38,7 | 2,40 | |
| TMB-4 | | 0,091 | 5,3 | 17,17 | |
| 2-PAM | echothiophate-*h*AChE | 0,3300 | 250 | 1,32 | Pang 2003 |
| Ortho-7 | | 0,1200 | 1,4 | 85,71 | |

***Tableau 24.*** *Constantes cinétiques de réactivation des K024, K048 et Ortho-7 sur les AChEs inhibées par des NOPs*[394,405,406]

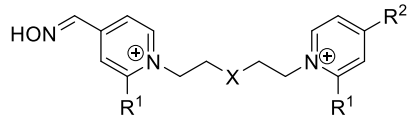
Cependant, *in vivo*, les résultats sont mitigés : l'Ortho-7 réactive aussi bien que la 2-PAM les AChEs des tissus périphériques à des doses 100 fois plus faibles, mais il n'y a pas de réactivation cérébrale.[407] Concernant le K027 et à moindre mesure le K048 (qui possède une toxicité intrinsèque équivalente à celle de l'obidoxime), les études *in vivo* montrent que ces molécules constitueraient une alternative à la 2-PAM pour le traitement des intoxications aux pesticides (Paraoxon, DDVP).[408,409] Testées sur le rat exposé au tabun, ces molécules, en combinaison avec de l'atropine, permettent d'obtenir des activités cholinergiques dans le sang, le diaphragme et le cerveau, équivalentes à celles obtenue lors de l'utilisation du TMB-4.[410] Les ratios de protections ( $PR = \frac{LD_{50}\ (oxime + atropine + tabun)}{LD_{50}\ (tabun)}$) sont supérieurs au TMB-4 pour ces deux molécules en combinaison avec l'atropine.[410] Aucune donnée pour ces oximes en utilisation seule n'est disponible. Enfin, une étude pharmacocinétique du K027 sur des cochons hybrides (*Sus crofora f. domestica*) a démontré que cette oxime, bien que présentant une bonne biodisponibilité, se retrouvait essentiellement dans le sang et les reins. Seul 1% de la concentration plasmique est retrouvée dans le cerveau.[411] Malgré cette faible présence dans le cerveau, les auteurs ont aussi étudié l'effet du K027 sur les récepteurs nicotiniques *in vitro*. L'effet inhibiteur de cette molécule *in vitro* existe mais reste faible en comparaison avec les réactivateurs de références et ceux développés au sein de notre laboratoire (**Chapitre 2-3**).[412] Couplé à une faible présence dans le cerveau, l'effet antagoniste envers les récepteurs nicotiniques est négligeable.

| Réactivateur | Obidoxime | HI-6 | K027 |
|---|---|---|---|
| Inhibition à 200µM | 51 % | 45 % | 31 % |

*Tableau 25. Inhibition de l'activité des recepteurs nicotiniques sur les cellules TE671*

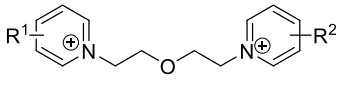
### *IV.1.2.1.2. Bis-pyridiniums aldoximes dont l'espaceur comprenant un hétéroatome*

Comme pour les mono-pyridiniums aldoximes et à l'image du HI-6 et de l'obidoxime, l'introduction d'hétéroatomes dans le lien entre les deux aromatiques a été envisagée afin de favoriser les interactions avec les résidus de la gorge de l'AChE *via* des liaisons hydrogènes. De nombreuses variations ont donc été réalisées (**Figure 74**). [404,413–419]



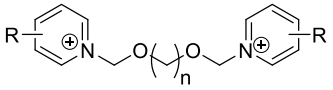
X : -$^{+}$SMe, $SO_2$, O, N-diethyl-4-pyridinium aldoxime
$R^1$ = CH=NOH, H
$R^2$ = CH=NOH, $CONH_2$

***Cabal 2004***



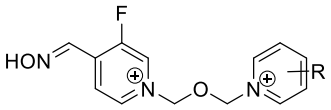
$R^1 = R^2$ = 2,4-CH=NOH
$R^1$ = 4-$CONH_2$, H
$R^2$ = 2,3,4-CH=NOH

***Kim 2006***



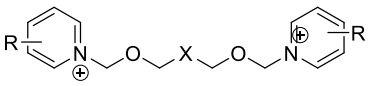
R= 2,3,4-CH=NOH
n = 2-5

***Oh 2006, Yang 2007, Asharya 2008***



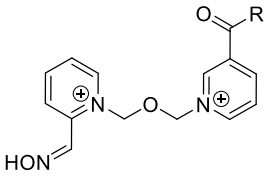
R = F, CH=NOH, $CONH_2$

***Jeong 2009***



R = 2,3,4-CH=NOH
X = Z-but-2-ene, but-2-yne, *m*/*p*-xylene

***Asharya 2009***



R = alkyl

***Worek 2012***

*Figure 74. Structure des bis-pyridiniums aldoximes dont l'espaceur comprend un hétéroatome*

Parmi ces structures étudiées, seuls les K127 et K117 permettent une réactivation des AChEs inhibée au tabun (**Tableau 26**), mais ces réactivateurs n'agissent pas sur un large spectre d'OPs. En effet, contrairement au HI-6, ces molécules ne réactivent pas les AChEs inhibées au cyclosarin.[420]

| *Oxime* | $K_D$ *(µM)* | $k_r$ *(min$^{-1}$)* | $k_{r2}$ *(M$^{-1}$ min$^{-1}$)* |
|---|---|---|---|
| HI-6 | 27 | 0,02 | 741 |
| K117 | 209 | 0,032 | 153 |
| K127 | 41 | 0,037 | 902 |

***Tableau 26.*** *Données de réactivation in vitro des oximes K117 et K127 sur les AChEs issues de cerveau de rat homogénéisé inhibées par le tabun*[420]

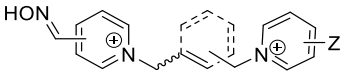
Ces molécules ont été évaluées *in vivo* sur le rat exposé au Tabun (**Tableau 27**). Seul le K127 égale le TMB-4 et surpasse le HI-6. Cependant, la réactivation des AChEs cérébrales reste faible, prouvant que les bis-pyridiniums aldoximes ont un spectre d'action partiel *in vivo*. Le K117 permet une réactivation équivalente au HI-6 mais cette molécule est toxique. Pour un usage en prophylaxie, ces molécules ne sont pas adéquates, leur indice de protection étant relativement faible.

| *Oximes* | *$LD_{50}$ en IM (mg/kg)* | *Indice de protection* | *% réactivation des AChEs* | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | *Sang* | *Diaphragme* | *Cerveau* |
| HI-6 | 781 | 1,08 | 16,2 | 4 | 2,1 |
| TMB-4 | 150 | 2,3 | 33,9 | 14,7 | 9,7 |
| K117 | 11 | 1,1 | 13,4 | 10,6 | 1,3 |
| K127 | 408 | 1,42 | 38 | 6,5 | 1 |

***Tableau 27.*** *Données de réactivation in vivo sur les rat exposés au tabun (traitement oxime + atropine pour les réactivations et les indices de protection)* [421]

### *IV.1.2.1.3. Bis-pyridiniums avec un espaceur rigide*

L'introduction d'un espaceur comprenant des insaturations a été étudié essentiellement par Kuca et Musilek (**Figure 75**). Les objectifs sont, d'une part, de rigidifier la structure de l'oxime afin d'obtenir une conformation favorable lors de l'approche de l'oxime sur la serine phosphylée et, d'autre part, d'augmenter l'affinité du réactivateur pour l'enzyme inhibée *via* des interactions de type cation-π et π-π. Deux séries de molécules ont été synthétisées selon la nature de l'espaceur (alcène ou xylène).




Z = $CONH_2$, CH=NOH, 4'-Me, 4'-Ph, 4'-Bn,
4'-$CH_2OH$, 4'-COOH, 4'-COMe, 4'-COOEt,
4'-CN, 4'-$SCH_2COOH$, 4'-$C(NH_2)$=NOH, H

***Figure 75.*** *Bis-pyridiniums aldoximes rigides synthétisées*[323,422–430]

Concernant les molécules dont l'espaceur comporte un alcène, la réactivation est influencée par la position de l'oxime (la position *para* est la plus efficace), la nature du groupement porté par le second pyridinium (le carbamoyle en *para* augmente l'affinité grâce à une liaison hydrogène avec la serine 298 du site périphérique) et enfin, la configuration de l'alcène (la configuration *E* est la plus favorable). De la même façon, concernant les molécules dont l'espaceur comporte un xylène, l'oxime doit être en position *ortho* ou *para.* La présence d'un groupement carbamoyle sur le deuxième pyridinium permet la même liaison hydrogène que précédemment (son absence provoque la perte de l'activité de réactivation) et le xylène interagit avec les résidus aromatiques de la gorge (*π-staking*). [427]

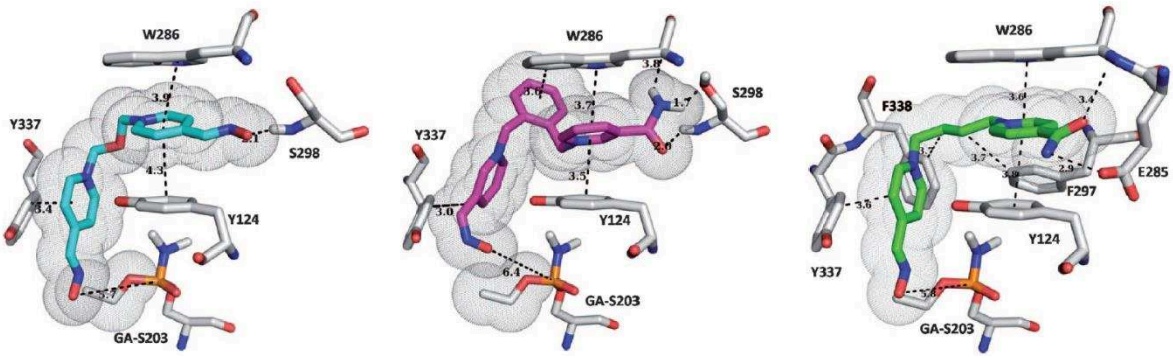



***Figure 76.*** *Etude d'amarrage moléculaire de l'obidoxime (en bleu – à gauche) du K646 (en magenta – au centre) et du K203 (vert – à droite) sur la mAChE inhibée par le tabun (pdb : 2JEZ)*[427]

Parmi l'ensemble des molécules synthétisées, les K203, K646, K107 et K108 sont les plus prometteuses (**Figure 77**). En effet, ces molécules possèdent des capacités de réactivation intéressantes *in vitro*, le K203, le K646 surpassent le HI-6 et le TMB-4 dans les expériences présentées avec les enzymes phosphylées par le tabun, le paraoxon ou le DFP (**Tableau 28**). Cependant dans le cas des K107et K108, les capacités de réactivation sont inférieures à celle du TMB-4 mais supérieures à celle du HI-6.[427]

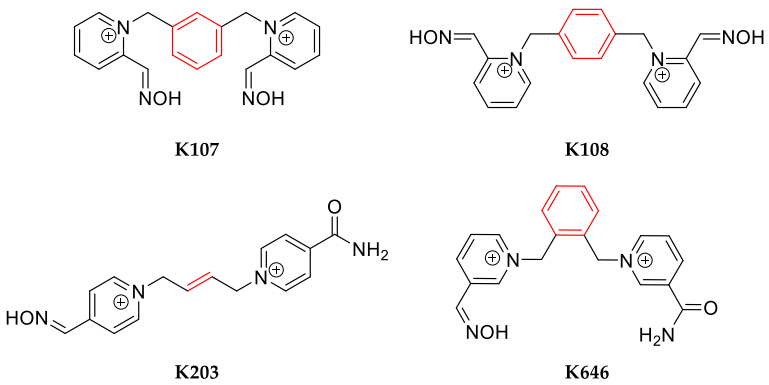



***Figure 77.*** *Structures des composés les plus prometteurs comprenant un espaceur insaturé*

| *Oximes* | *Tabun-hAChE* | *POX-hAChE* | *DFP-hAChE* |
|---|---|---|---|
| HI-6 | 0,90 | 9,60 | -7,00 |
| TMB-4 | -3,80 | 35,70 | 0,2 |
| K107 | -0,60 | 5,20 | 0,20 |
| K108 | -0,80 | 52,40 | -0,80 |
| K203 | 15,90 | 62,50 | 8,80 |
| K646 | 3,9 | 39,3 | 3,6 |

***Tableau 28.*** *Pourcentage de réactivation in vitro des hAchEs inhibées par différent NOPs après traitement aux oximes (15 min, 100µM)*[427]

Les constantes cinétiques de la réactivation au K203 de la *h*AChE empoisonnée par le tabun ont été déterminées *in vitro* (**Tableau 29**). Malgré un $k_r$ équivalent à celui du TMB-4 (0.096 et 0.079 $min^{-1}$ respectivement), l'affinité du K203 envers l'enzyme inhibée est 77 fois plus importante que celle du TMB-4 conduisant à un $k_{r2}$ élevé (16 000 versus 172 $M^{-1}.min^{-1}$ pour le TMB-4).

| *Oximes* | $K_D$ *(µM)* | $k_r$ *(min$^{-1}$)* | $k_{r2}$ *(M$^{-1}$ min$^{-1}$)* |
|---|---|---|---|
| HI-6 | 6 | 0.007 | 1 111 |
| TMB-4 | 460 | 0.079 | 172 |
| K203 | 6 | 0.096 | 16 000 |

***Tableau 29.*** *Constantes cinétiques de réactivation in vitro de la hAChE inhibée par le tabun.*[431]

L'efficacité du K203 a été évaluée *in vivo* sur le rat. Cette molécule a un effet important sur l'activité des cholinestérases du plasma mais aucune sur celles du cerveau (**Figure 78**).[432] Cette faible activité cholinergique dans le cerveau est attendue du fait que le K203 passe très faiblement la BHE. En effet, seule 1% de la concentration plasmique est présente dans le cerveau.[411]

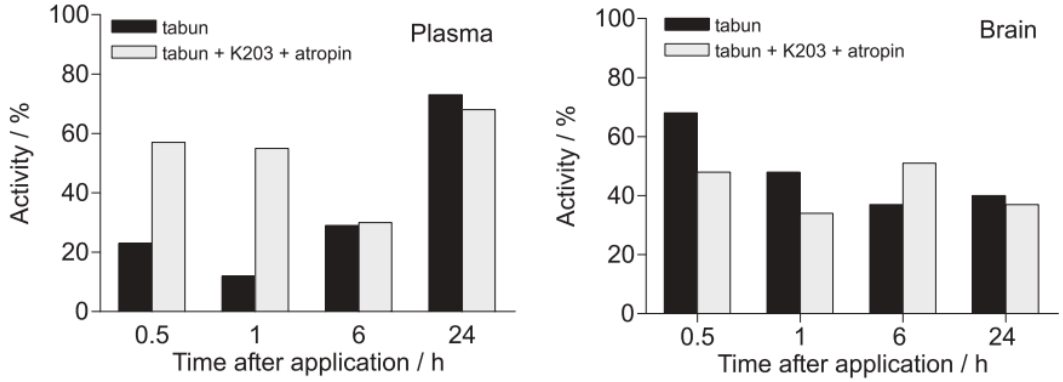



***Figure 78.*** *Effet du K203 (i.p., ¼ $LD_{50}$ + 10 mg/kg d'atropine) sur l'activité des cholinestérases dans le plasma et le cerveau de rat après exposition au tabun (sous-cutanée, ¾ $LD_{50}$)*[432]

Les $LD_{50}$ ont été déterminées sur la souris. Malheureusement, ces molécules présentent une toxicité intrinsèque très élevée, freinant toute application sur l'Homme (**Tableau 30**).[427]

| *Oximes* | TMB-4 | K107 | K108 | K203 | K646 |
|---|---|---|---|---|---|
| ***$LD_{50}$ souris (mg/kg)*** | 150,5 | 6,6 | 2,2 | 95 | 100,3 |

***Tableau 30.*** *Dose létale des oximes sur le souris (IM).*[427]

### IV.1.2.2. Bis-pyridiniums céto-oximes

Les α oxo-oximes, bien que développées également comme réactivateurs non chargés (cf IV.2.2), ont été incorporées également dans des bis-pyridinums. Treize structures ont été rapportées dans la littérature (**Figure 79**).[433,434]

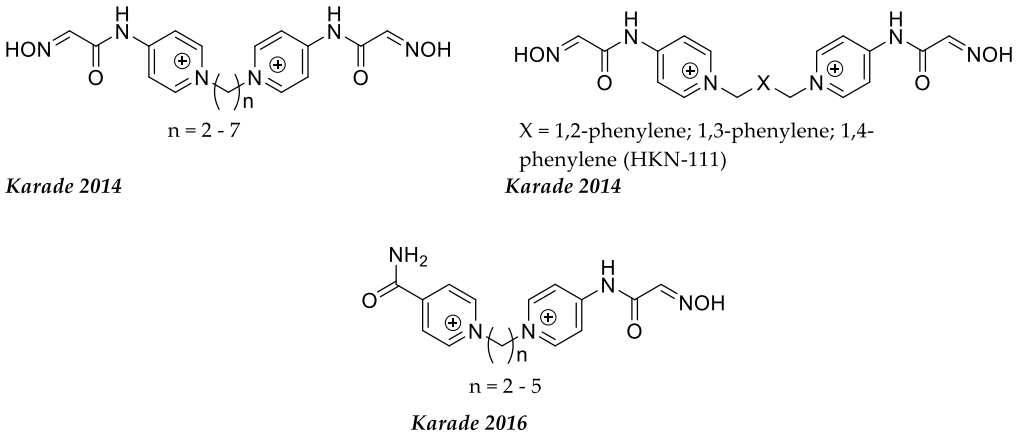



***Figure 79.*** *Structure des réactivateurs développés par Karade et coll.*

Le HKN-111 est plus efficace que l'obidoxime lors de la réactivation de la *h*AChE inhibée par le sarin grâce à sa très bonne affinité pouir l'enzyme phosphylée ($K_D$ = 17.46 µM vs 21.86 pour l'obidoxime). Cette molécule a donc été testée *in vivo* sur la souris. Sa toxicité élevée ($LD_{50}$ =35.35 mg/kg *vs* 180 pour la 2-PAM – IM), ses faibles capacités de réactivation des AChEs présentes dans le sérum (et aucune réactivation dans le cerveau) et *in fine* son absence d'effet protecteur font que cette molécule ne peut être utilisée en contre-mesure médicale.[435,436]

### IV.1.2.3. Autres réactivateurs bis-chargés

D'autres fonctions réactivatrices chargées ont été envisagées comme les bis-imidazoliums, ainsi que les hétérodimères pyridinium-pyridazinium, pyridinium-imidazolium, pyridinium-quinolinium et pyridinium-quinuclidinium (**Figure 80**).[389,437–440] Cependant, peu de données de réactivation ont été rapportées, ceci étant probablement dû à leur faible activité réactivatrice sur les AChEs inhibées ; elles ne seront donc pas développées plus avant dans ce manuscrit.

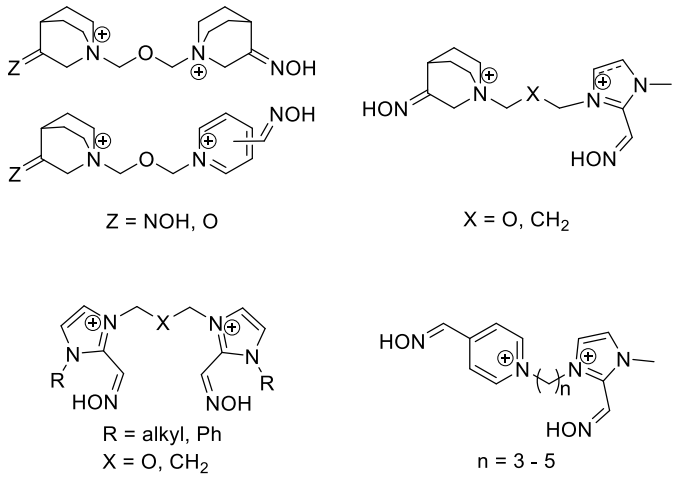



***Figure 80.*** *Exemples de fonctions réactivatrices bis-chargées autre que des bis-pyridiniums rapportés dans la littérature*

Plus anecdotique, des complexes métalliques de bispyridiniums aldoximes ont également été étudiés en tant que réactivateur (**Figure 81**). L'utilisation de ces complexes métalliques permettrait de potentialiser la réactivation en bloquant l'oxime sous sa forme oximate ou en diminuant le p*K*a de l'oxime (*via* l'utilisation d'un acide de Lewis). Deux exemples d'élaboration et d'évaluation *in vitro* de ces complexes sont rapportés dans la littérature.[441,442] Dans le cas du complexe de palladium-obidoxime (**Figure 81**), celui-ci est instable et sa capacité à réactiver est beaucoup plus faible que l'obidoxime native. De la même façon, les complexes de zinc réactivent faiblement l'AChE du fait d'interaction défavorables entre le métal et le site anionique de l'enzyme. Ces interactions fortes empêchent l'approche de l'oximate vers l'adduit serine phosphylé. Bien que très anecdotiques, ces exemples permettent de mettre l'emphase sur l'influence du p*K*a de l'oxime dans l'efficacité de réactivation.

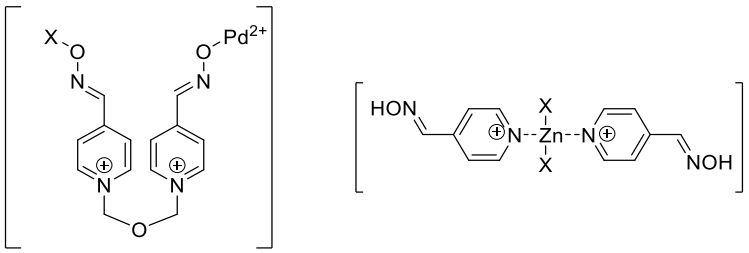



***Figure 81.*** *Complexes métalliques de bis-pyridiniums aldoximes*

### IV.1.3. Vectorisation des réactivateurs chargés

Leur faible capacité de passer la BHE est un des inconvénients principaux des oximes chargées. Diverses stratégies ont donc été envisagées pour contourner ce problème, comme l'utilisation d'une prodrogue de la 2-PAM que nous avons déjà présentée (**IV.1.1.1.4**).

#### IV.1.3.1. Nanoparticules

La première stratégie consiste à encapsuler une oxime dans divers types de nanoparticules (silice mésoporeuse, nanoparticules lipidiques, protéiques…) afin de relarguer cette dernière dans le SNC. Le mécanisme du passage de la BHE de ces nanoparticules n'est pas clairement établi, mais leur utilisation a un effet positif sur l'activité des ChEs cérébrales. Cette approche a été validée pour la 2-PAM (*in vivo* – **Figure 82**) ainsi que le HI-6. Cependant, la réactivation dépend de la nature de l'oxime, de celle des nanoparticules, et l'absence d'un réactivateur universel (chargé ou non) ne permet pas de pleinement tirer parti cette technologie.[355,356,443,444] Etonnamment, aucune des oximes nouvellement développées n'a fait l'objet d'une telle étude.

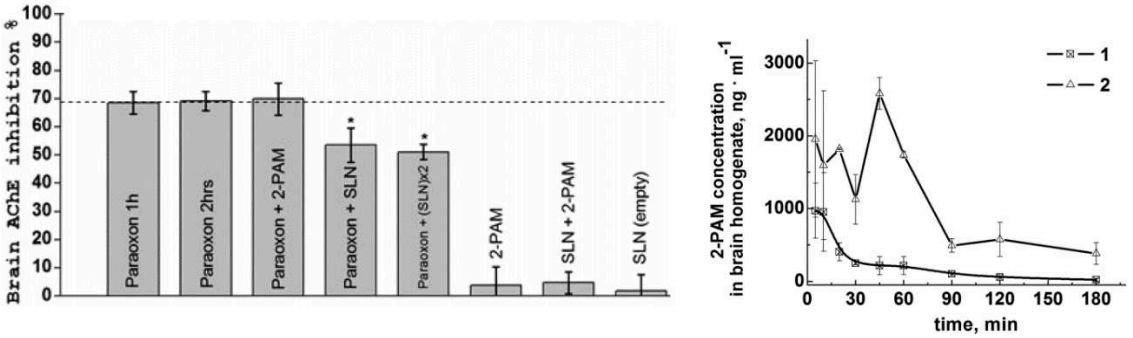



*Figure 82. A gauche, pourcentage d'AChE inhibées du SNC sur le rat exposé au paraoxon (0.8 $LD_{50}$, ip) et traités au 2-PAM libre (IV, 5 mg/kg) ou encapsulé dans une nanopartricule lipidique, (SLN dans la figure, IV, 5 ou 10 mg/kg) – à droite, évolution de la concentration de la 2-PAM dans le cerveau de rat (1 = libre ; 2 = encapsulée)*[356]

### IV.1.3.2. Bio-conjugaisons

Cette deuxième approche consiste en l'association d'un motif glucose et d'un pyridinium aldoxime (**Figure 83**) afin de traverser la BHE *via* les transporteurs de glucose (en particulier les transporteurs GLUTs, connus pour faciliter le transport intracellulaire du glucose).

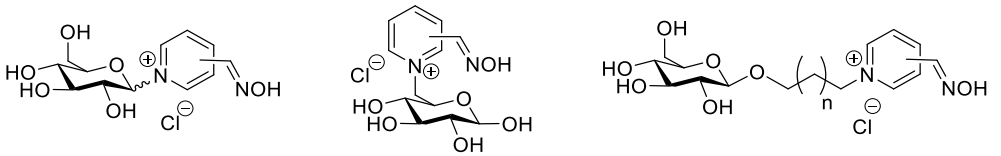



*Figure 83. Structures de conjugués pyridinium aldoxime – glucose rapportées dans la littérature*[445]

L'efficacité de réactivation *in vitro* de ces conjugués est équivalente voire inférieure à celle de la 2-PAM. L'ajout de l'adduit glucose diminue l'affinité pour l'enzyme inhibée et la vitesse de réactivation dépend de l'OPs utilisé (**Tableau 31**).[445,446] De plus, l'étude *in vitro* du passage de la BHE du conjugué montre une cinétique de passage lente au travers un modèle de la BHE (cellules MDR1-MDCK exprimant l'ensemble des récepteurs GLUTs).[446] L'absence de données *in vivo* est probablement liée à ces deux limitations soulevées.

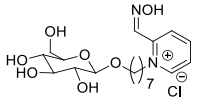
| *NOP* / *Oximes* | *VX* | | | *Sarin* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *$K_D$ (µM)* | *$k_r$ (min$^{-1}$)* | *$k_{r2}$ (mM$^{-1}$ min$^{-1}$)* | *$K_D$ (µM)* | *$k_r$ (min$^{-1}$)* | *$k_{r2}$ (mM$^{-1}$ min$^{-1}$)* |
| 2-PAM | 28.67 | 0.116 | 4.060 | 23.59 | 0.131 | 5.556 |
|  | 15.08 | 0.101 | 6.680 | 15.45 | 0.056 | 3.637 |

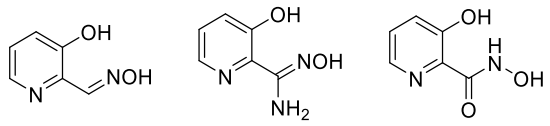
*Tableau 31. Constantes cinétiques de réactivation du VX- et sarin-hAChE par un conjugué sucre-pyridinium aldoxime.*[446]

## IV.2. Vers un passage passif de la BHE : développement de fonctions réactivatrices non-chargées

Certains auteurs considèrent l'utilisation de pyridinium aldoximes comme une condition *sine qua none* d'une réactivation efficace, malgré les limites évidentes que présente la présence des charges. Bien heureusement, plusieurs équipes de recherche ont su sortir de ce dogme et développer des réactivateurs non-chargés innovants dans le but de traverser la BHE.

### IV.2.1. Les pyridines aldoximes et leurs analogues

La stratégie consistant à ôter la charge permanente de la 2-PAM pour faciliter son passage de la BHE, a été reportée initialement par notre groupe de recherche en collaboration avec les équipes du Dr Rachid Baati (Université de Strasbourg), du Dr Florian Nachon (IRBA) et du Dr Martin Weik (IBS, Grenoble). La première étape, consistait à trouver une oxime non chargée ayant la même nucléophilie en condition physiologique que la 2-PAM. Dans le cadre d'un projet ANR (detox-neuro 2006-2011), dont le but était de tester plusieurs stratégies d'obtention de bio-scavengers des OP, notre consortium cherchait à greffer sur une plateforme biocompatible présentant une affinité pour les OP, et en particulier les agents V (anticorps monoclonaux, cyclodextrines ou polymères imprimés), un nucléophile capable d'hydrolyser ces neurotoxiques. Un screening *in vitro* de plus de 60 structures différentes[34,447] pour leur activité thio-phosphatase a permis d'identifier trois fonctions prometteuses (**Figure 84**), non chargées, qui ont alors été évaluées pour leur activité réactivatrice sur l'AChE phosphylée.




Pyridine aldoxime **PYR-1** | Amidoxime **PYR-2** | Acide hydroxamique **PYR-3**

***Figure 84.*** *Fonctions réactivatrices non-chargées identifiées par le laboratoire*

Les constantes cinétiques de réactivation des molécules PYR-1 et 2 ont été déterminée sur l'*h*AChE inhibée par le VX et comparées à celle de la 2-PAM (**Tableau 32**). Malgré un manque d'affinité flagrant dû à l'absence de charge permanente, les vitesses de réactivation $k_r$ se sont révélées très nettement supérieures à celle de la 2-PAM.

| Oximes | *pKa* | $K_D$ *(µM)* | $k_r$ *(min$^{-1}$)* | $k_{r2}$ *(mM$^{-1}$ min$^{-1}$)* |
|---|---|---|---|---|
| 2-PAM | 7,85 | 0,06 ± 0,01 | 215 ± 75 | 0,3 |
| A | 8,2 | 0,5 ± 0,1 | 30 000 ± 10 000 | 0,016 |
| B | 7,96 | 0,08 ± 0,1 | 30 000 ± 20 000 | 0,0026 |

***Tableau 32.*** *Constante de réactivation in vitro de la 3-hydroxypyridine 2-aldoxime et 2-amidoxime sur VX-hAChE*

La présence de la fonction phénol en *ortho* de l'oxime permet, d'une part, d'exacerber la nucléophilie de l'oxime tout en lui conférant un p*K*a proche de 8 (supérieur à celui de la pyridine aldoxime, et comparable à celui du pyridinum aldoxime) ; d'autre part, de limiter le phénomène de recapture *via* une cyclisation intramoléculaire rapide de la phosphyloxime (*vide infra* – **Figure 85**), déjà observée par le groupe de Rebek dans le cadre du développement d'un biocapteur pro-fluorescent des OP.[448,449] Compte tenu de son moindre encombrement stérique au niveau de la fonction nucléophile, et de son efficacité supérieure, la 3-hydroxy 2-pyridine aldoxime a été sélectionnée pour le développement de nouveaux réactivateurs.

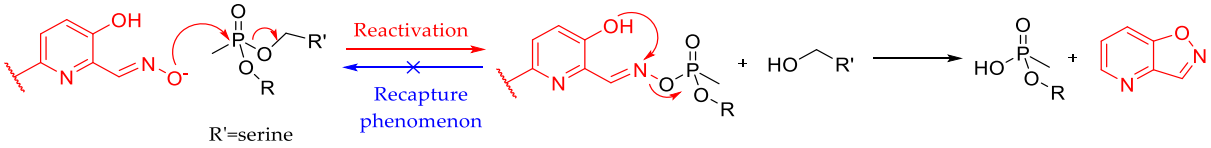
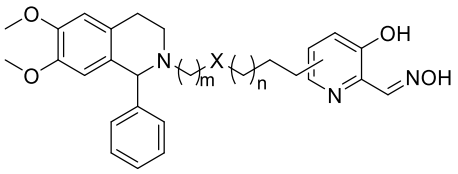


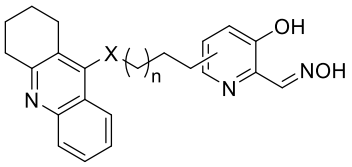

***Figure 85.*** *La 3-hydroxypyridinium aldoxime, une fonction limitant le phénomène de recapture*

La stratégie que le consortium a suivie, consistait à augmenter l'affinité de cette oxime non chargée pour l'enzyme phosphylée en lui greffant un ligand du site périphérique de l'enzyme en diverses positions de la pyridine, et avec diverses longueurs de bras espaceurs, l'ensemble étant guidé par des études d'amarrage moléculaire (*docking*) des réactivateurs potentiels dans le site de liaison de l'enzyme phosphylée, et, le cas échéant, par la résolution des structures *via* des clichés de diffraction des rayons X des complexes enzyme-réactivateurs. L'incorporation de différents ligands du site périphérique comme la PhenyltetrahydroIsoQuinoléine (PIQ), des analogue du Donépezil (inhibiteur de l'AChE), de la tacrine (inhibiteur de l'AChE) ou la tryptoline, a permis le développement de plus d'une trentaine de réactivateurs non-chargés (**Figure 86**).[35–40]



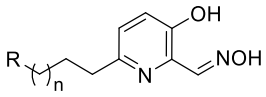
m = 0, 2 ; n = 0 - 3 ; X =$CH_2$, O

***Mercey 2011, 2012***



n = 5, X = NH, S

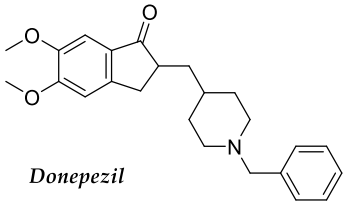
***Kliachyna 2014***



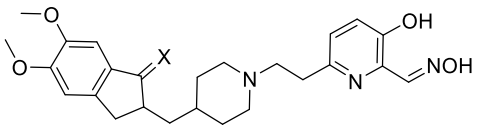
n = 1 - 3

R = triptoline, -N(2-Py)$_2$; NMe(CHPh$_2$), phtalimide, indole

***Renou 2013, 2014***

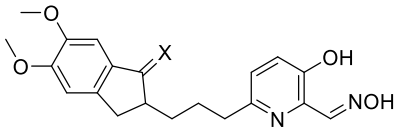


*Donepezil*



X = O, $H_2$

***Renou 2016***

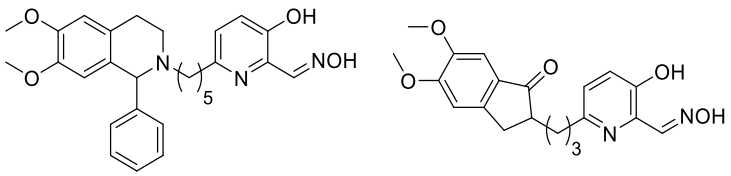


X = O, $H_2$

***Renou 2016***

***Figure 86.*** *Structures des réactivateurs tripartites élaborés à partir de la 3-hydroxypyridine aldoxime*

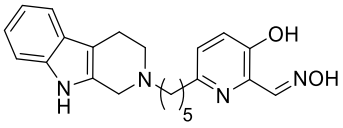
Parmi ces molécules, certaines sont plus efficaces *in vitro* que les réactivateurs de référence, et présentent un spectre d'activité plus large. La structure des « leads » est développée dans la **Figure 87** et les capacités de réactivation sont résumées dans le **Tableau 33**. L'ajout d'un ligand du site périphérique associé à notre fonction réactivatrice *via* un espaceur de longueur adéquate (4-5 atomes), greffé en position 6 de la 3-hydroxypyridinaldoxime permet une nette amélioration des capacités de réactivation de la 3-hydroxypyridinine aldoxime seule.



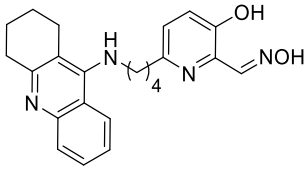
**PYR-4**
**(GM113)**



**PYR-5**



**PYR-6**



**RB-1**

***Figure 87.*** *Structure détaillée des têtes de série développées par l'équipe du Pr Renard et du Dr Baati*

| ***NOPs*** | ***VX*** | | | ***Tabun*** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Oxime*** | $k_r$ ($min^{-1}$) | $K_D$ ($\mu M$) | $k_{r2}$ ($mM^{-1}\ min^{-1}$) | $k_r$ ($min^{-1}$) | $K_D$ ($\mu M$) | $k_{r2}$ ($mM^{-1}\ min^{-1}$) |
| 2-PAM | 0.06 | 215 | 0.28 | 0.01 | 706 | 0.01 |
| HLü-6 | 0.60 | 54 | 11 | 0.040 | 250 | 0.16 |
| HLö-7 | 0.49 | 7.8 | 63 | 0.020 | 106 | 0.19 |
| HI-6 | 0.44 | 50 | 9 | Ø | Ø | Ø |
| TMB-4 | - | - | - | 0.085 | 145 | 0.6 |
| **PYR-4** | 0.44 | 17.3 | **25.5** | 0.015 | 5.6 | **2.7** |
| **PYR-5** | >0.14 | >50 | 2.7 | - | - | - |
| **PYR-6** | 1.1 | 125 | 9 | 0.06- | 180- | 0.3- |
| **RB-1** | 0.72 | 31 | 22 | 0.021 | 7.1 | 3 |

***Tableau 33.*** *Constantes cinétiques in vitro des leads développés par le consortium sur l'hAChE inhibée par le VX et le Tabun.*[35–40]

Les dérivés **PYR-4**, **PYR-6** et **RB-1** sont les plus prometteurs, cependant les dérivés de tacrine tels que **RB-1** présentent une inhibition importante de l'enzyme non-phosphylée. Pour les molécules de la famille des tryptolines, si elles sont intéressantes car capables de réactiver à la fois l'AChE et la BChE phosphylée, leur potentiel semble inférieur aux dérivés de PIQ. La molécule **PYR-4** (GM113) a été testée *in vivo* sur les souris empoisonnées par le VX par le Dr Guilhem Calas à l'IRBA.[53] Les données pharmacologiques sont présentées dans le **Tableau 34**. Les temps de résidences moyens sont compris entre 30 et 50 minutes, suggérant que les vitesses de diffusion ainsi que la clairance sont du même ordre de grandeur pour le GM113, le HI-6 et la 2-PAM. Le pourcentage de réactivation du GM113 est inférieur à ceux obtenus pour les références dans le cas d'une injection massique identique. Cependant, lorsque les concentrations molaires injectées sont équivalentes, le pourcentage de réactivation du GM113 et de la 2-PAM sont similaires. Le $T_{max}$ du GM113 est 2 fois plus élevé que celui des références, illustrant une entrée dans le compartiment sanguin plus lente dans le cas du GM-113. Enfin, l'indice de protection obtenu lors de l'exposition des souris au VX est inférieur à ceux des références. Ces données nous ont permis de conclure que la faible hydrosolubilité du GM113 compromet sa biodisponibilité et donc ses capacités réactivatrices *in vivo*. Deux des molécules lead possèdent une amine tertiaire directement greffée au niveau du bras de liaison, des données de docking suggèrent que cette amine, protonée à pH

physiologique, intervient dans des interactions cation-π avec les résidus du site périphérique de l'enzyme. Sachant que le potentiel de réactivation *in vivo* est un compromis subtil entre vitesse de réactivation, affinité pour l'enzyme phosphylée (qui doit être supérieur à celle pour l'enzyme native), biodisponibilité, et toxicité du réactivateur, les efforts actuels du consortium se portent sur la synthèse de dérivés de la 3-hydroxypyridine aldoxime portant une amine tertiaire comme ligand du site périphérique, ou des anilines plus simples que la tacrine, afin de moduler les propriétés pharmacocinétiques. Les dérivés de la tacrine sont synthétisés par l'équipe du Dr Rachid Baati à Strasbourg, les amines tertiaires par l'équipe rouennaise. Cette stratégie fait l'objet de mon travail de thèse, et sera présentée plus en détail dans le **Chapitre 2 et 3**.

| *Oxime* | *Dose en mg/kg (en µmol /kg)* | *PI (VX)* | *% React max* | *MRT (min)* | *$T_{max}$ (min)* |
|---|---|---|---|---|---|
| HI-6 | 50 (139) | 3.5 | 108* | 49 | 7.5 |
| 2-PAM | 50 (364.5) | 1.3 | 59.5 | 31.5 | 6.5 |
| **GM113 (PYR-4)** | **50 (105)** | **1.1** | **23** | **49** | **16.5** |
| HI-6 | 35.9 (100) | - | 118* | 45 | 6 |
| 2-PAM | 13.7 (100) | - | 26 | 24 | 3 |

***Tableau 34.*** *Pharmacocinétique du GM113 sur la souris (PI : indice de protection ; MRT : temps de résidence moyen, *concentration saturante)*

D'autres équipes ont choisi de travailler sur des oximes non chargées pour faciliter le passage de la BHE. Timperley et coll ont également travaillé sur la pyridine aldoxime en incorporant un ou plusieurs atomes de fluor sur le noyau pyridine avec, comme objectif de diminuer le p*K*a de l'oxime (**Figure 88**).[450] Cette stratégie n'a pas été couronnée de succès, le p*K*a n'ayant été diminué que d'une unité. De plus, comme illustré sur nos molécules, il est nécessaire d'adjoindre à ces fonctions réactivatrices un ligand du site périphérique, l'efficacité globale des réactivateurs dépendant tout autant de l'affinité que de la vitesse de réactivation.

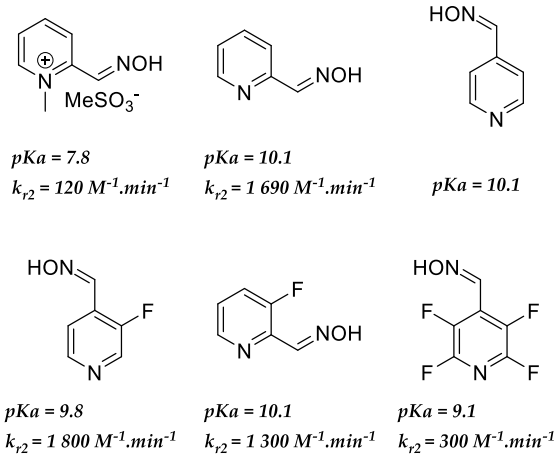
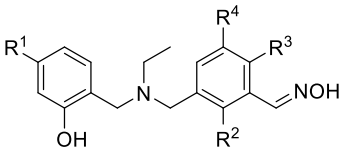



***Figure 88.*** *Pyridines aldoximes fluorées et efficacité d'hydrolyse in vitro de l'AChE empoisonnée par le sarin.*

La simplification des hydroxypyridine aldoxime en phenylaldoxime, déjà identifié par notre laboratoire comme fonction réactivatrice potentielle, bien que moins efficace que la pyridine correspondante (p*K*a

= 9.3),[34] mais plus facile d'accès synthétique, a été repris par Wei et coll (**Figure 89**).[451] Cependant, ces molécules ont des pourcentages de réactivation certes supérieurs à la 2-PAM, mais très inférieure au HI-6. Cela peut être expliqué par les p*K*a d'une part, et d'autre part, la phenylaldoxime est reliée à un aromatique *via* un bras espaceur très court, ne permettant pas une position optimale de l'oxime dans le site catalytique.

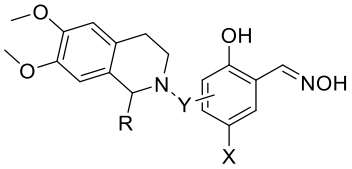



$R^1$ = H, OH, OMe $R^3$ = OH, H
$R^2$ = H, OH $R^1$ = H, Me

***Wei 2016***

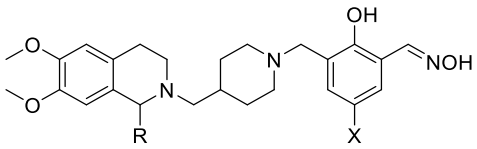
***Figure 89.*** *Structures rapportées par Wei et coll en 2016*

Face à ce résultat, le concept de réactivateur tripartite (nucléophile – bras de liaison – ligand du site périphérique) ainsi que les ligands utilisés au sein de nos réactivateurs ont été repris par Wei et coll (**Figure 90**).[452] En effet, la 2-hydroxyphenylaldoxime a été couplée à des tétrahydroquinoléines *via* des espaceurs mimant une partie de la structure du Donepezil, dérivé connu pour interagir avec les dérivés de la gorge de l'enzyme. Vingt-quatre structures sont rapportées, seules les plus efficaces de cette étude seront présentées ici.




R = H, Ph
Y = Me, piperidine-1,4-dimethyl
X = H, Me, OMe, Cl, Br, F

***Wei 2017***




Wei-4c, R = H; X = Cl
Wei-5c, R = H; X = Br
Wei-6c, R = H; X = F

***Figure 90.*** *Structures rapportées par Wei et coll en 2017*

Il est à noter que les données de réactivation des molécules ne portant pas d'halogène au niveau de la fonction réactivatrice ne sont pas indiquées dans cette publication, a priori, ceci est probablement dû à des capacités réactivatrices très faibles liées à des valeurs de p*K*a trop élevées pour l'oxime, limitant sa nucléophilie. Le remplacement de la pyridine par un phényle a un effet direct négatif sur l'efficacité globale de ces molécules notamment au niveau de la constante de vitesse $k_r$ (**Tableau 35**). Aussi, la présence du fluor sur le phényle - bien qu'augmentant la constante $k_r$ en comparaison avec la version bromée ou chlorée – provoque en revanche une diminution drastique de l'affinité. Ces molécules, bien que combinant les différents axes de nos recherches, sont moins efficaces que celles que nous avons décrites, la présence d'une pyridine semble donc nécessaire dans cette stratégie. En outre, la

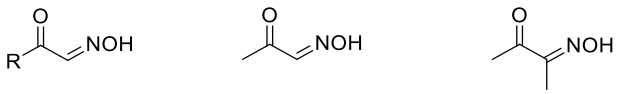
biodisponibilité *in vivo* de nos réactivateurs étant faible, l'absence de la pyridine rend ces molécules encore plus hydrophobes, compromettant a priori toute application *in vivo*.

| *NOPs* | *VX* | | | *Tabun* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Oxime*** | $k_r$ ***(min$^{-1}$)*** | $K_D$ ***(µM)*** | $k_{r2}$ ***(mM$^{-1}$ min$^{-1}$)*** | $k_r$ ***(min$^{-1}$)*** | $K_D$ ***(µM)*** | $k_{r2}$ ***(mM$^{-1}$ min$^{-1}$)*** |
| 2-PAM | 0.06 | 215 | 0.28 | 0.01 | 706 | 0.01 |
| HLü-6 | 0.60 | 54 | 11 | 0.040 | 250 | 0.16 |
| HI-6 | 0.44 | 50 | 9 | Ø | Ø | Ø |
| **D** | 0.44 | 17.3 | **25.5** | 0.015 | 5.6 | **2.7** |
| **Wei-4c** | - | - | 7.19 | 0.0034 | 8.9 | 0.382 |
| **Wei-5c** | - | - | 5.20 | 0.0029 | 7.2 | 0.412 |
| **Wei-6c** | - | - | 6.18 | 0.0052 | 53 | 0.098 |

***Tableau 35.*** *Constantes cinétiques des réactivateurs de Wei in vitro sur l'hAChE inhibée par le VX et le Tabun* [36,452]

### IV.2.2. Les α-oxo-oximes et leurs analogues

Dès 1955, les α-oxo-oximes sont rapportées dans la littérature comme des candidats réactivateurs potentiels. La présence du carbonyle permet d'exacerber la nucléophilie de l'oxime. Les deux premiers exemples de cette classe de réactivateurs sont la MINA (monoisonitrosoacetone) et le DAM (diacetylmonooxime - **Figure 91**).[33,52]




*a-oxo-oxime* *MINA* *DAM*

***Figure 91.*** *Structure générale des α-oxo-oximes (R = alkyle ou aryle) ainsi que les deux premiers exemples décrits*

La MINA (monoisonitrosoacetone) a été étudiée *in vitro* et *in vivo*.[453–455] Cette molécule présente une faible affinité envers l'enzyme inhibée comparée à la 2-PAM, l'efficacité est donc plus faible (**Tableau 36**). Malgré une réactivation faible, cette molécule est capable de traverser la BHE et de réactiver les AChEs du SNC. Cependant, les doses nécessaires sont trop élevées pour envisager une quelconque application sur l'Homme en prophylaxie comme en traitement d'urgence.

| **Agent** | $K_D$ **(µM)** | $k_r$ **(min$^{-1}$)** | $k_{r2}$ **(mM$^{-1}$ min$^{-1}$)** |
|---|---|---|---|
| VX | 6000 | 0,49 | 0,08 |
| Sarin | >> 5000 | >> 0,15 | 0,029 |
| Tabun | >> 5000 | >> 0,0006 | 0,0001. $10^{-6}$ |
| Paraoxon | >> 5000 | >> 0,05 | 0,01 |

***Tableau 36.*** *Constante de réactivation in vitro du MINA sur les hAChEs empoisonnées.*[453]

Ce motif a, ensuite, été modifié *via* l'incorporation de motifs soufrés.[456] Bien que les vitesses de réactivation soient améliorées, la faible affinité pour l'enzyme phosphylée diminue l'efficacité globale de ces réactivateurs en comparaison avec les pyridiniums aldoximes (**Tableau 37**).

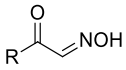
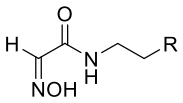
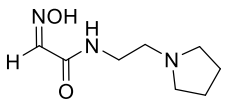
| Structure | R | pKa | Log P | VX | Sarin | Paraoxon |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | $k_{r2}$ ($M^{-1}$ $min^{-1}$) | $k_{r2}$ ($M^{-1}$ $min^{-1}$) | $k_{r2}$ ($M^{-1}$ $min^{-1}$) |
|  | H, MINA | 8.30 | 0.34 | 73.9 | 132.2 | 75.5 |
| | $CH_2$-SMe | 8.16 | 1.21 | 192.7 | 160 | 162.1 |
| | $CH_2$-S(O)Me | 7.74 | -1.02 | 56.4 | 83.1 | 49.9 |
| | $CH_2$-$SO_2$Me | 7.46 | -0.84 | 68.1 | 50.4 | 65 |
| | $CH_2$-$^+$$SMe_2$ | 6.54 | < -2 | 33.9 | 26.3 | 152.1 |

***Tableau 37.*** *Constantes cinétiques de réactivation in vitro des analogues soufrés de la MINA sur les eeAChEs inhibées par les NOPs ($k_{r2}$ exprimé sous l'appellation $k_2$).*[456]

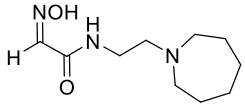
Le concept de ces α-oxo-oximes non-chargées a été repris par Radić, mais sur des α-amido aldoximes, plus faciles à synthétiser, mais pour lesquelles la nucléophilie et le pKa de l'oxime sont moins favorables, cette fonction amide diminuant la nucléophilie de l'oxime. Ces α-amido oximes ont été, entre autres, liées à une amine tertiaire protonable en milieu physiologique, qui permettrait de présenter des interactions cation-π avec le site périphérique de l'enzyme. Plus de 200 molécules ont été synthétisées, la structure générale ainsi que les deux molécules les plus efficaces sont décrites dans la **Figure 92**.



R = cyclic amine, aniline, heterocyle



**RS41A**



**RS194B**

***Figure 92.*** *Réactivateurs synthétisés par Radić et coll.*

Ces deux molécules ont fait l'objet d'études *in vitro* approfondies.[457–459] Les constantes cinétiques sont listées dans le **Tableau 38**. L'efficacité globale de ces molécules est supérieure à celle de la MINA cependant elles manquent d'affinité, ce qui les rend moins efficaces que la 2-PAM et le MMB-4.

| Oximes | Paraoxon | | | Sarin | | | Cyclosarin | | | VX | | | Tabun | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $k_r$ | $K_D$ | $k_{r2}$ | $k_r$ | $K_D$ | $k_{r2}$ | $k_r$ | $K_D$ | $k_{r2}$ | $k_r$ | $K_D$ | $k_{r2}$ | $k_r$ | $K_D$ | $k_{r2}$ |
| RS194B | 0.38 | 7.4 | 51 | 2.5 | 1.9 | 1300 | 0.88 | 3.9 | 230 | 3.1 | 2.1 | 1600 | $1.8.10^{-3}$ | 1.8 | 1.0 |
| RS41A | 0.15 | 4.3 | 35 | 3.7 | 11 | 340 | 1.9 | 21 | 90 | 3.1 | 4.6 | 670 | $8.2.10^{-4}$ | 3.6 | 0.22 |
| MINA | > 0.20 | > 20 | 8.4 | 1.6 | 14 | 120 | 1.2 | 16 | 75 | > 0.7 | > 6.0 | 110 | - | - | 0.039 |
| 2-PAM | 0.27 | 1.8 | 150 | 1.1 | 0.34 | 3200 | 0.73 | 6.6 | 110 | 0.65 | 0.25 | 2600 | $5.8.10^{-3}$ | 1.5 | 3.8 |
| MMB-4 | 0.70 | 1.5 | 470 | 4.0 | 0.82 | 4900 | 8.2 | 2.5 | 3500 | 3.4 | 1.3 | 2600 | Nd | Nd | Nd |

***Tableau 38.*** *Capacités de réactivation in vitro des RS41A, RS194B et des molécules de référence sur l'hAChE empoisonnée par différents NOPs ($k_r$ exprimé en $min^{-1}$, $K_D$ en mM et $k_{r2}$ en $M^{-1}min^{-1}$).*[458]

L'efficacité protectrice du RS194B a été évaluée *in vivo* post intoxication, mais aussi en prétraitement sur la souris. Les indices de protection sont élevés, illustrant l'intérêt de ce type de structure (**Tableau 39**).

| *Traitement* | *VX* | *Sarin* | *POX* | *Soman* | *Tabun* |
|---|---|---|---|---|---|
| Thérapie : RS194B (125 mg/kg) + atropine 1 min après exposition | 18 | 10 | 9.4 | 1.8 | 1.5 |
| Prétraitement : 125 mg/kg 15 minute avant l'exposition | 45 | 4.5 | 22 | 2.8 | 2.0 |

***Tableau 39.*** *Indices de protection obtenus sur les souris exposées à différents NOPs (injection sous-cutané) et traitées par le RS194B (injection IM).* [458]

La pharmacocinétique ainsi que la biodistribution du RS194B ont été étudiées sur le *guinea pig*.[460] Malgré une rapide distribution ($t_{½\ absorption} \approx 1$ h) et une élimination lente ($t_{½\ élimination} \approx 10$ h), le RS194B s'accumule essentiellement dans le foie et les reins. La quantité présente dans le cerveau est environ 0.2 % de la dose injectée et RS194B ne s'y accumule pas. Cette faible perméabilité à la BHE est aussi illustrée lors des tests PAMPA, et sur des cultures de cellules humaines (cellules endothéliales et MDR1-MDCK). Cette molécule n'est donc pas adéquate pour la réactivation dans le SNC. Enfin, le RS194B a été testé *in vitro* (globule rouge-*Ma*AChE) et *in vivo* sur le macaque exposé au sarin.[461] Malgré l'absence de données de réactivation dans le SNC, le RS194B permettrait de limiter les symptômes de la phase cholinergique aigüe.

Afin d'augmenter l'affinité de ce type de réactivateur pour l'enzyme, De Koning a élaboré des céto-oximes non-chargées incorporant un ligand du site périphérique (**Figure 93**).[462] Ces molécules sont bien moins efficaces que les molécules de références. Cependant, la simulation de dynamique et d'amarrage moléculaire effectuée sur ces structures mettent en évidence l'importance de la présence du ligand lors de la réactivation : ce ligand permet *via* les interactions avec les résidus aromatiques du site périphérique une stabilisation et un positionnement favorable de la molécule directement corrélés aux capacités de réactivation *in vitro*.[463]

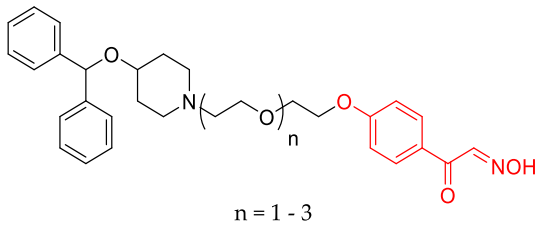
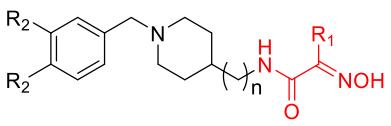
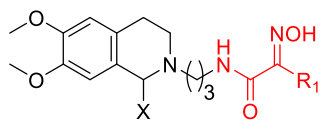



***Figure 93.*** *Structure des céto-oximes neutres synthétisées par De Koning.*

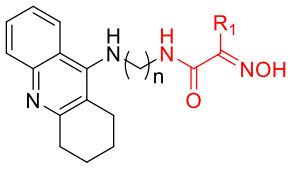
Sur ce même principe, en s'inspirant des ligands utilisés par notre équipe,[35–40] McHardy et coll ont rapporté la synthèse de différents réactivateurs présentant un $\alpha$-amido-oxime et une céto-oxime aromatique greffés sur un ligand du site périphérique (**Figure 94**).[464]



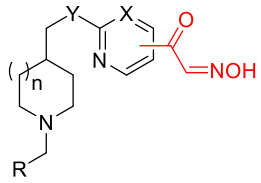
n = 0 - 1
$R_1$ = H, COMe, CN
$R_2$ = H, OMe



$R_1$ = H, COMe
$R_2$ = Ph, H



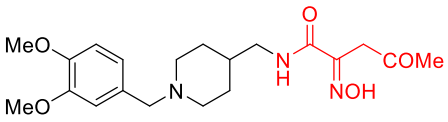
n = 1- 2, 4
$R_1$ = H, CN



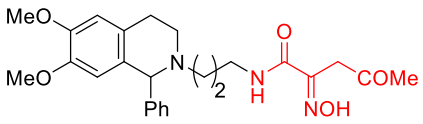
n = 0-1
R = aromatics, piperidine, pyrrolidine
X = CH, aromatics
Y = O, NH

***Figure 94.*** *Réactivateurs synthétisés par MacHardy et coll.*

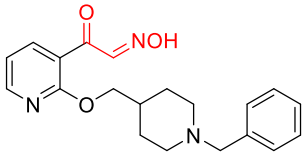
Les données cinétiques ne sont pas disponibles, seul le pourcentage de réactivation ainsi que la constante d'inhibition réversible *Ki* de la *h*AChE native sont communiqués dans ce premier screening (**Figure 95**). Aussi, leur élément de comparaison est le MINA, qui comme illustré précédemment, n'est pas un réactivateur de référence. Toutes les molécules surpassent aisément le MINA (7.7 % de réactivation obtenue) et présentent des capacités d'inhibition faibles à modérées de l'enzyme native. Ces quatre molécules sont en cours d'évaluation biologique (pénétration de la BHE, réactivation *in vivo* et effet protecteur *in vivo*).



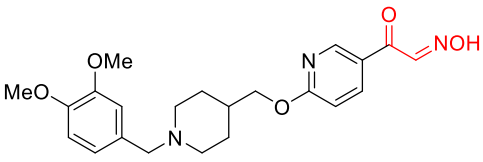
**MH-15**
Reactivation = 22.7 %
*Ki* = 1625 µM



**MH-17**
Reactivation = 36.5 %
*Ki* = 1926 µM



**MH-27**
Reactivation = 45.3 %
*Ki* = 180 µM



**MH-38**
Reactivation = 64.9 %
*Ki* = 233 µM

***Figure 95.*** *Structures et capacité in vitro de réactivation des leads de McHardy (20µM) sur la réactivation de l'AChE inhibée par le cyclosarin.*[464]

Enfin, plus récemment, des $\alpha$-amino oxime couplé à un triazole substitué notamment avec un imidazole portant ou non une oxime (**IV.2.4**) ont été rapporté par Maraković et testés sur les ChEs inhibées par le

VX, le sarin et le cyclosarin (**Figure 96**).[465] Initialement développés en tant que réactivateurs de l'AChE (%React$_{max\ +24h}$ = 10-70 %), ces molécules se sont révélés sélectives de la BChE (%React$_{max\ +24h}$ = 50-80 %). Bien que des pourcentages de réactivation soient rapportés, il n'y a pas de comparaison avec les oximes de référence, rendant difficile le classement de ces molécules. L'apport d'une deuxième oxime n'améliore pas les pourcentages de réactivation.

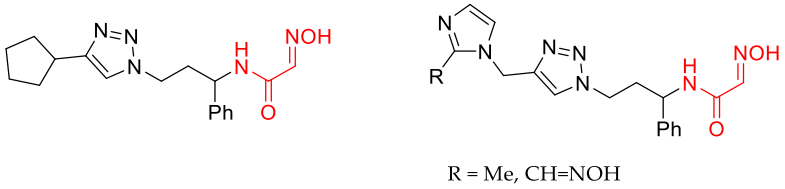



***Figure 96.*** *Réactivateurs de Marakovic et coll.*

### IV.2.3. Les amidines oximes

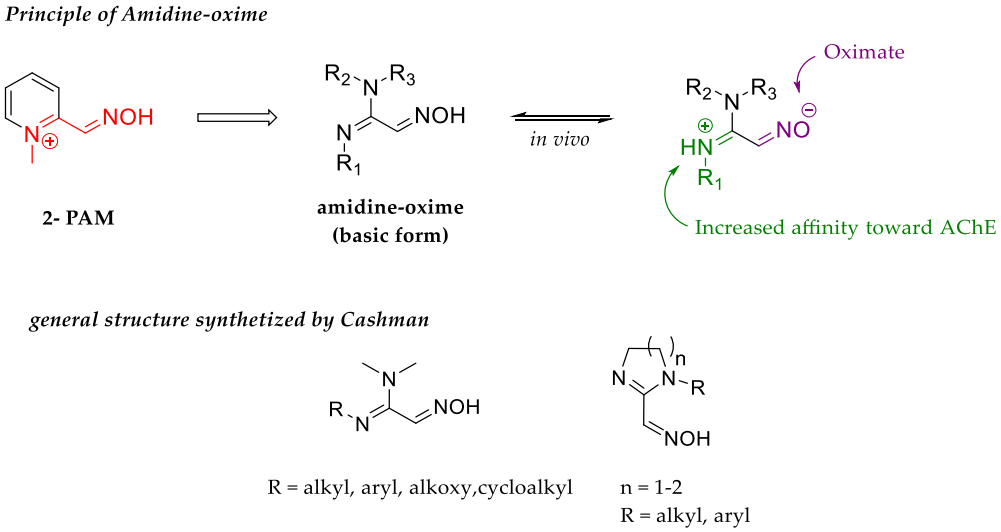
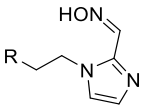



***Figure 97.*** *Structure générale des amidines oximes*

Développées en 2011 par l'équipe de Cashman, les amidines oximes ont été conçues comme des analogues, dans leurs formes zwitterioniques, de la structure de la 2-PAM (**Figure 97**). Elles ont la particularité de présenter une forte lipophilie, tout en étant malgré tout hydrosolubles. Le caractère électroattracteur de l'amidine permet à l'oxime qui lui est liée d'atteindre un p*K*a aux alentours de 8. L'amidine est protonée à pH physiologique, permettant de mimer la charge permanente de la 2-PAM. Un grand nombre de réactivateurs comportant ce motif, sous une forme acyclique et cyclique ont été synthétisés par Cashman et son équipe (**Figure 97**).[466,467] Toutes ces molécules présentent une activité réactivatrice *in vitro* des AChEs inhibées par un analogue du sarin (porteur d'une thiocholine en lieu et place du fluor comme groupe partant). Elles sont plus efficaces que le MINA, mais moins efficaces que la 2-PAM. Utilisées en traitement d'urgence sur des souris exposées à l'analogue du sarin, ces molécules ont un réel effet sur la survie des souris.[468] Une étude préclinique sur le rat d'une amidine-oxime

acyclique (R = *n*-butyl) permet de mettre en évidence un réel passage au travers de la BHE, le ratio de concentration plasma / cerveau ayant été évalué à 1,2 / 1 (après injection IM). Enfin, cette molécule non-toxique est capable de réactiver les AChEs dans le cerveau à hauteur de 20%. Bien que les constantes cinétiques de ces amidine oximes n'aient pas été publiées, et que leur potentiel de réactivation *in vitro* semble inférieur à ceux des bis-pyridinium aldoximes de référence, le développement de ces molécules mérite d'être poursuivi.

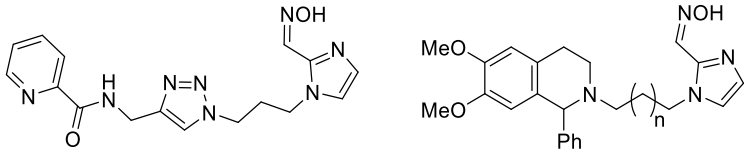
### IV.2.4. Les imidazoles oximes




R = 2,4-triazol alkyl, alkyne, aryl, PIQ

***Figure 98.*** *Structure générale des imidazoles oximes non-chargés*

A l'image des réactivateurs chargés de type imidazolium oxime, l'imidazole non-chargé portant une oxime a été évalué en tant que nouvelle fonction réactivatrice non-chargée dès 2011 (**Figure 98**).[184,457,459,469–471] Plus de 130 structures ont ainsi été publiées ; les têtes de séries présentant les meilleures activités seront présentées dans cette partie (**Figure 99**).




**RS150D** n = 3, **Wei-7g**
n = 4, **Wei-7h**

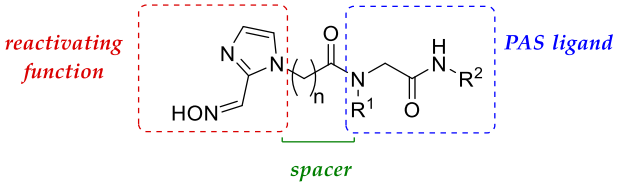
***Figure 99.*** *Structure des imidazoles-aldoxime les plus efficaces*

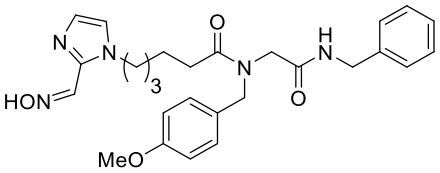
Les cinétiques de réactivation *in vitro* sur les AChEs inhibées par le tabun, le sarin et le VX ont été comparées aux réactivateurs de référence et à la MINA (**Tableau 40**). Le RS150D a été uniquement testé sur le Tabun, cependant les $k_{obs}$ rapportés lors de la réactivation de l'enzyme inhibée par différents NOPs montrent que sa capacité de réactivation est équivalente à celle de la 2-PAM et du MINA mais très inférieure à celle de l'obidoxime, du HI-6 et des Wei-7. Cela peut s'expliquer par une faible affinité pour l'enzyme phosphylée associée à une cinétique lente. L'ajout de la PIQ comme ligand du site périphérique permet d'obtenir des affinités équivalentes voire supérieures à celle des molécules de références (mais inférieure aux 3-hydroxypyridinaldoximes équivalentes) et donc d'augmenter l'efficacité globale, illustrant, de nouveau, l'importance du ligand. Aucune donnée *in vivo* n'est disponible pour le moment sur ces molécules.

| *Oximes* | *Sarin* | | | *VX* | | | *Tabun* | | | *Références* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $k_r$ | $K_D$ | $k_{r2}$ | $k_r$ | $K_D$ | $k_{r2}$ | $k_r$ | $K_D$ | $k_{r2}$ | |
| RS150D | - | - | - | - | - | - | $1{,}5.10^{-3}$ | 0,41 | $3{,}7.10^{-3}$ | Kovarik 2013 |
| Wei-7g | 0,04 | 0,143 | 0,28 | 0,14 | 0,024 | 5,75 | $9.10^{-3}$ | 0,026 | 0,36 | Wei 2014 |
| Wei-7h | 0,033 | 0,041 | 0,81 | 0,21 | 0,025 | 8,43 | 0,012 | 0,014 | 0,86 | Wei 2014 |
| 2-PAM | - | - | - | - | - | - | $5{,}8.10^{-3}$ | 1,5 | $3{,}8.10^{-3}$ | Kovarik 2013 |
| MINA | - | - | - | - | - | - | - | - | $3{,}9.10^{-3}$ | Kovarik 2013 |
| HLü-6 | 0,011 | 0,09 | 0,12 | 0,22 | 0,032 | 6,95 | 0,028 | 0,066 | 0,43 | Wei 2014 |
| HI-6 | 0,048 | 0,093 | 0,52 | 0,25 | 0,027 | 9,30 | nd | nd | nd | Wei 2014 |

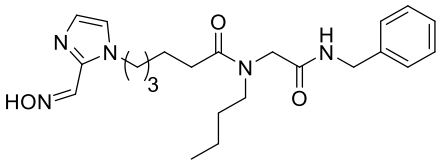
***Tableau 40.*** *Capacités de réactivation in vitro des RS150D, des imidazoles oximes de Wei et des molécules de référence sur l'hAChE empoisonnée par différents NOPs ($k_r$ exprimé en $min^{-1}$, $K_D$ en mM et $k_{r2}$ en $mM^{-1}min^{-1}$).*[469,470]

Enfin, plus récemment, De Koning rapporte la synthèse d'imidazole oxime neutre incorporant un ligand du site périphérique via la réaction multicomposante d'Ugi. Ces réactivateurs sont obtenus en une seule étape avec des rendements allant de 17 à 76%.




**Ugi-12c**
*pKa = 10.24*




**Ugi-12d**

***Figure 100.*** *Structure des imidazoles oximes développées par De Koning*

Ces réactivateurs ont été évalués *in vitro* sur la *h*AChE issue d'érythrocytes (**Tableau 41**). Ces molécules n'agissent pas à large spectre et sont, comme le HI-6, incapable de réactiver la hAChE inhibée par le tabun. L'apport d'un ligand de site périphérique ne permet pas d'améliorer les affinités envers l'enzyme inhibée et les vitesses de réactivation sont très inférieures à celles de la 2-PAM. Globalement ces molécules sont bien moins efficaces que la 2-PAM.

| *NOP* | *Constante cinétique* | *2-PAM* | *HI-6* | *Ugi-12c* | *Ugi-12d* |
|---|---|---|---|---|---|
| Tabun | $k_r$ | 0.01 | Ø | Ø | Ø |
| | $K_D$ | 706 | Ø | Ø | Ø |
| | $k_{r2}$ | 0.014 | Ø | Ø | Ø |
| Sarin | $k_r$ | 0.250 | 0.677 | 0.048 | 0.108 |
| | $K_D$ | 27.6 | 50.1 | 175.3 | 1199.5 |
| | $k_{r2}$ | 9.06 | 13.50 | 0.271 | 0.090 |
| Cyclosarin | $k_r$ | 0.182 | 1.3 | 0.096 | 0.073 |
| | $K_D$ | 3159.0 | 47.2 | 950.0 | 228.9 |
| | $k_{r2}$ | 0.06 | 27.55 | 0.102 | 0.322 |
| VX | $k_r$ | 0.215 | 0.242 | 0.084 | 0.174 |
| | $K_D$ | 28.1 | 11.5 | 140.3 | 815.8 |
| | $k_{r2}$ | 7.67 | 20.98 | 0.602 | 0.213 |

***Tableau 41.*** *Cinétique de réactivation in vitro de la hAChE issue d'érythrocytes*

Ces faibles capacités de réactivation sont dues, d'une part, au p*K*a de l'oxime qui est trop élevé (autour de 10), et d'autre part, au mode d'interaction de ces molécules avec l'enzyme inhibée. En effet pour ce dernier point, les études de *docking* sur la *h*AChE inhibée par le tabun, montrent que le benzyle interagit avec le Trp286 et la Tyr72, entrainant un positionnement trop haut pour que l'oxime soit en position optimale. Aussi l'imidazole interagit essentiellement par π-stacking avec le Trp86.

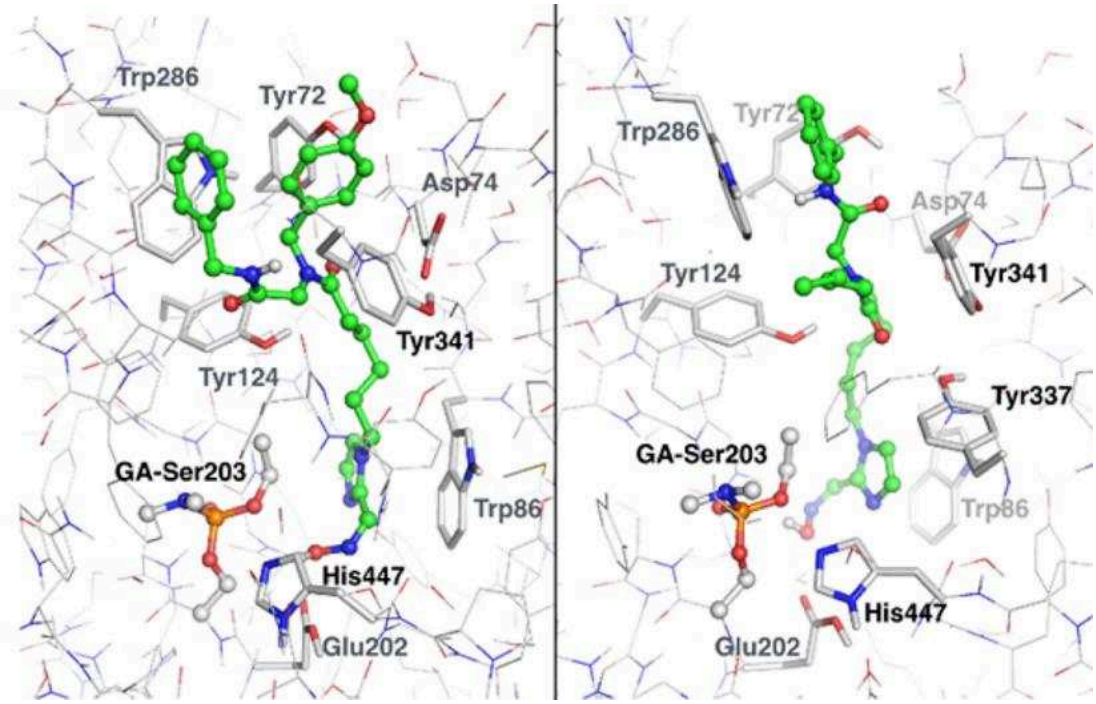
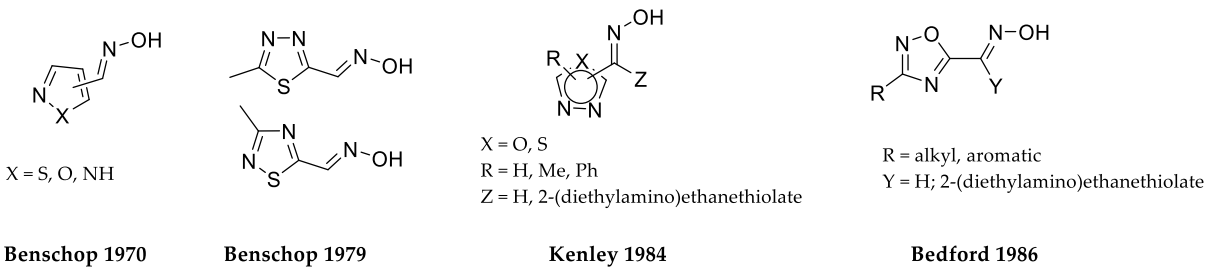



***Figure 101.*** *Etude d'amarrage moléculaire des molécules Ugi-12c (à gauche) et Ugi-12d (à droite) sur la hAChE inhibée par le tabun (pdb : 4EY4 et 3DL4).*

### IV.2.5. Autres hétérocycles carboximes

Succinctement présentés dans la partie historique des réactivateurs, de nombreux hétérocycles carboximes neutres ont été étudiés de 1970 à 1986 (**Figure 102**).[244–248]

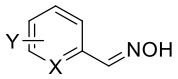



**Benschop 1970** **Benschop 1979** **Kenley 1984** **Bedford 1986**

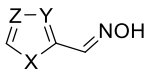
***Figure 102.*** *Structures des hétérocycles carboxime synthétisés entre 1970 et 1986*

Ces fonctions réactivatrices souffrent d'un manque flagrant d'affinité envers l'enzyme inhibée et sont moins efficace que la 2-PAM et le MINA en termes de pourcentage de réactivation. Cependant, ces hétérocycles permettent une véritable modulation du p*K*a de l'oxime (6 à 10 selon l'hétérocycle). Ces structures n'ont pas fait l'objet d'études par la suite, il serait intéressant d'associer celles présentant les meilleures constantes de réactivation $k_R$ avec des ligands du site périphérique, à l'image de ce que nous avons effectué avec les 3-hydroxypyridinealdoximes. C'est ce que nous aborderons dans le dernier chapitre de ma thèse.

Plus récemment, Ribero et coll ont publié une étude réunissant six fonctions hétérocycles-oximes innovantes.[472,473] Ces structures sont présentées dans la **Figure 103**.



**R-1,** X = CH, Y = 2-Me
**R-2,** X = CH, Y = 2-OH-3-$NO_2$
**R-3,** X = CH, Y = 2-OH-5-$NO_2$
**R-4,** X = CH, Y = 3-$NH_2$
**R-5,** X = CH, Y = 4-$NEt_2$
**R-6,** X = CH, Y = 4-MeO
**R-7,** X = N, Y = H
**R-8,** X = CH, Y = 4-F
**R-9,** X = CH, Y = 4-Cl
**R-10,** X = CH, Y = 4-$NO_2$



**R-11,** X = O, Y = Z = CH
**R-12,** X = S, Y = Z = CH
**R-13,** X = NH, Y = Z = CH
**R-14,** X = NMe, Y = Z = CH
**R-15,** X = O, Y = CMe, Z = N

***Figure 103.*** *Fonctions réactivatrices synthétisées par Ribeiro et coll.*[472,473]

Bien que les constantes cinétiques de réactivation n'aient pas été déterminées, les pourcentages de réactivation de ces molécules sur l'*h*AChE inhibée par l'éthyle paraoxon ainsi que leurs p*K*a sont rapportés, trois molécules présentent des caractéristiques intéressantes (**Tableau 42**). Cette étude met en évidence qu'il n'y aurait a priori pas de corrélation directe entre le p*K*a et la réactivation. En effet, le thiophene-2-aldoxime réactive 1,2 fois plus que la 2-PAM *in vitro*, malgré son caractère basique prononcé (p*K*a = 10). La délocalisation de la charge (5 formes conjuguées) et la présence de l'atome de soufre qui est polarisable permettraient une stabilisation de la forme anionique et donc une meilleure

réactivation. Il faut également souligner que l'efficacité de réactivation peut aussi être liée au positionnement relatif de l'oxime par rapport à la sérine phosphylée dans le site actif de l'enzyme. Un hétérocycle moins encombrant peut permettre plus de degrés de liberté à l'oxime dans ce site de liaison, et donc faciliter l'accès de l'oxime à l'atome de phosphore. Compte tenu de son caractère plus lipophile que les pyridiniums, cette molécule pourrait avoir des capacités très intéressantes en incorporant un ligand du site périphérique.

| *Oximes* | *Réactivation (%)* | *pKa* | *Log P* |
|---|---|---|---|
| 2-PAM | 83 | 7.68 | -2.31 |
| R-12 | 93 | 10.63 | 0.4064 |

***Tableau 42.*** *Capacité de réactivation du thiophène-carboxime sur l'hAChE inhibée par l'ethyl paraoxon*[473]

## IV.3. Fonctions réactivatrices sans oxime

Malgré les avancées faites dans la recherche de réactivateurs universels et capable de traverser la BHE, aucun nouveau réactivateur compétitif avec les bis-pyridinium aldoximes de référence n'a été proposé depuis leurs synthèses au milieu des années 1950. En conséquence, la recherche s'est également orientée vers des réactivateurs présentant d'autres fonctions nucléophiles que les oximes, avec, comme objectif d'avoir des molécules aux structures simplifiées, moins toxiques, capables d'atteindre le SNC et permettant une réactivation à large spectre.

### IV.3.1. Hydroxylamine, hydrazone et guanylhydrazone

Et si la réactivation pourrait se faire avec une hydroxylamine nucléophile ?[224,225] Ce concept simpliste, a été validé par une étude de chimie quantique et de modélisation dynamique rapportée en 2012 par Lo et Guanguly.[474] Leurs calculs montrent que la *N*-(pyridine-2-yl)hydroxylamine (**Figure 104**) pourrait être plus efficace que le MMB-4 pour la réactivation l'AChE inhibée par le tabun. En effet, la barrière d'activation est estimée à 1.7 kcal/mol contre 8.9 kcal/mol pour le MMB-4 rendant la réactivation plus accessible. Quoique l'affinité de cette structure envers l'enzyme est plus faible comparée à celle des bis-pyridinium aldoxime, l'indice de nucléophilie ω- met en évidence le fort caractère nucléophile en comparaison avec les oximes de référence tout en présentant une lipophilie suffisante pour le passage de la BHE ainsi qu'une faible toxicité prédite. Cependant, aucune donnée *in vitro* n'est disponible pour l'instant pour étayer ces simulations.

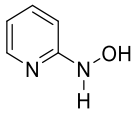
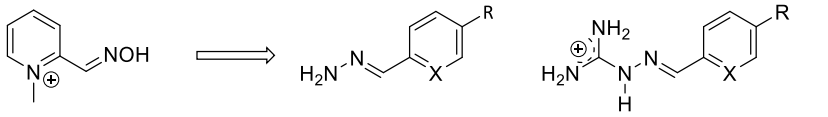



***Figure 104.*** *Structure de la N-(pyridine-2-yl)hydroxylamine*

L'analogie structurale entre amidines-oxime et pyridinium aldoximes a été étendu à des dérivés de type pyridinium-hydrazone et guanylhydrazone (**Figure 105**). [475,476] Ces structures, dont la potentielle réaction sur la sérine phosphorylée a été confirmée par des études de modélisation moléculaire, ont été testées *in vitro* sur l'*ee*AChE inhibée par le paraoxon. L'apport de l'adduit guanyl permettrait d'obtenir de meilleures interactions avec le site anionique de l'enzyme, générant une forme réactive neutre dont les azotes possèderaient une nucléophilie suffisante pour déplacer l'adduit phosphylé.



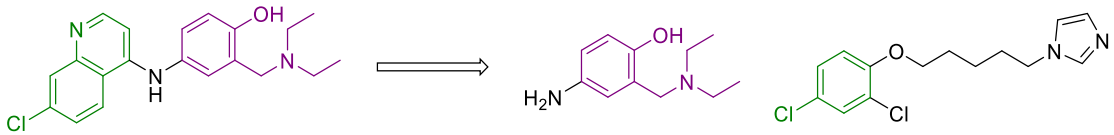

**2- PAM** R = H, X = $^{+}$NMe | R = H, $NO_2$, Cl, Me, $NMe_2$, OH, X = CH, N, $^{+}$NMe

***Figure 105.*** *Hydrazone et guanylhydrazone*

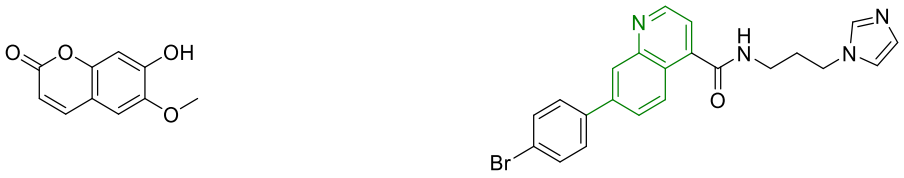
Cependant, ces molécules, peu nucléophiles, ne présentent pas de capacités réactivatrices intéressantes. En effet, l'hydrazone est trop basique pour que l'hydrazonate soit formé dans le site catalytique, et ne s'est pas révélée assez nucléophile pour s'additionner sur le phosphore dans sa forme neutre. L'apport du fragment guanyl n'a pas non plus permis d'améliorer la réactivation. Cependant, les propriétés d'inhibition de l'AChE native de ces molécules simples en font des candidats potentiels pour le traitement de la maladie d'Alzheimer à condition que ces motifs puisse traverser la BHE, les outils de prédiction n'étant pas favorables sur ce dernier point.[475,476]

### IV.3.2. Les bases de Mannich et apparentées

En 2015, Katz et coll ont rapporté la découverte d'une nouvelle classe de réactivateurs potentiels issus d'un criblage à haut débit de 2 000 substances actives dont l'utilisation en tant que médicament est approuvée par la FDA et qui possèdent une fonction nucléophile dans leur structure.[477] Deux molécules ont été identifiées : l'Amodiaquine (ADQ, antipaludéen) et la Scopoletin (une coumarine possédant des propriétés pharmacologiques diverses – **Figure 106**).[478,479] Cette dernière a des cinétiques de réactivation plus faibles que la 2-PAM et ne présente pas un large spectre d'action contrairement à l'ADQ.[480] Malgré de bonnes capacités réactivatrices, l'ADQ s'est cependant révélée très toxique *in vivo* (hépatotoxicité, agranulocytose). Afin de pallier cette toxicité et d'identifier le motif responsable de la réactivation, une étude de relation structure-activité a donc été menée et de nombreux analogues ont été synthétisés. Les analogues les plus efficaces sont détaillés dans la **Figure 106**.



**Amodiaquine** **ADOC** **SP134**



**Scopoletin** **SP138**

***Figure 106.*** *Structure de la Scopoletin, de l'Amodiaquine et de leurs analogues*

| *Oximes* | *Paraoxon* | | | | *DFP* | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $k_r$ | $K_D$ | $k_{r2}$ | *% React max* | $k_r$ | $K_D$ | $k_{r2}$ | *% React max* |
| 2-PAM | 83 | 75 | 110 | 100 | 48 | 430 | 11 | 100 |
| ADQ | 160 | 3.5 | 4 600 | 26 | 21 | 5.8 | 360 | 31 |
| ADOC | 1 400 | 11 | 13 000 | 100 | 150 | 170 | 89 | 67 |
| SP134 | 70 | 11 | 610 | 72 | 32 | 25 | 130 | 55 |
| SP138 | 73 | 34 | 220 | 100 | 41 | 62 | 67 | 82 |

***Tableau 43.*** *Capacités de réactivation in vitro de l'ADQ et ses analogues sur l'hAChE empoisonnée par différents NOPs ($k_r$ exprimé en $10^{-4}$ $min^{-1}$, $K_D$ en µM et $k_{r2}$ en $M^{-1}min^{-1}$).*

L'étude *in vitro* montre que l'efficacité de ces molécules est supérieure à celle de la 2-PAM. Ces molécules présentent de très bonnes affinités et des vitesses de réactivation très intéressantes (**Tableau 43**). L'administration de l'ADOC et du SP138 sous forme de sel (le SP134 a été écarté à cause d'effets myorelaxants indésirables), en pré- et post-exposition, a donc été entreprise sur des souris exposées au DFP. L'ADOC, administré 5 min avant ou/et après exposition (i.p.), permet une protection totale à 1.6 $LD_{50}$ de DFP (85-100% de suivi à +24h). Le SP138, administré *per os* (voie d'administration négligée dans le domaine des réactivateurs) avant exposition au DFP, confère également une véritable protection. Pour ces deux molécules, la réactivation des AChEs est homogène dans l'ensemble des tissus, y compris dans le cerveau. Cependant le mécanisme d'action exact n'a pas été démontré de manière formelle.

La co-cristallisation du SP134 avec la DFP-*m*AChE montre que dans le site actif, un dimère se forme (**Figure 107**), phénomène jusqu'alors jamais rapporté. Chaque molécule de ce dimère présente un mode d'interaction avec l'enzyme phosphylée qui lui est propre : l'un est dans le site actif (en orange dans la figure) tandis que le second est bloqué au niveau du site périphérique (en magenta dans la figure). La forte affinité est expliquée par l'abondance des interactions entre la partie aromatique du SP134 et les résidus aromatiques du site périphérique d'une part, entre le bras alkyle et les résidus de la gorge d'autre part (cette partie de la molécule est prise en sandwich entre une tyrosine et un tryptophane),

mais aussi entre la partie basique et le site cation-π (π-stacking de l'imidazole avec la tyrosine 72 de l'AChE de souris). Bien que le triazole sont très proche de l'adduit phosphylé, le mécanisme de réactivation n'a pas été déterminé avec certitude, les auteurs hésitant entre deux mécanismes :

- Une action directe : le déplacement du phosphore se ferait *via* la substitution nucléophile de la sérine sur le phosphore par le phénolate ou l'imidazole (à l'image des oximes) ;
- Une action indirecte : ces bases activeraient une molécules d'eau dans le site catalytique qui déplacerait le phosphore porté par la sérine.[149]

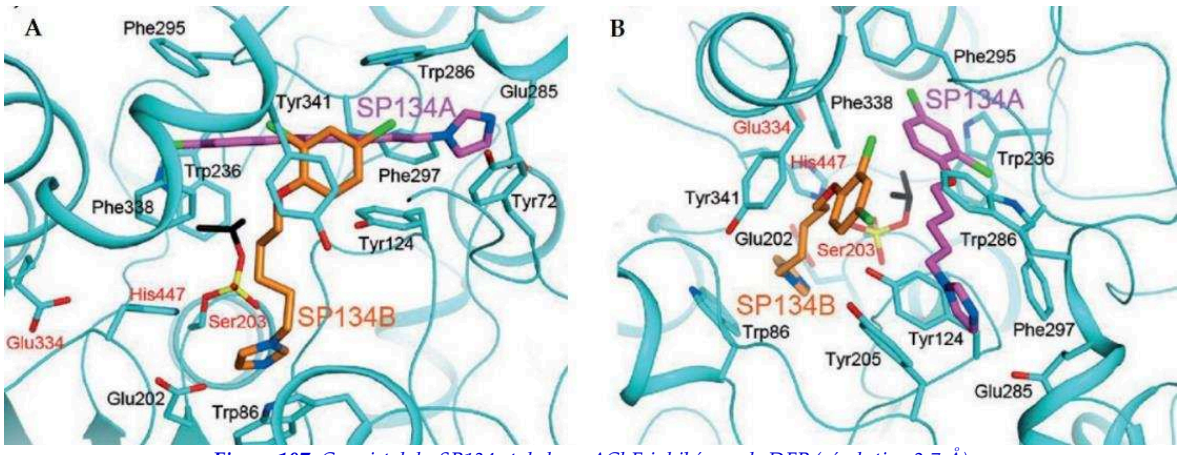



***Figure 107.*** *Co-cristal du SP134 et de la m-AChE inhibée par le DFP (résolution 2,7 Å)*

Dans le but de comprendre ce mécanisme, l'ADOC a fait l'objet d'une étude structure-activité plus poussée afin de comprendre l'influence des différents groupements sur la réactivation.[481] Les auteurs ont donc successivement modifié l'aniline, le phénol et l'amine benzylique ainsi que leur position relative sur le phényle. Le phénol (qui doit être en para de l'amine benzylique) jouerait un rôle critique dans la réactivation tandis que l'aniline et l'amine benzylique seraient essentielles à l'affinité. Cependant le mécanisme réactionnel de réactivation de l'enzyme phosphylée par ces bases de Mannich n'est pas élucidé. L'étude des produits de réactivations (par RMN, ou UPLC/MS) couplée aux calculs DFT et à la cristallographie (à l'image des travaux d'Allgardsson et coll en 2016)[256] permettrait d'élucider le véritable mode d'action de ces molécules.

Bien que ce concept soit une véritable innovation dans le domaine des réactivateurs, il nécessite encore d'être approfondi afin d'améliorer le spectre d'action mais aussi de mieux comprendre le mode de fonctionnement de cette nouvelle classe de molécules afin de développer de meilleures structures. En effet, les têtes de série sont certes plus efficaces que la 2-PAM *in vitro* mais elles ne réactivent pas avec la même efficacité les agents G (**Tableau 44**), et elles ne surpassent pas encore le HI-6. Enfin, l'utilisation de molécules déjà approuvées pour une utilisation comme médicament accélère l'obtention des autorisations de mise sur le marché, mais la question de la sélectivité au niveau des cibles biologiques peut se poser.

| Molécules | GA | GB | GD | GF | VX | VR |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2-PAM | 7.0 | 81 | 17.6 | 18.4 | 121 | 46 |
| ADOC | 4.5 | 45.4 | 5.6 | 40.5 | 266 | 719 |

***Tableau 44.*** *Efficacité in vitro du ADOC ($k_{r2}$ $M^{-1}min^{-1}$)*

### IV.3.3. Autres réactivateurs issus d'évaluation *in silico*

Bien que le mécanisme d'action des oximes et autres nucléophiles sur la sérine phosphorylée soit complexe est fasse intervenir de nombreux paramètres cinétiques et dynamiques,[258] des études *in silico* visant à évaluer le potentiel de réactivation de pharmacophores disponibles dans les librairies chimiques (Maybridge, ChemNavigator) ont été rapportées dans la littérature, notamment par Bhattacharjee et coll.[482,483] En 2010, ces derniers ont décrit un modèle de pharmacophore déduit du mode d'interaction des oximes rapportées dans la littérature (**Figure 108**).[484]

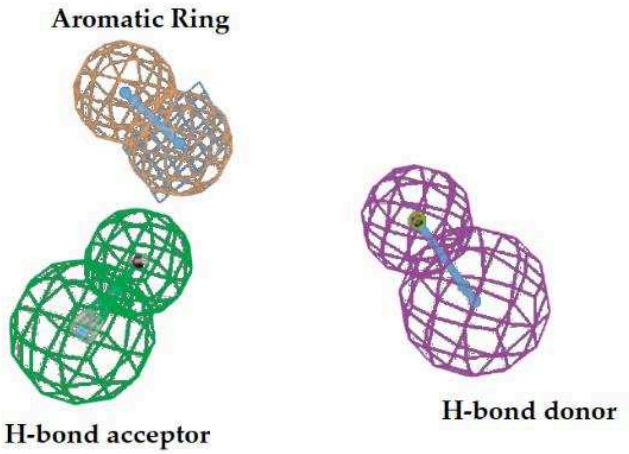
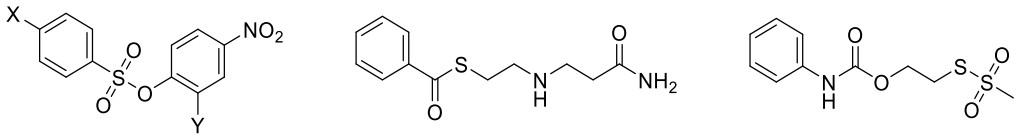



***Figure 108.*** *Modèle de pharmacophore issu des modes de liaison des oximes avec l'AChE inhibée par le Tabun*

Sur la base de ce modèle, l'identification et la sélection de réactivateurs potentiels s'est faite en tenant compte d'autres paramètres importants tels que le *log P*, la capacité à pénétrer la BHE ainsi que la toxicité du pharmacophore mais aussi la vitesse de réactivation *in vitro*. Parmi la pléthore de structures identifiées, 4 molécules ont été sélectionnées après screening *in vitro* (**Figure 109**).[482,483] La vitesse de réactivation (exprimée dans la publication en $mol^{-1}min^{-1}$) du B-7 est équivalente à celle de la 2-PAM tandis que celles des B-9, B-8 et B-6 sont 2 à 4 fois plus élevées que celle de la 2-PAM lors de la réactivation de l'*ee*AChE inhibée par le DFP. Les affinités ne sont pas communiquées, cependant les énergies de liaison calculées entre l'enzyme et ces molécules sont deux fois plus importantes en comparaison avec la 2-PAM.




B-6, X = Cl, Y = H
B-8, X = H, Y = Cl

B-7

B-9

***Figure 109.*** *Exemples de pharmacophores identifiés*

Malgré ces résultats encourageants, les résultats issus de l'évaluation *in vivo* de l'activité de ces molécules sur *le guinea pig* sont bien plus nuancées.[483] Seule la molécule B-6 permet une restauration partielle de l'activité des AChEs, restauration équivalente à celle de la 2-PAM dans le sang et le cerveau mais elle est deux fois plus faible au niveau du diaphragme. Par conséquent, le B-6 n'élimine pas totalement les effets de l'intoxication. La théorie et la pratique diffèrent souvent, les études *in silico* constituent un puissant outil de sélection mais nécessitent encore d'être perfectionnées. Le modèle pharmacologique découlant des observations faites avec les oximes n'est peut-être pas adapté pour la découverte de molécule surpassant les oximes de référence. Aussi, bien que les potentiels électrostatiques aient été déterminés sur ces molécules, le mécanisme d'action n'est, à aucun moment, abordé dans la discussion.

## IV.4. Conclusions sur les avancées de la recherche

Malgré les nombreuses limitations que présentent les réactivateurs chargés, les efforts de recherche actuels sont principalement dédiés aux pyridiums aldoximes. L'amélioration du passage de la BHE *via* l'ajout d'un carbohydrate ou l'utilisation de nanoparticules constitue un réel progrès mais ne résout pas totalement les limites de ces réactivateurs (en particulier le spectre d'action étroit de chaque pyridinium aldoxime, qui nécessiterait une identification rapide et précise de l'OP incriminé pour pouvoir mettre en œuvre les contre-mesures médicales les plus adaptées). Le dogme préconisant de la présence d'un ammonium quaternaire (pyridinium) comme condition *sine qua none* pour l'obtention d'un réactivateur efficace a été mis à mal par le développement récent de réactivateurs non-chargés, efficaces *in vitro*. Cette charge permanente n'est a priori plus un des critères incontournables pour le développement de nouveaux réactivateurs. Bien que des avancées notables aient été faites dans ce domaine, et bien que ce soit un véritable marché de niche, aucun nouveau traitement n'a été proposé ni approuvé par les autorités de santé après plus de 70 ans de recherches. La découverte et la mise sur le marché d'un traitement efficace contre les intoxications aux NOPs sont également fortement ralenties par l'impossibilité éthique et pratique d'évaluer leurs activités réelles sur un modèle autre que le primate.

Ma thèse, financée par la délégation générale pour l'armement, est donc dédiée à l'optimisation des structures des candidats réactivateurs « lead » découverts au laboratoire pour améliorer leurs

paramètres pharmacocinétiques afin de pouvoir les évaluer *in vivo*. Elle s'inscrit dans le cadre de plusieurs contrats de recherche (ANR Re-AChE, 2009-2014 ; ANR programme ASTRID « ReCNS-AChE » 2014-2017, financements du programme NRBC initié par le SGDSN -secrétariat général de la défense et de la sécurité nationale- et piloté par le CEA 2009-2018) réunissant d'un consortium composé d'équipes de chimistes de synthèse (équipes du Pr Pierre-Yves Renard à l'université de Rouen-Normandie et du Dr Rachid Baati de l'Université de Strasbourg), qui sont chargés de la synthèse des réactivateurs ; une équipe d'enzymologistes du service de santé des armées (équipe du Dr Florian Nachon de l'IRBA), qui est chargée de l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de l'efficacité de ces réactivateurs, mais, depuis le déménagement du laboratoire de La Tronche à Bretigny sur Orge, l'équipe n'a accès qu'à des analogues des NOPs ; et enfin et d'une équipe en biologie structurale à l'IBS de Grenoble (équipe du Dr Martin Weik), chargée de la mise au point des paramètres des programmes d'amarrage moléculaire optimisés (dockings flexibles), et de l'étude cristallographique des complexes enzymes – réactivateurs afin de comprendre leurs modes d'action et d'optimiser leurs structures. J'ai également pu bénéficier d'un financement PHC COGITO (France-Croatie), pour amorcer une collaboration avec l'équipe du Dr Zrinka Kovarik de l'Institute for Medical Research and Occupational Health de Zagreb (Croatie), qui peut tester l'efficacité des réactivateurs sur les toxiques réels et réaliser des études *in vivo.*

Comme annoncé dans la partie introductive, elle s'articulera autour de quatre chapitres. Le premier sera consacré à l'optimisation des protocoles de synthèse et à la resynthèse, à l'échelle du gramme, des derniers « leads » développés au sein du laboratoire afin de pouvoir fournir à nos partenaires biologistes les quantités suffisantes de composés pour effectuer les tests biologiques *in vivo*. Le deuxième chapitre s'inscrit dans la continuité du premier, et sera consacré à la conception, la synthèse et l'évaluation de réactivateurs non-chargés dérivés d'amine tertiaire de la 3-hydropyridine aldoxime pour un passage passif de la BHE. Le troisième volet sera consacré à l'élaboration et l'évaluation *in vivo* de réactivateurs non-chargés comportant un motif carbohydrate pour un passage actif de la BHE, en continuation des travaux effectués par le Dr Pierre Warnault, post-doctorant au laboratoire dans le cadre de l'ANR ReCNS-AChE. Enfin, une dernière partie sera consacrée au développement de nouvelles fonctions réactivatrices non-chargées incorporant notamment un motif thiadiazole-5-carboxaldoxime susceptible d'être accroché sur un ligand du site périphérique de l'enzyme.

# CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT DE REACTIVATEURS NON-CHARGES INCORPORANT UNE MORPHOLINE, UNE DIETHYLAMINE OU UNE TETRAHYDROSISOQUINOLEINE EN LIGAND DU SITE PERIPHERIQUE

## I. Introduction

Comme illustré dans le Chapitre 1, de multiples paramètres déterminent la capacité réactivatrice d'une oxime. Trois de ces paramètres sont cruciaux :

- L'affinité de l'oxime envers l'enzyme phosphorylée traduite par la constante de dissociation $K_D$, qui dépend de l'oxime, mais également de l'adduit phosphyle présent sur la sérine, qui peut induire des modifications importantes au niveaux des sites de liaison de l'enzyme phosphylée.
- L'aptitude de l'oxime à déplacer l'adduit phosphore de la sérine, traduite par la constante cinétique $k_r$. Celle-ci dépend du caractère nucléophile de l'oxime, mais aussi de son positionnement par rapport à l'atome de phosphore.
- Le positionnement de l'oxime dans le site actif de l'enzyme inhibée, que l'on peut prédire par étude d'amarrage moléculaire et qui peut être vérifié *a posteriori* par la co-cristallisation de l'oxime avec l'enzyme phosphylée.

Bien que certains mono- et bis-pyridiniums aldoximes possèdent des capacités de réactivation intéressantes, la nécessité d'améliorer les facteurs susnommés pour obtenir un large spectre d'action est cruciale.

Le passage de la BHE est, comme démontré dans le chapitre précédent, une nécessité à long terme. Les oximes chargées traversent très peu cette barrière biologique, limitant ainsi leur spectre d'action dans l'organisme, les AChEs du SNC n'étant pas réactivées de manière significative.

Les nouveaux réactivateurs doivent donc être de nature ambivalente : ils doivent être suffisamment lipophiles pour assurer un passage passif tout en étant suffisamment hydrophiles pour être utilisables in vivo.

La nécessité de développer des réactivateurs efficaces, à large spectre et capable d'atteindre le SNC est donc primordiale et constitue le socle de la recherche au sein de notre laboratoire depuis 2006.

### I.1. Travaux préalables

Comme brièvement présenté dans le chapitre 1 (**IV.2.1**), notre équipe a apporté de nombreuses avancées dans le domaine des réactivateurs.

Dans un premier temps, l'identification de nouvelles fonctions réactivatrices a été réalisée grâce à l'élaboration d'un système de criblage haut débit reposant sur l'utilisation d'un organophosphoré pro-fluorescent mimant le VX (**Figure 110**).[447] Cet OP, en présence d'un nucléophile, va subir une

substitution nucléophile de type $SN_2P$ conduisant à la libération de la partie pro-fluorescente. Ce fragment va alors spontanément se désagréger et libérer la fluorescence.

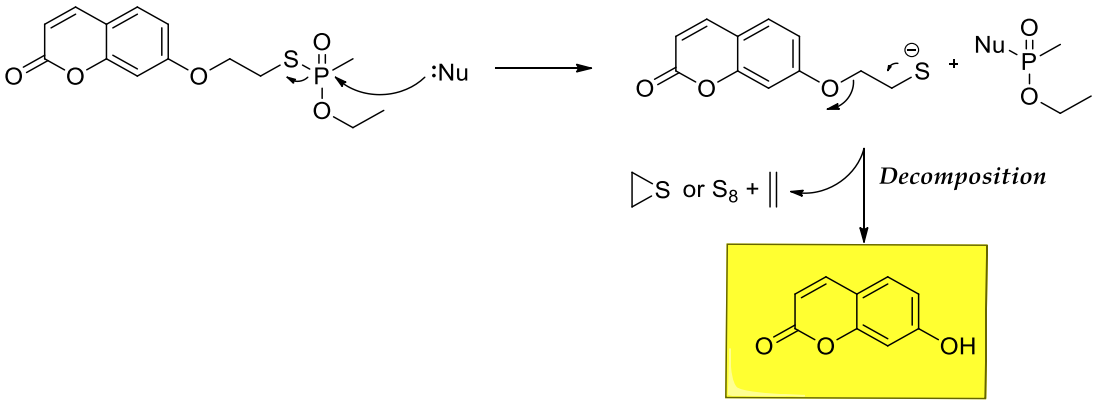



***Figure 110.*** *Principe du criblage haut débit développé par le laboratoire*

Les premiers hits identifiés – à savoir les 3-hydroxypyridine aldoximes, les 3-hydroxypyridine amidoximes et les acides 3-hydroxypyridine hydroxamiques, un second screening d'hydrolyse du PhX (analogue du VX, avec un résidu phényle en lieu et place du méthyle), suivi d'une évaluation *in vitro* en présence d'enzymes inhibées, a permis la sélection de trois $\alpha$-nucléophiles dont la 3-hydroxypyridine aldoxime (**Figure 111**).[34] Malgré une vitesse de réactivation ($k_r$) 8 fois supérieure à celle de la 2-PAM, son manque d'affinité pour l'enzyme ne permet pas de l'utiliser telle quelle.

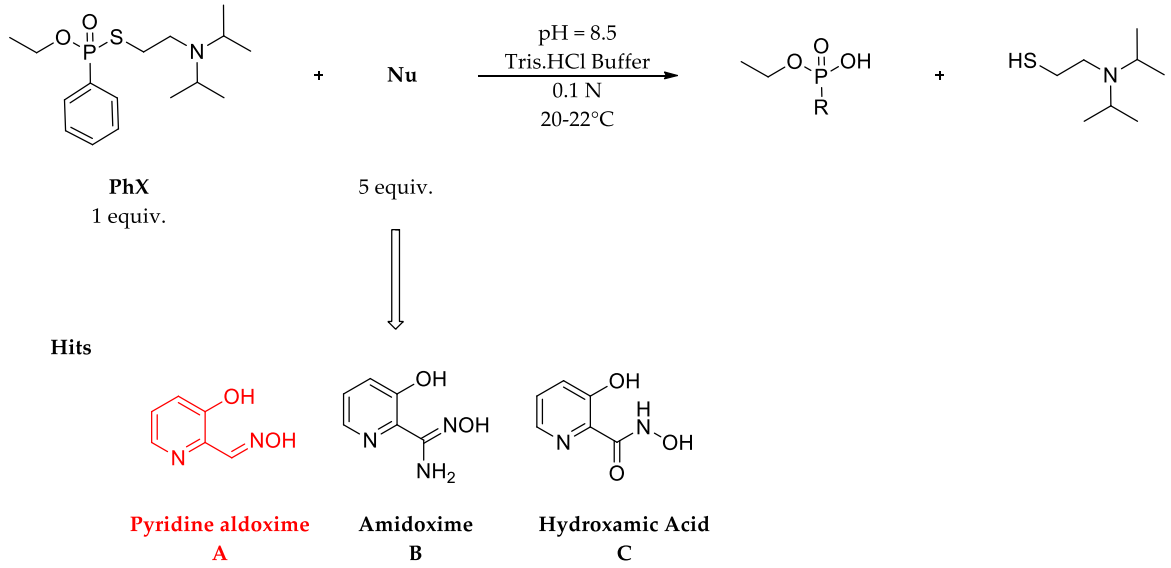



***Figure 111.*** *Hydrolyse du PhX et identification des touches*

L'élaboration de nouveaux réactivateurs tripartites dont la conception s'appuie sur les données structurales de l'enzyme, a donc été mise en œuvre (**Figure 112**). Ces réactivateurs tripartites consistent en l'incorporation d'un ligand du site périphérique associé à notre fonction réactivatrice via une chaîne aliphatique qui se logerait dans la gorge hydrophobe de l'enzyme. Une longueur optimale de 4 à 5 méthylènes a été prédite par des études d'amarrage moléculaire. Les interactions possibles au niveau

du site périphérique sont essentiellement de type cation-π et π-π. De ce fait, il a été postulé que l'incorporation d'un motif affin envers l'enzyme, composé d'aromatiques et/ou d'amines tertiaires permettrait d'augmenter l'affinité de l'oxime pour l'enzyme, de favoriser une orientation de l'oxime propice à la réactivation et, *in fine*, d'augmenter l'efficacité globale de nos réactivateurs.

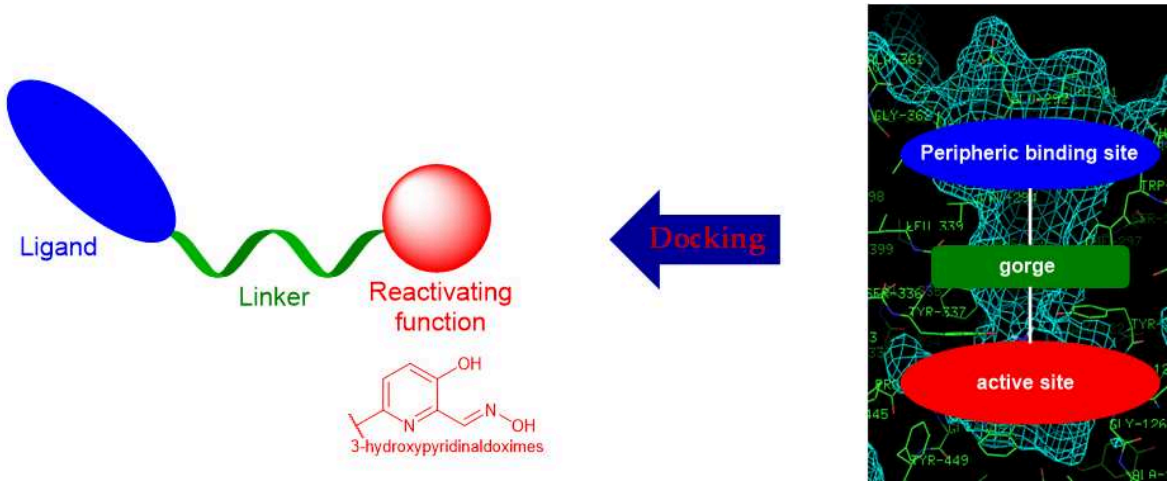



***Figure 112.*** *Principe des réactivateurs tripartites*

L'utilisation de ligands du site périphériques possédant dans leur structure des amines tertiaires a été guidée par trois critères principaux : augmenter l'hydrosolubilité globale du réactivateur, permettre des stratégies de synthèses flexibles et efficaces, mais surtout offrir un site de liaison supplémentaire pour le réactivateur. Etant données les propriétés recherchées pour nos molécules en vue d'un passage de la BHE, le choix de l'amine est primordial. En effet, le p*K*a de cette amine doit être compris entre 7 et 10 pour, qu'en conditions physiologiques (pH entre 6.8 et 7.4), un équilibre entre la forme neutre et la forme protonée soit présent (**Figure 113**). Sous sa forme neutre, le réactivateur devrait être capable de passer de manière passive la BHE (absence de charge permanente). Une fois reprotoné dans le SNC, la liaison du réactivateur au site périphérique de l'enzyme pourrait être favorisée par des interactions cation-π entre l'ammonium et le Trp286 situé à l'entrée du site périphérique de l'enzyme, mimant ainsi l'approche du neurotransmetteur. Aussi, un équilibre subtil est nécessaire au niveau de l'affinité envers l'enzyme. Une trop forte affinité peut provoquer une inhibition indésirable des AChEs natives (non phosphylées) tandis qu'une trop faible affinité diminuerait l'efficacité du réactivateur.

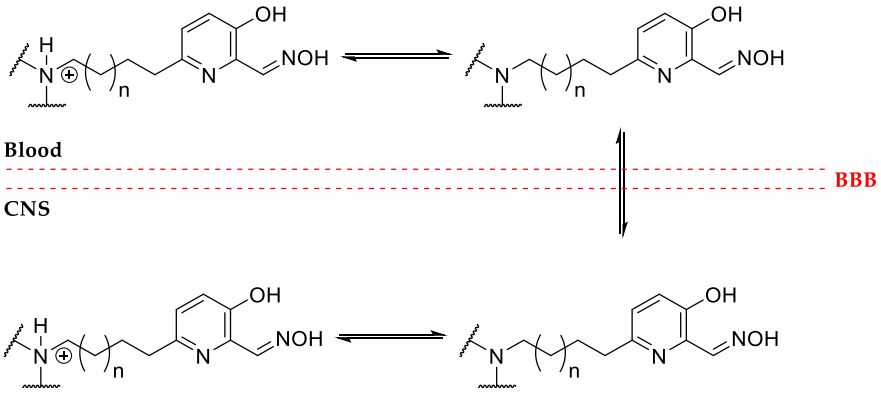
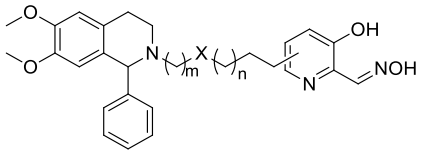



***Figure 113.*** *Passage passif de la BHE*

Ainsi, le premier ligand à avoir été utilisé dans nos réactivateurs est dérivé d'un noyau phényle tetrahydroisoquinoléine (PIQ) (**Figure 114**). Initialement rapporté en 1950,[485] ses capacités inhibitrices ont été (re)découvertes au travers des travaux menés par Sharpless sur la formation d'inhibiteurs spécifiques *via* la chimie « click » *in situ*.[486,487] En effet, ce ligand est sélectif du site de liaison périphérique de l'enzyme et présente une constante de dissociation de l'ordre du μM, a priori suffisante pour une application aux réactivateurs.



m = 0, 2 ; n = 0 - 3 ; X =$CH_2$, O

***Mercey 2011, 2012***

***Figure 114.*** *Structures des réactivateurs dérivés de la PIQ*

Ces molécules montrent des capacités *in vitro* à réactiver l'AChE inhibée par les NOPs très supérieures à celles des réactivateurs de référence.[36,488] Pour exemple, le composé **GM113** (n = 2 ; m = 0, X = $CH_2$) est 2.8 fois supérieur au HI-6 et 2.3 fois supérieur à l'obidoxime pour la réactivation de VX-*h*AChE. Malheureusement, ces molécules se sont révélées trop peu hydrosolubles pour poursuivre leur développement et leur évaluation *in vivo*.[489] Il était donc nécessaire de compléter notre chimiothèque de réactivateurs aminés et d'étudier d'autres alternatives (formulation sous forme de sels, encapsulation).

## I.2. Objectifs

Avec comme objectif de simplifier la structure pour augmenter l'hydrosolubilité et faciliter les synthèses (notamment la montée en échelle de l'ordre du gramme) l'incorporation d'amines de structure plus simple et commercialement disponibles, a donc été entreprise.

Parmi les amines tertiaires cycliques envisagées, la morpholine[490] a été sélectionnée et incorporée dans nos réactivateurs tripartites par mon prédécesseur, Dr Julien Renou (Thèse ANR ReAChE, 2010-2013),

ainsi qu'un stagiaire de master 1, Romain Mougeot. Un réactivateur à base de diethylamine a également été synthétisé par le Dr Catherine Gomez (**Figure 115**), post doctorante dans l'équipe. La tétrahydrosisoquinoléine (TIQ) a aussi été envisagée et des réactivateurs portant cette amine ont été synthétisés par Guillaume Mercey (**Figure 115**). Cependant, les quantités de produits fournis à nos collaborateurs biologistes, s'ils ont permis d'effectuer une première évaluation *in vitro* encourageante des capacités réactivatrices de ces oximes, elles n'ont pas permis une évaluation complète *in vitro* de ces molécules, ainsi que leur évaluation *in vivo*.

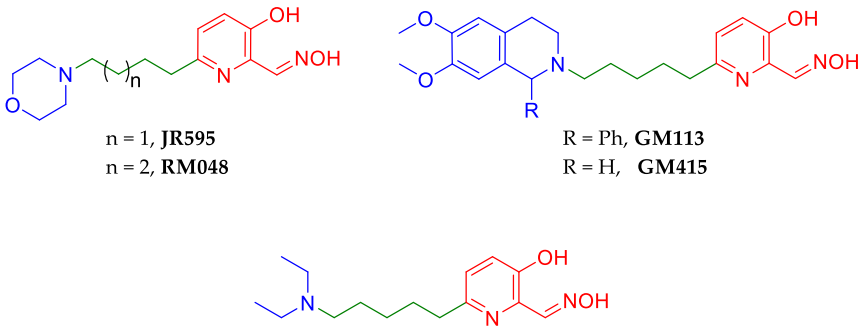



***Figure 115.*** *Structure des réactivateurs de ce chapitre (en bleu, le ligand du site périphérique ; en vert, l'espaceur ; en rouge la fonction réactivatrice)*

Ainsi, le premier objectif qui m'a été confié afin de finaliser l'évaluation de ces molécules, est de les produire à l'échelle du gramme – tout en améliorant les procédés de synthèse déjà établis – pour les études *in vivo*. De plus, la formulation des réactivateurs sous forme de sels a été étudiée. Enfin, le **GM415** a fait d'objet d'une étude d'encapsulation menée en collaboration avec le Dr Patrick Masson et le Dr Tatiana Pashirova en Russie (Université de Kazan) afin de vérifier l'intérêt de cette technologie sur des réactivateurs peu hydrosolubles.

Ce chapitre sera donc organisé en deux parties. La première partie décriera les voies de synthèse initiales, et leur optimisation, puis les conditions de purification sous forme neutre ou formulées en sels. La seconde partie de ce chapitre sera dédiée à l'évaluation biologique (*in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*) de ces réactivateurs. Aussi l'apport d'une formulation ou d'une encapsulation *in vivo* sera discutée.

## II. Synthèse des réactivateurs non-chargés

Cette partie sera consacrée à l'obtention des réactivateurs **GM113**, **GM415**, **RM048**, **JR595** et **CG193** sous forme neutre et sous forme de sels à l'échelle du gramme.

## II.1. Analyse rétrosynthétique

La synthèse de nos oximes non-chargées a été développée et publiée précédemment.[36–38,40,488,491] Selon la polarité de l'amine deux stratégies peuvent être employées : une stratégie convergente et une stratégie linéaire à partir du précurseur commun **4**, obtenu à partir de l'acide 3-hydroxypicolinique **7** (**Figure 116**).

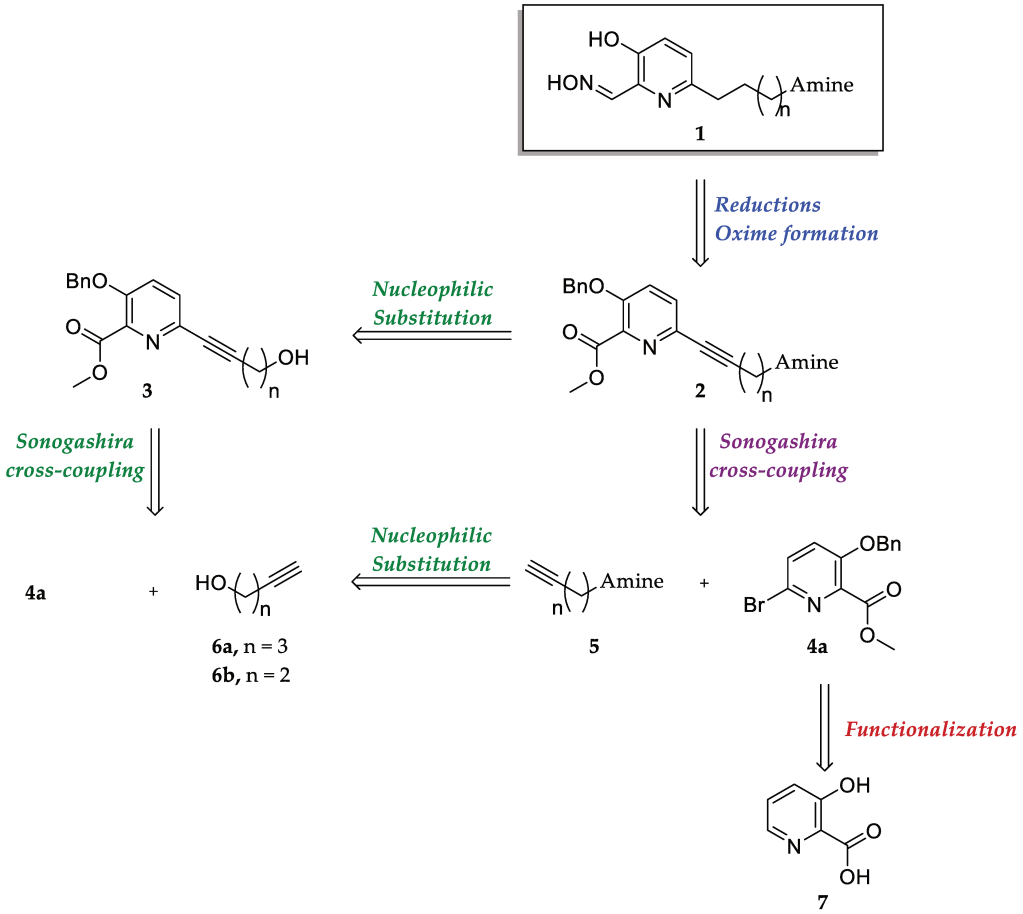



*Figure 116. Schéma rétrosynthétique des réactivateurs décrits dans ce chapitre*

La voie de synthèse convergente consiste à assembler d'une part, le bras espaceur et le ligand (intermédiaire **5**) puis de coupler cet intermédiaire par un couplage pallado-catalysée de Sonogashira avec la bromopyridine protégée **4a**. Cette voie de synthèse a été utilisée dans la synthèse du **GM113**.

La voie de synthèse linéaire, consiste à greffer de manière successive l'espaceur **6** pour obtenir l'intermédiaire **3**, puis le ligand après activation de la fonction alcool de **3** sous forme de tosylate ou mesylate puis substitution nucléophile pour obtenir l'intermédiaire **2**. En effet, l'utilisation du couplage de Sonogashira au niveau de l'étape-clef ne s'est pas systématiquementy avérée optimale : pour la plupart des amines étudiée, la polarité de l'amine ne permet pas d'obtenir le produit de couplage de Sonogashira avec de bons rendements et de hautes puretés. Dans le cas du **JR595**, une voie alternative a été tentée et sera décrite en détail dans une partie dédiée.

## II.2. Synthèse du fragment 4a

Précurseur de la fonction réactivatrice, le fragment **4a** est obtenu en 3 étapes à partir de l'acide 3-hydroxypicolinique **7** disponible commercialement (25 g – 918 € - Sigma Aldrich). La procédure classique consiste en une estérification (intermédiaire **8**) suivie d'une bromation en position 6 de la pyridine et enfin d'une protection du phénol **9** par un groupement benzyle (Bn – intermédiaire **4a** - **Figure 117**).

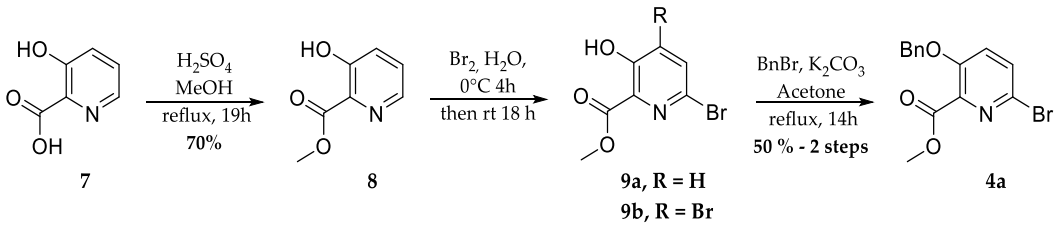



*Figure 117. Synthèse du fragment 4 – procédure initialement mise en place*

Cependant, quelques modifications ont été nécessaires pour pouvoir produire efficacement les différents réactivateurs sur l'échelle du gramme, le produit de départ étant relativement onéreux. Ces optimisations ont rendu ce procédé robuste et permettent l'obtention de l'intermédiaire **4a** à hauteur d'une vingtaine de grammes (**Figure 118**).

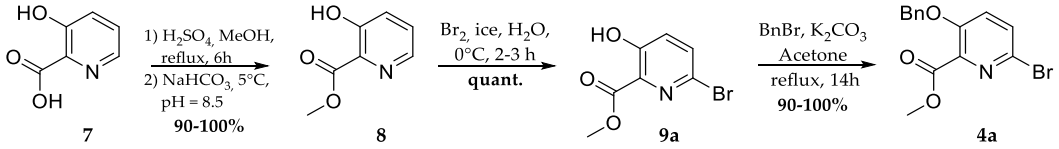



*Figure 118. Synthèse du fragment 4 – procédés modifiés*

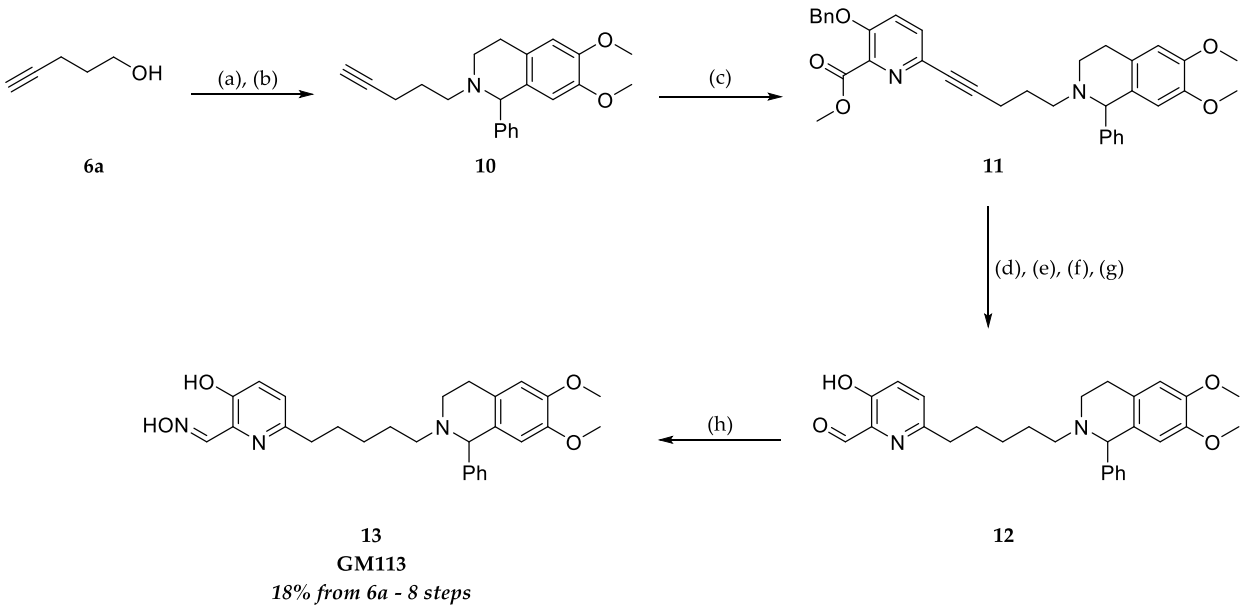
Concernant l'estérification, après concentration du brut réactionnel, il est nécessaire de passer à un pH basique à froid jusqu'à atteindre un pH de 8,5 afin de maximiser la récupération du produit lors des extractions successives. Un pH inférieur à 8 diminue le rendement de récupération tandis qu'un pH supérieur à 9 additionné à un mauvais contrôle de la température provoque une saponification du composé **8**. Le rendement, initialement de 70%, devient, dès lors, quantitatif (rendement variant entre 90 - 100% selon l'opérateur).

La bromation est véritablement l'étape limitante de ce procédé. En effet, la procédure usuelle produisait en plus du composé monobromé **9a** souhaité, le composé dibromé **9b** à hauteur de 20 % molaire (25 % massique), provoquant une perte sèche non-négligeable. Un strict contrôle de la température (0°C), du temps de réaction (2 à 3 h - suivi par CCM), couplé à une agitation vigoureuse et homogène permettent d'obtenir de manière sélective et quantitative le dérivé mono-bromé désiré **9a** pur après traitement aqueux. La benzylation étant aussi quantitative (90 - 100% selon l'opérateur après purification sur gel de silice), la production de cet intermédiaire clef se fait avec un rendement de 80 à 90% sur 3 étapes contre 35 % précédemment.

### II.3. Synthèse du GM113

La synthèse du **GM113** a été publiée en 2011 et est détaillée dans la **Figure 119**.[488] Le fragment **10** est obtenu par substitution nucléophile de l'alcool activé (sous forme de tosylate) par la PIQ (71 % sur deux étapes à partir de **6a**). Lorsque le mésylate est employé, le rendement chute de 20 % comparé au tosylate. Cela peut s'expliquer par une purification sur gel de silice plus aisée lors de l'emploi du tosylate comparé au mésylate.

Par la suite, le couplage pallado-catalysé entre les molécules **4a** et **10** permet d'obtenir l'intermédiaire **11** avec un rendement de 75% après purification sur colonne. Après hydrogénation (92%), une suite de trois réactions est employée pour générer l'aldéhyde **12**. Après protection du phénol sous forme d'éther silylé, l'ester est réduit en aldéhyde par l'emploi de DIBAL-H à -78 % puis l'éther silylé est clivé par le TBAF. Cette procédure de déprotection / reprotection, n'a pas pu être évitée, la protection du phénol sous forme d'éther de benzyle donnant les meilleurs rendements pour l'obtention du composé **11**, alors que la réduction de l'ester en aldéhyde donne de meilleurs rendements si le phénol est protégé sous forme d'éther silylé. L'hydrogénation, la génération de l'éther silylé et la réduction en aldéhyde ne nécessitent pas de purification (filtration sur celite - traitement aqueux), l'isolation de l'aldéhyde **12** déprotégé s'effectue à l'issu de la déprotection (colonne sur gel de silice, acétate d'éthyle : éther de pétrole 1:1). L'oxime finale **13** est alors obtenue après réaction avec l'hydroxylamine avec un rendement de 71 % (pureté HPLC > 98 %) après purification sur gel de silice. Le **GM113** est *in fine* obtenu avec rendement global de 18 % sur 6 étapes à partir de **6a** à hauteur de 20 mg (soit 40 mg en deux lots) avec une pureté HPLC de 98 %.




**6a** **10** **11**

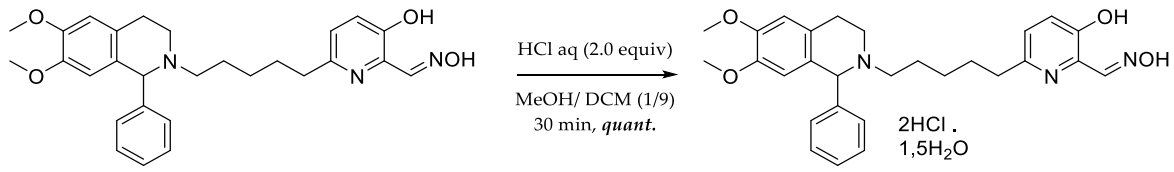
**13**
**GM113**
***18% from 6a - 8 steps***

**12**

(a) MsCl or TsCl, TEA, DCM, ***quant.***; (b) PIQ, $K_2CO_3$, ACN, reflux, ***71%***; (c) **4a,** $Pd(PPH_3)_4$ - 5 mol%, CuI - 10 mol%, TEA:DCM (1:2, v/v), rt, 12h, **75%**; (d) $Pd(OH)_2$, $H_2$, AcOEt, rt, 15h; (e) TBSCl, imidazole, DFM, 2h; (f) DIBAL-H, DCM, -78°C, 10 min; (f) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***4 steps - 49%***; (g) $NH_2OH.HCl$, NaOAc, EtOH, 1h, ***71%.***

***Figure 119.*** *Synthèse du GM113*

Le GM113 (**13**) a été par la suite transformé en chlorhydrate (**13a - Figure 120**), sans qu'aucune purification ne soit nécessaire à hauteur de 23 mg et envoyé au Dr Guilhem Calas (IRBA) pour l'étude pharmacocinétique sur la souris. Bien que la génération de ce chlorhydrate soit aisée (pas de purification nécessaire), sa caractérisation est beaucoup moins simple. En effet, le chlorhydrate est extrêmement hygroscopique rendant les analyses élémentaires difficiles à mettre en place. D'autres analyses auraient pu être utilisées telle que l'analyse thermogravimétrique (ATG), cependant cette analyse destructive nécessite 100 mg de produit final contre quelques milligrammes pour l'analyse élémentaire. Cette analyse élémentaire, et un contrôle final de la pureté par HPLC analytique nous ont permis de fournir un produit parfaitement caractérisé (en particulier en ce qui concerne la composition précise du sel), et dont la pureté finale a été évaluée à 97%



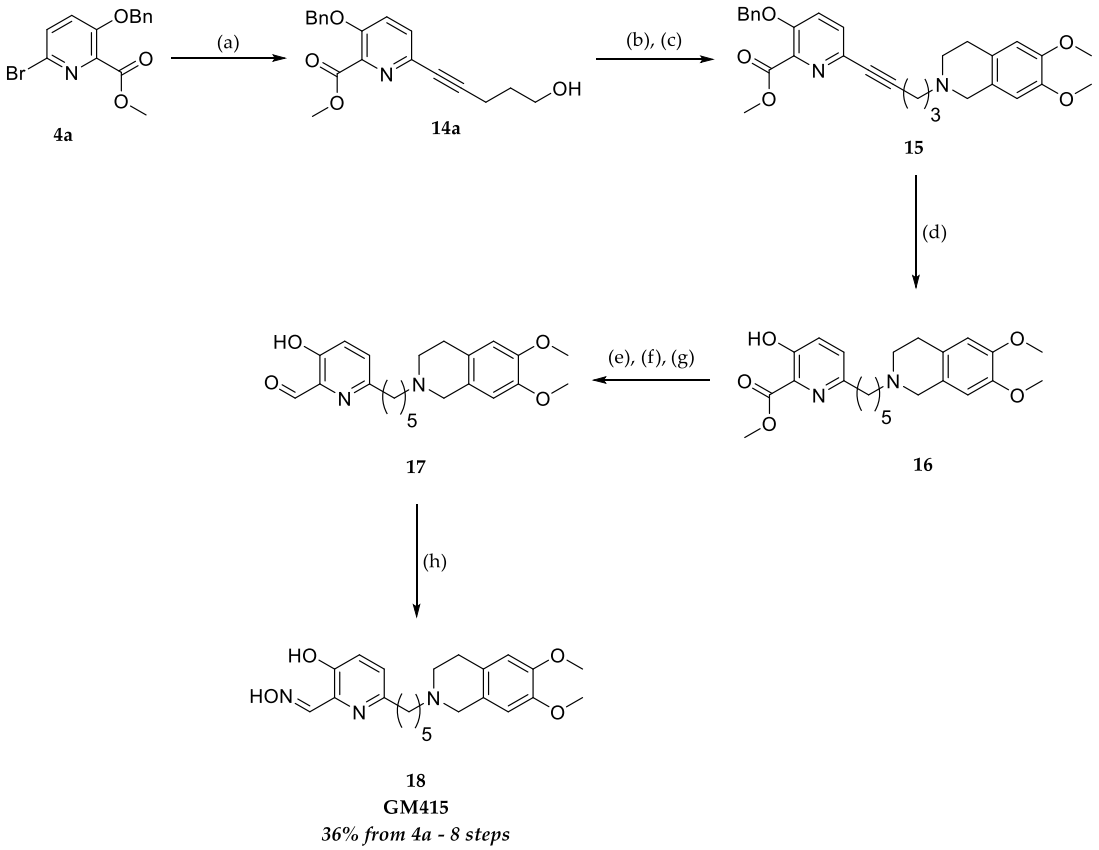

**GM113**
**13**

**GM113.HCl**
**(AB-178)**
**13a**

***Figure 120.*** *Génération du chlorhydrate du GM113*

## II.4. Synthèse du GM415

La synthèse du **GM415** a été effectuée de nombreuses fois au cours de ce doctorat. A l'opposé du **GM113**, la synthèse du **GM415** est totalement linéaire et permet d'obtenir la molécule finale avec un rendement de 36 % sur les 8 étapes à partir du précurseur **4a** (quantité maximale obtenue en 1 lot : 976 mg ; quantité totale synthétisée : 2.2 g - **Figure 121**).

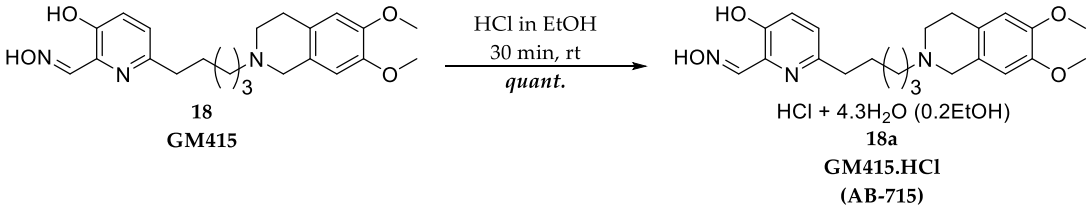



(a) **6a**, $Pd(PPH_3)_4$ - 5 mol%, CuI - 10 mol%, TEA:DCM (1:2), rt, 12h, ***quant.***; (b) MsCl or TsCl, TEA, DCM, ***quant.***; (c) **TIQ.HCl**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***74%***; (d) $Pd(OH)_2$, $H_2$, MeOH, rt, 14h, ***quant.***; (e) TBSOTf, TEA, DCM, 2h; (f) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (g) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***3 steps - 67%***; (h) $NH_2OH.HCl$, NaOAc, MeOH, 1h, ***73%***.

***Figure 121.*** *Synthèse du GM415*

Le couplage de Sonogashira permet d'obtenir l'intermédiaire **14a** de manière quantitative. L'activation de l'alcool sous forme de tosylate ou mésylate s'effectue de manière quantitative, et permet d'obtenir le produit de substitution **15** avec des rendements allant de 50 à 74% suivant le lot. Pour des raisons de temps de réaction, le mésylate est préférable dans cette synthèse (1h de réaction, traitement aqueux sans chromatographie pour le mésylate contre une nuit de réaction et une purification finale sur silice pour le tosylate), les deux permettent l'obtention de **15** avec des rendements comparables. Après hydrogénation catalytique, l'intermédiaire **16** subit la même séquence réactionnelle que précédemment permettant l'obtention de l'intermédiaire **17** avec un rendement acceptable de 67% (3 étapes). Enfin la génération de l'oxime **18** se fait dans les mêmes conditions que précédemment avec un rendement de 73 %. Le chlorhydrate du GM415 (**18a**) a été obtenue de manière quantitative (**Figure 122**) à hauteur de

570 mg. La pureté a été évaluée à 98% par HPLC analytique, et la composition précise du sel déterminée par analyse élémentaire (données calculées : %C : 51.48 ; %N : 7.68 ; %H : 8.04 ; données expérimentales %C : 51.70 ; %N : 7.59 ; %H : 7.60).



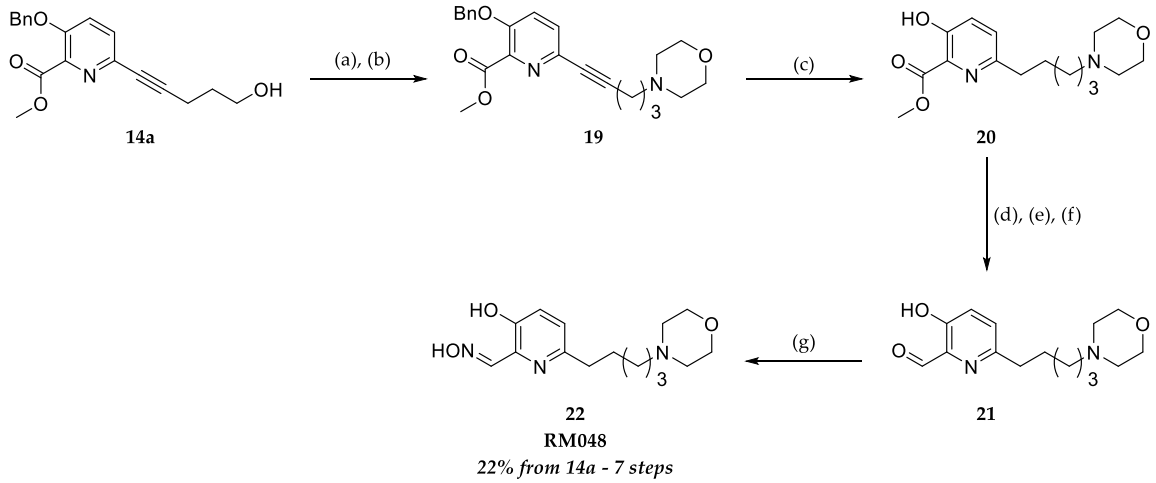

**18**
**GM415**

**18a**
**GM415.HCl**
**(AB-715)**

*Figure 122. Génération du chlorhydrate du GM415*

## II.5. Synthèse du RM048

La synthèse du **RM048** est identique à celle du **GM415**, l'oxime finale est obtenue avec un rendement global de 22 % à partir de l'intermédiaire **14a** (7 étapes), à hauteur de 800 mg (en deux lots) avec une pureté variant de 97 à 99 % (**Figure 123**).




**14a** **19** **20** **21** **22**
**RM048**
***22% from 14a - 7 steps***

(a) MsCl, TEA, DCM, ***quant.***; (b) **morpholine**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***74%***; (c) $Pd(OH)_2$, $H_2$, MeOH, rt, 14h, ***quant.***; (d) TBSOTf, TEA, DCM, 2h; (e) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (f) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***3 steps - 40%***; (g) $NH_2OH.HCl$, NaOAc, MeOH, 1h, ***76%***.

*Figure 123. Synthèse du RM048*

Différents sels de **RM048** ont été générés quasi-quantitativement incluant le chlorhydrate (**22a** ; HPLC : 97%, analyse élémentaire : données calculées : %C : 50.20 ; %N : 11.71 ; %H : 7.22 ; données expérimentales %C : 51.04 ; %N : 11.83 ; %H : 6.97) et le mésylate (**22b** - données calculées : %C : 48.23 ; %N : 10.55 ; %H : 7.08 ; %S : 8.05 ; données expérimentales %C : 48.43 ; %N : 10.98 ; %H : 6.91 ; %S 8.43) et envoyés au Dr Guilhem Calas (IRBA). Ce compose a été également fourni au Dr. Zrinka Kovarik (Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Croatie) sous forme neutre.

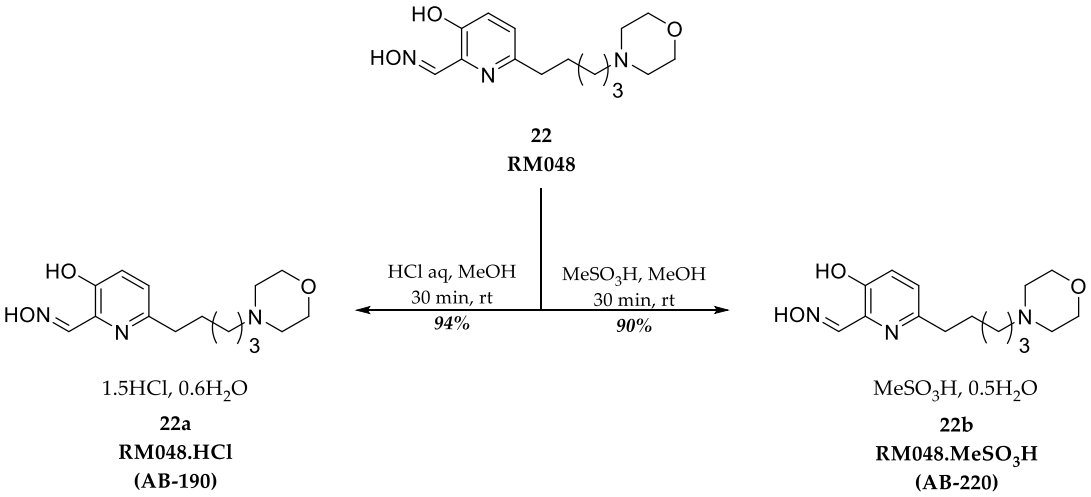



*Figure 124. Génération des sels de RM048*

## II.6. Synthèse du JR595

La synthèse du **JR595**, analogue en C4 du **RM048**, souffre d'une limitation importante au niveau de l'étape de substitution nucléophile. En effet, la substitution nucléophile est en compétition avec l'élimination du nucléofuge, entraînant une diminution drastique du rendement, le produit d'élimination étant favorisé par la présence d'une conjugaison étendue (**Figure 125**).

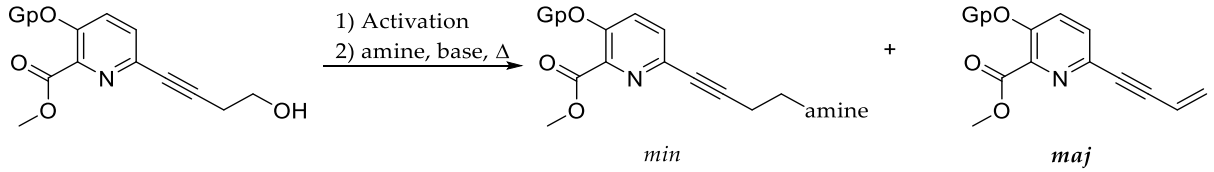
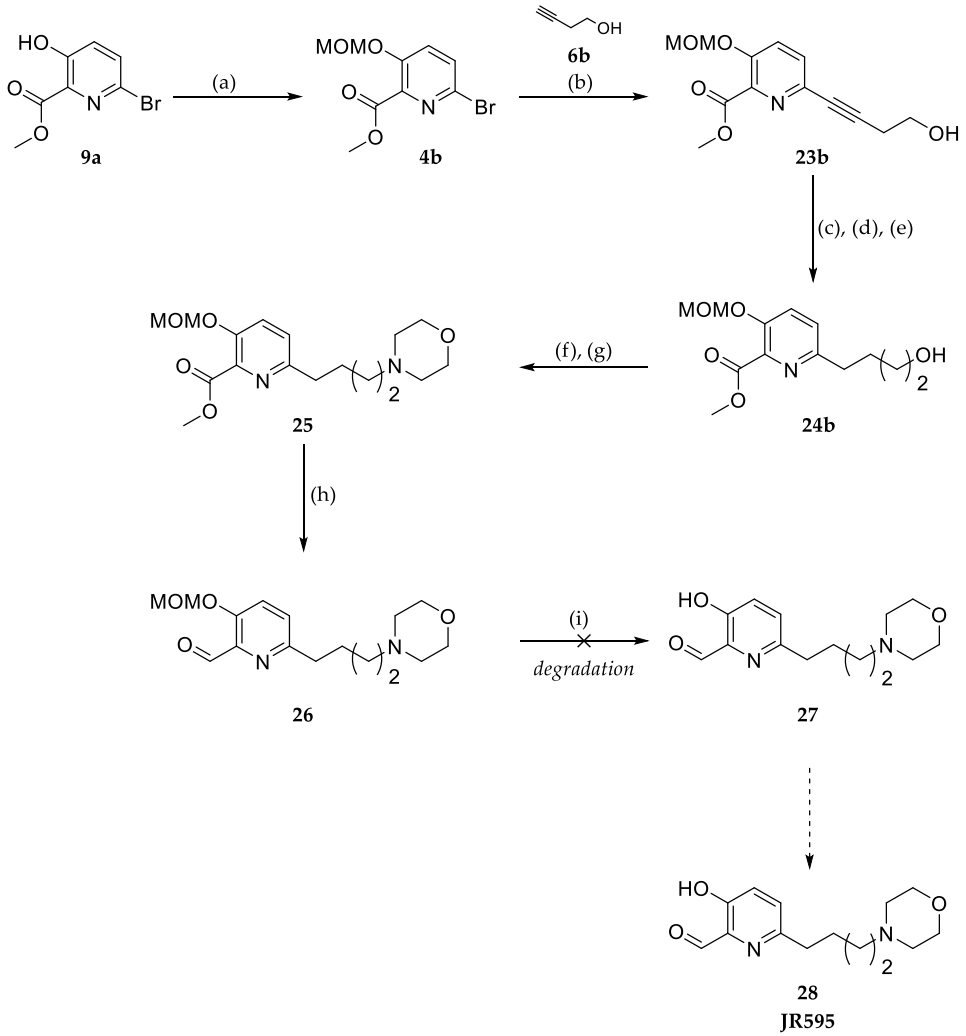



*Figure 125. Compétition entre la substitution nucléophile et l'élimination (Gp : groupement protecteur)*

De ce fait, une modification de la synthèse a été tentée de manière à effectuer la réduction du bras espaceur avant l'étape de substitution nucléophile, et donc, de limiter l'élimination (**Figure 126**). Pour se faire, la protection du phénol a été modifiée en éther de Méthoxyméthyle (MOM- **4b**) en lieu et place de l'éther benzylique **4a** afin de pouvoir réduire l'alcyne en alcane sans que l'hydroxy de la pyridine ne soit déprotégé. Ainsi, après couplage de Sonogashira de l'intermédiaire **4b** et **6b**, une succession de trois réactions consistant en une protection de l'alcool primaire **23** suivi de la réduction de l'alcyne en alcane par hydrogénation catalytique, et, enfin, d'une déprotection de l'alcool a permis l'obtention de l'intermédiaire **24** avec un rendement non-optimisé de 78% sur ces trois étapes. Cependant, malgré ce changement, le produit de substitution **25** n'a été obtenu qu'avec de faibles rendements (33 % en moyenne). La présence du groupe protecteur MOM en lieu et place de l'éther silylé rend également l'étape de réduction plus délicate. En présence du MOM, la génération de l'aldéhyde **26** par réduction au DIBAL-H est très rapide (1,5 min contre 10-15 min précédemment), il faut donc contrôler précisément et le temps de réaction et la quantité de réducteur utilisé. Malheureusement, la déprotection

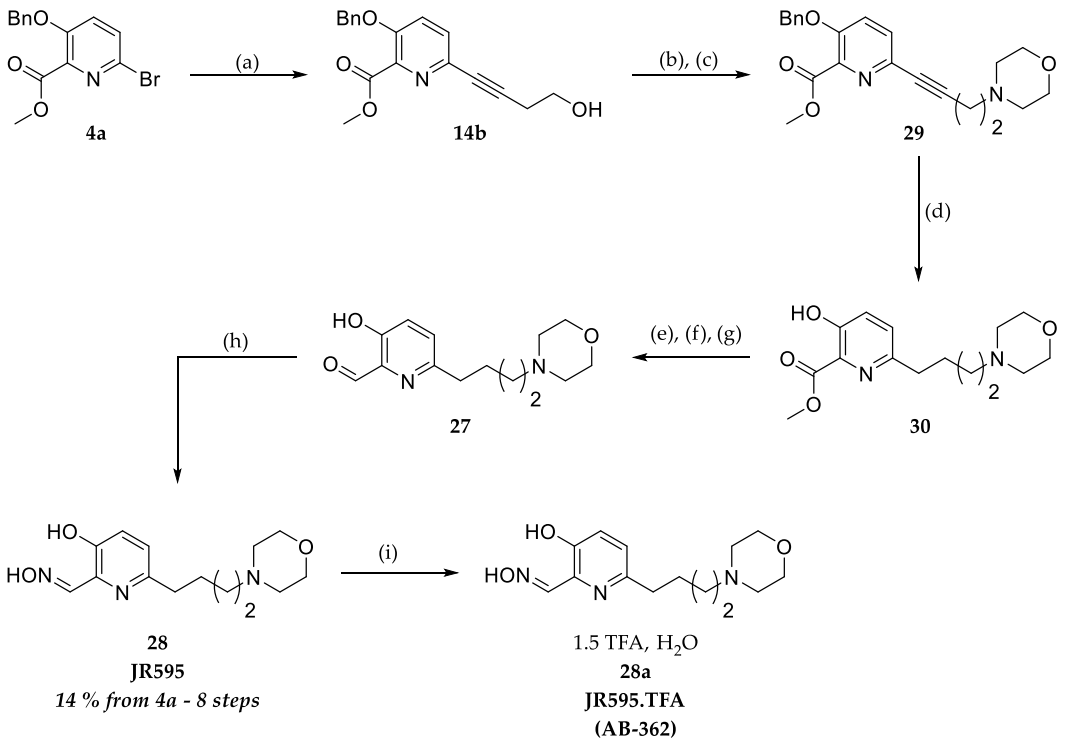
l'intermédiaire **26** a, dans les conditions employées, conduit à une dégradation de la molécule. D'autres conditions de réaction auraient pu être utilisées, mais le faible rendement de la réaction de substitution nucléophile pour obtenir l'intermédiaire **25**, qui globalement, n'améliorerait pas le rendement final en réactivateur, ne nous a pas encourager à poursuivre plus avant cette voie de synthèse alternative.




(a) MOMCl, NaH, DMF, 0°C, 1h, ***95%*** or MOMCl, $K_2CO_3$, Acetone, reflux, 12h, ***94%***; (b) $Pd(PPh_3)_4$ - 5 mol%, CuI - 10 mol%, TEA:DCM (1:2), rt, 12 h, ***94%*** ; (c) TBSCl, imidazole, DMF, 12h; (d) $Pd(OH)_2$, $H_2$ , MeOH, rt, 2h; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***3 steps - 78%***; (f) MsCl,TEA, DCM, 1h, ***quant.***; (g) **morpholine**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***33%***; (h) DIBAL-H, DCM, -78°C, 1.5 min, ***96%***; (i) TFA, DCM, 0°C to rt, 1h.

***Figure 126.*** *Tentative de modification de la synthèse du JR595*

Face à cet échec, la voie de synthèse classique a été reprise (**Figure 127**), un contrôle de l'étape de substitution nucléophile entre l'intermédiaire **14b** et la morpholine (température de réaction, nature du solvant) nous a, malgré tout, permis de minimiser la quantité de produit d'élimination, l'intermédiaire **29** ayant été obtenu avec un rendement acceptable de 58 %. *In fine*, le composé **JR595** a été obtenu à hauteur de 360 mg (pureté HPLC : 98%) avec un rendement global de 14 % à partir de l'intermédiaire **4a**.



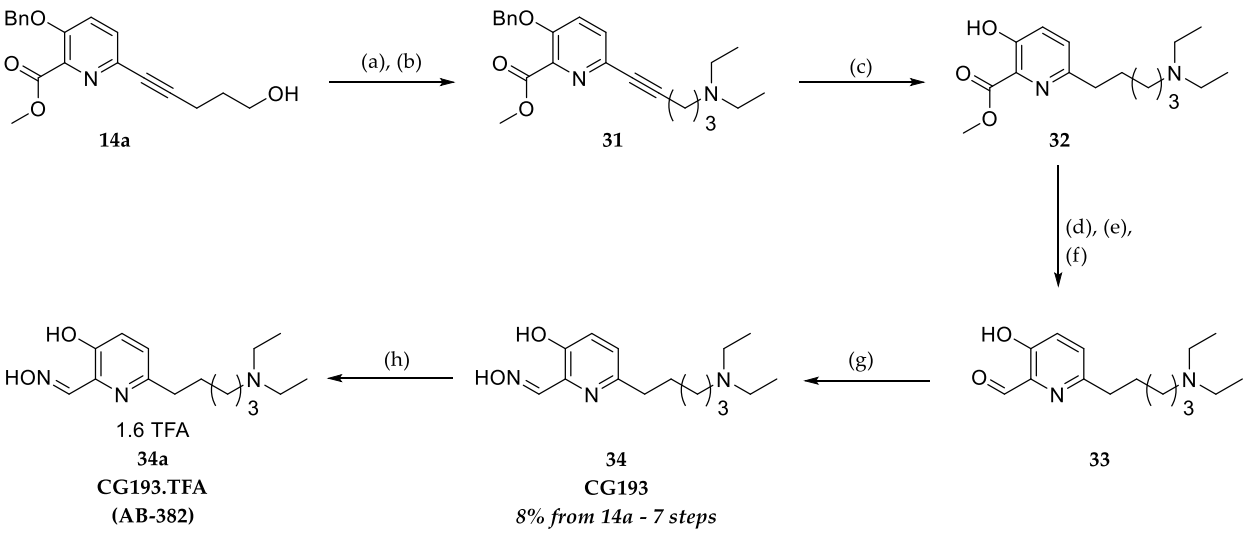

(a) **6b**, $Pd(PPh_3)_4$ CuI, TEA:DCM (1:3), rt, 12 h, ***94%***; (b) MsCl, TEA, DCM, ***quant.***; (c) morpholine, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, 58%; (d) $Pd(OH)_2$, $H_2$, MeOH, rt, 14h, ***quant.***; (e) TBSOTf, 2,6-lutidine, DCM, 12 h; (f) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (g) TBAF, THF, 0°C, 12 h, ***3 steps - 48%***; (h) $NH_2OH.HCl$, NaOAc, MeOH, 12h, ***73%***; (i) reverse phase purification, ***58%***.

***Figure 127.*** *Synthèse du JR595 – voie classique*

Le sel de trifluoroacétate de **JR595** (**28a**) a également été préparé *via* une purification en phase inverse du composé final en utilisant un mélange acétonitrile/eau/TFA (0.1%) comme phase mobile. Une étape de lyophilisation nous permet d'obtenir ce sel de trifluoroacétate avec un rendement de 50% (pureté HPLC : 98%), à hauteur de 168 mg, et dont la composition a été déterminée par analyse élémentaire (calculés : %N : 8.97 ; %C : 43.59 ; %H : 5.27 ; expérimental : %N : 8.70 ; %C : 43.79 ; %H : 5.16). Le **JR595** sous forme neutre et sous forme de sel de TFA a été expédié à l'équipe de Zrinka Kovarik (Zagreb, Croatie).

## II.7. Synthèse du CG193

La synthèse de ce réactivateur est identique a celle précédemment décrite pour la préparation du **GM415** et **RM048** (**Figure 128**). Le **CG193** a été obtenu, à hauteur de 200 mg, avec un rendement non-optimisé de 8% à partir de **14a** (7 étapes) et le sel de TFA a été généré *via* une purification finale en phase inverse (**34a** – pureté HPLC 97.98 %).




(a) TsCl, TEA, DCM, rt, 12h, ***quant.***; (b) **DIEA**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***41%***; (c) $Pd(OH)_2$, $H_2$, MeOH, rt, 14h, ***quant.***; (d) TBSOTf, TEA, DCM, 2h; (e) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (f) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***3 steps - 36%***; (g) $NH_2OH.HCl$, NaOAc, MeOH, 1h, ***50%***; (h) TFA, $H_2O$, MeOH, ***45%***

***Figure 128.*** *Synthèse du CG193*

## III. Evaluations biologiques des réactivateurs

De nombreuses évaluations biologiques *in vitro* et *in vivo* ont été menées sur ces différents réactivateurs par nos collaborateurs en Croatie, en Russie et en France. Les résultats, présentés ci-dessous, font, pour la plupart, l'objet de deux publications (une acceptée à Chemistry, a European Journal, une soumise à ACS Nano) qui seront annexées à la fin de ce manuscrit.

### III.1. Evaluations *in vitro*

#### III.1.1. Evaluation des propriétés physico-chimiques des réactivateurs

Afin d'évaluer la probabilité de passage des oximes aux travers de la BHE, la détermination de paramètres physico-chimiques des **GM415**, **RM048**, **GM113**, **CG193** et **JR595** a été effectué *in silico* et *in vitro*.

De nombreuses méthodes empiriques,[492,493] à l'image des règles de Lipinski[494,495] qui prévoit la biodisponibilité orale des composés, ont été élaborées pour évaluer le passage de la BBB. Ces règles se basent sur des propriétés physico-chimiques des composés comme le poids moléculaire (MW), le caractère lipophile (logP, logD), le nombre de liaisons hydrogène donneur (HDB), le nombre de liaisons hydrogène accepteur (HAB), le nombre de liaisons rotatives (RB), la surface polaire (PSA) et la valeur

du p*K*a.[496] Ces règles, décrites ci-dessous, sont généralement plus contraignantes que les règles de Lipinski. Les molécules candidates doivent donc avoir :

- une masse moléculaire plus faible (MW ≤ 450) ;
- une lipophilie modérée (logP ≤ 5) ;
- peu d'atomes accepteurs et donneurs de liaisons hydrogène (HBD ≤ 3 et HBA ≤ 7) ;
- peu de liaisons rotatives (RB ≤ 8) ;
- une faible surface polaire (PSA ≤ 70 Å$^2$).

Les différents résultats obtenus pour les réactivateurs **GM415**, **RM048**, **GM113**, **JR595** et **CG193** sont résumés dans la **Figure 129**.

Tous les réactivateurs évalués ont des valeurs optimales de lipophilie (logP = 1.2-3.1) et des nombres optimaux HBD (2) et HBA (6-7). La limite de poids moléculaire n'est pas respectée dans le cas du **GM113**. La flexibilité moléculaire, caractérisée par le nombre de liaisons rotatives (6-10), est favorable pour les **RM048** et **JR595**. Le défaut commun de ces oximes est leur surface polaire trop élevée (78-87 Å$^2$).

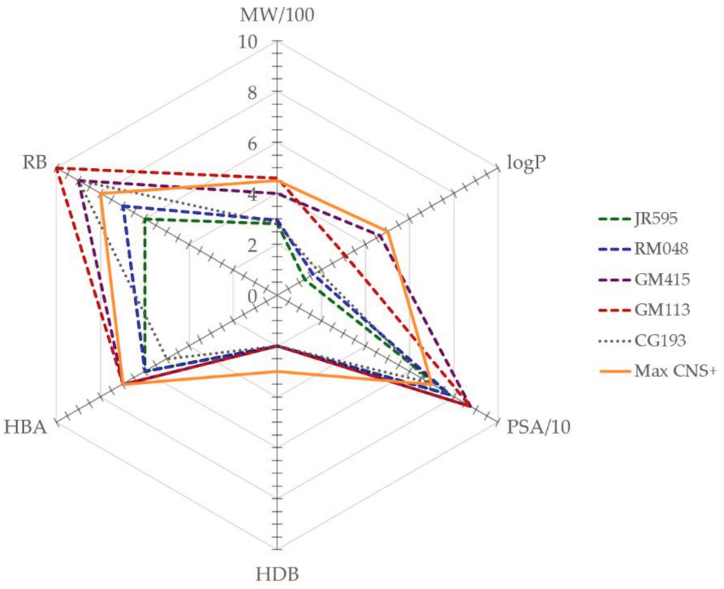



***Figure 129.*** *Tracé radar des propriétés physicochimiques prédites des réactivateurs (masse moléculaire MW, logP, nombre de liaison hydrogène donneurs HDB, nombre de liaison hydrogène accepteurs HAB, nombre de liaisons rotatives RB, surface polaire PSA ; en orange, les valeurs maximales conseillée pour une molécule CNS+).*

De même, le p*K*a du groupement le plus basique (c'est-à-dire l'amine, **Tableau 45**) se situe dans la fourchette recommandée (7-10) à l'exception du **CG193**. Aussi, les p*K*a ont été déterminés *in vitro* par l'équipe de Zrinka Kovarik, montrant la bonne corrélation entre les outils de prédiction *in silico* et *in vitro*.

| *Oximes* | *pKa in silico* | | | | *pKa in vitro* | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Oxime* | *Phénol* | *Pyridine* | *Amine* | *$pKa_1$* | *$pKa_2$* |
| ***JR595*** | ***8.33*** | ***10.33*** | ***3.29*** | ***7.32*** | *8.08 ± 0.04* | *10.53 ± 0.21* |
| ***RM048*** | ***8.37*** | ***10.33*** | ***3.41*** | ***7.50*** | *8.03 ± 0.06* | *nd* |
| ***GM415*** | ***8.52*** | ***10.33*** | ***3.44*** | ***7.89*** | *8.20 ± 0.06* | *10.44 ± 0.27* |
| ***GM113*** | ***10.34*** | ***8.89*** | ***3.44*** | ***7.82*** | - | - |
| ***CG193*** | ***8.14*** | ***10.03*** | ***3.55*** | ***10.63*** | - | - |

***Tableau 45.*** *Tableau des pKa par prédiction in silico (MarvinSketch 16.11.7) et mesurés in vitro*

A partir d'un algorithme décrit récemment par Wager et coll, [497–499] les scores CNS MPO (Central Nervous System Multi-Parameter Optimization) ont été calculés pour les cinq réactivateurs. Ce score multifactoriel prend en compte six paramètres physicochimiques fondamentaux (LogP, LogD, pKa, HDB, PSA, MW) et permet de prédire le passage des candidats au travers la BHE. La méthode de calcul est détaillée dans la **Figure 130**. Le score CNS MPO est obtenue selon l'équation : **MPO score=** $\sum \mathbf{T0_{paramètres}}$ où T0 est la désirabilité comprise entre 0 et 1 (0 est le plus défavorable et 1 le plus favorable).

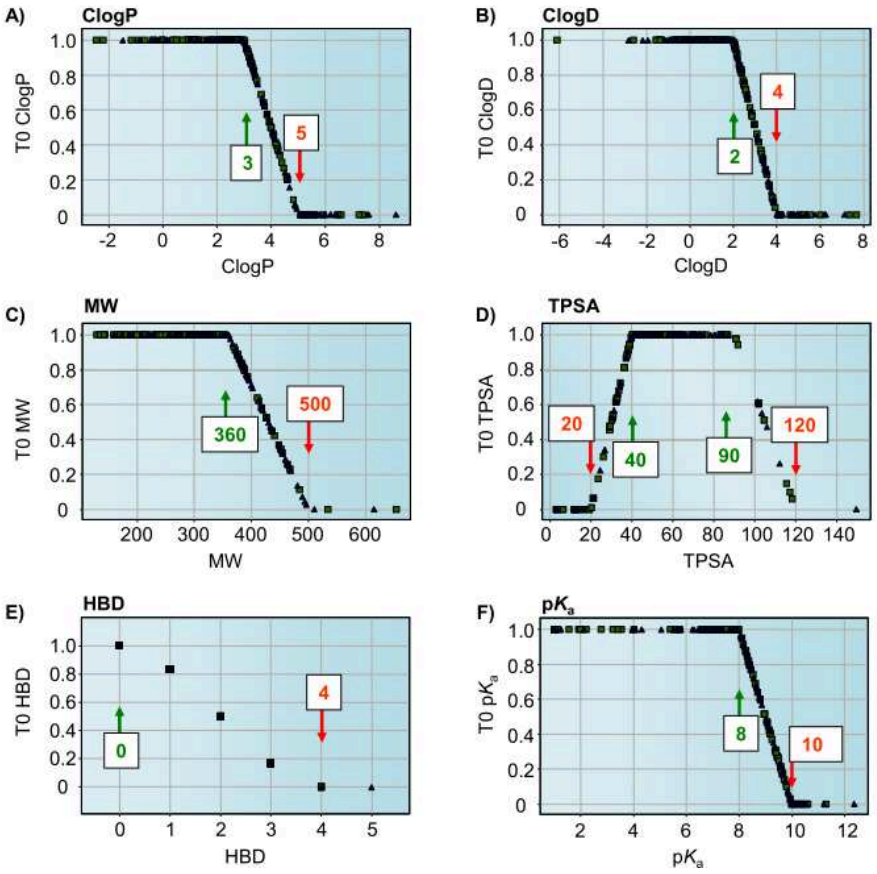



***Figure 130.*** *: Détails du calcul des scores CNS-MPO[497]*

Un score supérieur ou égal à 4 (sur une échelle de 0-6) est donc un indicateur prédisant un passage efficace de la BHE. Les scores des cinq oximes **RM048**, **GM415**, **JR595** et **CG193** sont favorables à l'exception du **GM113** : **RM048 = 5.5 ; JR595 = 5.5, GM415 = 4.8, CG193 = 4.5** et **GM113 = 2.5**.

En conclusion, les composés **RM048** et **JR595** possèdent les propriétés physico-chimiques les plus favorables pour prédire une bonne pénétration dans le CNS.

Enfin, la pénétration cérébrale des **JR595**, **RM048** et **GM415** par diffusion passive a été évaluée par le Dr Bélen Pérez (Université Autonome de Barcelone, Espagne), en utilisant le test de perméation de membrane artificielle (PAMPA-BBB). La perméabilité *in vitro* ($P_e$) des oximes au travers d'un extrait lipidique de cerveau de porc a été déterminée en utilisant une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) / EtOH (70/30). La validation du test a été effectuée en comparant les valeurs de perméabilité expérimentales et issues de la littérature de quatorze médicaments commerciaux, donnant une bonne corrélation linéaire ($R^2 = 0,9199$) :

$$\mathbf{P_e\ (expérimentale) = 1,4525\ P_e\ (littérature) - 0,4926.}$$

En utilisant cette équation et les limites de perméabilité de la BHE établies par Di et coll,[500] les fourchettes suivantes de perméabilité $P_e$ ont été établies :

- $P_e > 5,3$ pour les composés à haute perméabilité à la BHE (CNS +)
- $P_e < 2,4$ pour les composés à faible pénétration de la BHE (CNS -)
- $5,3 > P_e > 2,4$ pour les composés à pénétration incertaine de la BHE (CNS ±).

Selon le résultat du test PAMPA, le transport passif à travers la BHE a été observé pour toutes les oximes testées (**Tableau 46**). À titre de comparaison, les oximes standards HI-6 et 2-PAM se sont avérées imperméables à la BHE lors d'un test PAMPA similaire.[501]

| *Oxime* | $P_e$ ($10^{-6}$ cm $s^{-1}$) |
|---|---|
| JR595 | 6.1 ± 0.5 (CNS+) |
| RM048 | 8.1 ± 0.31 (CNS+) |
| GM415 | 12.1 ± 1.9 (CNS+) |

***Tableau 46.*** *Perméabilité à la BHE in vitro ($P_e$) du JR595, RM048, GM415 obtenues lors du test PAMPA*

En conclusion, les résultats de prédiction de passage de la BHE *in silico* and *in vitro* réalisés pour les cinq réactivateurs **GM415, RM048, GM113, CG193 et RM048** montrent que les composés **RM048 et JR595** présentent les probabilités les plus fortes d'un passage vers le CNS.

### III.1.2. Inhibition des ChEs natives et étude cristallographique

Les constantes d'inhibitions réversibles $K_i$ des **JR595**, **RM048** et **GM415** sur les cholinestérases humaines en présence d'acétylthiocholine, ont été déterminées *in vitro* par l'équipe de Zrinka Kovarik (Zagreb, Croatie) et comparées au HI-6 et au 2-PAM (**Tableau 47**). Toutes les constantes cinétiques sont de l'ordre du micromolaire. Le **GM415** et le **RM048** inhibent de la même manière l'AChE et la BChE tandis que le **JR595** montre une sélectivité pour la BChE (46 µM contre 135 µM pour l'AChE). Les faibles affinités obtenues pour l'AChE et la BChE natives (notamment pour **RM048**) montrent que ces composés sont de relativement faibles inhibiteurs de ces deux enzymes (condition importante à respecter pour développer des réactivateurs efficaces).

| Oximes | $K_i$ *h*AChE (µM) | $K_i$ *h*BChE (µM) |
|---|---|---|
| JR595 | 135 ± 14 | 46 ± 20 |
| RM048 | 168 ± 23 | 170 ± 15 |
| GM415 | 37 ± 1.1 | 33 ± 1.2 |
| HI-6 | 46 ± 4.3 | 420 ± 100 |
| 2-PAM | 210 ± 45 | 140 ± 16 |

***Tableau 47.*** *Constantes d'inhibition réversible $K_i$ des oximes sur les hChEs à 25 °C.*

Ces observations ont été confirmées par la détermination, par diffraction des rayons X, de la structure du complexe *Tc*AChE/**RM048** (code PDB : 6EWK – **Figure 131**), obtenue par l'équipe de Martin Weik (IBS, Grenoble). Cette structure montre l'orientation favorable de l'oxime du RM048 vers la serine catalytique à une distance de 3.5 Å dans le site actif dans l'enzyme. Ce positionnement favorable du réactivateur est dû à une interaction de type π-π stacking entre le noyau pyridine et le Trp84 (Trp86 de la *h*AChE), une liaison hydrogène formée entre une molécule d'eau et l'oxime dans le site catalytique, et une interaction de type cation-π entre l'azote protoné de la morpholine et le Trp279 (équivalent au Trp286 de la *h*AChE) dans le site périphérique. RM048 est également stabilisé dans cette structure par une molécule de PEG (issue des conditions de cristallisation).

La superposition avec les structures cristallines des conjugués sarin-*h*AChE (code PDB : 5FPQ)[256] et VX-*Tc*AChE (code PDB : 1VXR)[111] montre que le **RM048** pourrait se lier à la *h*AChE phosphorylée dans la même orientation active que celle observée dans la structure cristalline native (**Figure 131**).

La liaison spécifique de la partie morpholine au site périphérique lui confère un avantage par rapport à la 2-PAM, qui se lie uniquement au site catalytique stabilisé par des interactions π-π avec Trp84 (Trp86 dans la *h*AChE) et dont l'oxime pointe à l'opposé de la sérine catalytique phosphorylée ou native (code PDB 2VQ6; code PDB : 2WG1).[110,502] Le HI-6 se lie également au site périphérique, cependant, en raison de son $K_i$ faible, c'est aussi un relativement bon inhibiteur de l'AChE native, caractéristique défavorable pour les réactivateurs.

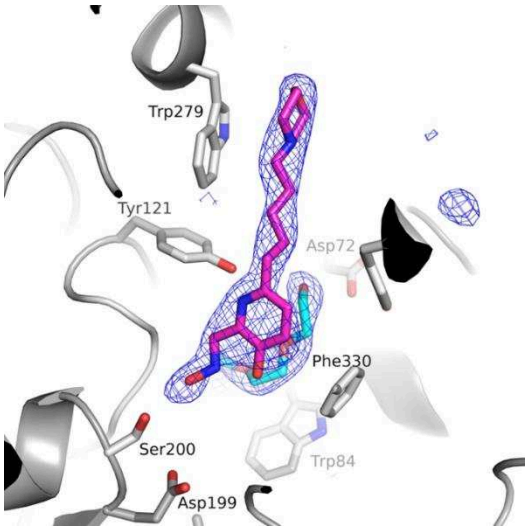



***Figure 131.*** *Structure cristalline de la TcAChE en présence du RM048 (oxime en magenta ; PEG en cyan ; code PDB : 6EWK).*

*In vivo*, en l'absence de PEG, l'oxime pourrait osciller entre diverses conformations comme cela a été observé dans d'autres structures cristallines de complexes AChE/oximes (par exemple, oxime de bis-imidazolium **2BIM-7**, code PDB : 5BWB ; **ortho-7**, code PDB : 5BWC).[503] Dans les complexes de l'AChE avec d'autres oximes, un changement conformationnel de la chaîne latérale de Trp279 (Trp286 dans la *h*AChE) a été rapporté (**Figure 132**).[503] Cependant, dans le complexe **RM048**-*Tc*AChE, la chaîne latérale Trp279 conserve sa conformation native.

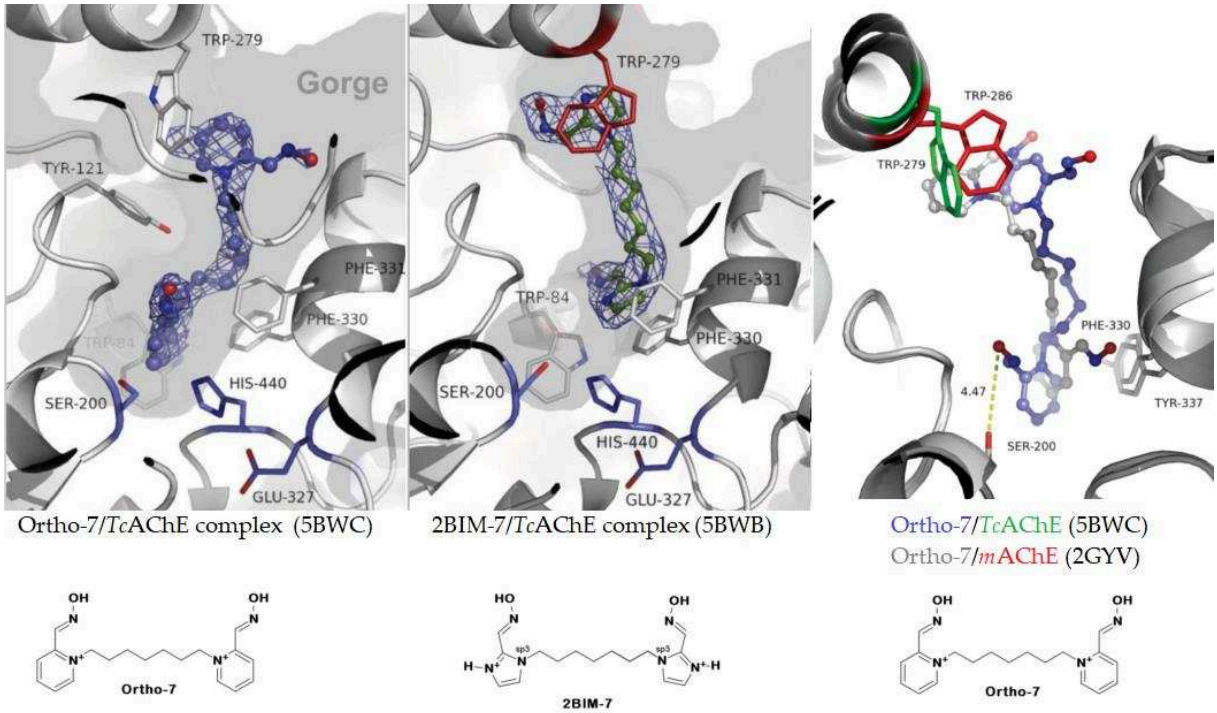



***Figure 132.*** *Exemple de structures cristallines des AChEs en présence de bis-oximes.*[503]

### III.1.3. Réactivation des ChEs inhibées par des NOPs

Les capacités réactivatrices des oximes ont été évaluées sur l'AChE inhibée par différents NOPs (VX sarin, Tabun, cyclosarin et paraoxon) par l'équipe de Zrinka Kovarik (**Tableau 48**). Sur l'ensemble des *h*AChEs empoisonnées par différents NOPs testés, les oximes permettent une restauration de 80 à 100 % de l'activité enzymatique. Ces molécules présentent donc un large spectre d'action.

Dans le cas du VX, les dérivées de la morpholine, bien que les affinités soient plus faibles (2 à 5 fois) comparées à celle du HI-6, présentent des vitesses de réactivation deux fois plus importantes. Le **GM415**, avec une affinité six fois supérieure à celle du HI-6 pour l'enzyme phosphylée, réactive à la même vitesse que le HI-6. Les efficacités globales sont donc équivalentes voire supérieures dans le cas du **GM415**. Cette observation est aussi valable dans le cas du cyclosarin.

Dans le cas de la *h*AChE inhibée par le sarin, les vitesses et les affinités de nos réactivateurs sont inférieures à celles du HI-6. Cependant, le HI-6 ne réactive que 90% des enzymes tandis que nos oximes régénèrent 90 à 100 % de l'activité enzymatique.

Enfin, le HI-6 réactive peu, voire pas, les *h*AChEs inhibées par le paraoxon ou le tabun. Nos molécules réactivent ces deux enzymes empoisonnées avec des efficacités non-négligeables.

| OP | Oxime (µM) | $k_r$ ($min^{-1}$) | $K_D$ (µM) | $k_{r2}$ ($M^{-1}$ $min^{-1}$) | $React_{max}$ % (t min) |
|---|---|---|---|---|---|
| VX | JR595 | 0.68 ± 0.07 | 300 ± 60 | 2270 ± 240 | 100 (10) |
| | RM048 | 0.57 ± 0.08 | 120 ± 50 | 4900 ± 1250 | 100 (10) |
| | GM415 | 0.31 ± 0.01 | 10 ± 3 | 30900 ± 8100 | 100 (10) |
| | HI-6[a] | 0.33 ± 0.02 | 60 ± 10 | 5740 ± 1120 | 90 (15) |
| Sarin | JR595 | 0.29 ± 0.03 | 270 ± 90 | 1080 ± 290 | 100 (10) |
| | RM048 | 0.12 ± 0.01 | 220 ± 60 | 560 ± 130 | 100 (30) |
| | GM415 | 0.180 ± 0.005 | 130 ± 10 | 1380 ± 60 | 90 (15) |
| | HI-6 | 0.9 ± 0.1 | 170 ± 40 | 5420 ± 780 | 60-90 (4) |
| Cyclosarin | JR595 | 0.09 ± 0.01 | 430 ± 130 | 210 ± 40 | 100 (45) |
| | RM048 | 0.04 ± 0.01 | 120 ± 80 | 320 ± 140 | 100 (100) |
| | GM415 | 0.020 ± 0.006 | 120 ± 100 | 170 ± 90 | 100 (120) |
| | HI-6[b] | - | - | 22100 ± 1300 | 100 (< 1) |
| Tabun | JR595 | 0.016 ± 0.007 | 410 ± 280 | 40 ± 10 | 80 (120) |
| | RM048 | 0.014 ± 0.001 | 310 ± 100 | 45 ± 10 | 90 (240) |
| | GM415 | 0.014 ± 0.002 | 140 ± 60 | 100 ± 40 | 80 (210) |
| | HI-6 | nd[c] | nd | nd | 10 (24h) |
| Paraoxon | JR595 | 0.36 ± 0.03 | 850 ± 150 | 430 ± 40 | 80 (10) |
| | RM048 | 0.27 ± 0.03 | 620 ± 180 | 440 ± 80 | 80 (15) |
| | GM415 | 0.24 ± 0.02 | 190 ± 70 | 1300 ± 350 | 80 (10) |
| | HI-6 | 0.026 ± 0.001 | 590 ± 50 | 50 ± 2.2 | 90 (170) |

***Tableau 48.*** *Cinétique de réactivation des oximes sur la hAChE inhibée par différents NOPs ([a] Maček Hrvat 2016;[182] [b] dépendance linéaire du $k_{obs}$ par rapport à la concentration d'oxime dans l'intervalle de concentration étudiée ; [c] non déterminé).*

Face à ces excellents résultats, les molécules ont été évaluées en test de réactivation sur la *h*BChE inhibée par les mêmes NOPs (**Tableau 49**). Bien que, cette fois-ci, les molécules n'agissent pas à large spectre (pas de réactivation dans le cas du sarin), le GM415 est le plus efficace dans le cas de la *h*BChE inhibée par le VX, le cyclosarin, le tabun et le paraoxon. Cependant, les résultats restent moins bons que dans le

cas de l'*h*AChE. Une explication à cette différence de réactivité serait la différence structurale des deux enzymes. En effet, la BChE ne possède pas un site périphérique aussi important que celui de l'AChE limitant ainsi les interactions et donc l'affinité des ammoniums envers la BChE inhibée par les NOPs.

| OP | Oxime (µM) | $k_r$ ($min^{-1}$) | $K_D$ (µM) | $k_{r2}$ ($M^{-1}$ $min^{-1}$) | $React_{max}$ % (t min) |
|---|---|---|---|---|---|
| VX | JR595 | 0.10 ± 0.04 | 370 ± 240 | 270 ± 70 | 100 (60) |
| | RM048 | 0.059 ± 0.004 | 160 ± 40 | 360 ± 65 | 80 (60) |
| | GM415 | 0.096 ± 0.007 | 130 ± 30 | 760 ± 150 | 80 (45) |
| | HI-6[a] | 0.12 ± 0.03 | 370 ± 230 | 330 ± 230 | 85 (120) |
| Sarin | JR595 | 0.005 ± 0.001[b] | - | - | 90 (325) |
| | RM048 | 0.0036 ± 0.0004[b] | - | - | 65 (325) |
| | GM415 | 0.007 ± 0.002[b] | - | - | 80 (325) |
| | HI-6 | 0.04 ± 0.02 | 270 ± 200 | 150 ± 40 | 100 (300) |
| Cyclosarin | JR595 | 0.5 ± 0.1 | 790 ± 420 | 610 ± 180 | 90 (10) |
| | RM048 | 0.39 ± 0.05 | 700 ± 190 | 560 ± 80 | 90 (15) |
| | GM415 | 0.32 ± 0.07 | 330 ± 140 | 980 ± 210 | 90 (15) |
| | HI-6[c] | - | - | 780 ± 30 | 90 (30) |
| Tabun | JR595 | nd | nd | nd | < 10 (24h) |
| | RM048 | nd | nd | nd | < 20 (24h) |
| | GM415 | 0.004 ± 0.001 | 540 ± 290 | 7.9 ± 2.8 | 40 (24h) |
| | HI-6[d] | 0.0016 ± 0.0004 | 1800 ± 1000 | 0.91 ± 0.57 | 25 (18h) |
| Paraoxon | JR595 | 0.15 ± 0.02 | 1160 ± 310 | 130 ± 20 | 90 (40) |
| | RM048 | 0.056 ± 0.006 | 250 ± 80 | 230 ± 50 | 100 (90) |
| | GM415 | 0.075 ± 0.01 | 290 ± 110 | 260 ± 70 | 100 (90) |
| | HI-6 | 0.0068 ± 0.0004 | 450 ± 70 | 15 ± 2 | 80 (500) |

***Tableau 49.*** *Cinétique de réactivation des oximes sur la hBChE inhibée par différents NOPs ([a] Katalinić 2016;[183] [b] $k_{obs}$ ($min^{-1}$) ± S.D., à une concentration d'oxime donnée ; [c] dépendance linéaire du $k_{obs}$ par rapport à la concentration d'oxime dans l'interval de concentration étudié ; [d] Čalić 2006[406])*

### III.1.4. Cytotoxicité

La cytotoxicité ainsi que la distribution dans les tissus ont été évalués par l'équipe de Zrinka Kovarik. Les différentes oximes ont été testées sur les cellules de type SH-SY5Y qui est un type cellulaire utilisé comme modèle *in vitro* des fonctions neuronales.[504] Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité en comparaison avec les cellules non traitées. Parmi la série de réactivateurs, le **GM415** présente une toxicité non négligeable en comparaison avec les autres réactivateurs de ce chapitre (**Figure 133**). Cependant, la différence entre concentrations étudiées et celles réellement présentes dans le SNC (**III.3.3**) est 1000 fois inférieure, de ce fait, il est fort probable qu'*in vivo*, la toxicité neuronale soit moindre. Les valeurs de cytotoxicité sont détaillées dans le **Tableau 50**.

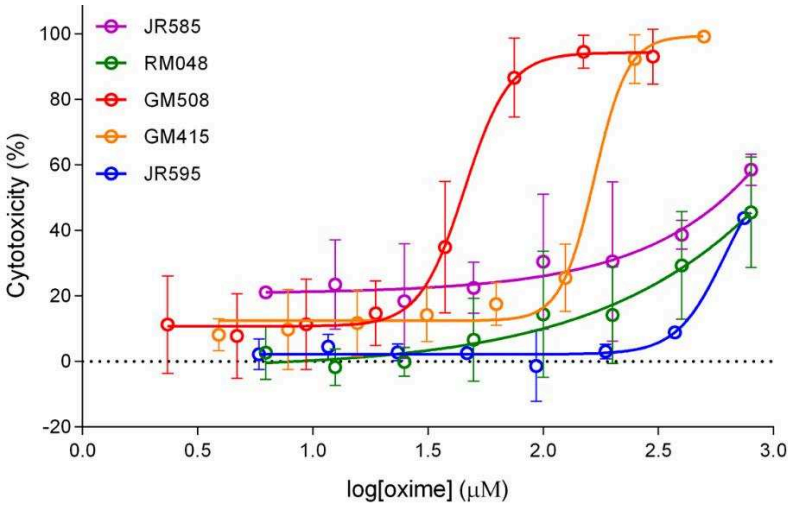



***Figure 133.*** *Cytotoxicité des réactivateur sur les cellules de types SH-SY5Y (considérée comme l'inverse de la viabilité des cellules)*

En analysant les structures testées, le motif tétrahydroisoquinoléine semble responsable de cette toxicité. En effet, le **GM508** est environ 3.8 fois plus toxique que le **GM415**. Aussi, le remplacement de ce motif par une pipéridine (**JR585**) rend le réactivateur 4 fois moins toxique *in vitro*. Enfin, l'ajout de l'oxygène dans l'hétérocycle permet d'avoir des molécules faiblement toxiques (**JR595**, **RM048**).

| Oximes | Concentration testée (µM) | $IC_{50}$ 24 h (µM) |
|---|---|---|
| **JR585** | 6.25 - 800 | 630 |
| **JR595** | 6.25 - 800 | > 800 |
| **RM048** | 6.25 - 800 | > 800 |
| **GM415** | 3.91 - 500 | 159 |
| **GM508** | 2.34 - 300 | 42 |
| HI-6 | 6.25 - 800 | > 800 |
| 2-PAM | 6.25 - 800 | > 800 |

***Tableau 50.*** *Cytotoxicité sur les cellules SH- SY5Y par mesure de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes (MTS).*

### III.1.5. Interaction avec les récepteurs nicotiniques de type $\alpha 7$

Lorsque l'AChE est inhibée, l'ACh s'accumule dans la fente synaptique et conduit à une surstimulation des récepteurs nicotiniques (nAChRs) mais aussi muscariniques (mAChRs), ce qui se traduit par la phase cholinergique aigüe. Ainsi, limiter les activités de ces récepteurs permettrait de maintenir une transmission neuronale « normale » malgré l'inhibition de l'AChE et ainsi limiter les conséquences de l'intoxication. Présente dans le traitement d'urgence, l'atropine inhibe les nAChRs mais n'agit pas sur les mAChRs. Les oximes, outre leur activité réactivatrice, ont la capacité d'interagir avec les récepteurs cholinergiques notamment les récepteurs nicotiniques (nAChR) de type $\alpha 7$, récepteurs colocalisés avec l'AChE.[505,506] Ce phénomène, bien qu'observé pour le HI-6 et la 2-PAM,[507] n'est pas complètement

appréhendé et fait l'objet d'un intérêt croissant.[268] En effet, une oxime « multi-cible » capable d'agir à la fois sur l'AChE et les récepteurs de l'ACh constituerait une avancée majeure dans le domaine.

L'effet du **GM415** et du **RM048** a donc, dans un premier temps, été évalué sur les ovocytes de *Xenopus laevis* exprimant le nAChR neuronal humain de type $\alpha$7 par le Dr Romulo Araoz (Laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologies, CEA Saclay, Institut des Neurosciences Paris-Saclay, UMR 9197 CNRS),[508] avec comme objectif de mettre en évidente un effet antagoniste de nos molécules.

A une concentration de 10µM de **RM048**, le pourcentage d'inhibition est d'environ 50% mais est totalement réversible (**Figure 134**). *A contrario*, le **GM415** inhibe plus fortement le courant cholinergique et le taux de réversibilité est moins important. La réversibilité de chaque composé dépend de leur structure et des interactions qu'ils peuvent établir au sein du site orthostérique (en assumant que ce soient des antagonistes compétitifs). L'antagoniste (oxime dans ce cas) stabilise alors un état conformationnel du récepteur dit fermé. Le **GM415**, de part sa structure, pourrait mieux s'ancrer dans le site d'interaction.

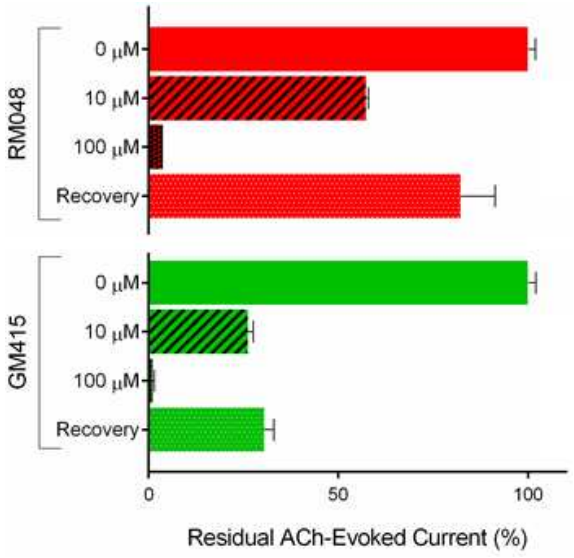



***Figure 134.*** *Effet antagoniste sur le récepteur α7 RnACh humain des oximes RM048 et GM415 (technique HiClamp)*

A titre de comparaison, les K027, K203, HI-6 et l'obidoxime ont été testés sur les récepteurs nicotiniques et présentent des inhibitions bien plus faibles que celles présentées par nos oximes (**Tableau 51**).[505]

| Réactivateurs | HI-6 | Obidoxime | K027 | K203 |
|---|---|---|---|---|
| Inhibition à 200 µM (%) | 51 | 45 | 31 | 50 |

***Tableau 51.*** *Inhibition des RnAChE in vitro*[505]

L'étude de la réponse de ce récepteur en fonction de la dose de **RM048** a donc été étudiée (**Figure 135**). L'$IC_{50}$ a donc été déterminée à 15.49 µM en concordance avec la première expérience. Cependant, bien qu'il soit attendu qu'à une concentration de 100 µM, l'activité des récepteurs soit totalement supprimée, la courbe réponse-dose montrent qu'une concentration de 1 mM est nécessaire. Aussi, l'amplitude du

pic de courant évoquée par l'AChE est diminuée plus ou moins fortement selon la dose de RM048 sans que cette oxime n'influence la vitesse de désensibilisation (200 ms).

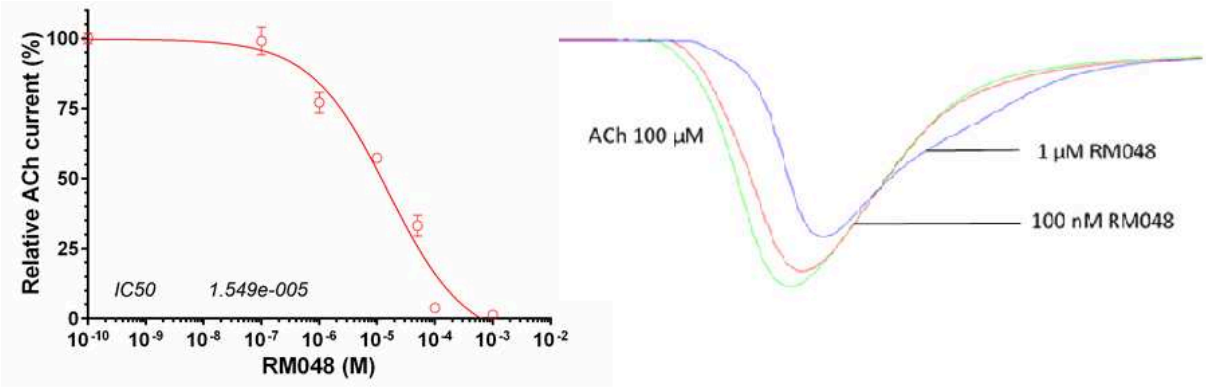



***Figure 135.*** *A gauche, Inhibition dose-dépendante du courant cholinergique par l'oxime RM048 chez des ovocytes de X. laevis exprimant le nAChR humain de type α7 (amplitude du pic du courant enregistrée à un potentiel imposé de -60 mV en présence de concentrations croissantes de RM048 ; les pics d'amplitude ont été normalisés contre des courants évoqués par 100 µM ACh soit la $EC_{50}$) ; A droite, Effet de l'oxime RM048 sur le nAChR humain de type α7 (temps d'incubation : 5 s ; en vert : courant évoquée par 100 µM ACh ; en rouge : 100 nM de RM048 ; en bleu : 1µM RM048)*

Ce résultat peut être expliqué par la nature même de ces récepteurs. En effet, le nAChR ne peut pas constamment être ouvert en présence d'ACh, ce récepteur se désensibilise en environ 200 ms. En cas d'absence de désensibilisation (présence de toxine agoniste), la mort est inévitable.[509,510]

Bien que ces résultats soient préliminaires, ils indiquent que le **RM048** et le **GM415** sont des antagonistes des nAChR *α*7. A plus long terme, l'effet sur les récepteurs muscariniques M1, beaucoup plus abondants au niveau du SNC, sera évalué.

## III.2. Evaluations *ex vivo* – Bioépurateurs pseudo-catalytiques

Les **JR595** et **GM415** ont été évalués en tant que bioépurateurs pseudo-catalytiques du fait des bons résultats de réactivation obtenus *in vitro* (efficacité de réactivation et affinité élevées). En effet, ces oximes et les cholinestérases natives présentes dans le sang humain pourraient établir un cycle catalytique d'hydrolyse des NOPs par conjugaison rapide de ceux-ci avec les AChEs érythrocytaires et les BChEs plasmatiques suivie d'une hydrolyse assistée par ces oximes.

La récupération de l'activité cholinergique globale par les oximes a donc été évaluée sur le sang humain en présence de différents NOPs (VX, sarin, cyclosarin et paraoxon - **Figure 136**). Le **JR595** permet une récupération de plus de 80% de l'activité cholinergique en 5 à 15 min en fonction de la concentration de NOP ; à l'exception du cyclosarin où 60 min sont nécessaires. Cette récupération lente dans ce dernier cas est explicable du fait que plus de 80% de l'activité cholinergique est originaire des *h*AChEs et que le **JR595** réactive faiblement *in vitro* les *h*AChEs inhibées par le cyclosarin. Dans le cas d'un excès de

paraoxon 50 fois plus important, le **JR595** permet une récupération de 40 % de l'activité cholinergique. Comparée au **JR595**, le **GM415** permet une réactivation beaucoup plus lente, n'atteignant le maximum de récupération qu'au bout de 40 à 60 min. Ceci est cohérent car **GM415** présente un $k_r$ *in vitro* plus faible. A noter que les deux oximes testées permettent d'atteindre *in fine* des taux de réactivation indépendants de la quantité de NOPs présent dans le cas du sarin, du cyclosarin et du VX dans le cas du **JR595**.

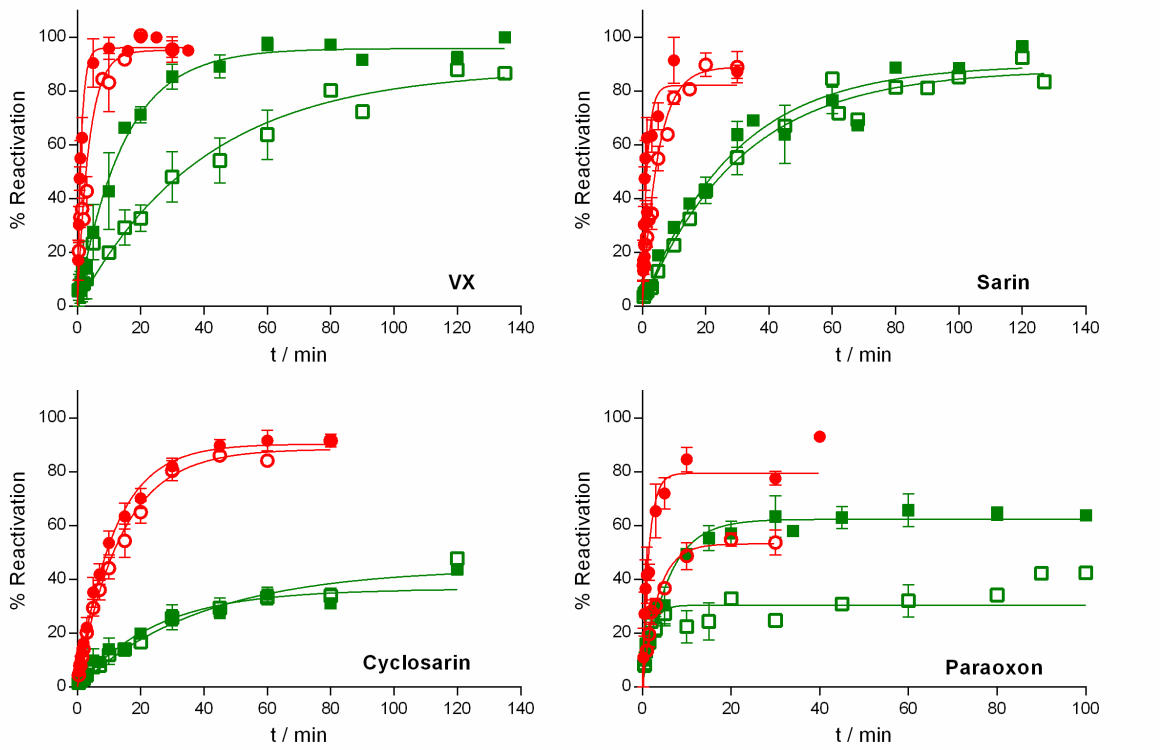



***Figure 136.*** *Récupération de l'activité cholinergique dans le sang humain empoisonné au NOPs (symbole plein, 0.7 µM ; symbole vide : 3.4 µM) et traité par le JR595 (1 mM, en rouge) et le GM415 (1mM, en vert)*

Ces deux oximes testées lors de l'étude de dégradation dans le sang humain montrent des capacités de réactivation supérieures à d'autres études *ex-vivo* similaires.[183,185,511] L'avantage dans notre cas est que les cholinestérases utilisées sont natives et non pas issues de mutagénèse dirigée. Bien que ces résultats puissent être améliorés, ils montrent la capacité *ex vivo* de ces composés à réactiver les enzymes humaines et apportent une preuve de concept quant à l'utilisation des 3-hydroxypyridines aldoximes dans des systèmes de bioépurateurs pseudo-catalytiques.

## III.3. Evaluations *in vivo*

### III.3.1. Pharmacocinétique et indice de protection du RM048

La pharmacocinétique a été étudiée par le Dr Guilhem Calas (IRBA) qui a développé un protocole spécifique aux réactivateurs. En effet, le protocole classique consiste à doser la quantité de réactivateur (uPLC) présent dans les échantillons sanguins de l'animal model sain à intervalle de temps régulier. Outre la nécessité d'utiliser des outils d'analyse sensibles, cette méthode nécessite des volumes de sang importants et ne sont pas reproductibles d'un laboratoire à l'autre.

Le Dr Guilhem Calas a développé une méthode innovante permettant, d'une part, une ponction plus faible de sang (15 µL) mais aussi de quantifier la présence d'oximes en procédant à un test de réactivation *in* vitro sur la *h*AChE préalablement inhibée par le VX (**Figure 137**).[53] Le sang ponctionné est héparinisé (évite la coagulation du sang) puis centrifugé afin de récupérer le plasma contenant le réactivateur. Préalablement soumis à un traitement thermique, dénaturant ainsi les cholinestérases présentes dans le plasma de la souris (56°C, 30 min), ce plasma résultant est mis en présence d'AChE humaine inhibée par le VX. Après incubation (37°C, 30 min), l'activité de la *h*AChE est mesurée (test d'Ellman) et comparée au contrôle (*h*AChE + oxime – correspondant à une valeur théorique de 100% de réactivation). La concentration d'oxime est alors déterminée par l'équation $\%E_{react} = 100 \,.\, (1 - e^{k \,.\, [ox].t})$ où $k$ est la constante bimoléculaire apparente ($\mu M^{-1}min^{-1}$) et $t$, le temps d'incubation (ici 30 min).

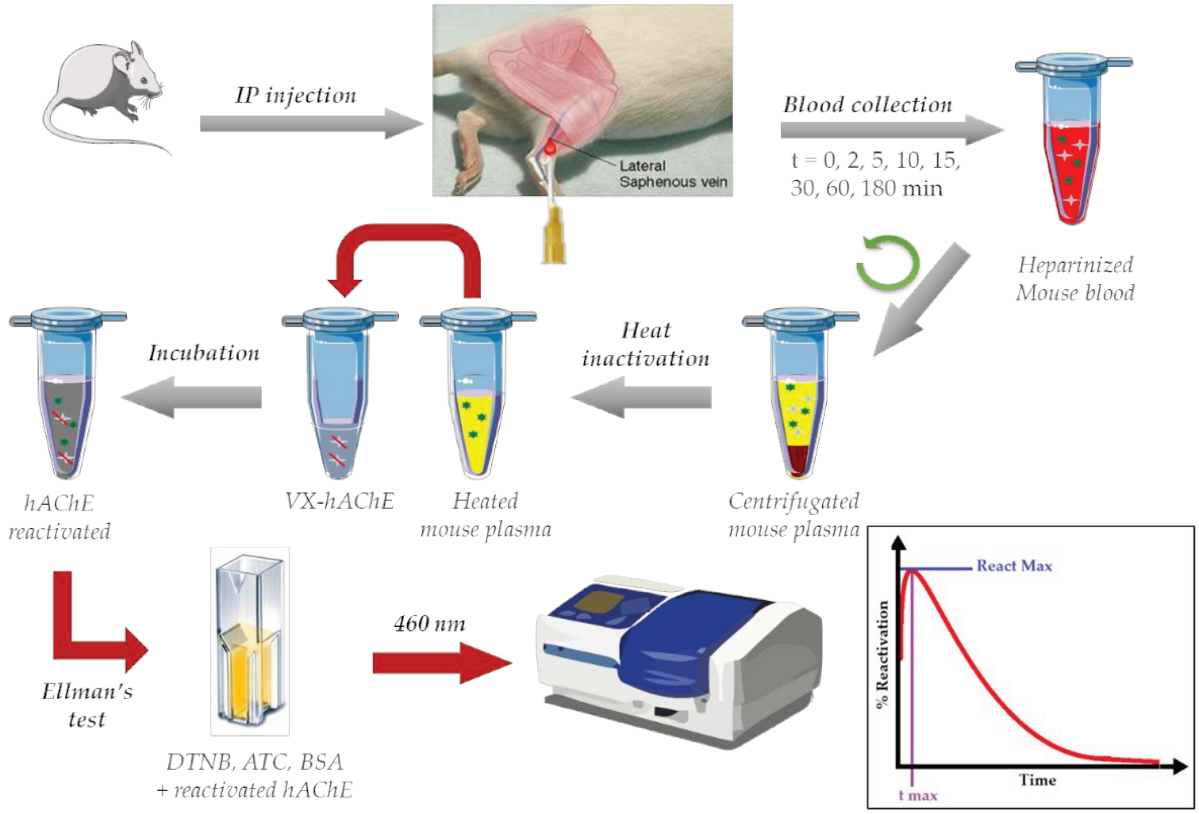



***Figure 137.*** *Evaluation de la pharmacocinétique sur la souris*

A partir de la courbe pharmacocinétique, trois constantes essentielles sont déterminées :

- Le %React $_{max}$, qui représente le pourcentage de réactivation maximal.
- Le $t_{max}$, qui représente le temps necessaire pour atteindre le %React max
- Le MRT (Mean Residence Time) qui représente le temps de résidence moyen, calculé par l'équation suivante : $MRT = \frac{AUM_C}{AUC}$ (avec AUC : aire sous la courbe; $AUM_C$ : aire sous la courbe dérivée).

La pharmacocinétique du **RM048** a donc été évaluée suivant la méthode innovante du Dr Guilhem Calas, sur la souris empoisonnée au Paraoxon. Les différentes formes (amine libre, chlorhydrate et methanesulfonate) du **RM048** ont été testées et les constantes pharmacocinétiques ont été déterminées (**Tableau 52**).

Les temps de résidence moyens sont compris entre 14 et 20 minutes, suggérant que les vitesses de diffusion ainsi que la clairance sont plus importantes pour le **RM048** comparées à la 2-PAM et au HI-6 (la 2-PAM étant considérée comme la meilleure oxime pour la protection *in vivo* contre une intoxication au paraoxon chez la souris). Le pourcentage de réactivation du **RM048** sous ses trois formes est inférieur à ceux obtenus pour le HI-6, mais ils sont équivalents voire supérieurs à la 2-PAM. Le $t_{max}$ du **RM048** change selon sa formulation : sous forme neutre ou chlorhydrate, le $t_{max}$ est plus important comparé à la 2-PAM et au HI-6, illustrant une entrée dans le compartiment sanguin plus lente ; sous forme de sel de mésylate, le $t_{max}$ est diminué d'un facteur 1.3 à 1.5 comparée à la 2-PAM et au HI-6 respectivement, démontrant que la forme mésylate à un apport non-négligeable sur la biodisponibilité *in vivo*.

| Oxime | Dose (µmol/kg) | MRT (min) | $t_{max}$ (min) | React max (%) |
|---|---|---|---|---|
| RM048 | 100 | 14 ± 1 | 7,5 ± 2,5 | 48,5 ± 7,0 |
| RM048 HCl | 100 | 14,5 ± 2 | 6 | 48,7 ± 3,4 |
| RM048 $MeSO_3H$ | 100 | 20,5 ± 6 | 3,5 ± 1,2 | 59,1 ± 12,6 |
| HI-6 | 100 | 45,1 ± 1,4 | 5,8 ± 0,3 | 117,7 ± 2,2 |
| 2-PAM | 100 | 31 ± 3 | 4,5 ± 0,5 | 51 ± 2 |

***Tableau 52.*** *Pharmacocinétique du RM048 neutre ou sous forme de sel sur la souris exposée au paraoxon*

Les indices de protection (ratio $\frac{LD_{50\ NOP}}{LD_{50\ NOP+oxime}}$ ) lors de l'exposition au paraoxon des souris ont été mesurés (**Figure 138**). Le **GM113** sous la forme chlorhydrate permet une protection supérieure au HI-6 mais inférieure à la 2-PAM, illustrant l'apport de la formulation en comparaison avec la précédente étude (IP = 1.08).[489] Concernant le **RM048**, l'apport de la formulation est nettement appréciable puisque que l'indice de protection du **RM048** sous forme neutre, déjà supérieure à la 2-PAM, est multiplié par un facteur 1.7 et 2 pour la forme chlorhydrate et mésylate respectivement.

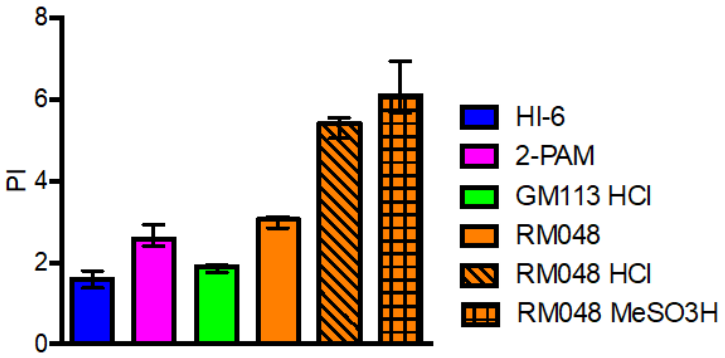



***Figure 138.*** *Indice de protection des réactivateurs sur la souris exposée au paraoxon*

Sur la base de ces résultats très prometteurs obtenus avec le **RM048** sous forme de methansulfonate, l'effet sur la survie des souris exposées au paraoxon, au NIMP et au NEMP a été mesurée avec apport ou non d'atropine dans le traitement (**Tableau 53**). La présence d'Atropine permet une augmentation drastique des taux de survie avec ou sans traitement par un réactivateur. Ce phénomène bien connu est dû, d'une part à l'effet anti muscarinique de cette molécule, et d'autre part, à un probable effet synergique avec les réactivateurs.[512] Les protections offertes par le mésylate de **RM048** au paraoxon sont exceptionnellement élevées surpassant l'ensemble des réactivateurs de référence. Lors de l'exposition au NEMP, le mésylate surpasse aisément la 2-PAM et est équivalent à l'obidoxime et au HI-6. Cependant dans le cas du NIMP, les indices sont supérieurs à ceux de la 2-PAM mais restent inférieurs à ceux du HI-6.

| **Réactivateurs** | **Sans atropine** | | | **Avec atropine (10 mg/kg)** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Paraoxon | NEMP | NIMP | Paraoxon | NEMP | NIMP |
| Ø | 1 | 1 | 1 | 2,43 | 1,83 | 1,7 |
| 2-PAM | 2,58 | 1,43 | 1,07 | 4,95 | 4,03 | 2,04 |
| HI-6 | 1,6 | 3 | 2,63 | 4,3 | 7,63 | 7,03 |
| RM048 $MeSO_3H$ | 6,1 | 2,56 | 1,27 | 14,23 | 6,57 | 3,87 |
| Obidoxime | 3,79 | 2,27 | 2,85 | | | |

***Tableau 53.*** *Indice de protection des différents réactivateurs sur les souris exposées aux NOPs*

Bien que les données *in vivo* soient nuancées, les capacités à protéger contre une intoxication au paraoxon du RM048 sous forme de mésylate surpassent aisément celle de la 2-PAM voire celle du HI-6 et sont équivalentes au HI-6 et à l'obidoxime dans le cas d'une intoxication au NEMP La poursuite du développement de cette molécule, plus facile à obtenir que son analogue en C4, est en cours.

### III.3.2. Pharmacocinétique et distribution dans les tissus du JR595

Les études de distribution du JR595 dans les tissus sur la souris sont actuellement en cours. Les données ne sont pas disponibles pour le moment mais seront présentées lors de la soutenance.

### III.3.3. Apport de l'encapsulation : le cas du GM415

A l'image de ce qui a été fait avec la 2-PAM,[356] le **GM415** a été encapsulé seul et avec la 2-PAM dans des nanoparticule par l'équipe du Dr Tatiana Pashirova (Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan) et cette forme galénique évaluée *in vivo* sur le rat avec comme objectif une délivrance au SNC. Ces nanoparticules (SLN : solid lipid nanoparticule), sont biocompatibles (faible toxicité), biodégradables, stables dans le sang, et présentent des capacités d'encapsulation véritablement intéressante (98% d'efficacité d'encapsulation, quantité encapsulée, possibilité d'encapsuler deux molécules dans le cas de SLN mixtes aqueuses/lipidiques).

Le **GM415** a donc été encapsulé seul et en présence de 2-PAM (**Tableau 54**). Le GM415 est encapsulé avec une efficacité de 52 à 63% et une charge de 3 à 4 % massique.

| Formulation | Efficacité d'encapsulation (%) | | Capacité de chargement (%) | |
|---|---|---|---|---|
| | 2-PAM | GM-415 | 2-PAM | GM-415 |
| GM415-SLN | - | 52±2 | - | 3.5±0.1 |
| 2-PAM+GM415-SLN | 94.7±2 | 63.1±3 | 6.3±0.1 | 4.2±0.2 |

***Tableau 54.*** *Efficacité et capacité d'encapsulation des SLNs*

La stabilité de ces nanoparticules a donc été évaluée sur une langue période (10 mois – 4°C). Elles se sont révélées extrêmes stable, les paramètres physiques n'ayant que très peu varié (diamètre hydraulique, Dh ; indice de polydispersion, IPd; potentiel Zeta, PZ - **Tableau 55**).

| Formulation | + 24 h | | | +10 mois | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Dh, nm | IPd | PZ, mV | Dh, nm | IPd | PZ, mV |
| Empty SLN | 68±13 | 0.26±0.01 | -55±1.5 | - | - | - |
| GM415-SLN | 106±19 | 0.38±0.02 | -30.0±0.7 | 106±19 | 0.39±0.1 | -19.2±0.5 |
| 2-PAM+GM415-SLN | 164±23 | 0.61±0.02 | -25±5 | 106±16 | 0.49±0.2 | -10.3±0.3 |

***Tableau 55.*** *Stabilité physique des SLNs*

La libération des réactivateurs a été étudiée *in vitro* dans un premier temps (**Figure 139**). Pour libérer 50% de réactivateur, 48 minutes sont nécessaires pour le **GM415** contre 14 min pour la 2-PAM. De la même façon, 10 heures sont nécessaires à la libération totale des nanoparticules contre 1h30 pour la 2-PAM.

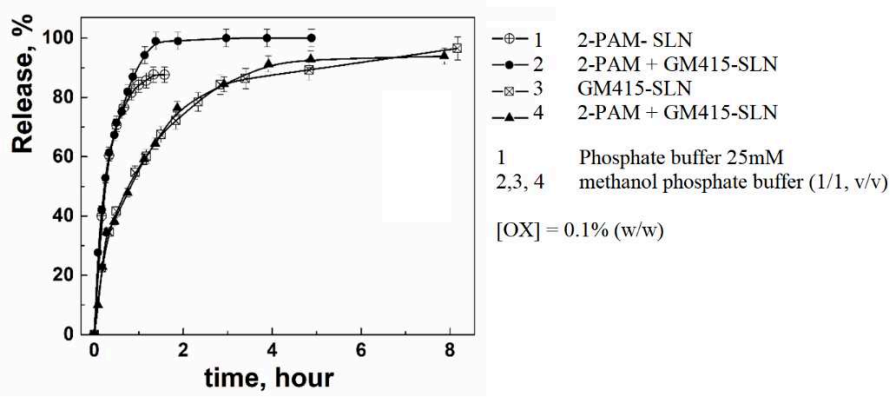


*Figure 139. Libération des oximes in vitro*

La pharmacocinétique du **GM415** libre (injection monodose, 5 mg/mg, *iv.*) comparée au **GM415** encapsulée (5mg/kg) a été étudiée aussi bien dans le plasma que dans le cerveau (**Figure 140**). La concentration dans le cerveau est beaucoup plus haute lors de l'utilisation des nanoparticules, illustrant l'apport certain de cette technologie. La pharmacocinétique est décrite par un modèle à deux compartiments selon l'équation $[OX]_t = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ où $\alpha$ et $\beta$ sont les constantes cinétiques de la distribution et de l'élimination respectivement (t : temps). Etant donné que la phase de distribution est très rapide, seule la phase d'élimination a été étudiée. Le temps de demi-vie d'élimination du **GM415** sous forme libre est de 18 min (24 min pour la 2-PAM) tandis que pour le **GM415** encapsulé, l'élimination est 8.5 fois plus lente (154 min).

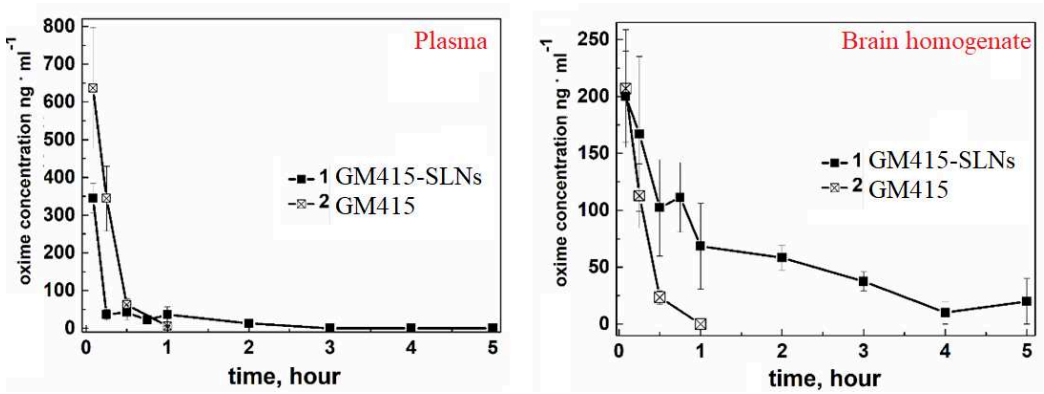



*Figure 140. Evolution de la concentration du GM415 libre (2) et encapsulé (1) dans le plasma (à droite) et dans le cerveau (à gauche).*

Le pourcentage de réactivation des AChEs dans le cerveau des rats exposés au paraoxon (0.8 LD50 soit 600 µg/kg, *ip*) puis traités au **GM415** libre ou encapsulé (5 mg/kg) a été mesuré à intervalle de temps régulier (**Figure 141**). Dans le cas du **GM415** libre, le pourcentage maximal de réactivation est atteint au bout de 30 minutes (7 %) et diminue du fait de l'élimination rapide du **GM415** libre. A contrario, le **GM415** encapsulé, permet une réactivation non négligeable au bout de 3h (20 %) jusqu'à atteindre un maximum de 30 % au bout de 5 h. Ce lapse de temps entre le début de l'expérience et le maximum de la réactivation est due au relargage lent du **GM415**.

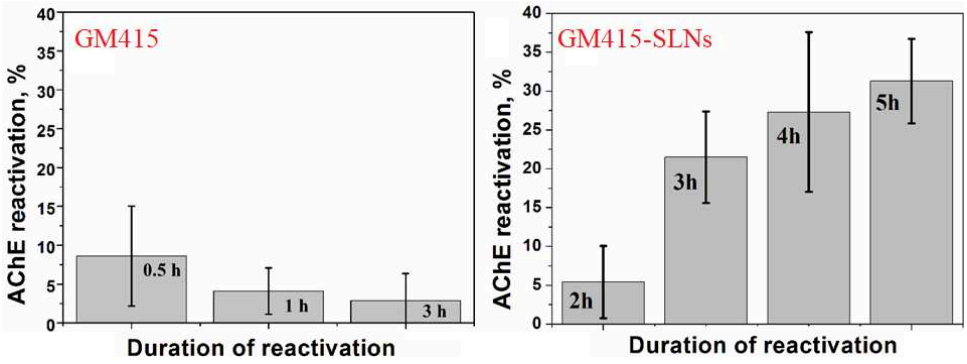



*Figure 141. Réactivation des AChEs centrales de rats exposés au paraoxon par le GM415 libre (à droite) et encapsulé (à gauche)*

Afin de pallier cette absence de réactivation en début d'expérience, l'utilisation de SLNs mixtes incorporant à la fois la 2-PAM et le **GM415** a donc été étudié (**Figure 142**). L'utilisation de ces deux oximes permet d'atteindre dès 30 min 10 % de réactivation. Au bout de 5 h, le maximum de réactivation est de 35 % illustrant un effet synergique des deux oximes dans la réactivation.

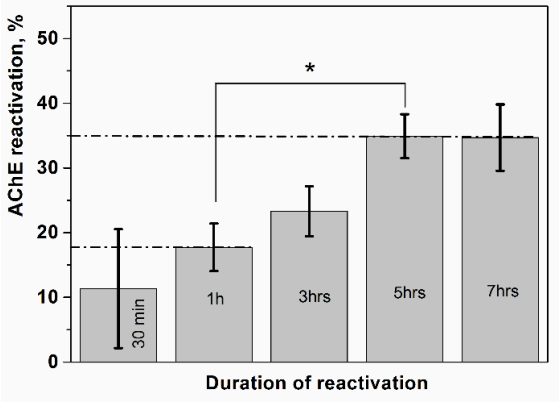



***Figure 142.*** *Réactivation des AChEs centrales du rat exposé au paraoxon et traité par les SLNs contenant la 2-PAM et le GM415*

Ces taux de réactivation au niveau central sont inédits et illustre la viabilité des réactivateurs neutres et de l'encapsulation. L'ensemble de ces résultats ont été soumis au journal ACS Nano (facteur d'impact = 13.942).

Une autre étude est en cours concernant le GM415 chlorhydrate. Les résultats sont à l'heure actuelle indisponibles.

## IV. Conclusion du Chapitre 2

L'objectif de cette première partie était d'optimiser les synthèses à l'échelle du gramme pour les réactivateurs **RM048**, **JR595**, **GM113**, **GM415** et **CG193** déjà développés en vue de poursuivre leurs évaluations *in vitro et in vivo*. Des études *in silico* et *ex vivo* de prédiction de passage de la BHE ont également été réalisés.

Les synthèses à l'échelle du gramme ont nécessité l'optimisation des premières étapes pour l'obtention quantitative de l'intermédiaire **4** et limiter les étapes de purification par chromatographie sur gel de silice. Cette optimisation a permis une augmentation importante du rendement (quasi-quantitatif selon l'opérateur) comparé à la précédente procédure qui permettait de n'obtenir l'intermédiaire **4** qu'avec un rendement modeste de 37 % sur 3 étapes. A l'exception du **GM113** et du **CG193**, tous les rendements de réaction ont été améliorés y compris pour le **JR595**. Enfin la préparation de sels (chlorhydrate, methanesulfonate et trifluroacétate) a pu être mise en œuvre pour l'ensemble des réactivateurs.

L'évaluation *in silico* et *in vitro* du passage de la BHE s'est révélée positive pour l'ensemble des oximes à l'exception du **GM113**.

Evalués par l'équipe de Zrinka Kovarik sur les véritables NOPs, les **JR595**, **GM415** et **RM048** se sont révélés bien plus efficaces que les oximes actuellement sur le marché. L'utilisation du **JR595** en tant que bioépurateur pseudo-catalytique a donné des résultats dépassant nos espérances et constituant une avancée réelle dans le domaine de la prophylaxie.

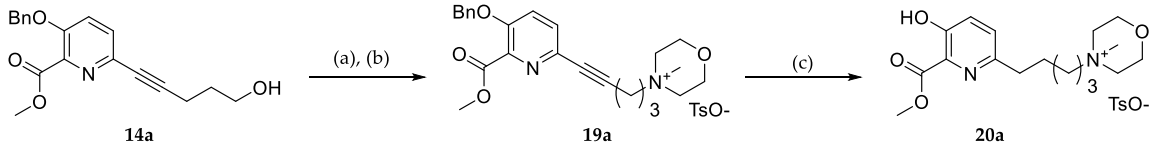
Le **RM048** et le **GM415** agiraient aussi au niveau des récepteurs nicotiniques, élargissant ainsi leurs champs d'action dans le cadre de la réduction de la phase cholinergique aiguë subséquente à un empoisonnement aux NOPs. Bien que ces résultats soient préliminaires, ils ouvrent la voie au développement de réactivateurs dits « *Multi-Target* » agissant aussi bien sur l'AChE que sur les récepteurs nicotiniques voire muscariniques.

En outre, ces oximes sous forme de sels permettent une amélioration sensible de la survie *in vivo*, illustrant l'importance de biodisponibilité sur les capacités de réactivation et de protection.

Enfin, l'apport de l'encapsulation du **GM415** en combinaison avec la 2-PAM permet d'atteindre des pourcentages de réactivation au niveau du SNC encore jamais rapporté dans la littérature (35 % en 3h).

L'ensemble de ces résultats vont faire l'objet de plusieurs publications dont une acceptée à Chemistry, a European Journal et une soumise à ACS Nano. Ces deux publications sont présentées à la fin du manuscrit. Une troisième publication sur l'évaluation de l'indice de protection du **RM048** *in vivo* est en cours de finalisation.

En perspective de ce chapitre, il serait interessant d'étudier également le comportement de ces molécules sous forme chargées de manière permanante à l'image des travaux de Chambers et coll.,[365–369] un premier teste de compatibilité synthétique (substitution, hydrogènation catalytique) a été effectué sur les precurseurs du RM048 avec succès (**Figure 143**).




(a) TsCl, TEA, DCM, ***quant.***; (b) **N-methylmorpholine**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***95%***; (c) $Pd(OH)_2$, $H_2$, MeOH, rt, 12h, ***quant.***

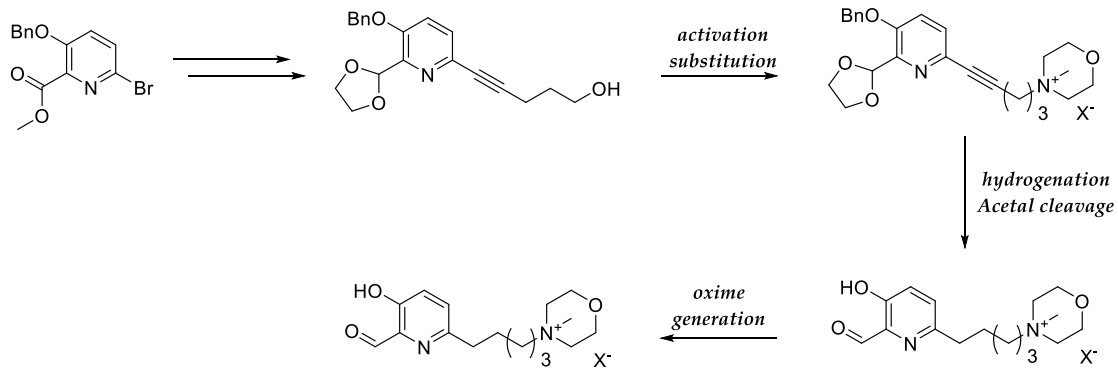


***Figure 143.*** *Accès aux analogues chargés de manière permaneante*

Ce chapitre a permis de valider la structure de ces réactivateurs possédant une amine tertiaire (cyclique ou aliphatique) et la fonction 3-hydroxypyridine aldoxime reliées entre elles par un bras espaceur d'une longueur de 4 ou 5 atomes de carbone. Sur la base de ces résultats prometteurs, le chapitre suivant présentera les travaux réalisés afin de compléter cette famille de réactivateur avec l'incorporation de différents motifs aminés inédits.

# CHAPITRE 3 : CONCEPTIONS, SYNTHESES ET EVALUATIONS BIOLOGIQUES DE REACTIVATEURS NON-CHARGES INCORPORANT UNE AMINE CYCLIQUE EN TANT QUE LIGAND DU SITE PERIPHERIQUE

## I. Introduction

Au vu des très bons résultats obtenus avec les dérivés de la morpholine et de la tétrahydroisoquinoléine, cette seconde partie de ma thèse a été consacrée à élargir la famille de réactivateurs incorporant une amine protonable comme ligand du site périphérique.

Le choix des différentes amines s'est fait par la nécessité, d'une part, d'améliorer l'affinité du réactivateur avec l'AChE phosphorylée et cela en maximisant la possibilité d'avoir des interactions fortes, mais réversibles, du ligand avec le site périphérique de l'enzyme. Ce dernier étant composé en majorité de résidus aromatiques, les interactions de type π-stacking et π-cation sont envisageables. D'autre part, les propriétés physico-chimiques des réactivateurs doivent être améliorées. En effet, il s'agit d'avoir une substance parfaitement hydrosoluble dans les milieux biologiques mais aussi suffisamment lipophile pour que cette substance soit capable de traverser la BHE par passage passif dans un premier temps.

Quatre types d'amines ont donc été envisagés (**Figure 145**) :

- Des amines non-commerciales dérivées des carbamazépines, anti-épileptiques connus pour posséder une activité au niveau du SNC (structures **A**) ;
- Des amines analogues à la tétrahydroisoquinoléine, à l'image des **GM113** et **GM415**, en vue d'une simplification structurale et d'une étude SAR (structures **B**) ;
- Des amines cycliques simples et commerciales dérivées de la pipéridine à l'image du **JR585** (*Chemistry – A European Journal* DOI : 10.1002/chem.201801394 - structures **C**)[491] ;
- Enfin, inspiré par les motifs régulièrement retrouvés en chimie médicinale,[513–515] des pipérazines dont les p*K*a varient (de 0 à 10) et dont la diversité structurale permettrait de compléter l'étude SAR (structures **D**).

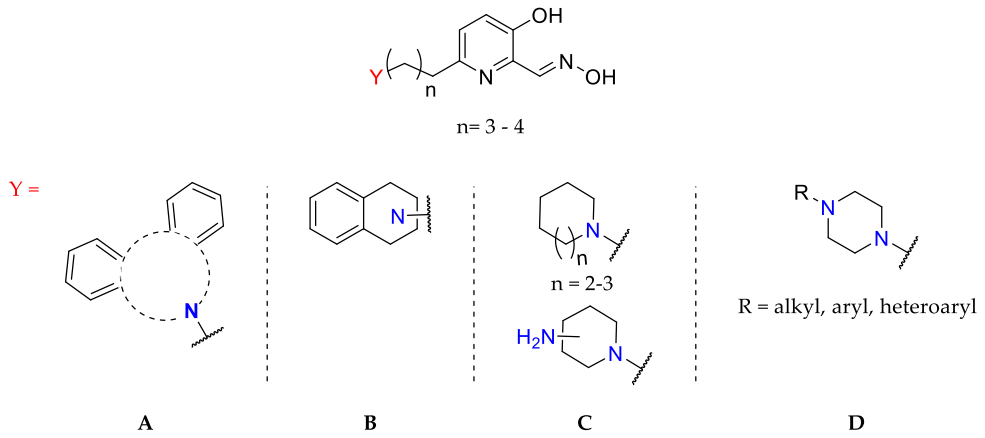



***Figure 145.*** *Structures envisagées dans ce chapitre*

Chacun de ces groupes de réactivateurs feront l'objet d'une argumentation quant à leur conception et les synthèses seront également présentées en détails. Afin de faciliter la lecture, les résultats des évaluations *in vitro* et, lorsque cela est possible, *in vivo* seront présentés dans chacune des sous-parties.

## II. Incorporation de dérivés des carbamazépines

La carbamazépine et l'oxcarbazépine sont des substances médicamenteuses utilisées dans le traitement des épilepsies et des troubles bipolaires (**Figure 146**).[510,516] Elles se caractérisent par la présence d'une dibenzo[*b,f*]azépine et d'un carbamate. Ces molécules agissent au niveau du SNC en bloquant les canaux sodiques et donc l'induction du potentiel d'action dans les synapses. De structure simple (MW < 250 g/mol), ces molécules présentent une forte lipophilie ($1.8 \leq log\ P \leq 2.7$) et se distribuent principalement dans le cerveau et les tissus lipidiques. Ces molécules ont servi d'inspiration à la conception de ligands inédits pour de nouveaux réactivateurs non-chargés.

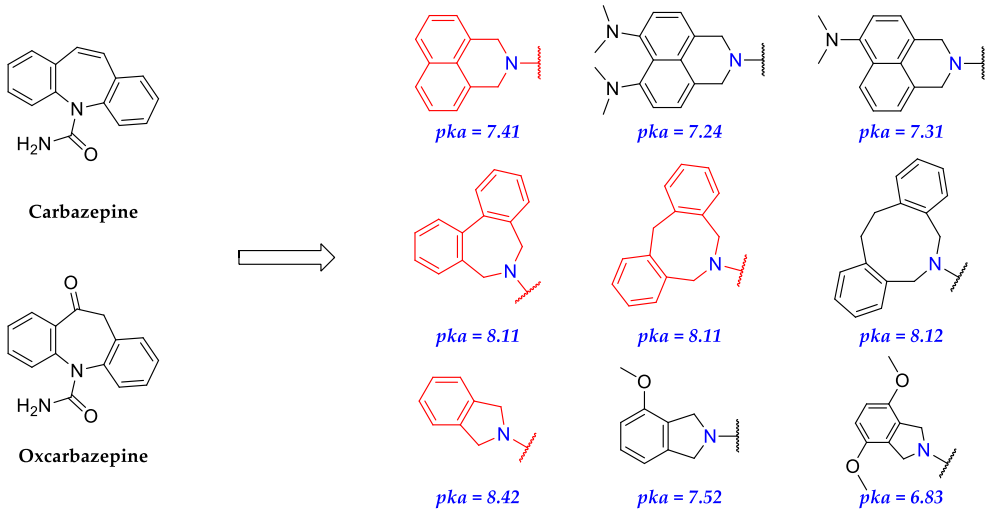



***Figure 146.*** *Structures des ligands envisagés (en rouge, les ligands prioritaires de cette étude) inspirés de la Carbamazépine et de l'Oxcarbazépine*

Afin d'obtenir une amine protonable à pH physiologique affine pour le site périphérique de l'AChE, la structure aromatique a été conservée mais l'amine a été déplacée en position benzylique (**Figure 146**). Grâce à ce changement, les p*K*a simulés de l'amine sont compris entre 7 et 8, et à pH physiologique, les proportions d'amines sous forme protonée ou neutre seraient équivalentes. La structure plane et la lipophilie de ces ligands sont très élevées et permettraient *a priori* un passage de la BHE plus aisé. Néanmoins, cette structure planaire pourrait être problématique en raison d'effets secondaires potentiels (intercalant de l'ADN, tératogénèse). Cependant en l'absence d'outil de prédiction ADMET au laboratoire et s'agissant d'un traitement ponctuel d'urgence, si ces réactivateurs se révèlent actifs, l'utilisation de ces molécules fera, comme tout médicament, l'objet d'une étude bénéfice-risque à plus long terme.

Bien que l'hydrosolubilité puisse être limitée, l'ajout de groupement hydro-solubilisant peut être envisagé à plus long terme, sans aucune conséquence sur les valeurs de p*K*a. Les noyaux aromatiques ainsi que la présence d'une amine facilement protonable en milieu physiologique permettraient de très fortes interactions de type π-π et cation-π avec le site périphérique de l'AChE, riche en résidus aromatiques.

Cette partie sera donc consacrée à l'étude *in silico* de ces potentiels réactivateurs ainsi qu'au développement de leurs synthèses. Pour des raisons de clarté et de concision, les résultats seront présentés uniquement pour les amines pour lesquelles les travaux sont les plus aboutis, dont les structures ont été mises en évidence dans la **Figure 146**.

## II.1. Conception *in silico*

Parmi les multiples possibilités envisagées, quatre amines ont été sélectionnées avec comme critère essentiel leur p*K*a, leur log P, leur affinité *in silico* avec la *m*AChE inhibée par le VX ainsi que leur accès synthétique (**Figure 147**).

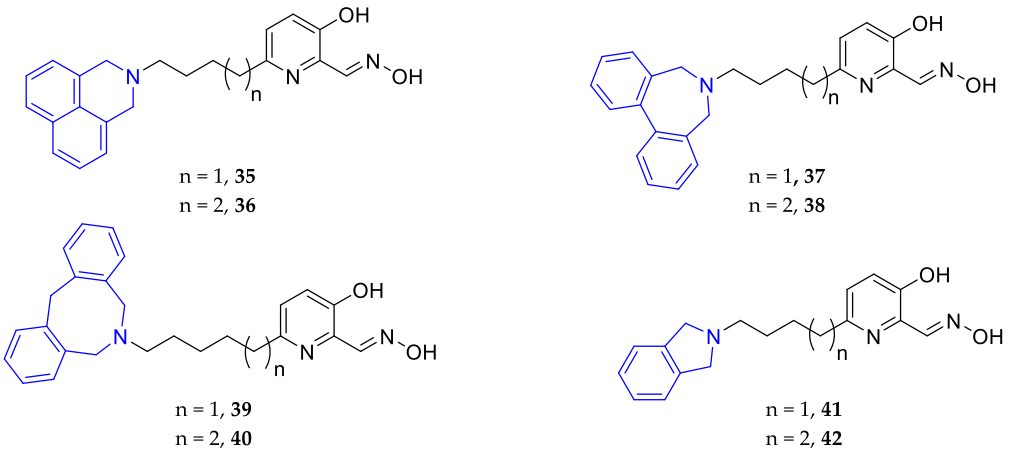



***Figure 147.*** *Structures des réactivateurs envisagés*

Dans un premier temps, une étude d'amarrage moléculaire statique a été effectuée à partir du fichier PDB de la *m*AChE inhibée par le VX (code PDB : 2Y2U). Ce fichier a été préparé en utilisant le logiciel AutodockTools.[517,518] Ensuite, la taille et la position de la « boîte » (à l'intérieur de laquelle des différentes conformations et interactions seront étudiées) est définie par un ensemble de coordonnées (x, y, z). Cette étape est cruciale au bon déroulement de l'étude : en effet, une boîte trop grande allongerait les temps de calculs tandis qu'une boîte trop petite limiterait le nombre de conformations possibles du ligand. Les réactivateurs étudiés ont été préalablement générés en utilisant ChemBioDraw (13.0) et leurs énergies ont été minimisées en utilisant le logiciel ChemBio3D (13.0). Cette minimisation a été réalisée en utilisant le champ de force MMFF94 (Merck Molecular Force Field – 100 000 itérations) et a permis d'obtenir la conformation du ligand la plus stable. Après génération des fichiers pdbqt des ligands et de l'enzyme

par le logiciel AutodockTools, l'étude d'amarrage est réalisée à l'aide du logiciel AutoDock Vina.[518] Les résultats obtenus se présentent sur la forme d'un fichier pdbqt présentant les 10 conformations les plus stables de la molécule dockée dans l'enzyme ainsi qu'un fichier texte présentant les énergies de liaison exprimées en kcal/mol de ces 10 conformations.

Les différentes amines ont été dockées avec un espaceur à 4 chaînons (**Figure 148 - Figure 149**). Les structures comportant la 2,3-dihydro-1H-benzo[*d,e*]isoquinoline (**35-36**) et la 5,6,7,12-tetrahydrodibenzo[*c,f*]azocine (**39-40**) ont un mode de liaison très proche : les noyaux aromatiques interagissent par π-stacking avec le Trp286 du site périphérique, l'amine protonée interagit avec la Tyr341 (cation-π) et la pyridine est stabilisée par le Trp86 du site cation-π. La molécule comprenant la 6,7-dihydro-5H-dibenzo[*c,e*]azepine (**37**), en plus des interactions précédemment décrites, interagit avec la Phe295 par π-stacking. Enfin concernant le réactivateur portant l'isoindoline comme ligand du site périphérique (**41**), la faible taille de ce ligand induit de nombreuses conformations inversées de la molécule dans le site actif avec le motif indoline dans le site catalytique de l'enzyme (interaction avec le Trp-86) et la fonction réactivatrice de le site périphérique (interaction avec le Trp-286). Malgré cela, les formes productives présentent les mêmes interactions que précédemment.

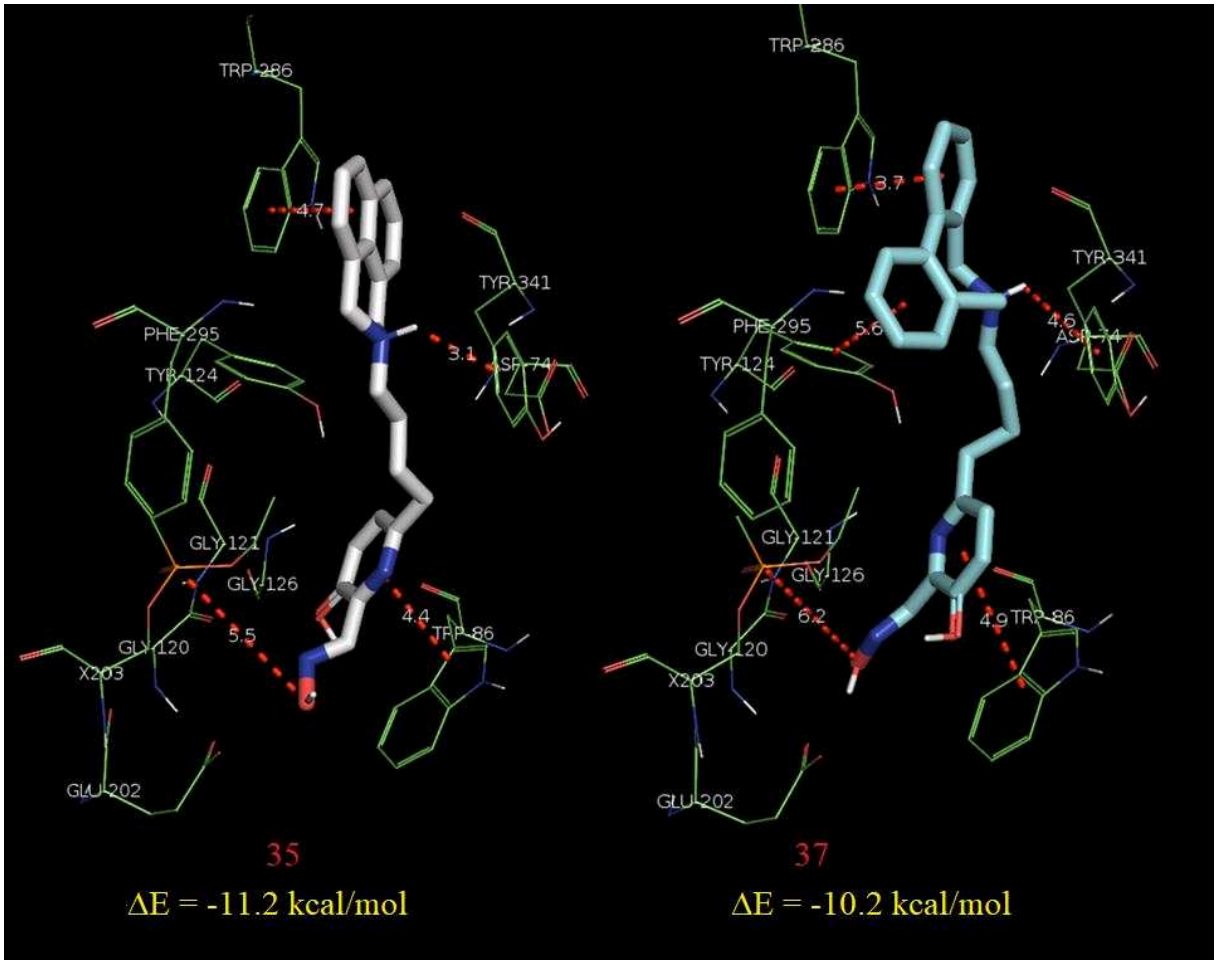



***Figure 148.*** *Conformations proposées des réactivateurs* ***35*** *(gauche) et* ***37*** *(droite) ; conformation prédominante – Docking statique - visualisé sur Pymol (version 2.0.7) dans la mAChE inhibée par le VX.*

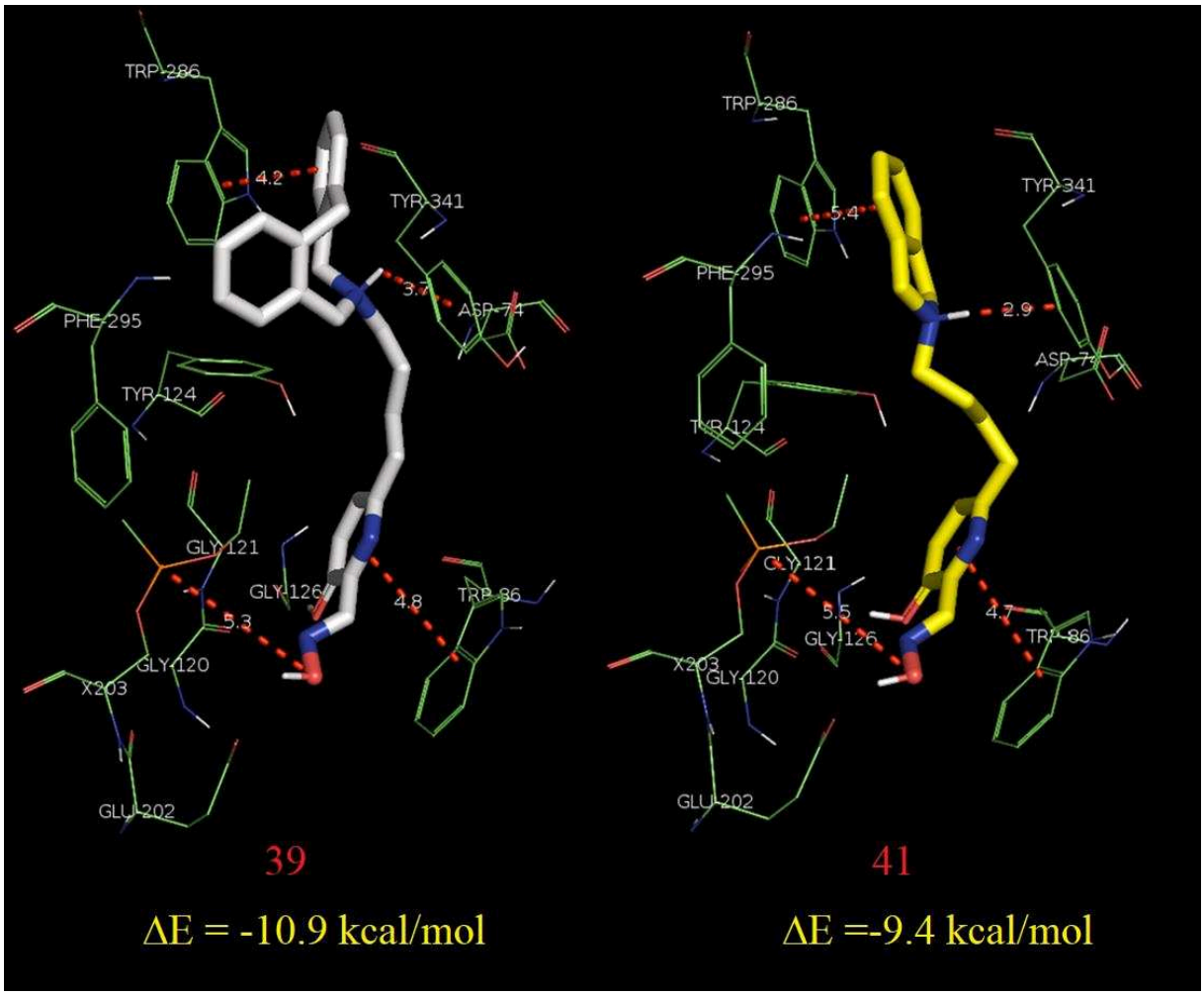



***Figure 149.*** *Conformations proposées des réactivateurs* ***39*** *(gauche) et* ***41*** *(droite) ; conformation prédominante – Docking statique - visualisé sur Pymol (version 2.0.7) de la mAChE.*

Néanmoins ce type de docking statique présente des limitations notamment lorsque l'enzyme possède une certaine flexibilité. C'est le cas pour l'AChE dont les précédentes structures cristallographiques obtenues par diffractions des rayons X démontrent une flexibilité conformationnelle de nombreux acides aminés notamment au niveau des chaînes latérales de certains résidus aromatiques présents au niveau du site périphérique et de la gorge.[111,255,259,519–521]

Un docking flexible a donc été mis en place afin de mieux appréhender les différences de conformations. Celui-ci consiste à dissocier l'enzyme en deux parties distinctes : la partie rigide qui reste statique et la partie flexible contenant les résidus susceptibles de bouger (Trp86, Trp286, Tyr341, Tyr124, Tyr337). Les oximes sont préparées de la même manière que précédemment. Etant donné les calculs longs (2h30 contre 1min30 en statique) qui nécessitent un matériel informatique très performant (idéalement 8 CPUs), seuls les réactivateurs à 4 et 5 carbones incorporant la 2,3-dihydro-1H-benzo[*de*]isoquinoline (**35-36**) et la 6,7-dihydro-*5H*-dibenzo[*c,e*]azepine (**37-38**) en tant que ligand du site périphérique ont été étudiés (**Figure 150**).

La **Figure 150** (à droite) illustre la mobilité des résidus notamment pour le Trp286 et le Trp86 qui présentent des conformations avec une rotation pouvant aller jusqu'à 90° s'adaptant ainsi à la structure et la taille du ligand étudié.

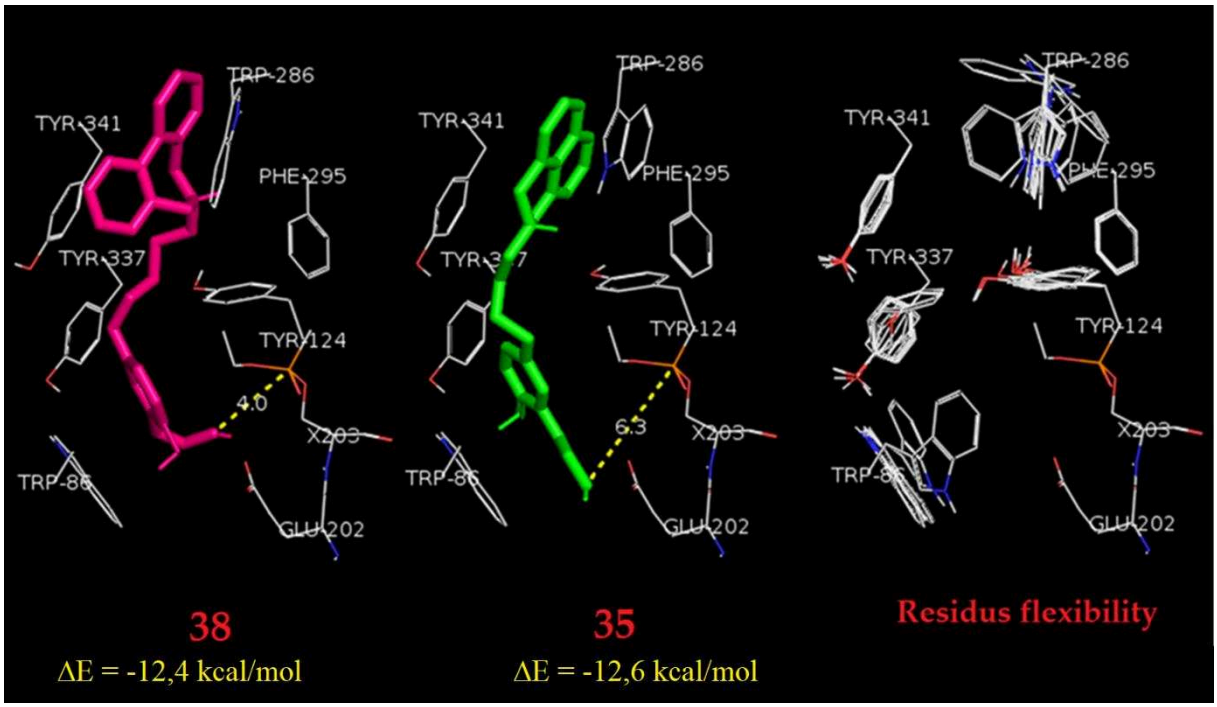



***Figure 150.*** *Conformations les plus stables obtenues lors des dockings flexibles de* ***38*** *(gauche) et* ***35*** *(centre) ; conformations des résidus observées lors des dockings flexibles (droite) visualisées sur Pymol 2.0.7.*

L'influence de la longueur du bras de l'espaceur (3 à 6 atomes) a également été étudiée sur l'ensemble des amines choisies en docking statique. Les valeurs d'énergies de stabilisation ainsi que les distances caractéristiques des interactions importantes sont présentées dans le **Tableau 56** avec comme exemple d'amine étudiée la 2,3-dihydro-1H-benzo[*d,e*]isoquinoline. Bien que les énergies de liaison calculées soient très semblables, les molécules incorporant 4 à 5 carbones dans le bras espaceur présentent beaucoup plus de formes productives (oxime pointant vers le phosphore de la serine) que leurs analogues à 3 et 6 chaînons. Aussi, les interactions de type π-stacking et cation-π avec le site périphérique sont présentes tout en permettant un bon positionnement de l'oxime dans le site actif. Enfin la distance idéale entre l'oxime et le phosphore est comprise entre 4 et 5 Å. Seule la molécule à 5 chaînons respecte cette distance, bien que l'oxime ne soit pas en position optimale.

| *Espaceur* | *Energie de stabilisation (kcal/mol)* | *Distance aromatique / Trp286 (Å)* | *Distance NH+ / Tyr341 (Å)* | *Distance pyridine / Trp86 (Å)* | *Distance Oxygène de l'oxime / phosphore de la Ser203 (Å)* | *Nombre de formes productives* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| propyl | -11.8 | 5.6 | 2.7 | 4.2 | 5.1 | 2/10 |
| Butyl | -10.9 | 4.7 | 3.1 | 4.4 | 5.5 | 4/10 |
| Pentyl | -11.5 | 4.9 | 6.0 | 4.4 | 4.0 | 7/10 |
| hexyl | -11.3 | 4.4 | 4.0 | 4.6 | 3.9 | 2/10 |

***Tableau 56.*** *Influence de la longueur de l'espaceur sur l'énergie de stabilisation et le positionnement des réactivateur incorporant la 2,3-dihydro-1H-benzo[d,e]isoquinoline*

Afin de mieux appréhender les caractéristiques des réactivateurs, les paramètres physico-chimiques ont également été simulés et comparés aux valeurs maximales conseillées, afin de prévoir la probabilité de passage passif au travers la BHE. Les différentes valeurs obtenues pour les réactivateurs **36**, **38**, **40**, et **42** sont illustrées dans la **Figure 151** Les molécules **36**, **38** et **42** remplissent l'ensemble des critères. *A contrario*, la molécule **40** présente une lipophilie légèrement plus élevée que la valeur recommandée (5). Cependant, avec bras espaceur plus court d'un atome de carbone (**39**), les critères sont également respectés.

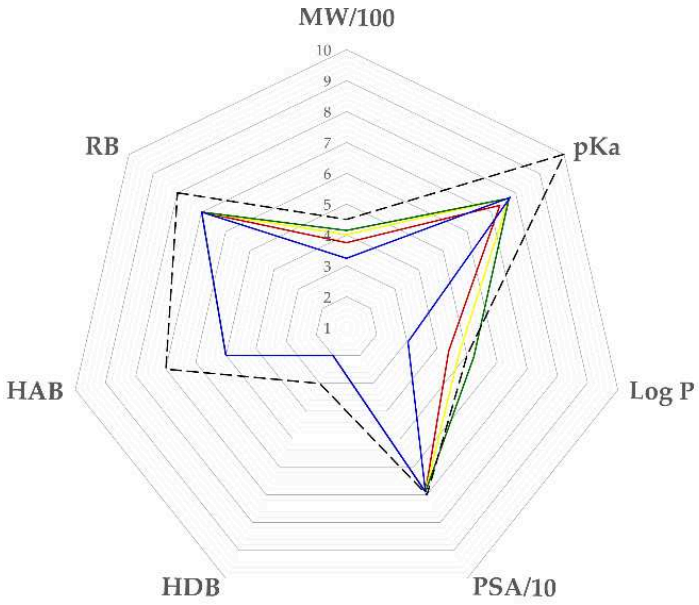



***Figure 151.*** *Radar des propriétés physicochimiques des réactivateurs envisagés (en rouge,* ***36*** *; en jaune* ***38*** *; en vert,* ***40*** *; en bleu* ***42*** *; en noir, valeurs maximales conseillées)*

Les scores CNS-MPO ont été calculés (**Tableau 57**), cependant la forte lipophilie de ces molécules traduites au travers des LogP et cLogD, deux facteurs intrinsèquement liés et pris en compte dans le calcul, amoindrit ce score CNS-MPO pour l'ensemble des molécules. Bien que ces scores MPOs ne soient pas dans la fourchette idéale (4 ≤ ), il est important de relever que d'une part, les facteurs sont d'égales importances et que le score est issu d'une étude statistique (dont les extrêmes sont ignorés pour ne pas créer de biais), d'autre part, plus de 16% des médicaments CNS+ sur le marché présentent un score compris entre 3 et 4.[497]

| Molécules | CNS_MPO score | Molécules | CNS-MPO score |
|---|---|---|---|
| **35** | 4.02 | **39** | 3.29 |
| **36** | 3.69 | **40** | 3.10 |
| **37** | 3.62 | **41** | 4.02 |
| **38** | 3.33 | **42** | 3.69 |

***Tableau 57.*** *Score CNS-MPO des molécules 35 à 42*

Les évaluations *in silico* étant globalement favorables, les synthèses des réactivateurs ont donc été entreprises.

## II.2. Synthèse des réactivateurs inspirés des carbamazépines

Différentes voies de synthèse ont été développées (**Figure 152**) : une voie de synthèse linéaire, à l'image du **GM415**, et une voie de synthèse convergente, à l'image du **GM113**.

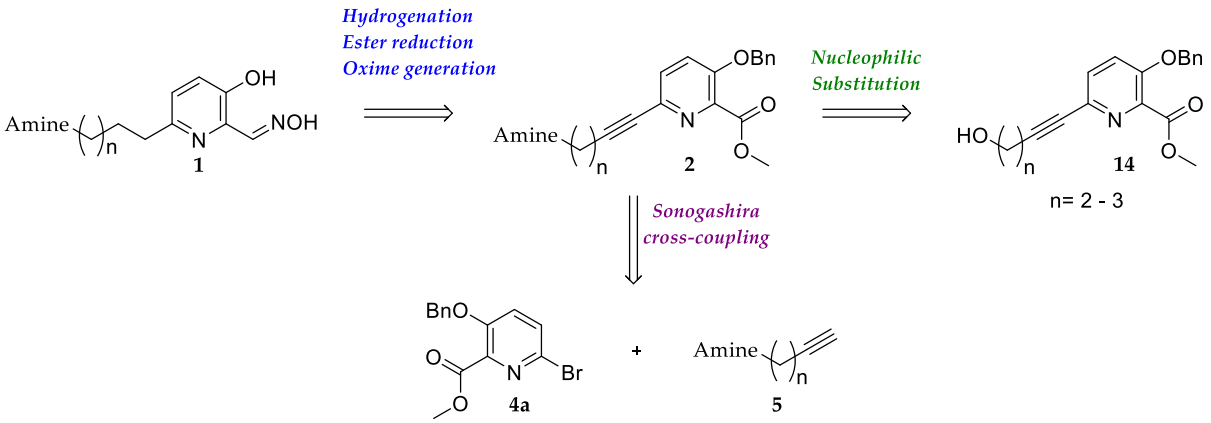



***Figure 152.*** *Rétrosynthèses envisagées*

### II.2.1. Voie de synthèse classique – synthèse des amines libres

La première voie de synthèse est identique à celles employées pour le **RM048** et le **GM415** et nécessite de disposer des amines libres (**Figure 153**). Les efforts ont été consacrés à l'obtention des amines **43**, **44** et **46** essentiellement. La méthode de synthèse de l'amine **43** a été utilisée pour les autres cibles synthétiques.[522]

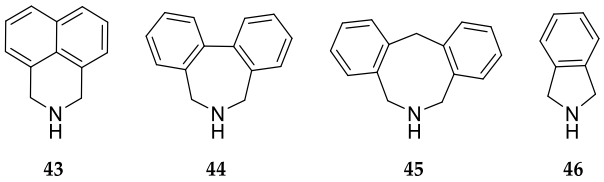



***Figure 153.*** *Amines libres désirées*

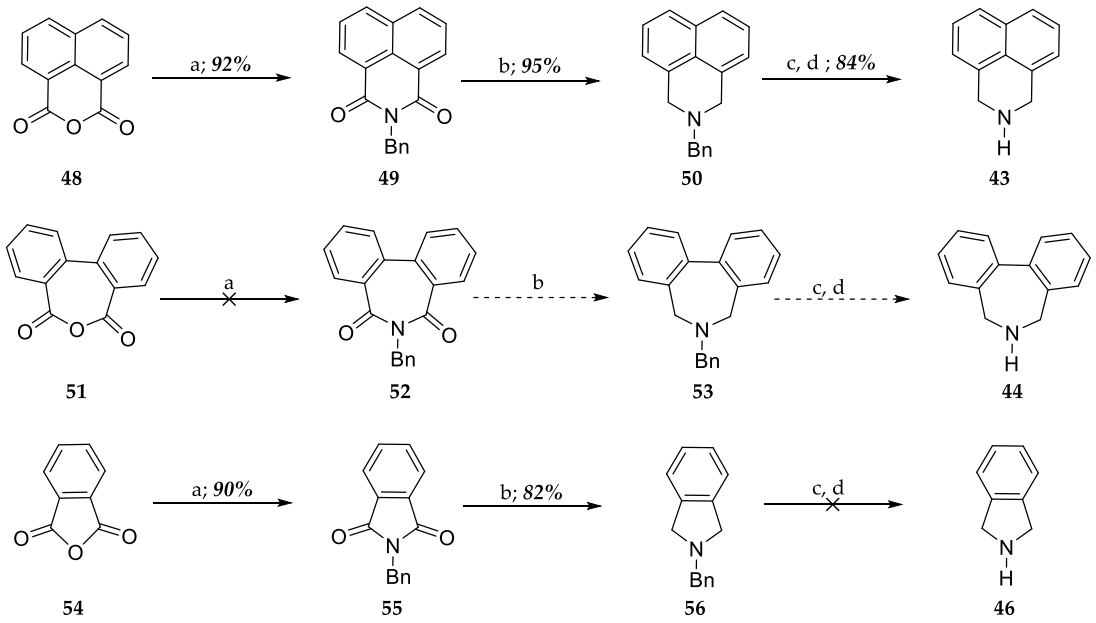
La première étape de la synthèse des amines libres (**Figure 154**) consiste en la formation des imides à partir des anhydrides associés par réaction avec la benzylamine pour donner les adduits correspndants. Les imides sont alors réduits en amine benzylée puis l'amine cyclique déprotégée est obtenue par traitement à l'éthyle chloroformate puis à l'hydrazine.

Des trois amines désirées, seule l'amine **43** a été obtenue, avec un rendement global de 73 % sur trois étapes. Cette amine libre est sensible à la lumière, à l'oxygène et à la température et se dégrade même lorsque des conditions de stockages rigoureuses sont employées. La forme chlorhydrate est aussi instable que la forme libre.

Concernant l'obtention de l'amine **46**, la synthèse a échoué lors de la *N*-débenzylation de l'intermédiaire **56**, probablement du fait de la réactivité du produit désiré, en effet, le traitement à l'hydrazine couplée à des conditions non-inertes et non-anhydres génère probablement du phtalhydrazine à l'image de la

synthèse de Gabriel. Une tentative de réduction du phtalimide en présence de $BH_3.Me_2S$ a aussi échoué. Face à l'impossibilité de générer cette amine et en prenant compte les études *in silico* menées, cette amine a été abandonnée.

Concernant la 5,6,7,12-tetrahydrodibenzo[*c,f*]azocine (**44**), malgré des conditions réactionnelles identiques, la transformation de l'anhydride en imide benzylique **52** n'a pas été observée. A noter que pour cette dernière amine, une voie de synthèse alternative a été décrite en 2017, nécessitant plusieurs biocatalyses.[523]




(a) $BnNH_2$ (1.05 equiv.), EtOH (0.15 M), 3h, reflux; (b) $AlCl_3$ (4 equiv.), LAH (4 equiv.), THF (0.06 M), 0°C - rt; (c) Ethyl chloroformate (1.3 equiv.), DCM (0.3 M), reflux,(d) KOH in ethylene glycol (26 equiv., 3.4 M), hydrazine monohydrate (7.3 equiv.), 160°C, 4h

***Figure 154.*** *Synthèses des amines libres*

Des tests de substitution nucléophile sur les alcools (avec ou sans noyau pyridine – **57a** à **62a** - **Figure 155**) préalablement activés (mésylate, tosylate, chlorure) dans différentes conditions (activation thermique ou micro-onde, solvants différents) avec l'amine **43** n'ont pas permis d'obtenir le produit de substitution (**64-65**) malgré la détection de sa présence lors des analyses MS (traces). Cette étude méthodologique n'a pas permis de trouver les conditions permettant l'obtention du produit désiré. Cela peut être expliqué par la cinétique lente de la réaction de substitution nucléophile, par la faible nucléophilie de l'amine **43**, ainsi que son instabilité induisant une dégradation rapide, et des étapes de purification très difficiles. Aussi, l'amine libre se dégrade également lors du stockage malgré les conditions de stockage rigoureuses (stockage sous atmosphère d'argon en absence de lumière à -25°C). Face à cette impasse, l'amination réductrice sur l'aldéhyde **63** avec l'amine **43** a été étudiée sans pour autant permettre l'obtention de l'amine alkylée probablement due à l'instabilité des réactifs et donc l'impossibilité de générer l'imine désirée *in situ*.

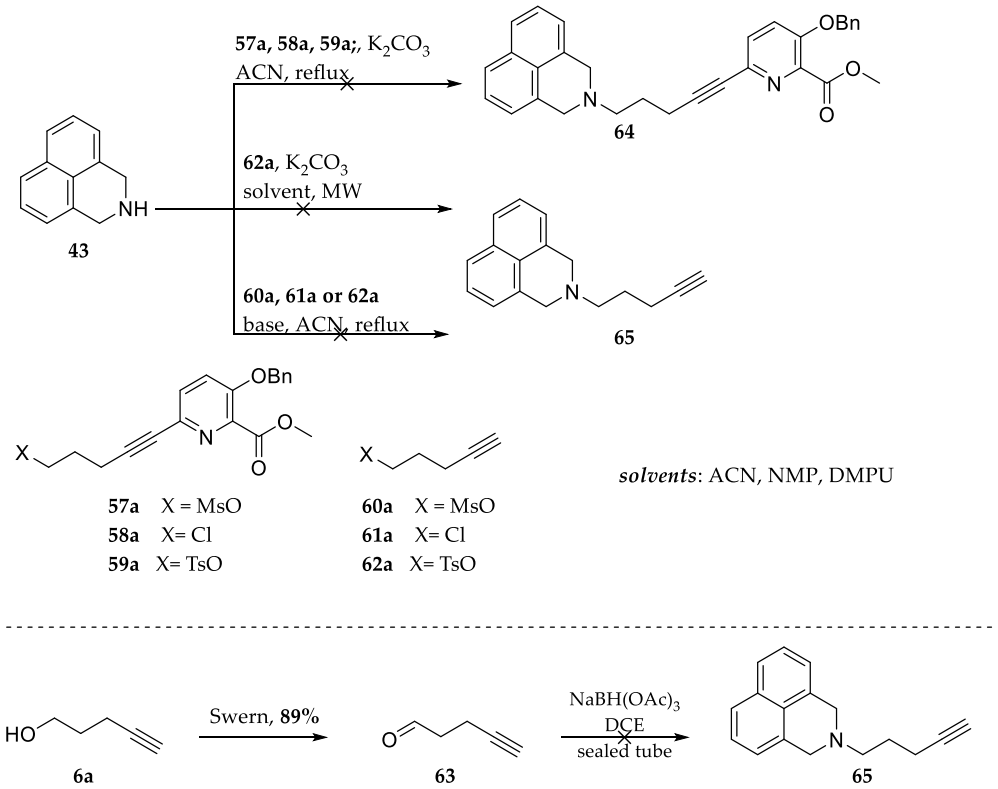



***Figure 155.*** *Différentes tentatives d'alkylation de l'amine 39*

Ces synthèses permettent de mettre en exergue, d'une part, la faible réactivité de ces amines et, d'autre part, leur instabilité intrinsèque. De ce fait, une autre approche beaucoup plus convergente a été tentée où le cycle aminé est généré avec le bras espaceur.

### II.2.2. Voie de synthèse convergente

Tenant compte des précédents échecs, une voie de synthèse beaucoup plus convergente a été envisagée. Celle-ci consiste à générer les alcools (**69, 71, 74**) en position benzylique qui, par la suite, sont transformées en bromure d'alkyle correspondant (**70, 72, 75** - **Figure 156**). La double substitution nucléophile en présence de l'espaceur aminé permet l'obtention de l'amine alkylée (**75-78**) de manière quantitative. En suivant cette stratégie, seul l'intermédiaire **74** n'a pas été obtenu. Après ozonolyse, le brut réactionnel contient un mélange de produit de départ et de mono et bis aldéhyde, et sa purification n'a pas été possible.

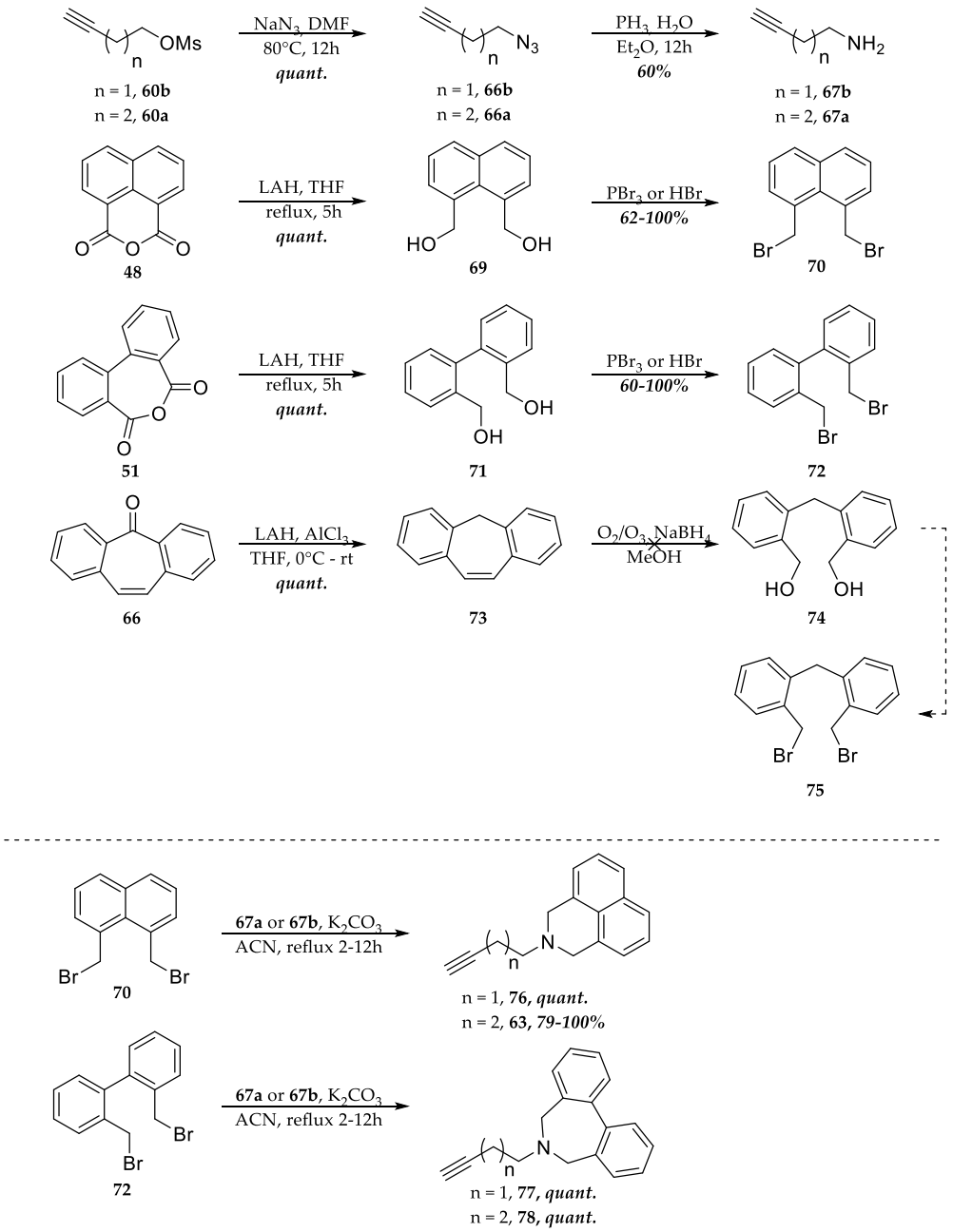



*Figure 156. Génération des amines portant un bras espaceur*

Le couplage de Sonogashira entre le précurseur de la fonction réactivatrice **4a** et l'amine alkylée est la réaction clef de cette synthèse (**Figure 157**). Dans le cas des molécules **63** et **76**, le couplage de Sonogashira n'a pas permis l'obtention des produit désirés, seul le produit d'homocouplage, provenant du couplage de Galser, a été obtenu et ne peut être valorisé. Cependant dans le cas de la 6,7-dihydro-5H-dibenzo[*c,e*]azepine alkylée (**78**), le produit de couplage **81** a été obtenu avec un rendement modeste de 30%, la purification étant difficile.

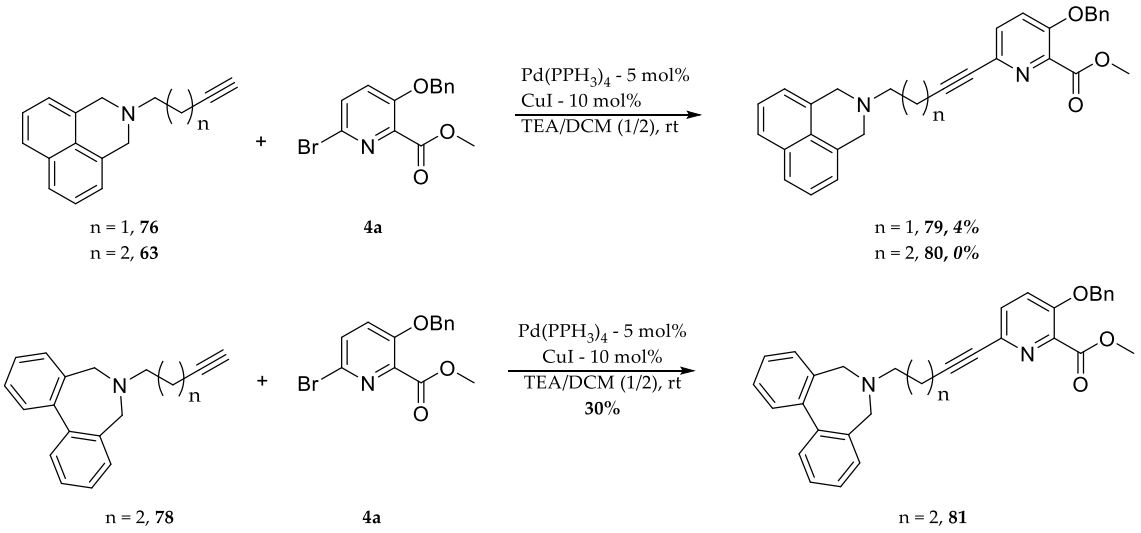



***Figure 157.*** *Couplage de Sonogashira des molécules 63, 76 et 78*

Après hydrogénation de l'intermédiaire **81**, la molécule **82** a été soumis à la succession des trois réactions déjà mises en œuvre pour les autres réactivateurs afin de générer l'aldéhyde à partir de l'ester (protection du phénol sous forme d'éther sylilé, réduction de l'ester en aldéhyde, déprotection en présence de TBAF - **Figure 158**). La dernière déprotection a été un échec, la basicité du TBAF ayant provoqué la dégradation de la molécule désirée (clivage $CH_2$ – pyridine et N-$CH_2$).

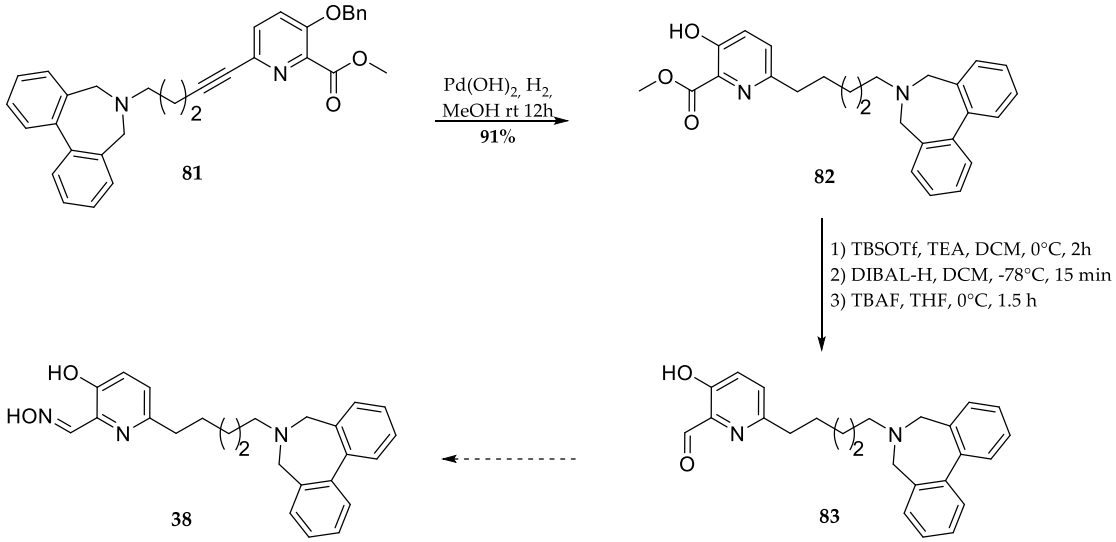
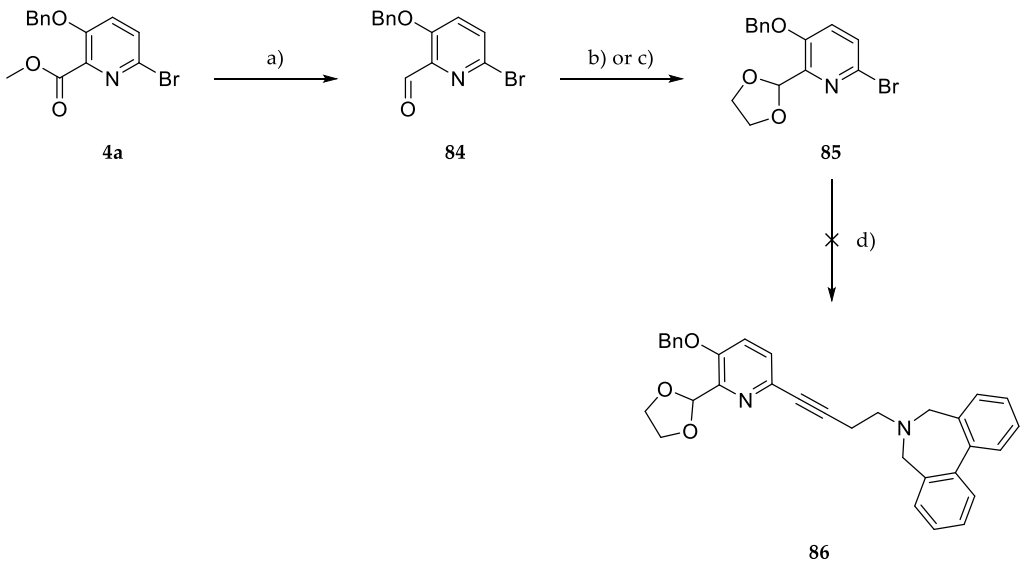



***Figure 158.*** *Vers l'obtention du réactivateur 38*

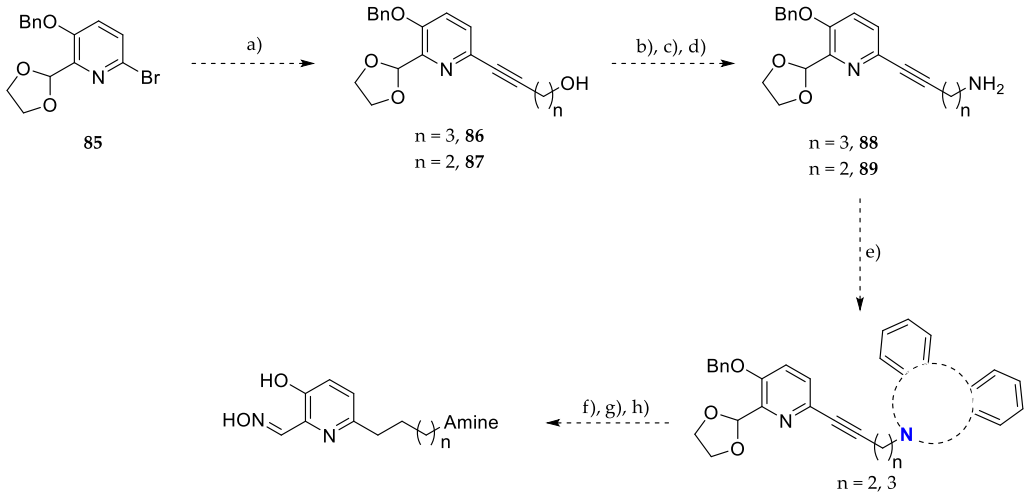
Face à cet échec, une dernière voie alternative a été tentée (**Figure 159**). Elle consiste toujours en un couplage de Sonogashira mais cette fois avec la pyridine portant un aldéhyde protégé sous forme d'acétal (**85**). Malheureusement, le couplage a également échoué, seul le produit d'homocouplage est observé par spectrométrie de masse.




(a) DIBAL-H, 15 min, -78°C, DCM, ***quant.***; (b) Ethylene glycol, $BF_3.ET_2O$, MS 4Å, 0°C, 1h, DCM, ***quant.***; (c) ethylene glycol, APTS, MS 4Å, reflux, 12h, ***63%;*** (d) **77**, $Pd(PPH_3)_4$ - 5 mol%, CuI - 10 mol%, TEA/DCM (1/2), rt, 12h

***Figure 159.*** *Couplage de Sonogashira avec la pyridine-acétal 85*

Bien que des voies de synthèse alternatives (**Figure 160**) puissent être envisagées, ces cibles ont été abandonnées vu les multiples échecs rencontrés et le manque de temps. Cependant, étant donné les évaluations *in silico*, la synthèse de ces molécules mériterait d'être poursuivie au laboratoire.




(a) **6a** or **6b** $Pd(PPH_3)_4$ - 5 mol%, CuI - 10 mol%, TEA/DCM (1/2), rt, 12h; (b) MsCl, 0°C, 1h, DCM; (c) $NaN_3$, DMF, 60°C, 12h; (d) $PPH_3$, $H_2O$, THF, 12h; (e) **70, 72** or **75,** $K_2CO_3$, ACN, 2-12h; (f) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h (g) Formic acid/$H_2O$ (1/1), rt; (h) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 3h

***Figure 160.*** *Alternative synthétique pour l'obtention des réactivateurs 35-42*

## III. Incorporation d'analogues simplifiés de la PIQ

Du fait des échecs synthétiques rencontrés dans la génération de la famille précédente, l'incorporation d'amines commerciales de structure plus simple a donc été envisagée. Sur la base du **GM113** et du **GM415**, une simplification structurale de la PIQ et le changement de la position de l'azote ont donc été envisagés afin de vérifier l'influence de ces changements sur la réactivité de ces molécules (**Figure 161**).

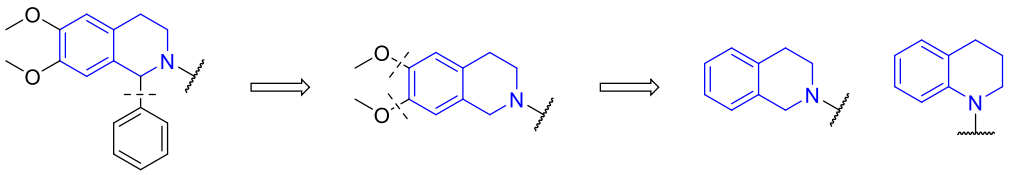



***Figure 161.*** *Simplifications structurales de la PIQ*

### III.1. Conception *in silico*

Les réactivateurs incorporant les amines simplifiées de la PIQ (**Figure 162**) ont fait l'objet d'une étude d'amarrage moléculaire flexible telle que décrite précédemment et ces études ot été comparées aux résultats obtenus pour le GM113 et le GM415.

n = 2, **90**
n = 3, **91**

n = 2, **92**
n = 3, **93**

***Figure 162.*** *Réactivateurs étudiés dans cette partie*

A des fins de comparaisons, les conformations les plus stables obtenues lors des dockings flexibles des molécules en C5 (**91** et **93**) ainsi que les GM113 (1 seul diastéréoisomère) et GM415 sont représentés dans la **Figure 163**. Le mode de liaison est sensiblement le même :

- Le ligand du site périphérique est pris en sandwich entre le Trp286 et la Tyr124 ;
- Présence d'une liaison H entre l'ammonium et l'hydroxy de la Tyr124 ;
- La pyridine est stabilisée par π-stacking avec le Trp86 ;
- La Tyr 341 interagit avec le bras espaceur *via* des interactions hydrophobes.

Dans le cas de la molécule **93**, la distance de l'oxime est loin d'être optimale, ce qui peut être expliqué par l'interaction de la pyridine avec Trp337 provoquant un positionnement plus haut que ceux observés dans le cas des autres molécules.

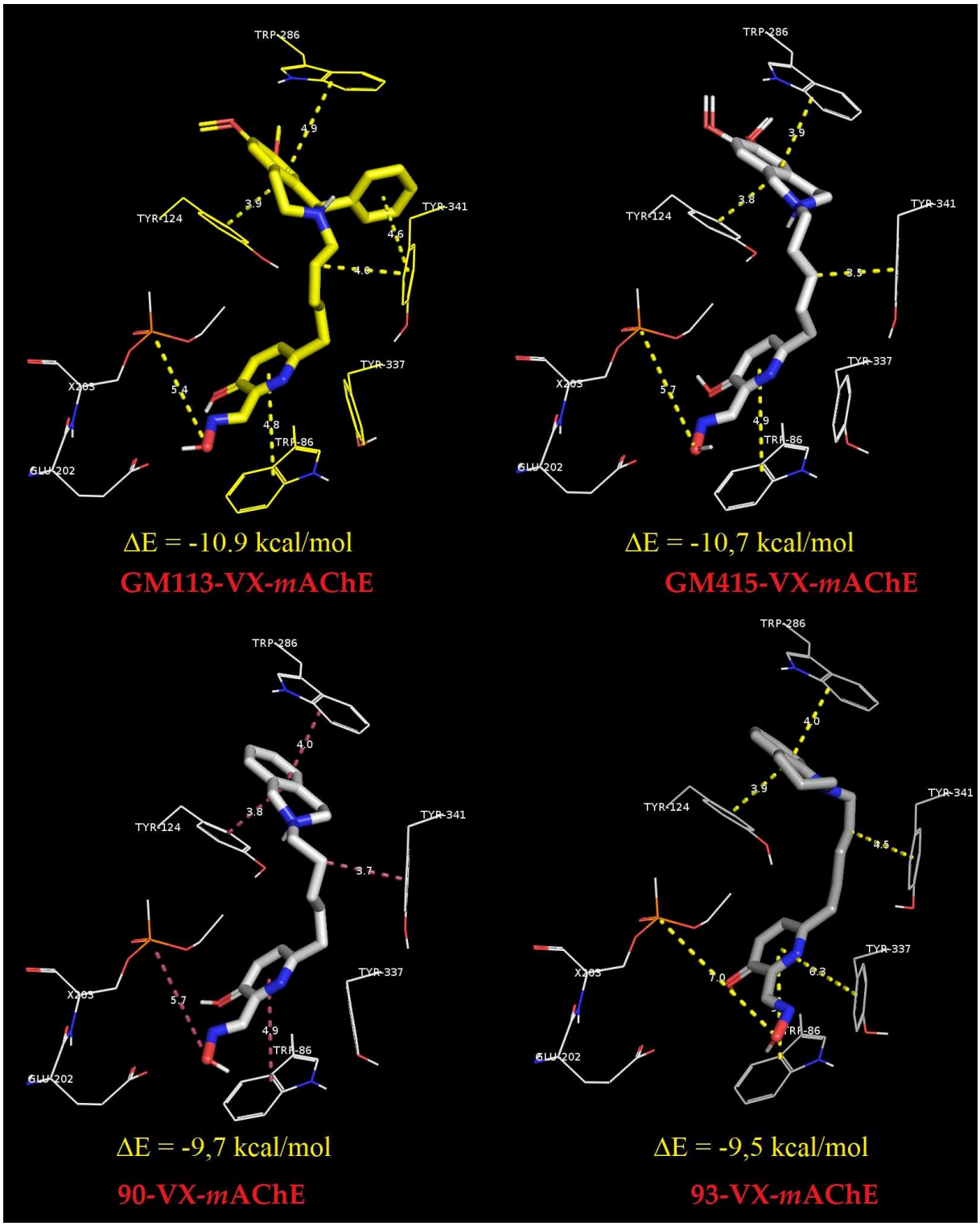



***Figure 163.*** *Conformations les plus stables obtenues lors des dockings flexibles du GM113 (haut, gauche), du GM415 (haut, droite), et des molécules 90 et 93 (bas) visualisé sur Pymol (version 2.0.7)*

Les paramètres physicochimiques sont résumés dans le **Tableau 58**. Le retrait des groupements methoxy du GM415 provoque une forte augmentation du p*K*a (≈ 7 à 9-10) dans le cas des molécules **90-91**. Les formes tautomères dûes à la présence des groupement methoxy expliquent cet abaissement du p*K*a. Le changement de position de l'azote de la position benzylique (**90-91**) à la position phénylique (**92-93**) provoque logiquement une diminution du p*K*a, le doublet d'azote étant en conjugaison avec le

cycle aromatique. De ce fait, très peu de formes protonées de ces molécules seront présentes à pH physiologique. Afin de garantir une biodisponibilité suffisante, ces molécules devront faire l'objet d'une formulation. Concernant le passage de la BHE, les différents facteurs physicochimiques ainsi que les scores MPO-CNS sont favorables.

| *Molécule* | *pKa amine* | *MW* | *RB* | *HDB* | *HAB* | *LogP* | *LogD* | *PSA* | *Score MPO-CNS* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **90** | 10.35 | 325.41 | 6 | 2 | 5 | 2.56 | 2.17 | 68.95 | 4.42 |
| **91** | 9.17 | 339.41 | 7 | 2 | 5 | 3.03 | 2.49 | 68.95 | 4.66 |
| **92** | 5.66 | 325.41 | 6 | 2 | 5 | 4.22 | 4.14 | 68.95 | 3.89 |
| **93** | 5.60 | 339.41 | 7 | 2 | 5 | 4.66 | 4.59 | 68.95 | 3.67 |
| CNS+ max | 10 | 450 | 8 | 3 | 7 | 5 | - | 70.00 | ≥ 4 |

***Tableau 58.*** *Propriétés physico-chimiques simulées par MarvinSketch et Chemicalize.*

## III.2. Aspect synthétique

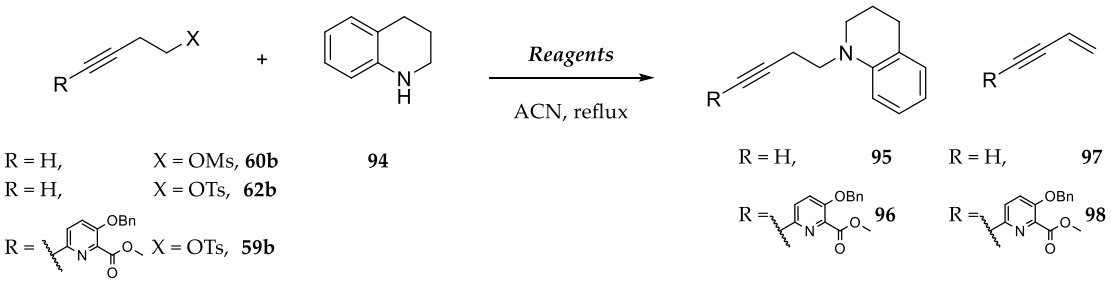
Cette partie sera consacrée à la synthèse des réactivateurs présentés précédemment. Dans un premier temps, l'incorporation de la tétrahydroquinoléine sera présentée suivi de l'incorporation de la tétrahydroisoquinoléine. A noter que les rendements présentés ne sont pas optimisés. Lorsque différentes méthodologies ont été employées, le meilleur rendement de chaque étape sera pris en compte dans le calcul du rendement global. Enfin, ces molécules ont été isolées sous forme de sels de trifluoroacétate caractérisés par RMN $^{1}$H et $^{18}$F. La proportion de TFA par rapport au réactivateur a été déterminée en RMN $^{18}$F par un étalonnage interne utilisant $PhCF_3$. En effet, étant donné le caractère extrêmement hygroscopique de ces molécules rendant l'analyse élémentaire ardue, cette méthode de caractérisation, déjà été utilisée au laboratoire pour d'autres projets de l'équipe, a été mise en place.

### III.2.1. Synthèses des réactivateurs 92 et 93

#### III.2.1.1. Synthèse du 92

Etant donné le caractère peu nucléophile de la 1,2,3,4-tetrahydroquinoline **94** ainsi que son caractère apolaire, la voie de synthèse convergente a été envisagée en premier lieu. Celle-ci consiste, comme présenté précédemment, à lier, dans un premier temps, le bras espaceur et le ligand puis à coupler ce fragment avec la bromopyridine **4**. Une rapide étude méthodologique a été menée concernant l'étape de substitution nucléophile (**Tableau 59**). Dans les conditions classiques de réaction avec la molécule **60b** (entrée 1), seul le produit d'élimination **97** est obtenu. L'utilisation du tosylate (**62b** – entrée 2) ne permet d'obtenir que 19% de la molécule **95** désirée (rendement non-reproductible). L'utilisation de KI (1 équiv) afin de générer *in situ* l'iodure d'alkyle (entrée 3), beaucoup plus réactif, n'a pas permis d'obtenir le produit de substitution. Aussi, l'absence de base ne donne aucune conversion (entrée 4).

Enfin, un test de substitution nucléophile sur l'intermédiaire activée **59b**, donne le même résultat, à savoir une conversion totale en produit d'élimination (**98** - entrée 5).




| *Entrée* | *Réactif de départ* | *Conditions réactionnelles* | *Rendements isolés* |
|---|---|---|---|
| **1** | **60b** | **94** (1 equiv.), $K_2CO_3$ (2 equiv.) | **97** (100%) |
| **2** | **62b** | **94** (1 equiv.), $K_2CO_3$ (2 equiv.) | **95** (19 %), **97** (81%) |
| **3** | **62b** | **94** (1 equiv.), KI (1 equiv.) $K_2CO_3$ (2 equiv.) | **97** (100%) |
| **4** | **62b** | **94** (1 + 1 equiv. à + 24h) | Ø |
| **5** | **59b** | **94** (1 equiv.), $K_2CO_3$ (1 equiv.) | **98** (100%) |

***Tableau 59.*** *Tentative d'optimisation du greffage de l'amine* ***94***

La molécule **95** a donc été mis en réaction en présence de la bromopyridine **4** dans nos conditions classiques de couplage de Sonogashira (**Figure 164**). Malheureusement, le produit de couplage **99** a été obtenu avec un faible rendement de 14% et en quantité trop faible pour poursuivre la synthèse. Etant donnée la faible reproductibilité de la substitution nucléophile, la molécule **92** a été abandonnée au profit de la molécule **93** pour laquelle le problème d'élimination ne se pose pas.

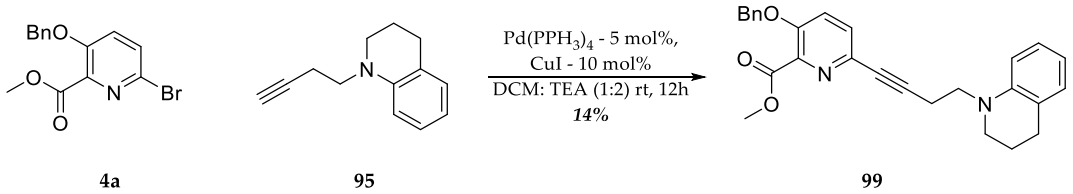
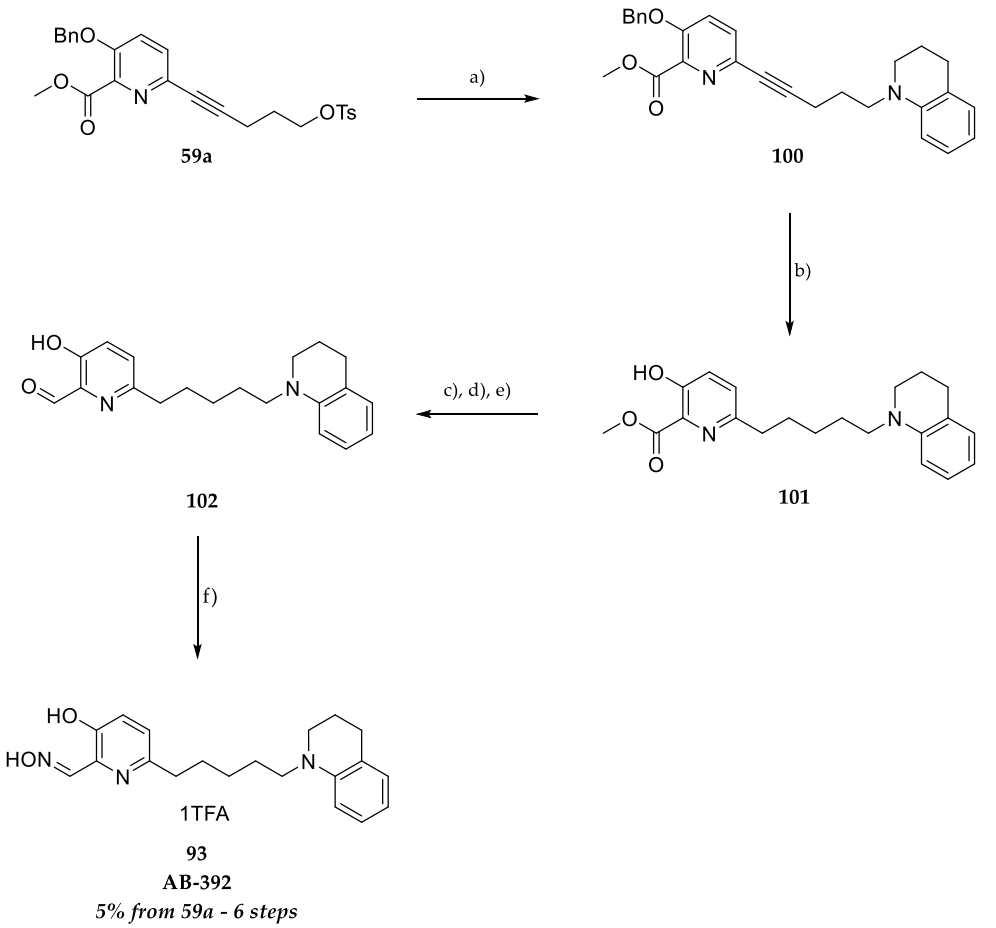



***Figure 164.*** *Couplage de Sonogashira entre l'alcyne* ***95*** *et la bromopyridine* ***4***

### III.2.1.2. Synthèse du 93

Au vu des résultats obtenus précédemment (substitution nucléophile difficile, couplage de Sonogashira peu productif), une voie de synthèse pour l'obtention de la molécule **93** totalement linéaire a été choisie (**Figure 165**). Le greffage de l'amine **94** est réalisé sur l'intermédiaire **59a**, dans les conditions de substitution classique, avec un rendement non-optimisé de 24%. Après hydrogénation de **100** (avec un rendement de 96%), l'intermédiaire **101** a été soumis à la suite de trois réactions déjà présentée (protection / réduction / déprotection). L'aldéhyde **102** est obtenu avec un rendement de 31% sur 3 étapes. Enfin, l'oxime **93** a été isolée après chromatographie en phase inverse sous la forme de sel de TFA (81 mg) avec un rendement de 71%, soit un rendement global non-optimisé de 5.1% à partir de **59a** (6 étapes).




(a) **94**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12, ***24 %***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***96%***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***31% aver 3 steps***; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, ***72%***.

***Figure 165.*** *Synthèse du réactivateur* ***93***

### III.2.2. Synthèses des molécules 90 et 91

Cette partie sera consacrée à l'obtention des réactivateurs à 4 et 5 chaînons incorporant le motif tetrahydroquinoléine comme ligand du site périphérique. Ces synthèses ont été effectuées avec l'assistance d'Alex Talbot, stagiaire M1, notamment lors des synthèses réalisées à l'échelle de la dizaine de grammes.

#### III.2.2.1. Synthèse du réactivateur 90

La molécule **90** a été obtenue en suivant la voie de synthèse convergente précédemment décrite (**Figure 166**). L'étape de substitution nucléophile est réalisée à partir du tosylate **62b** ou du mesylate **60b** avec des rendements sensiblement identiques (autour de 80%) mais qui varient selon le manipulateur (entre 68-93%). Concernant le couplage de Sonogashira, celui-ci est toujours problématique avec des rendements variant de 14 à 45% non-reproductibles selon le manipulateur. Après hydrogénation catalytique de l'intermédiaire **105**, la suite de trois réactions permet l'obtention de l'aldéhyde **107** (28%

sur 3 étapes – rendement non-optimisé). L'oxime **90** est isolée sous la forme de sel de TFA après purification par phase inverse (242 mg) avec un rendement de 76%, soit un rendement global non-optimisé de 8.5% à partir de **60b**.

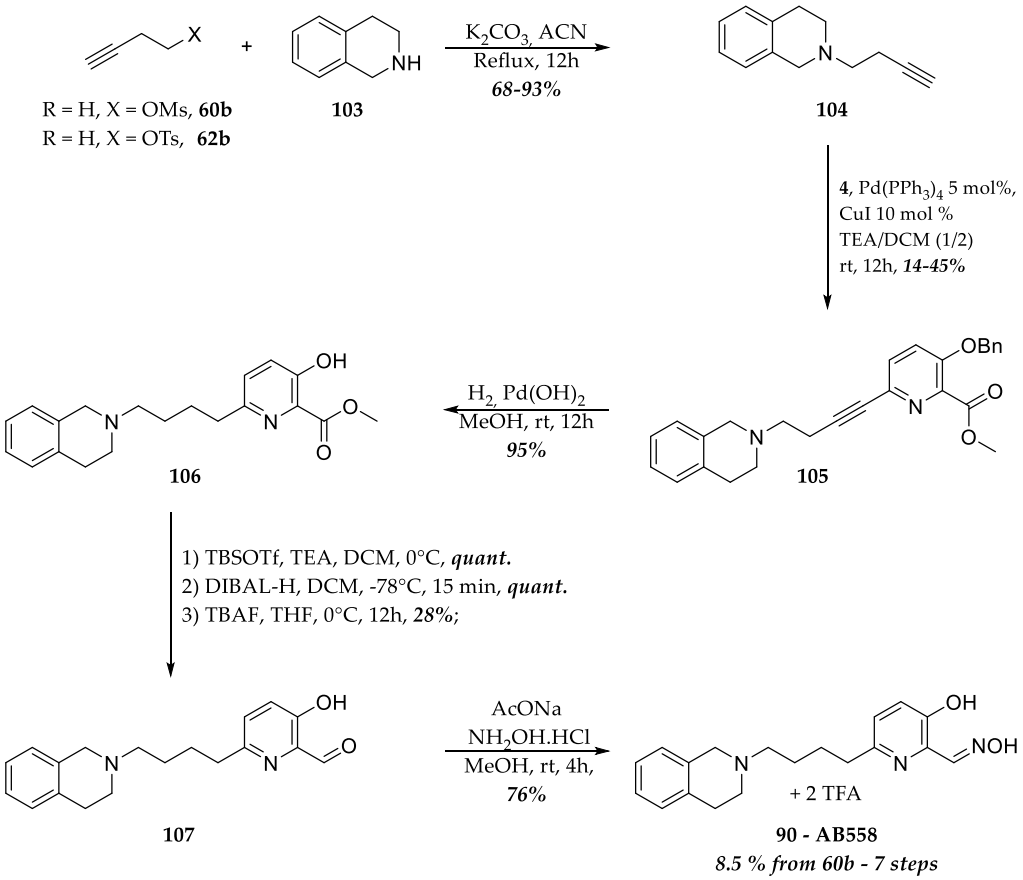
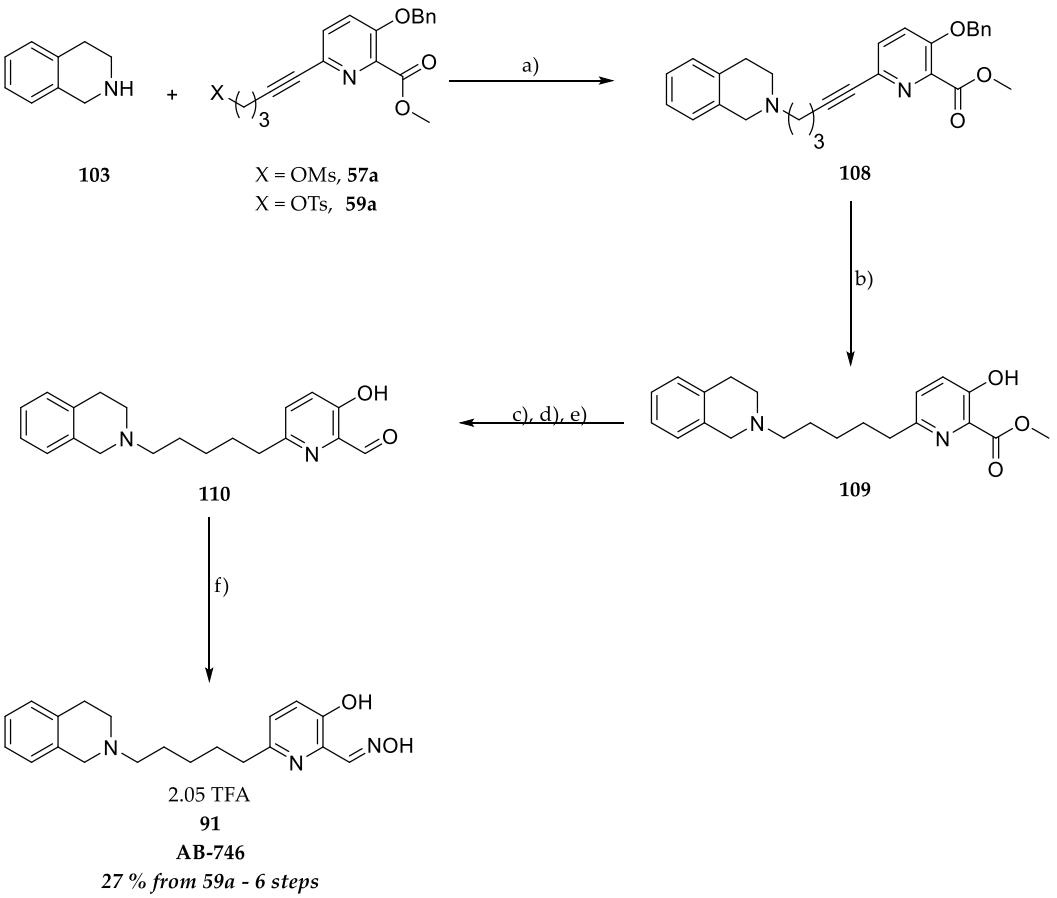



*Figure 166. Synthèse du réactivateur 90*

### III.2.2.2. Synthèse du réactivateur 91

La molécule **91** a été obtenue en suivant la même voie de synthèse que la molécule **93** (Figure 167). Le réactivateur **91** sous la forme de sel de TFA a été obtenu en 7 étapes à partir de **59a** avec un rendement global non-optimisé de 27% (227 mg). A noter que l'oxime de ce réactivateur sous forme neutre a tendance à s'hydrolyser lors du stockage. Aucune dégradation n'a été observée lorsque l'oxime est stockée sous forme de sel de trifluoroacétate.




(a) $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***13-72%;*** (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***97%;*** (c)TBSOTf, TEA, DCM, 0°C, 2h; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***60% over 3 steps***; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, ***64%.***

***Figure 167.*** *Synthèse du réactivateur* ***91***

## III.3. Evaluations *in vitro*

Ces trois molécules ont été envoyées à différents partenaires afin d'évaluer d'une part leur capacité in vitro à réactiver l'enzyme inhibée (Dr José Dias à l'IRBA) ainsi que leur aptitude à passer passivement la BHE (Dr Belen Perez à Barcelone).

### III.3.1. Passage de la BHE *in vitro*

La pénétration cérébrale des **90** (AB-436), **91** (AB-746) et **93** (AB-392) par diffusion passive a été évaluée par le Dr Bélen Pérez, en utilisant le test de perméation de membrane artificielle (PAMPA-BBB). La perméabilité *in vitro* ($P_e$) des oximes au travers d'un extrait lipidique de cerveau de porc a été déterminée en utilisant une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) / EtOH (70/30). La validation du test a été effectuée en comparant les valeurs de perméabilité expérimentales et celles issues de la littérature de quatorze médicaments commerciaux, donnant une bonne corrélation linéaire ($R^2$ = 0,9321) :

**$P_e$ (expérimentale) = 1,6601 $P_e$ (littérature) – 1,3856.**

En utilisant cette équation et les limites de perméabilité de la BHE établies par Di et coll,[500] les fourchettes suivantes de perméabilité $P_e$ ont été établies :

- $P_e$ > 5,255 pour les composés à haute perméabilité à la BHE (CNS +)
- $P_e$ < 1,935 pour les composés à faible pénétration de la BHE (CNS -)
- 5,255 > $P_e$ > 1,935 pour les composés à pénétration incertaine de la BHE (CNS ±).

Selon le résultat du test PAMPA (**Tableau 60**), le transport passif à travers la BHE a été observé pour les réactivateurs **90** et **93**. Etonnamment, le réactivateur **91** ne semble pas passer la BHE malgré un score MPO-CNS calculé de 4,66 tandis que la molécule **93** traverse la BHE malgré son score MPO de 3,67 illustrant la différence entre les prédictions et les tests.

| *Oxime* | *$P_e$ ($10^{-6}$ cm $s^{-1}$)* | *Prédiction CNS* | *Score MPO-CNS* |
|---|---|---|---|
| **90** (AB-558) | 9,1 ± 0,1 | CNS+ | 4,42 |
| **91** (AB-746) | 17,5 ± 1,1 | CNS- | 4,66 |
| **93** (AB-392) | 8,4 ± 0,4 | CNS+ | 3,67 |

***Tableau 60.*** *Perméabilité à la BHE in vitro ($P_e$) des molécules **90**, **91** et **93** obtenues lors du test PAMPA*

### III.3.2. Réactivation des *h*AChEs *in vitro*

Concernant l'évaluation *in vitro* de leur capacité à réactiver l'AChE phosphylée, l'étude menée par le Dr José Dias est en cours. Cependant, bien que les constantes cinétiques ne soient pas encore disponibles, des constantes $k_{obs}$ à 100 µM nous ont été communiquées (**Tableau 61**) et nous permettent d'avoir un aperçu de la réactivité de nos oximes *in vitro*. L'ensemble des molécules réactivent à large spectre contrairement au HI-6. Dans le cas du NEMP (analogue du VX) et du paraoxon, toutes les molécules synthétisées présentent des constantes de vitesse supérieures au HI-6 et à la 2-PAM :

- Dans le cas du NEMP : la molécule **90** est 7 fois plus efficace que le HI-6, la molécule **91** est 2.6 fois plus efficace que le HI-6 et la molécule **93** est 1.3 fois plus efficace que le HI-6 ;
- Dans le cas du paraoxon : la molécule **90** est 20 fois plus efficace que le HI-6 et les molécules **91-93** sont 11 fois plus efficaces que le HI-6.

Dans le cas du NIMP (analogue du sarin) et du NEDPA (analogue du tabun), la molécule **93** est bien moins efficace que la 2-PAM (facteur 1.8 et 4.5 respectivement). *A contrario*, les molécules **90** et **91** réactivent bien mieux que la 2-PAM.

Ainsi, sur la base de ces résultats préliminaires, la molécule **90** semble être la plus efficace. Cependant, il est nécessaire de finaliser l'étude avec l'obtention des constantes cinétiques de réactivation afin de tirer des conclusions définitives et de rationaliser ces réactivités.

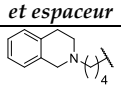
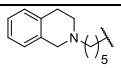
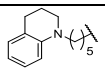
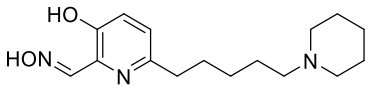
| *Oximes* | *Structure ligand et espaceur* | *VX (NEMP)* | *Sarin (NIMP)* | *Tabun (NEDPA)* | *POX* |
|---|---|---|---|---|---|
| **90** |  | 1.9 ± 0.24 | 0.29 ± 0.003 | 0.65 ± 0.1 | 0.49 ± 0.01 |
| | | 2.07 ± 0.27 | 0.29 ± 0.003 | 0.66 ± 0.1 | 0.49 ± 0.01 |
| | | **1.99** | **0.29** | **0.66** | **0.49** |
| **91** |  | 0.76 ± 0.033 | 0.19 ± 0.001 | 0.37 ± 0.06 | 0.29 ± 0.005 |
| | | 0.68 ± 0.02 | 0.17 ± 0.001 | 0.32 ± 0.05 | 0.27 ± 0.004 |
| | | **0.72** | **0.18** | **0.35** | **0.28** |
| **93** |  | 0.35 ± 0.002 | 0.11 ± 0.0006 | 0.04 ± 0.01 | 0.28 ± 0.007 |
| | | 0.34 ± 0.002 | 0.11 ± 0.0007 | 0.035 ± 0.01 | 0.28 ± 0.007 |
| | | **0.35** | **0.11** | **0.038** | **0.28** |
| **HI-6** | | 0.28 ± 0.005 | 0.45 ± 0.002 | Ø | 0.025 ± 0.0002 |
| **2-PAM** | | 0.14 ± 0.001 | 0.2 ± 0.002 | 0.17 ± 0.001 | 0.03 ± 0.0002 |

***Tableau 61.*** *$k_{obs}$ à 100 µM en $min^{-1}$ sur la hAChE inhibée par différents NOPs (expérience en microplaque; en gras la moyenne arondie des deux mesures; Ø : pas de réactivation).*

## IV. Incorporation d'amines cycliques

L'incorporation d'amines cycliques a déjà été effectuée avec succès au sein du laboratoire. Outre la morpholine (**RM048**-**JR595**), la pipéridine a aussi donné d'excellents résultats *in vitro* lors des évaluations *in vitro* menées par le Dr. Zrinka Kovarik (**JR585**- **Figure 168**).




**JR585**

***Figure 168.*** *Structure du JR585*

Bien que le **JR585** soit moins efficace que le HI-6 pour la plupart des NOPs, cette molécule est capable de réactiver la *h*AChE inhibée par le Tabun. En outre, elle réactive plus efficacement les ChEs inhibées par le paraoxon que le HI-6 (**Tableau 62**).

| *h*AChE | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **OP** | **Oxime** | **$k_r$ ($min^{-1}$)** | **$K_D$ ($\mu M$)** | **$k_{r2}$ ($M^{-1}$ $min^{-1}$)** | **$React_{max}$ (min)** |
| **VX** | **JR585** | 0.17 ± 0.03 | 90 ± 30 | 1890 ± 410 | 90 (30) |
| | HI-6[b] | 0.33 ± 0.02 | 60 ± 10 | 5740 ± 1120 | 90 (15) |
| **Sarin** | **JR585** | 0.075 ± 0.003 | 160 ± 20 | 490 ± 50 | 100 (60) |
| | HI-6 | 0.9 ± 0.1 | 170 ± 40 | 5420 ± 780 | 60-90 (4) |
| **Cyclosarin** | **JR585** | 0.06 ± 0.01 | 330 ± 110 | 180 ± 40 | 100 (60) |
| | HI-6[d] | - | - | 22100 ± 1300 | 100 (<1) |
| **Tabun** | **JR585** | 0.0033 ± 0.0004 | 110 ± 40 | 30 ± 5 | 50 (400) |
| | HI-6 | nd[e] | nd | nd | 10 (24h) |
| **Paraoxon** | **JR585** | 0.07 ± 0.02 | 200 ± 110 | 340 ± 100 | 70 (30) |
| | HI-6 | 0.026 ± 0.001 | 590 ± 50 | 50 ± 2.2 | 90 (170) |
| *h*BChE | | | | | |
| **OP** | **Oxime** | **$k_r$ ($min^{-1}$)** | **$K_D$ ($\mu M$)** | **$k_{r2}$ ($M^{-1}$ $min^{-1}$)** | **$React._{max}$ (%)** |
| **VX** | **JR585** | 0.05 ± 0.01 | 270 ± 150 | 180 ± 50 | 90 (120) |
| | HI-6[b] | 0.12 ± 0.03 | 370 ± 230 | 330 ± 230 | 85 (120) |
| **Sarin** | **JR585** | 0.0022 ± 0.0005[c] | - | - | 45 (325) |
| | HI-6 | 0.04 ± 0.02 | 270 ± 200 | 150 ± 40 | 100 (300) |
| **Cyclosarin** | **JR585** | 0.32 ± 0.04 | 810 ± 200 | 390 ± 50 | 90 (15) |
| | HI-6[d] | - | - | 780 ± 30 | 90 (30) |
| **Tabun** | **JR585** | nd[e] | nd | nd | < 10 (24h) |
| | HI-6 | 0.0016 ± 0.0004 | 1800 ± 1000 | 0.91 ± 0.57 | 25 (18h) |
| **Paraoxon** | **JR585** | 0.020 ± 0.003 | 140 ± 40 | 140 ± 30 | 90 (270) |
| | HI-6 | 0.0068 ± 0.0004 | 450 ± 70 | 15 ± 2 | 80 (500) |

***Tableau 62.*** *Cinétiques de réactivation du JR595 sur les hChEs inhibées par differents NOPs*

Ainsi, afin de mieux appréhender l'apport de la pipéridine dans nos réactivateurs, des modifications structurales concernant la taille du cycle mais aussi l'ajout d'une deuxième amine sur la pipéridine ont été entreprises. (**Figure 169**).

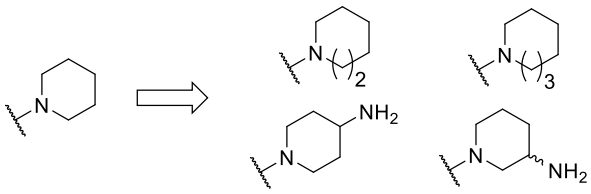



***Figure 169.*** *Ligands du site périphérique étudiés dans cette partie*

Après une rapide présentation de la conception *in silico* des réactivateurs, les synthèses seront présentées en détails ainsi que les évaluations biologiques.

## IV.1. Conception *in silico*

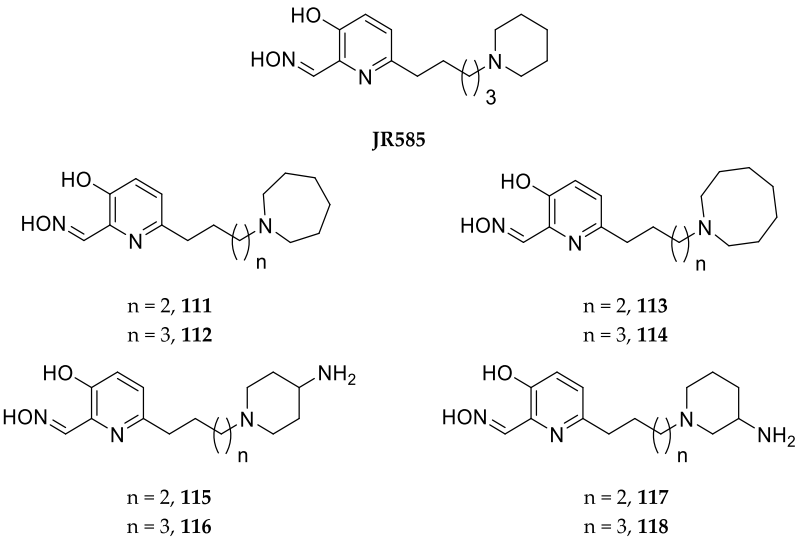



***Figure 170.*** *Réactivateurs étudiés*

Différents réactivateurs ont été envisagés (**Figure 170**) et les molécules possédant un bras espaceur à 5 chaînons ont fait l'objet d'une étude d'amarrage moléculaire statique (forme protonée majoritaire à pH = 7.4). Les interactions sont résumées dans le **Tableau 63**. Le mode d'interaction est sensiblement le même pour les réactivateurs étudiés. L'augmentation de la taille du cycle permet d'augmenter le nombre d'interactions (interactions C-H et Van Der Waals) augmentant l'énergie de stabilisation calculée. Le motif aminopipéridine permet d'ajouter d'autres modes de liaison notamment avec le Trp286 ($\pi$-cation) et d'augmenter également l'hydrosolubilité de ces molécules.

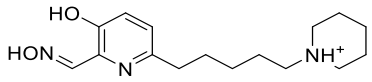
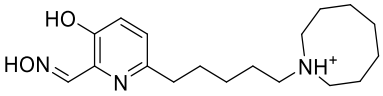
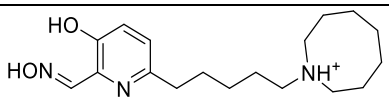
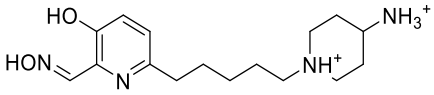
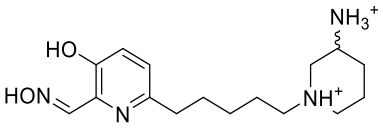
| Réactivateurs | Energie de stabilisation (kcal/mol) | Distance oxime / phosphore de la Ser203 | Résidus | Interactions (distance) |
|---|---|---|---|---|
|  **JR585** | -9.0 | 5.5 Å | Phe297<br>Tyr341<br>Tyr124<br>Trp86 | π-alkyl (5.40 Å)<br>π-cation (4.47 Å)<br>liaison H (2.70 Å)<br>π-π (4.14 Å) |
|  **112** | -9.3 | 5.5 Å | Phe297<br>Tyr341<br>Tyr124<br><br>Trp86 | Van der Waals<br>π -cation (4.39 Å)<br>C-H (3.4 Å)<br>C-H (3.29 Å)<br>π-π (4.23 Å) |
|  **114** | -9.4 | 5.6 Å | Tyr341<br>Tyr124<br>Phe297<br>Trp86 | π -cation (4.32 Å)<br>Van der Waals<br>Van der Waals<br>π-π (4.14 Å) |
|  **116** | -8.7 | 6.2 Å | Tyr124<br>Trp286<br>Tyr341<br><br>Phe297<br>Trp86 | liaison H (2.90 Å)<br>π -cation (6.0 Å)<br>π -cation (4.29 Å)<br>C-H (3.67 Å)<br>Van der Waals<br>π-π (4.14 Å) |
|  **118** | -9.0 | 6.2 Å | Tyr124<br>Trp286<br>Tyr341<br>Phe297<br>Trp86 | liaison H (2.46 Å)<br>π -cation (5.4 Å)<br>π -cation (4.75 Å)<br>Van der Waals<br>π-π (4.11 Å) |

***Tableau 63.*** *Interactions et distances observées entre les réactivateurs et la mAChE inhibée par le VX lors de l'étude d'amarrage moléculaire statique (interactions visualisées à l'aide du logiciel Discovery Studio version 17.2.0.16349 et Pymol version 2.0.7).*

Les paramètres physicochimiques ont été calculés comme précédemment (**Tableau 64**). Malgré des valeurs de p*K*a basique supérieurs à 10, et des surfaces polaires supérieures à 70 Å², les scores MPO sont favorables pour l'ensembles des molécules. L'ajout d'une amine primaire permettrait d'avoir au moins une amine protonée à pH physiologique garantissant ainsi la biodisponibilité et les interactions avec le site périphérique de l'enzyme inhibée.

| *Molécules* | *pKa ligand* | *MW (g/mol)* | *RB* | *HDB* | *HAB* | *logP* | *logD* | *PSA (Å²)* | *MPO score* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **111** | 10.60 | 291.40 | 6 | 2 | 5 | 2.01 | 1.31 | 68.95 | 4.5 |
| **112** | 10.70 | 305.42 | 7 | 2 | 5 | 2.44 | 1.72 | 68.95 | 3.5 |
| **113** | 10.70 | 305.42 | 6 | 2 | 5 | 2.44 | 1.74 | 68.95 | 4.5 |
| **114** | 10.81 | 319.45 | 7 | 2 | 5 | 2.88 | 2.16 | 68.95 | 4.42 |
| **115** | 6.80<br>9.64 ($NH_2$) | 292.38 | 6 | 3 | 6 | 1.15 | 0.32 | 94.97 | 4.09 |
| **116** | 6.98<br>9.68 ($NH_2$) | 306.41 | 7 | 3 | 6 | 0.65 | -0.88 | 94.97 | 4.25 |
| **117** | 8.39<br>10.56 ($NH_2$) | 292.38 | 6 | 3 | 6 | 0.25 | -1.14 | 94.97 | 4.09 |
| **118** | 8.47<br>10.58 ($NH_2$) | 306.41 | 7 | 3 | 6 | 0.71 | -0.05 | 94.97 | 4.26 |
| **JR585** | 10.49 | 291.39 | 7 | 2 | 5 | 2.02 | 1.32 | 68.95 | 4.5 |
| **Max CNS +** | 10 | 450 | 8 | 3 | 7 | 5 | - | 70.00 | ≥ 4 |

***Tableau 64.*** *Propriétés physico-chimiques simulées par MarvinSketch et Chemicalize.*

## IV.2. Synthèses des réactivateurs

Cette partie sera consacrée à la synthèse des réactivateurs présentés précédemment. Dans un premier temps, les synthèses des réactivateurs portant le motif azépane et azocane seront d'abord présentées. Les synthèses des composés avec le motif 4-aminopipéridine ainsi que 3--aminopipéridine (sous forme racémique) seront ensuite détaillées. Les synthèses suivent le même schéma synthétique que celui utilisé pour **RM048** et **GM415**. A noter que les rendements présentés ne sont pas optimisés. Lorsque différentes méthodologies ont été employées, le meilleur rendement de chaque étape sera pris en compte dans le calcul du rendement global. L'ensemble des réactivateurs ont été envoyés au Dr José Dias (IRBA) pour évaluation *in vitro*. Les sels de TFA des réactivateurs ont été caractérisés par RMN $^{1}H$ et $^{18}F$ (étalon interne $PhCF_3$).

### IV.2.1. Synthèse des dérivées de l'azépane

#### IV.2.1.1. Synthèse du réactivateur 111

La synthèse de ce dérivé n'a pas abouti, en effet la réaction de substitution nucléophile sur le dérivé **57b** ou **59b** et l'azépane **119**, ne permet pas d'obtenir le produit de substitution désiré (**Figure 171**), seul le produit d'élimination est obtenu majoritairement. Au vu des difficultés de mise en œuvre du couplage de Sonogashira de l'alcyne vraie portant l'amine, les efforts de synthèse se sont consacrés à son analogue comportant un espaceur à 5 carbones (**112**), plus facile d'accès.

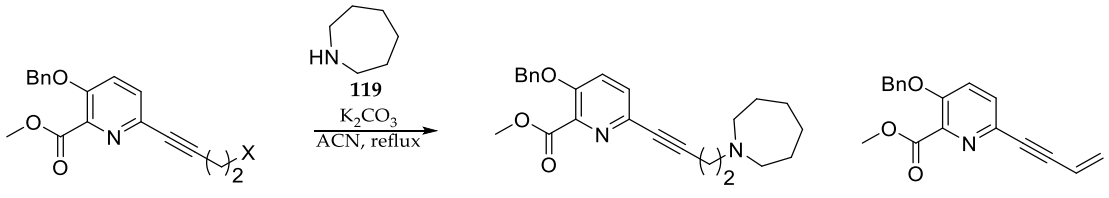
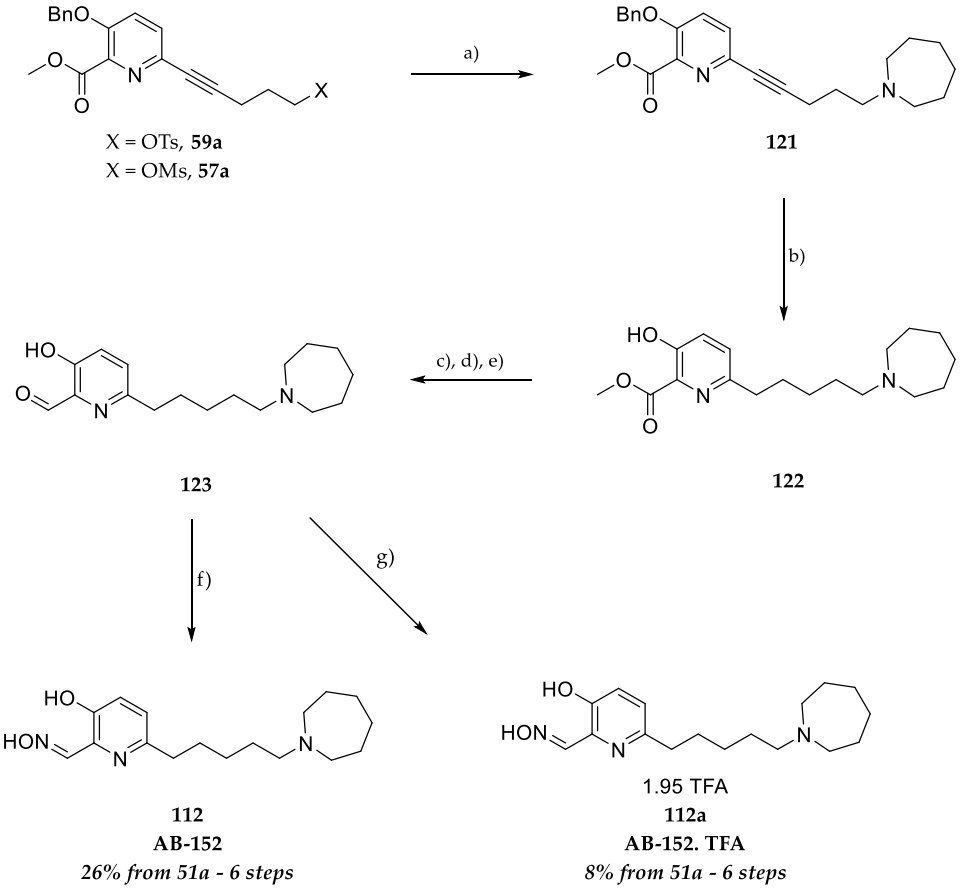



***Figure 171.*** *Tentative d'obtention de l'intermédiaire 120 par substitution nucléophile*

#### IV.2.1.2. Synthèse du composé 112

La voie synthétique choisie pour cette molécule est linéaire (**Figure 172**). L'intermédiaire **121** est obtenu par substitution nucléophile de l'alcool activé sous forme de tosylate **59a** ou de mésylate **57a** par l'azépane **119**. L'utilisation du mésylate (**57a**) permet d'avoir un rendement allant de 31 à 62% tandis que l'utilisation du tosylate (**59a**) permet d'obtenir l'intermédiaire clef avec des rendements allant de 21 à 25%. Ce resultat peut être rationalisé par l'encombrement stérique créé par le groupe tosyle, rendant l'accès de notre amine également encombrée difficile. L'intermédiaire **122** est obtenu après hydrogénation catalytique de l'alcyne avec un rendement quantitatif. L'obtention de l'intermédiaire **123**

se fait selon les conditions classiques avec un rendement global maximal de 68% après purification par chromatographie sur gel de silice. Enfin la génération de l'oxime **112** est réalisée avec un rendement de 60% après purification en phase normale. A noter que la purification de cette étape finale par chromatographie en phase inverse ne permet d'obtenir l'oxime **112a** (sel de TFA) qu'avec un rendement de 16% dû aux pertes liées à la phase inverse. Ainsi les molécules **112** et **112a** sont obtenues après 6 étapes à partir de l'intermédiaire **57a**, à hauteur de 38 mg et 98 mg, avec des rendements non-optimisés de 26% et 8% respectivement. La molécule **112** a été testée par le Dr José Dias (IRBA) *in vitro* tandis que la molécule **112a** a été évalué *in vivo* sur la souris par le Dr Guilhem Calas (IRBA). Sur le schéma de synthèse est précisé le nom de la molécule utilisé lors des échanges avec nos partenaires biologistes.




(a)**119**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***21-62 %***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***quant.***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C, ***93-98%***; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min, ***73-75%***; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***20-96%***; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, ***60%***; (g) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, then, reverse phase purification ***18%***.

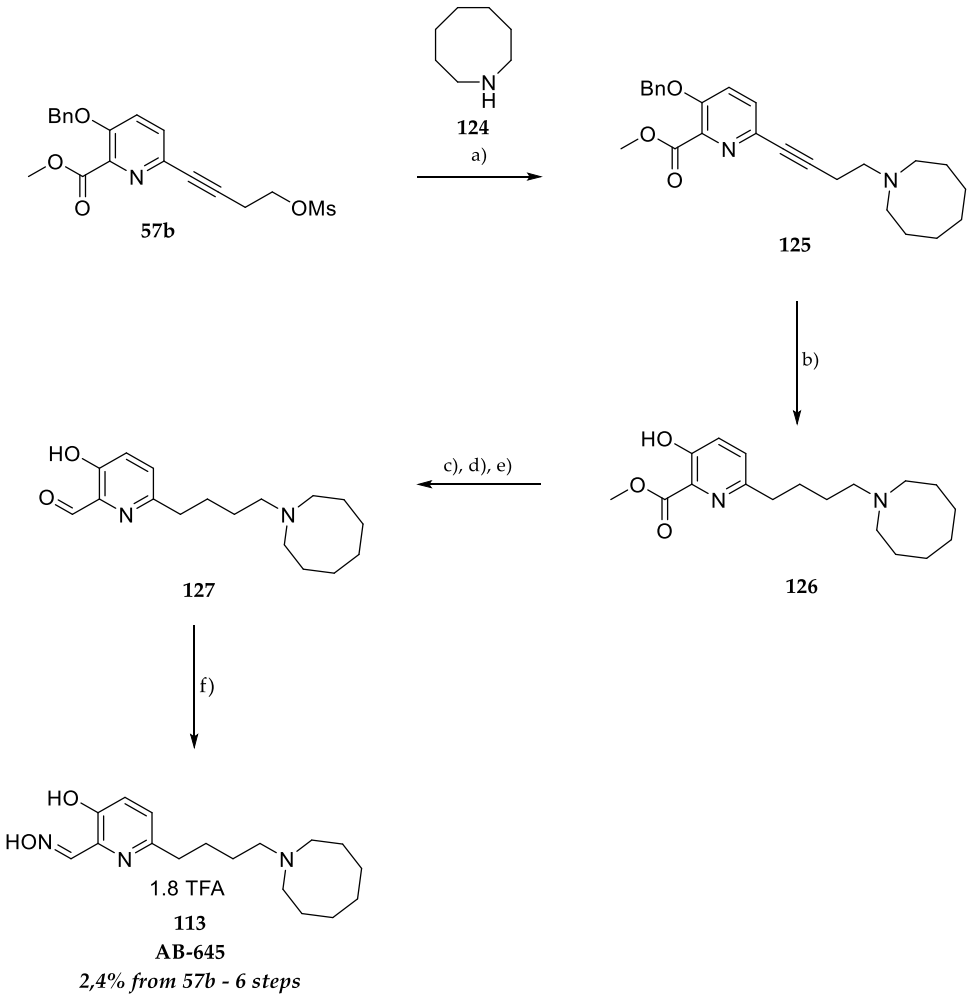
***Figure 172.*** *Synthèses du réactivateur* ***112*** *et de son sel de TFA* ***112a***

## IV.2.2. Synthèse des dérivées de l'azocane

### IV.2.2.1. Synthèse du composé 113

La substitution nucléophile de l'azocane **124** sur l'alcool activé **57b** permet l'obtention de l'intermédiaire **125** avec un rendement non optimisé de 29%. Ce faible rendement est dû à la réaction d'élimination qui

est prépondérante dans ce cas. Après hydrogénation catalytique, l'aldéhyde **127** est généré à partir de l'ester **126** après protection-réduction-déprotection avec un rendement global non-optimisé de 46%. La génération de l'oxime **113** est réalisée dans les conditions réactionnelles classiques. Après purification par chromatographie en phase inverse, la molécule **113** a été obtenue sous forme de sel de TFA avec un rendement global non-optimisé de 2.4 % sur 6 étapes), à hauteur de 5 mg (**Figure 173**).

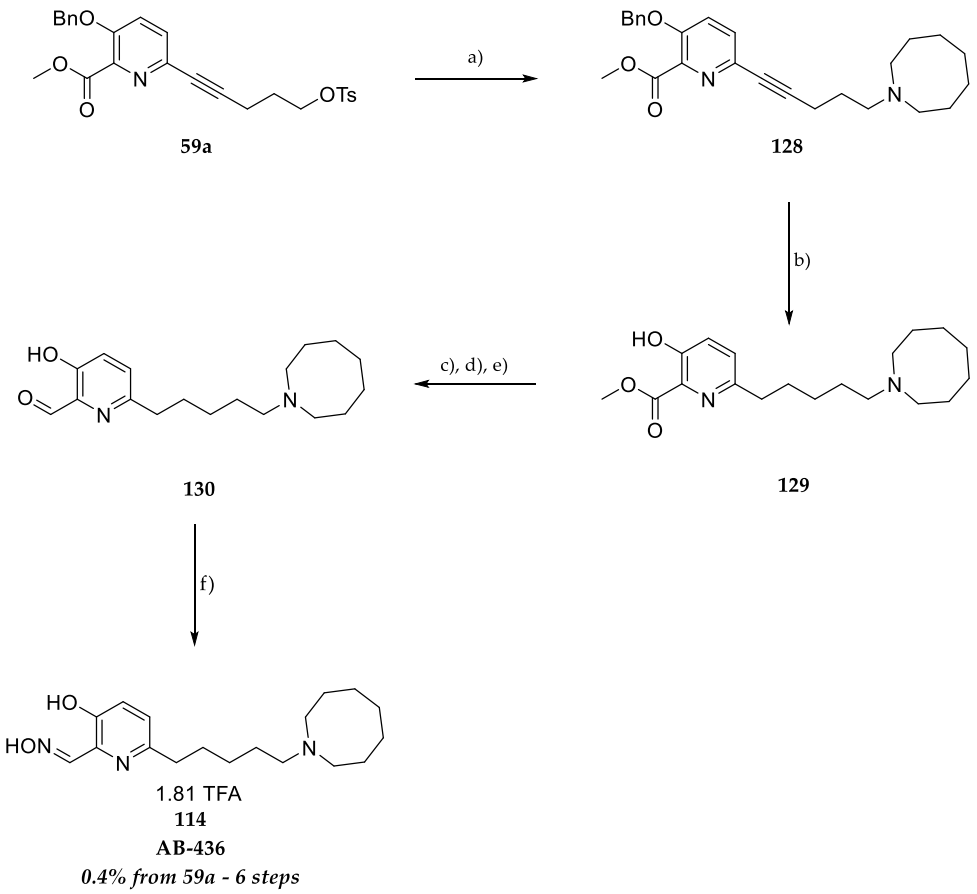



(a) **124**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***29 %***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***quant.***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***46 % - 3 steps***; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, then, reverse phase purification ***18%.***

***Figure 173.*** *Synthèse du réactivateur 113*

### IV.2.2.2. Synthèse du composé 114

La substitution nucléophile sur l'alcool activé **59b** permet l'obtention de l'intermédiaire **128** avec un rendement non optimisé de 85%. Après hydrogénation catalytique réalisée avec un rendement de 74%, l'ester **129** est transformé en l'aldéhyde **130** après protection-réduction-déprotection avec un rendement global non-optimisé de 19%. Après génération de l'oxime et purification par chromatographie en phase inverse, la molécule **114** a été obtenue sous forme de sel de TFA avec un rendement global non-optimisé de 0.4 % sur 6 étapes à partir de **59a**, à hauteur de 5 mg (**Figure 174**).




(a) **124**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***85 %***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***74%***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C, ***71%***; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min, ***46%***; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***57%***; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, ***60%***; (g) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, then, normal and reverse phase purification ***3%***.

***Figure 174.*** *Synthèse du réactivateur 114*

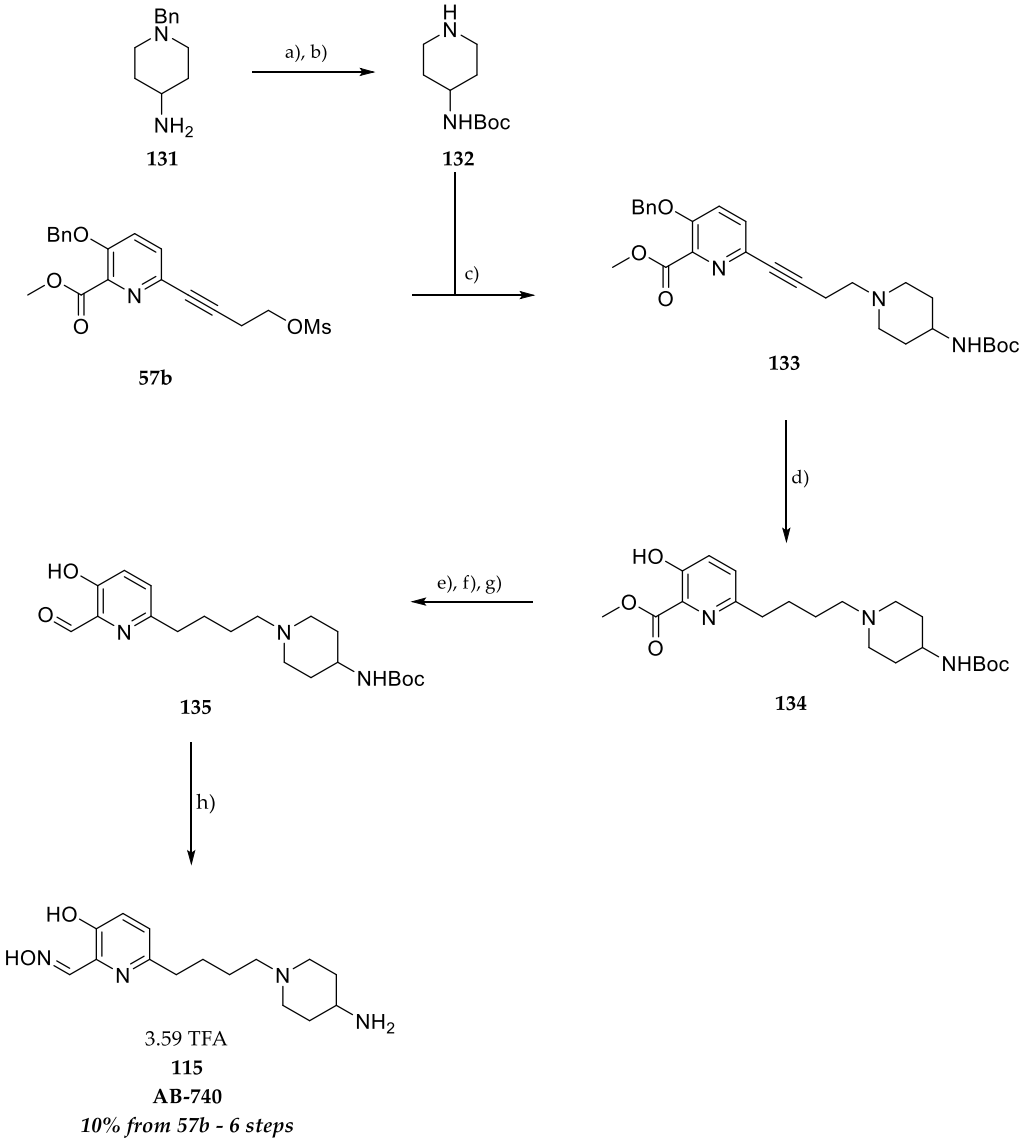
## IV.2.3. Synthèses des dérivés des 4-amino et 3-aminopipéridines

### IV.2.3.1. Synthèses des réactivateurs incorporant le motif 4-aminopipéridine

#### *IV.2.3.1.1. Synthèse du réactivateur 115*

L'amine **132** a été obtenue sur deux étapes à partir de l'amine commerciale **131** (**Figure 175**). La protection de l'amine primaire sous forme de Boc, suivie d'une déprotection de la pipéridine a été réalisée avec un rendement de 97% sur deux étapes. La réaction de substitution nucléophile entre **57b** et l'amine **132** a permis d'obtenir le composé **133** avec un rendement de 32% après purification par chromatographie sur gel de silice. L'intermédiaire **134**, obtenu après hydrogénation catalytique de l'intermédiaire **133**, est mis en réaction dans la suite de réaction de protection - réduction - déprotection classique pour obtenir l'aldéhyde **135** (57% sur 3 étapes). Par ailleurs, un essai de déprotection au $NH_4F$ (1.5 equiv) dans le méthanol (0.1 M) en lieu et place du TBAF (1 M dans THF) afin de faciliter l'étape de purification a été effectué et permet une déprotection totale de l'éther silylé en 1h30 (suivi MS). Cependant, cette alternative nécessite une optimisation afin d'être mise en place dans la suite

réactionnelle. La dernière étape est une réaction monotope séquentielle consistant en la génération de l'oxime et d'une déprotection du groupement amino. Après purification par chromatographie en phase inverse, le réactivateur **115** est obtenu sous la forme de sel de TFA), à hauteur de 177 mg, avec un rendement de 57% soit un rendement global non-optimisé de 10% à partir de l'intermédiaire **57b** sur 6 étapes.



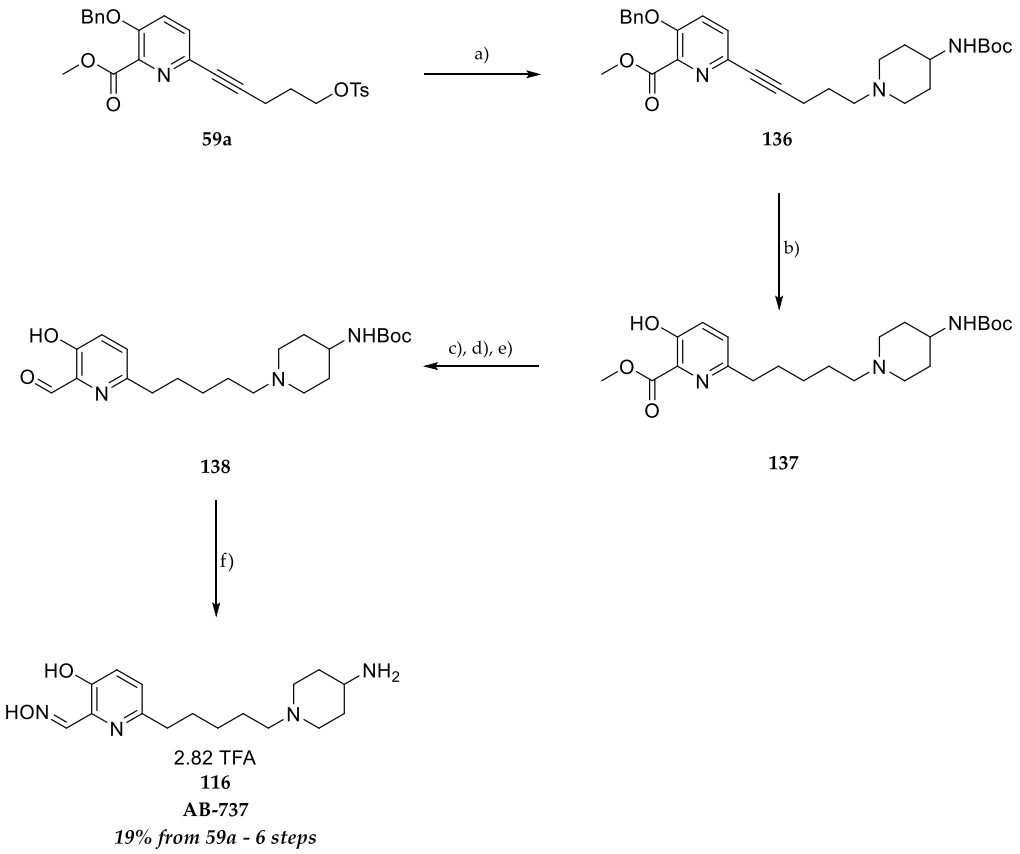

(a)$Boc_2O$, DIPEA, THF, 0°C, overnight, ***97%***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, ***quant.***; (c)$K_2CO_3$, ACN, reflux, 6h, ***32%***; (d) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 4 days, ***quant.***; (e) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C, ***quant.***; (f) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min, ***76%***; (g) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***75%***; (h) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 10 min, then TFA, 10 min, ***57%***.

***Figure 175.*** *Synthèse du réactivateur **115***

### *IV.2.3.1.2. Synthèse du réactivateur 116*

Le réactivateur **116** a été obtenu sous la forme de sel de TFA, à hauteur de 298 mg, avec un rendement global non-optimisé de 19% sur 6 étapes, à partir de l'intermédiaire **59a** (**Figure 176**). La synthèse de ce réactivateur débute par la substitution nucléophile de l'amine **132** sur le tosylate **59a** avec un rendement

de 98 %. Après hydrogénation catalytique de l'alcyne **136** avec un rendement quantitatif, l'intermédiaire **137** a été soumis à la suite de trois réactions de protection – réduction - déprotection afin de générer l'aldéhyde **138** (30% sur 3 étapes). La dernière étape permet la génération de l'oxime ainsi que la déprotection du ligand de manière séquentielle (monotope) avec un rendement de 65% après purification par chromatographie en phase inverse.




(a) **132**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 6h, ***98%***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***99%***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C, ***92%***; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min, ***quant.***; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***33%***; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 10 min, then TFA, 10 min, ***65%***.

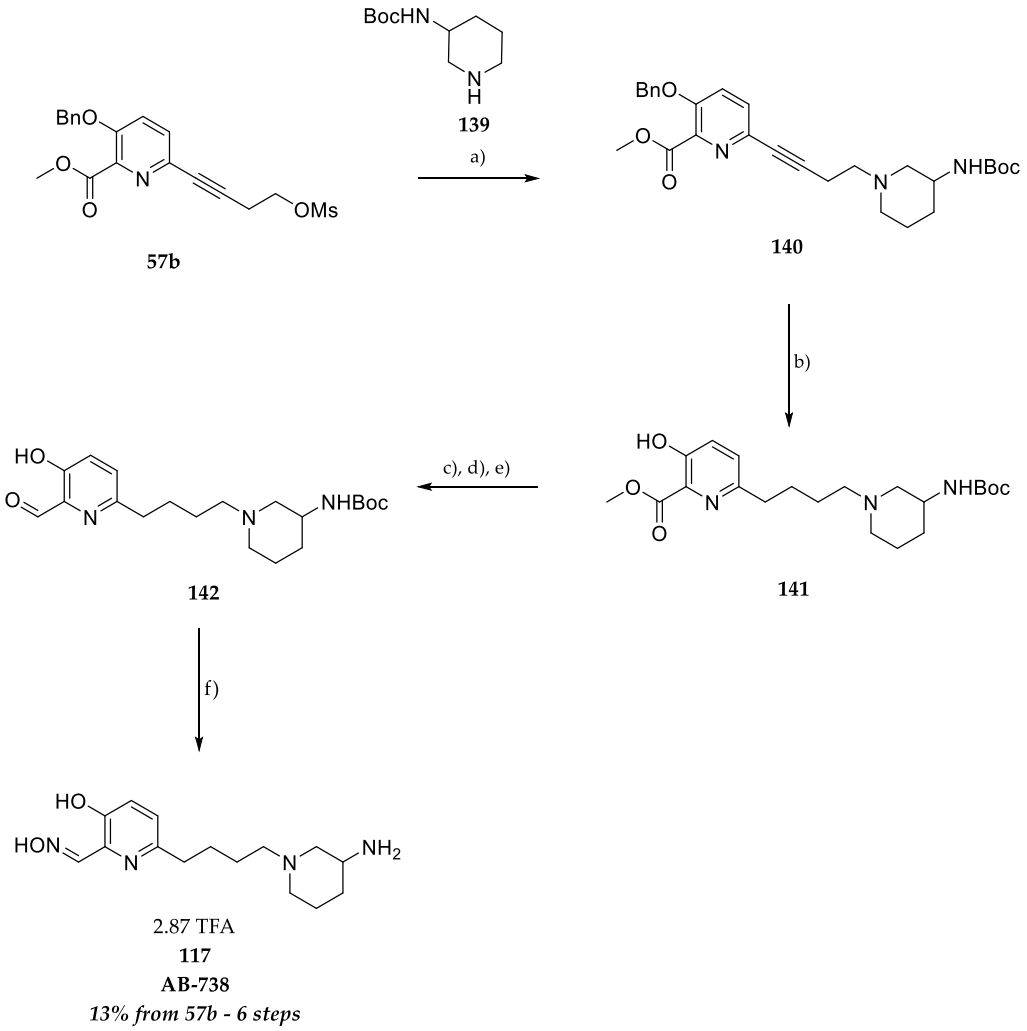
***Figure 176.*** *Synthèse du réactivateur 116*

### IV.2.3.2. Synthèse des réactivateurs incorporant le motif 3-aminopipéridine

#### *IV.2.3.2.3. Synthèse du réactivateur 117*

La synthèse du réactivateur **117** suit la même séquence réactionnelle que celle utilisée pour le réactivateur **115**. Le réactivateur a donc été obtenu sous la forme de sel de TFA, sous forme racémique, à hauteur de 200 mg, avec un rendement global non-optimisé de 13% sur 6 étapes à partir de l'intermédiaire **57b** (**Figure 177**). La réaction de substitution nucléophile entre l'amine **139** commerciale et le mésylate **57b** permet d'obtenir l'intermédiaire **140** avec un rendement faible de 38%. L'hydrogénation catalytique de l'alcyne **140** permet d'obtenir l'intermédiaire **141** avec un rendement de 98%. L'aldéhyde **142** est alors obtenu par protection-réduction-déprotection avec un rendement de 55%

sur 3 étapes. Enfin, la génération de l'oxime et la déprotection finale sont effectuées selon les mêmes conditions que précédemment (monotope séquentielle) avec un rendement de 64% après purification par chromatographie en phase inverse.



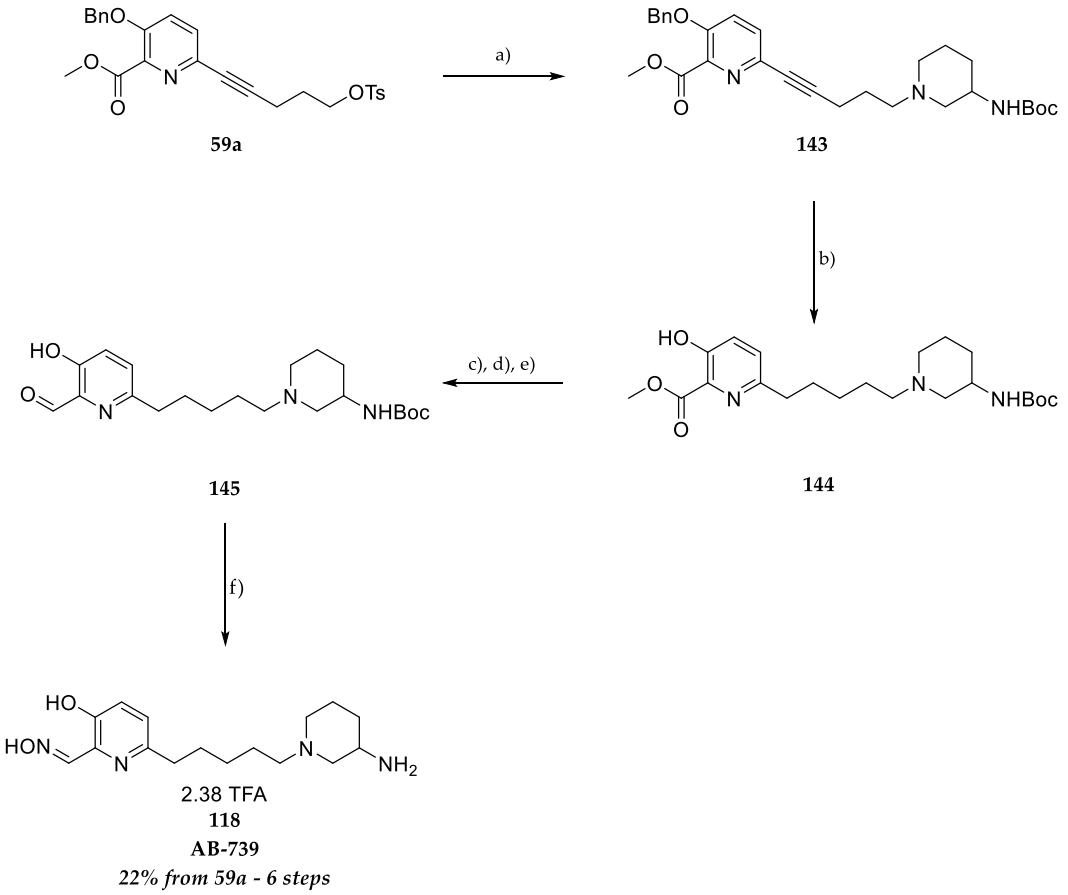

(a)$K_2CO_3$, ACN, reflux, 6h, ***38%***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***98%***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***55% over 3 steps***; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 10 min, then TFA, 10 min, ***65%***.

***Figure 177.*** *Synthèse du réactivateur* ***117***

### *IV.2.3.2.4. Synthèse du réactivateur 118*

Suivant la même séquence réactionnelle que le réactivateur **116**, la molécule **118** a été obtenue sous la forme de sel de TFA, à hauteur de 258 mg, avec un rendement global non-optimisé de 22% sur 6 étapes à partir du dérivé tosylé **59a** (**Figure 178**). La substitution nucléophile entre le dérivé **59a** et l'amine **139** permet d'obtenir l'intermédiaire **143** avec un rendement de 83% après purification par chromatographie sur gel de silice. Après hydrogénation catalytique de l'alcyne **143** avec un rendement de 92%, l'intermédiaire **144** est successivement protégé, réduit et déprotégé pour obtenir l'intermédiaire **145** avec un rendement sur 3 étapes de 37%. La réaction monotope séquentielle sur l'intermédiaire **145**

décrite précédemment permet l'obtention du réactivateur **118** avec un rendement de 76 % après purification par chromatographie en phase inverse.




(a) **139**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 6h, ***83%***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***92%***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***37% over 3 steps***; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 10 min, then TFA, 10 min, ***76%***.

***Figure 178.*** *Synthèse du réactivateur* ***118***

## IV.3. Evaluations biologiques

Ces molécules ont été envoyées à différents partenaires afin d'évaluer leur capacité à réactiver les cholinestérases in vitro et également au Dr. Belén Pérez pour évaluation *in vitro* du passage de la BHE.

### IV.3.1. Passage de la BHE *in vitro*

Comme précédemment, la pénétration cérébrale des molécules **115** à **118** par diffusion passive a été évaluée par le Dr Bélen Pérez, en utilisant le test de perméation de membrane artificielle (PAMPA-BBB). La perméabilité *in vitro* ($P_e$) des oximes au travers d'un extrait lipidique de cerveau de porc a été déterminée. La validation du test a été effectuée en comparant les valeurs de perméabilité

expérimentales et issues de la littérature de quatorze médicaments commerciaux, donnant une bonne corrélation linéaire ($R^2$ = 0,9321) :

$$P_e \text{ (expérimentale)} = 1{,}6601\ P_e \text{ (littérature)} - 1{,}3856.$$

En utilisant cette équation et les limites de perméabilité de la BHE établies par Di et coll,[500] les fourchettes suivantes de perméabilité $P_e$ ont été établies :

- $P_e > 5{,}255$ pour les composés à haute perméabilité à la BHE (CNS +)
- $P_e < 1{,}935$ pour les composés à faible pénétration de la BHE (CNS -)
- $5{,}255 > P_e > 1{,}935$ pour les composés à pénétration incertaine de la BHE (CNS ±).

Selon le résultat du test PAMPA, le transport passif à travers la BHE n'a pas été observé pour les molécules testées (**Tableau 65**). L'amine libre sous forme $NH_2$ nécessite d'être modifiée afin que le passage de la BHE soit facilité.

| *Oxime* | *$P_e$ ($10^{-6}$ cm $s^{-1}$)* | *Prédiction CNS* | *Score MPO-CNS* |
|---|---|---|---|
| **115** (AB-740) | 1,4±0,1 | CNS- | 4.09 |
| **116** (AB-737) | 1,0±0,1 | CNS- | 4.25 |
| **117** (AB-738) | 0,8±0,0 | CNS- | 4.09 |
| **118** (AB-739) | 0,1±0,0 | CNS- | 4.26 |

***Tableau 65.*** *Perméabilité à la BHE in vitro ($P_e$) des molécules 90, 91, 93 obtenues lors du test PAMPA*

### IV.3.2. Réactivation des *h*AChEs in vitro

Concernant l'évaluation *in vitro* de leur pouvoir de réactivation, l'étude menée par le Dr José Dias est en cours. Cependant, bien que les constantes cinétiques ne soient pas encore disponibles, des constantes $k_{obs}$ à 100 µM nous ont été communiquées et nous permettent d'avoir un aperçu de leur réactivité *in vitro* (**Tableau 66**). Seules les molécules **116** à **118** réactivent l'AChE inhibée par les différents NOPs testés. En, effet, les molécules **112** à **115** sont incapables de réactiver l'*h*AChE inhibée par le NEDPA (analogue du Tabun), tandis que les molécules **116** à **118** réactivent de manière plus efficace que la 2-PAM (2.3 à 3.7 fois plus efficace que la 2-PAM à 100 µM). Concernant la réactivation de l'*h*AChE inhibée par le NEMP (analogue du VX) ou le paraoxon, l'ensemble de molécules possède des constantes bien supérieures à celles du HI-6 et de la 2-PAM. Malheureusement, dans le cas du sarin, seules les molécules **117** et **115** ont des constantes supérieures à celle de la 2-PAM et seule, la molécules **115** surpasse le HI-6 à 100 µM.

En conclusion, la molécule **115**, malgré son absence de réactivation sur l'*h*AChE inhibée par le NEDPA, à des capacités supérieures au HI-6 ; la molécule **117** présente les plus grandes capacités de réactivation à 100 µM pour une utilisation à large spectre.

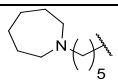
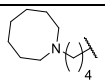
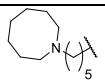
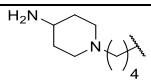
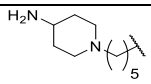
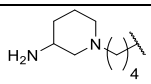
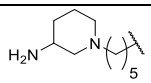
| *Oximes* | *Structure du ligand et de l'espaceur* | *VX (NEMP)* | *Sarin (NIMP)* | *Tabun (NEDPA)* | *POX* |
|---|---|---|---|---|---|
| **112** |  | **0.4** | **0.38** | **Ø** | **0.24** |
| **113** |  | 0.55 ± 0.01<br>0.70 ± 0.02<br>**0.63** | 0.14 ± 0.0009<br>0.13 ± 0.0007<br>**0.14** | Ø<br>Ø<br>**Ø** | 0.25 ± 0.008<br>0.31 ± 0.012<br>**0.28** |
| **114** |  | 0.24 ± 0.002<br>0.32 ± 0.003<br>**0.28** | 0.008 ± 0.0008<br>0.009 ± 0.008<br>**0.009** | Ø<br>Ø<br>**Ø** | 0.09 ± 0.0006<br>0.10 ± 0.0008<br>**0.10** |
| **115** |  | 2.68 ± 0.03<br>2.51 ± 0.25<br>**2.60** | 0.57 ± 0.02<br>0.64 ± 0.03<br>**0.61** | Ø<br>Ø<br>**Ø** | 1.7 ± 0.19<br>1.9 ± 0.25<br>**1.8** |
| **116** |  | 0.46 ± 0.01<br>0.46 ± 0.01<br>**0.46** | 0.18 ± 0.002<br>0.19 ± 0.002<br>**0.19** | 0.37 ± 0.03<br>0.41 ± 0.03<br>**0.39** | 0.25 ± 0.003<br>0.26 ± 0.004<br>**0.26** |
| **117** |  | 0.8 ± 0.026<br>0.87 ± 0.03<br>**0.84** | 0.24 ± 0.003<br>0.29 ± 0.007<br>**0.27** | 0.57 ± 0.06<br>0.68 ± 0.07<br>**0.63** | 0.26 ± 0.003<br>0.27 ± 0.003<br>**0.27** |
| **118** |  | 0.38 ± 0.006<br>0.39 ± 0.006<br>**0.39** | 0.16 ± 0.002<br>0.15 ± 0.001<br>**0.16** | 0.52 ± 0.06<br>0.41 ± 0.04<br>**0.47** | 0.19 ± 0.002<br>0.18 ± 0.002<br>**0.19** |
| **HI-6** | | 0.28 ± 0.005 | 0.45 ± 0.002 | Ø | 0.025 ± 0.0002 |
| **2-PAM** | | 0.14 ± 0.001 | 0.2 ± 0.002 | 0.17 ± 0.001 | 0.03 ± 0.0002 |

***Tableau 66.*** *$k_{obs}$ à 100 µM en $min^{-1}$ sur la hAChE inhibée par différents NOPs (expérience en microplaque; en gras la moyenne arrondie; Ø : pas de réactivation).*

L'évaluation *in vitro* a été complétée dans le cas de la molécule **112**. Les constantes cinétiques de réactivation de l'*h*AChE inhibée par différents NOPs ainsi que les $IC_{50}$ sur l'enzyme native sont détaillées dans le **Tableau 67**. Concernant les affinités envers l'enzyme inhibée, la molécule **112** est bien moins affine que les réactivateurs de référence malgré une affinité envers l'enzyme native bien supérieure. Aussi, les cinétiques de réactivation sont bien plus élevées que celles présentées par la 2-PAM et le HI-6 (à l'exception du sarin où le HI-6 surpasse la molécule **112**). L'efficacité globale de cette molécule est équivalente au 2-PAM dans le cas du VX et du sarin, mais surpasse aisément les réactivateurs de référence dans le cas du paraoxon.

| *Constantes cinétiques* | *NOPs* | *Oximes* | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **112** | **HI6** | **2PAM** |
| $K_D$ *(µM)* | VX (NEMP) | 216 ± 31 | 19 ± 4 | 26 ± 7 |
| | Sarin (NIMP) | 69 ± 15 | 57 ± 11 | 25 ± 7 |
| | Tabun (NEDPA) | Ø | Ø | 211 ± 113 |
| | Paraoxon | nd | 290 ± 70 | 68 ± 16 |
| $k_r$ *(min$^{-1}$)* | VX (NEMP) | 1.3 ± 0.12 | 0.38 ± 0.02 | 0.19 ± 0.013 |
| | Sarin (NIMP) | 0.66 ± 0.05 | 0.76 ± 0.06 | 0.27 ± 0.02 |
| | Tabun (NEDPA) | Ø | Ø | 0.47 ± 0.19 |
| | Paraoxon | nd | 0.1 ± 0.01 | 0.066 ± 0.02 |
| $k_{r2}$ *(mM$^{-1}$min$^{-1}$)* | VX (NEMP) | 6 | 20 | 7.3 |
| | Sarin (NIMP) | 9.5 | 13.3 | 10.8 |
| | Tabun (NEDPA) | Ø | Ø | 2.24 |
| | Paraoxon | 2.7 | 0.36 | 0.97 |
| **$IC_{50}$ (µM)** | - | 25 ± 4 | 82 ± 6 | 580 ± 28 |

***Tableau 67.*** *Constantes cinétiques de réactivation in vitro de la molécule 112 sur la hAChE inhibée par différents NOP (nd : non-déterminé ; Ø : absence de réactivation) et $IC_{50}$ sur la hAChE*

Etant donnée les capacités excellentes dans le cas du paraoxon, la molécule **112** a fait l'objet d'essais de protection sur la souris par le Dr Guilhem Calas. Afin d'éviter les problèmes de solubilité, le sel de trifluoroacétate du réactivateur **112a** a été employée. Les indices de protection ont donc été déterminés sur la souris (**Tableau 68**). Pour les trois NOPs testés, les indices de protection sont du même ordre de grandeur : la molécule **112a** protège donc les souris des NOPs de la même façon sur les 3 NOPs testés contrairement aux molécules de référence. Dans le cas du paraoxon, la molécule surpasse le HI-6 mais les capacités de protection restent inférieures à la 2-PAM et à l'obidoxime. Enfin, utilisée en protection contre le NEMP et le NIMP, la molécule est plus efficace que la 2-PAM mais reste moins efficace comparé au HI-6 et l'obidoxime. Face à ces résultats décevants et malgré l'homogénéité des indices de protection obtenus, le développement de la molécule **112** a été abandonné.

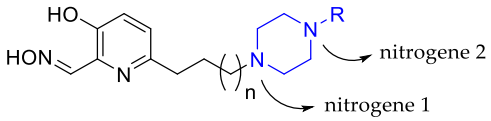
| **Traitement** | **Paraoxon** | **VX (NEMP)** | **Sarin (NIMP)** |
|---|---|---|---|
| Aucun réactivateur | 1 | 1 | 1 |
| 2-PAM | 2,58 | 1,43 | 1,07 |
| HI-6 | 1,6 | 3 | 2,63 |
| Obidoxime | 3,79 | 2,27 | 2,85 |
| **112a** | 1,61 | 1,57 | 1,4 |

***Tableau 68.*** *Indices de protection déterminés sur la souris en absence d'atropine*

## V. Incorporation de pipérazines *N*-substituées

Le motif pipérazine est un fragment très fréquemment rencontrer en chimie médicinale notamment dans les molécules actives au niveau du SNC.[513–515,524–526] L'intérêt de ce fragment, outre ses activités biologiques diverses, est sa capacité avérée à améliorer les propriétés pharmacocinétiques des molécules, telles que la solubilité dans l'eau et la stabilité métabolique. La présence de deux atomes d'azotes dans ce cycle permet une véritable modulation des propriétés physicochimiques de la molécule mais aussi sa formulation sous forme de sel. De ce fait, ce motif a été rapidement envisagé en tant que ligand du site périphérique dans le développement de nos réactivateurs.

### V.1. Conception *in silico*




| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| n = 2, R = Me, | **146** | n = 2, R = Ph, | **150** | n = 2, R = 2-py, | **156** |
| n = 3, R = Me, | **147** | n = 3, R = Ph, | **151** | n = 3, R = 2-py, | **157** |
| n = 2, R = Et, | **148** | n = 2, R = Bn, | **152** | n = 2, R = 2-pym, | **158** |
| n = 3, R = Et, | **149** | n = 3, R = Bn, | **153** | n = 3, R = 2-pym, | **159** |
| | | n = 2, R = -$CHPh_2$, | **154** | | |
| | | n = 3, R = -$CHPh_2$, | **155** | | |

***Figure 179.*** *Réactivateurs étudiés dans cette partie*

Différents substituants ont été envisagés sur ce motif pipérazine (**Figure 179**) avec comme objectif une modulation des de valeurs de p*K*a des atomes d'azote mais aussi de la lipophilie et de l'affinité envers l'enzyme inhibée. Cette partie sera consacrée aux études d'amarrage moléculaire ainsi qu'aux simulations des propriétés physico-chimiques pour le passage de la BHE pour ces composés.

En premier lieu, l'ajout d'une chaîne alkyle linéaire a été étudié au travers des molécules **146** à **149** afin de vérifier l'apport du motif pipérazine. Des études d'amarrage moléculaire en statique et en flexible ont donc été menées sur la *m*AChE inhibée par le VX. Les différentes interactions sont illustrées dans la **Figure 180**. L'azote relié au bras espaceur est protoné, permettant des interactions intéressantes de type cation-π ainsi que des liaisons hydrogènes stabilisantes avec les résidus Tyr124, Tyr341 et Tyr337. La chaîne alkyle interagit aussi avec le site périphérique *via* des interactions de type π-allyle et π-σ avec les résidus Trp286 et Tyr72. Ces molécules sont stabilisées par de nombreuses interactions de type Van Der Waals. Enfin, l'oxime est en position active, c'est-à-dire qu'elle pointe vers le phosphore de la serine phosphylée (distance comprise entre 4.3 et 5.6 Å). De plus, le noyau pyridine est stabilisé par un π-stacking avec le Trp86.

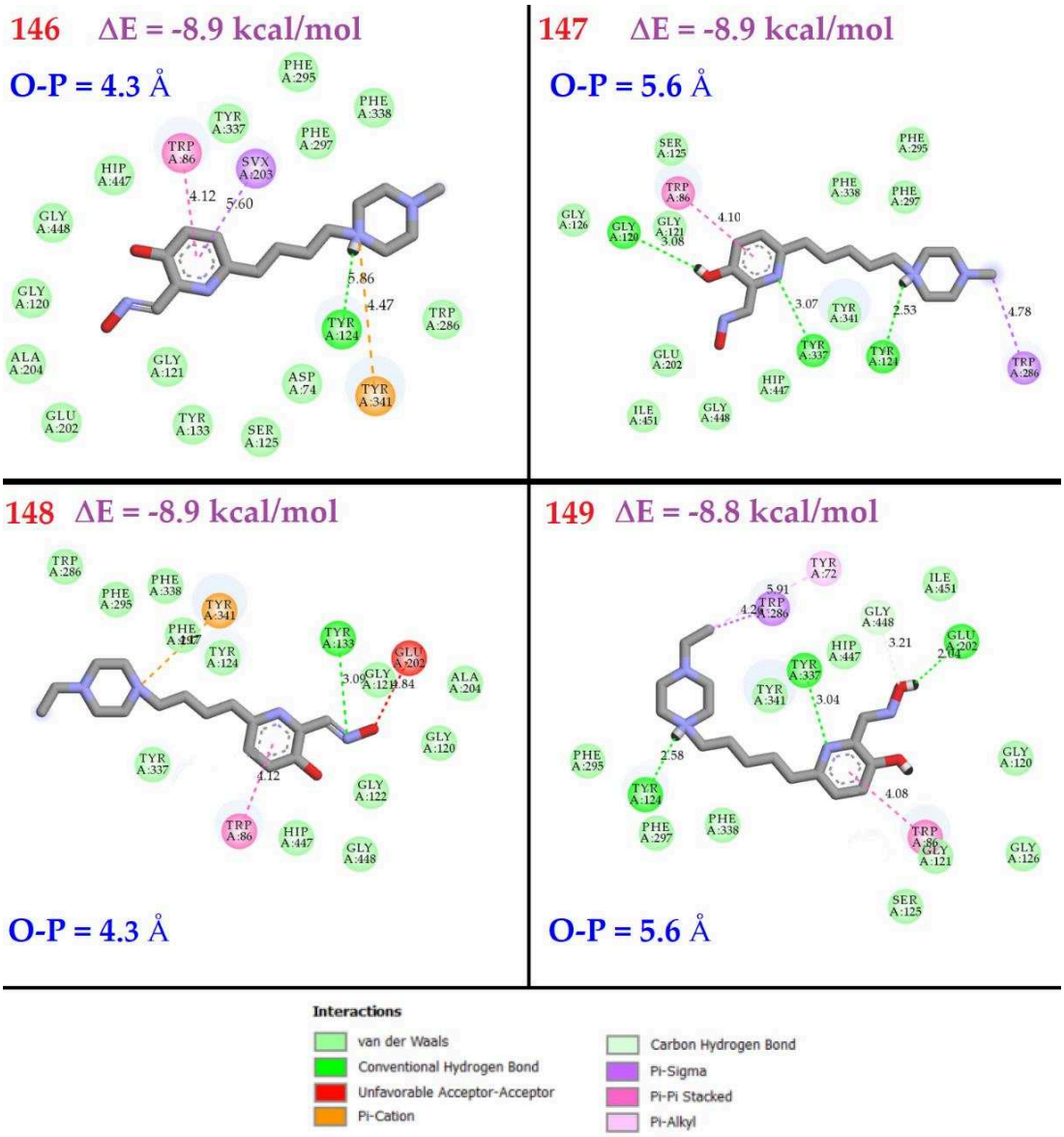



***Figure 180.*** *Interactions entre les molécules 146 à 148 dockées (statique) avec la mAChE inhibée par le VX (visualisé sur Discovery Studio version 17.2.0.16349 ; O-P : distance oxime phosphore).*

Cependant, les interactions peuvent être augmentées notamment par l'apport de motifs aromatiques et hétérocycliques. Les molécules **150** à **159** ont donc été évaluées en docking flexible illustrant des modes d'interactions spécifiques (**Figure 181**). En effet, le greffage d'un motif phényle permet des interactions de type π-stacking avec la Tyr124 et le Trp286. Aussi, cette interaction permet de placer idéalement l'azote 1 de la pipérazine en face de la Tyr341, induisant une interaction cation-π. Le remplacement du phényle par un benzyle permet d'augmenter les degrés de liberté du cycle aromatique. En effet, le mode d'interaction change et permet un π-stacking avec le Trp286 mais aussi un π-stacking T-shaped (perpendiculaire) avec le résidu Tyr124 tout en conservant l'interaction avec la Tyr341. L'ajout d'un second phényle sur cette molécule permet d'ajouter un π-stacking T-shaped (perpendiculaire) avec le résidu Tyr341. Lorsque l'azote 2 de la pipérazine est substitué par une pyridine, les modes de liaison observés avec le phényle sont retrouvés. Etant donné la valeur de p*K*a de cette pyridine, des interactions

cation-π en plus des π-stacking avec la Tyr124 et le Trp286 pourraient avoir lieu. Enfin, l'ajout d'un second azote sur la pyridine change complètement le mode de liaison qui se rapproche sensiblement de celui observé avec l'adduit diphényle.

Outre ces interactions avec le site périphérique, les oximes sont en position active : elles pointent vers le phosphore de la serine phosphylée (distance comprise entre 3.9 et 4.5 Å). Enfin, le noyau pyridine est stabilisé par un π-stacking avec le Trp86 pour toutes les structures étudiées.

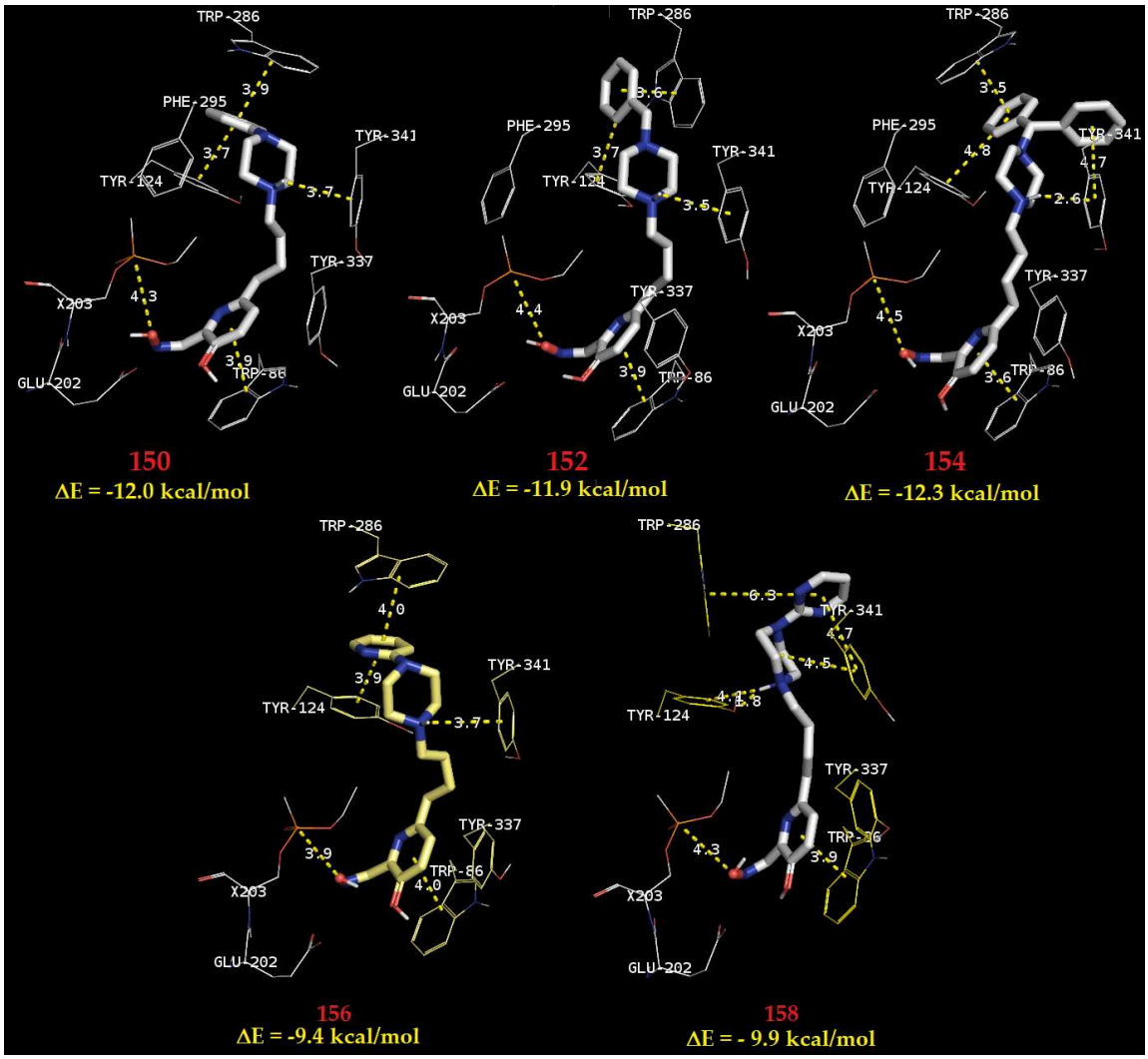



***Figure 181.*** *Dockings flexibles des molécules* ***150***, ***152***, ***154***, ***156*** *et* ***158*** *avec la mAChE inhibée par le VX (visualisés sur Pymol version 2.0.7)*

Face à ces résultats plus qu'encourageant, les propriétés physicochimiques ont donc été étudiées avec attention. Ces paramètres sont résumés dans le **Tableau 69**. L'avantage majeur des pipérazines est que le p*K*a de l'azote 1 du cycle est idéalement situé entre 7 et 8 (à l'exception de la molécule **154**). Malheureusement l'azote 2 du cycle pipérazine présente des p*K*a trop faible pour espérer une protonation. Cependant, dans le cas des pipérazines *N*-aromatique et *N*-hétérocyclique, la protonation n'est pas nécessaire étant donnée les interactions déjà présentes. A partir des paramètres simulés, les scores MPO-CNS ont été calculés en utilisant le programme python que nous avons développé. Toutes

les molécules présentent des scores compris entre 4.8 et 5.5 à l'exception des molécules **154** et **155** du fait de leur lipophile élevée et de la présence d'un grand nombre de liaisons rotatives. Ces données nous donnent un bon espoir d'obtenir des molécules actives au niveau du SNC.

| *Oximes* | *pKa N1* | *pKa N2* | *pKa R* | *MW (g/mol)* | *RB* | *HDB* | *HAB* | *logP* | *logD* | *PSA (Å²)* | *MPO score* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***146*** | *7,91* | *2,38* | - | *292,38* | *6* | *2* | *6* | *0,94* | *0,63* | *72,19* | *5,5* |
| ***147*** | *7,98* | *2,45* | - | *306,41* | *7* | *2* | *6* | *1,31* | *0,95* | *72,19* | *5,5* |
| ***148*** | *7,95* | *2,53* | - | *306,4* | *7* | *2* | *6* | *1,25* | *0,92* | *72,19* | *5,5* |
| ***149*** | *8* | *2,63* | - | *320,43* | *8* | *2* | *6* | *1,64* | *1,27* | *72,19* | *5,5* |
| ***150*** | *7,9* | *-0,63* | - | *354,45* | *7* | *2* | *6* | *2,82* | *2,52* | *72,19* | *5,24* |
| ***151*** | *7,98* | *-0,6* | - | *368,48* | *8* | *2* | *6* | *3,21* | *2,85* | *72,19* | *4,91* |
| ***152*** | *7,83* | *2,3* | - | *368,48* | *8* | *2* | *6* | *2,72* | *2,45* | *72,19* | *5,21* |
| ***153*** | *7,9* | *2,37* | - | *382,51* | *9* | *2* | *6* | *3,13* | *2,8* | *72,19* | *4,88* |
| ***154*** | *10,33* | *3,51* | - | *444,58* | *9* | *2* | *6* | *4,48* | *4,19* | *72,19* | *2,15* |
| ***155*** | *7,88* | *2,5* | - | *458,66* | *10* | *2* | *6* | *4,9* | *4,58* | *72,19* | *2,84* |
| ***156*** | *8,52* | - | *5,22* | *355,44* | *7* | *2* | *7* | *2,39* | *2,16* | *85,08* | *5,16* |
| ***157*** | *7,85* | - | *5,2* | *369,47* | *8* | *2* | *7* | *2,8* | *2,5* | *85,08* | *5,18* |
| ***158*** | *7,49* | - | *2,05* | *356,43* | *7* | *2* | *8* | *1,86* | *1,71* | *97,97* | *5,24* |
| ***159*** | *7,71* | - | *2,04* | *370,46* | *8* | *2* | *8* | *2,3* | *2,08* | *97,97* | *5,12* |
| ***Max CNS +*** | *10* | - | - | *450* | *8* | *3* | *7* | *5* | - | *70.00* | *≥ 4* |

***Tableau 69.*** *Propriétés physicochimiques simulées par MarvinSketch et Chemicalize.*

## V.2. Synthèses des réactivateurs comportant un motif pipérazine *N*-substituée

Les synthèses des différents réactivateurs présentés seront détaillées dans cette partie. Cette famille de réactivateurs sera divisée en trois parties distinctes selon la nature du groupement porté par la pipérazine. D'abord l'incorporation des *N*-alkylpipéridines sera présenté, puis la synthèse des composés portant le motif *N*-aryls pipérazines et enfin, la synthèse des composés portant le motif *N*-hétéroaryl pipérazines. A noter que les rendements indiqués ne sont pas optimisés. Les sels de TFA obtenus ont été caractérisés par RMN $^{1}H$ et $^{18}F$ (dosage interne utilisant $PhCF_3$). L'ensemble de ces molécules a été envoyé au Dr José Dias pour évaluation *in vitro*. Le réactivateur **147** a aussi été évalué *in vivo* par le Dr Guilhem Calas.

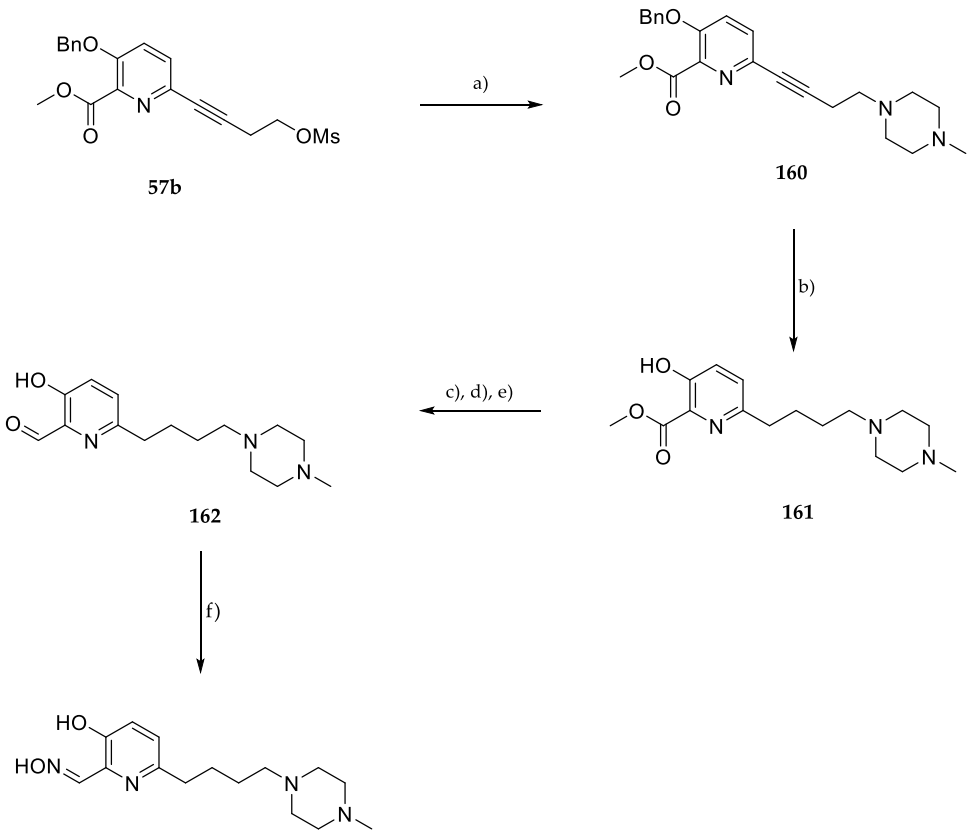
### V.2.1. Synthèses des réactivateurs portant un motif pipérazine *N*-alkylée

Cette partie sera consacrée aux synthèses des réactivateurs **146** à **149**. Différentes voies de synthèse ont été mises en place et seront discutées dans cette partie.

### V.2.1.1. Synthèse des réactivateurs incorporant la *N*-méthyle pipérazine (146-147)

#### *V.2.1.1.1. Synthèse du réactivateur 146*

Le réactivateur **146** a été obtenu sous forme de sel de TFA, à hauteur de 200 mg, avec un rendement global de 13% sur 6 étapes à partir de l'alcool activé **57b** (**Figure 182**). De la même manière que pour les réactivateurs présentés précédemment, une réaction de substitution nucléophile de la *N*-méthyl pipérazine sur le mésylate **57b** permet d'obtenir avec un rendement faible de 43% l''intermédiaire **160**. Après hydrogénation catalytique de la molécule **160** avec un rendement quantitatif, l'aldéhyde **162** est obtenu à partir de l'intermédiaire **161** avec un rendement global sur 3 étapes de 58%. La dernière étape permet d'obtenir la molécule **146** avec un rendement de 54%.



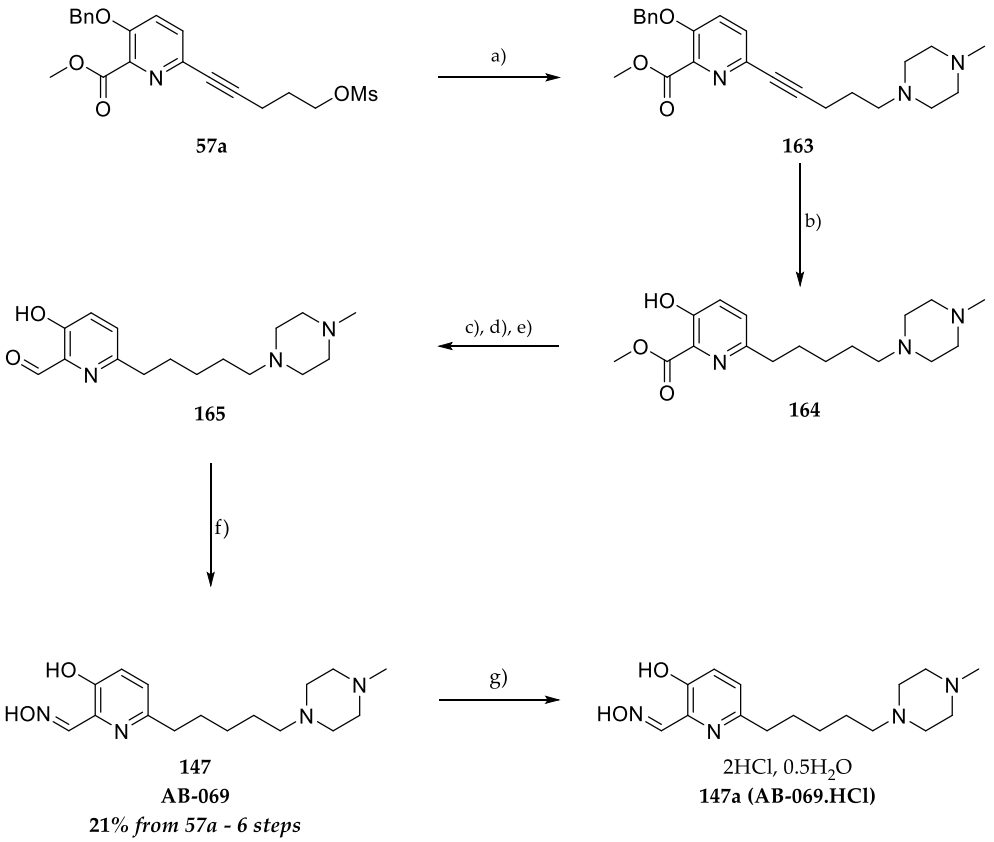

(a) $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***43%***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***quant.***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***58% over 3 steps***; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, then reverse phase purification, ***54%***.

***Figure 182.*** *Synthèse du réactivateur* ***146***

#### *V.2.1.1.2. Synthèse du réactivateur 147*

La synthèse du réactivateur **147** est identique à celle du réactivateur **146**. La molécule **147** a été obtenue sous forme neutre, à hauteur de 200 mg, avec un rendement global de 21% sur 6 étapes à partir du

mésylate **57a** (**Figure 183**). Testée sous forme neutre *in vitro*, cette molécule a fait l'objet d'une formulation sous forme de chlorhydrate (53 mg, caractérisé par analyse élémentaire) pour les évaluations *in vivo*.




(a) **N-methylpiperazine**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***76%***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***97%***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***61% over 3 steps***; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, ***46%***; (g) $HCl_{aq}$, MeOH, 30 min, ***75%***.

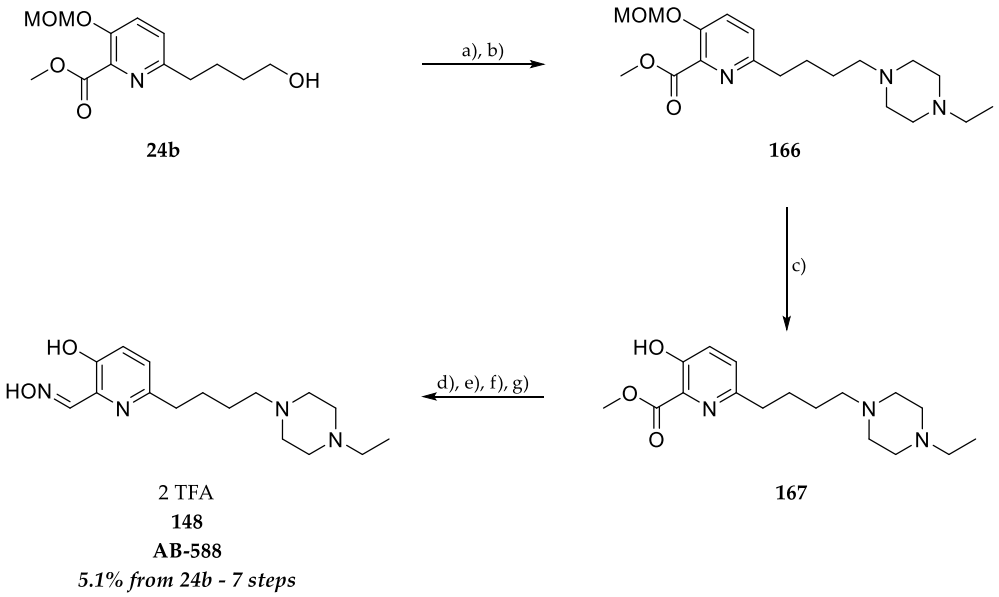
***Figure 183.*** *Synthèse du réactivateur 147*

### V.2.1.2. Synthèse des réactivateurs portant le motif *N*-éthylpipérazine (148-149)

#### *V.2.1.2.1. Synthèse du réactivateur 148*

A l'image de la voie alternative tentée lors de la synthèse du **JR595**, et avec comme objectif d'améliorer les rendements des différentes étapes de synthèse, la synthèse du réactivateur **148** débute avec une réaction de substitution nucléophile sur l'alcool **24a** préalablement activé sous forme de mésylate (**Figure 184**). Le produit de substitution **166** a été obtenu avec un rendement faible de 31%. Par comparaison avec la synthèse du réactivateur **146**, l'utilisation de l'intermédiaire **22a** ne permet pas d'améliorer le rendement. Etant donné que la nucléophilie entre la *N*-méthyl et la *N*-éthyl pipérazines sont identiques, ce faible rendement peut être explicable par le caractère labile du groupement MOM notamment lors des purifications par chromatographie sur gel de silice. La déprotection du groupement MOM en milieu acide fort, permet l'obtention de l'intermédiaire **167** avec un rendement faible de 22%,

illustrant de nouveau les limitations de cette voie de synthèse qui n'a pas été optimisée. Après protection du phénol sous la forme d'éther silylé, l'ester est réduit en aldéhyde, puis l'éther silylé est clivé en présence de TBAF, cet aldéhyde intermédiaire n'a pas été obtenu suffisamment pur pour être caractérisé. Cette molécule a donc été utilisée sans purification dans l'étape finale consistant à générer l'oxime suivie d'une phase de purification par chromatographie en phase inverse (75% sur 4 étapes). L'oxime **148** a donc été obtenue sous la forme de sel de TFA (caractérisé par RMN), à hauteur de 45 mg, avec un rendement global non-optimisé de 5% sur 7 étapes à partir de l'intermédiaire **24a**.

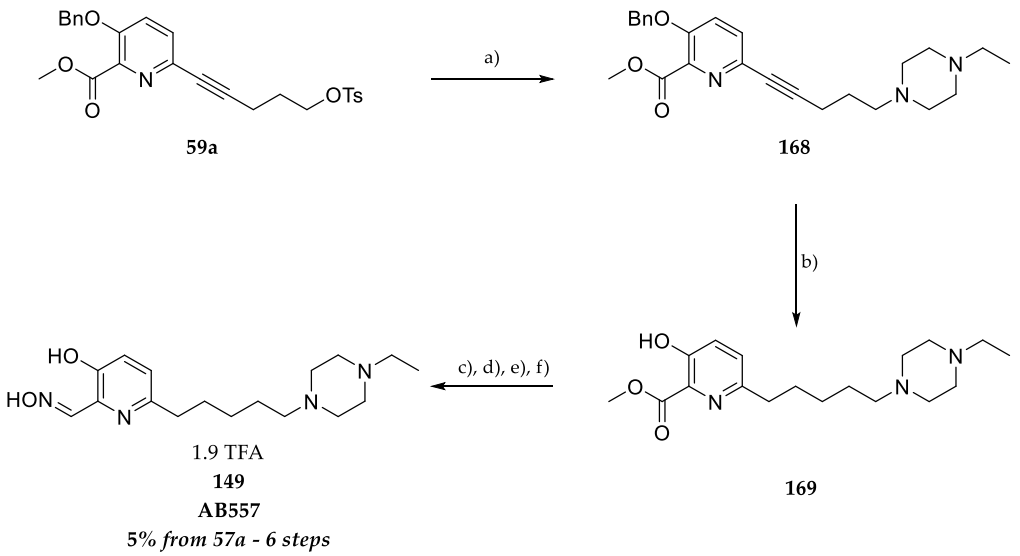



(a) MsCl, TEA, DCM, 2h, rt, ***quant.***; (b) **N-ethylpiperazine**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***31%***; (c) TFA, DCM, rt, 2h, ***22%***; (d) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (e) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (f) TBAF, THF, 0°C, 30 min; (g) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, then reverse phase purification, ***75% over 4 steps***.

***Figure 184.*** *Synthèse du réactivateur* ***148***

### *V.2.1.2.2. Synthèse du réactivateur 149*

Le réactivateur **149** a été obtenu sous la forme de sel de TFA (caractérisé par RMN), à hauteur de 70 mg, avec un rendement global non-optimisé de 5% sur 6 étapes à partir du tosylate **59a** (**Figure 185**). Le greffage de la N-ethyl pipérazine s'est faite avec un rendement de 92%. L'intermédiaire **168** est réduit en **169** par hydrogénation catalytique avec un rendement faible de 50% dû à une erreur de manipulation lors du traitement de la réaction ayant entraîné la perte d'une partie du produit. Comme pour le réactivateur **148**, l'aldéhyde n'a pas été obtenu suffisamment pur pour être caractérisé et a donc directement été mis en réaction pour former l'oxime **149** isolée après purification par chromatographie en phase inverse.




(a) **N-methylpiperazine**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***92%***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***50%***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, ***10% over 4 steps***;

***Figure 185.*** *Synthèse du réactivateur* ***149***

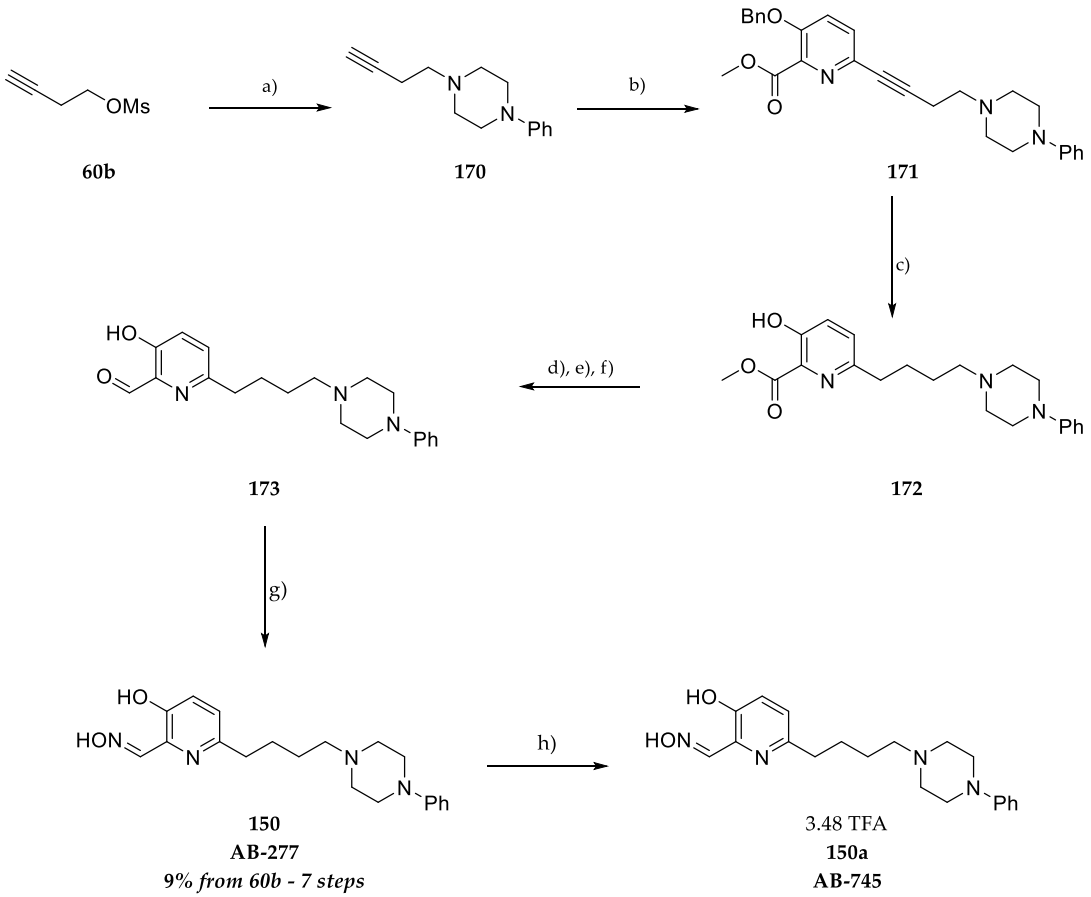
## V.2.2. Synthèses des réactivateurs portant un motif *N*-aryl pipérazine

### V.2.2.1. Synthèse des réactivateurs incorporant la -phényl pipérazine (150-151)

#### *V.2.2.1.1. Synthèse du réactivateur 150*

La molécule **150** a été obtenue sous forme neutre à hauteur de 58 mg, avec un rendement global non-optimisé de 9% à partir de l'intermédiaire **60b** (**Figure 186**). Cette molécule insoluble en milieu aqueux a donc été transformée sous forme de sel de TFA dont le ratio a été déterminé par RMN du fluor (**150a** – 46%, 57 mg).

Concernant la synthèse, la réaction de substitution nucléophile de la *N*-phényl pipérazine sur le mésylate **60b** a permis l'obtention du produit de substitution **170** avec un rendement de 78%. Le couplage de Sonogashira avec l'intermédiaire **4** permet l'obtention du produit de couplage désiré **171** avec un rendement après isolation de 32%. Après hydrogénation catalytique de cet intermédiaire, l'aldéhyde **173** est généré après protection – réduction - déprotection de l'intermédiaire **172** avec un rendement de 38% sur ces 3 étapes. Enfin l'oxime **150** est générée dans les conditions classiques avec un rendement de 92%.

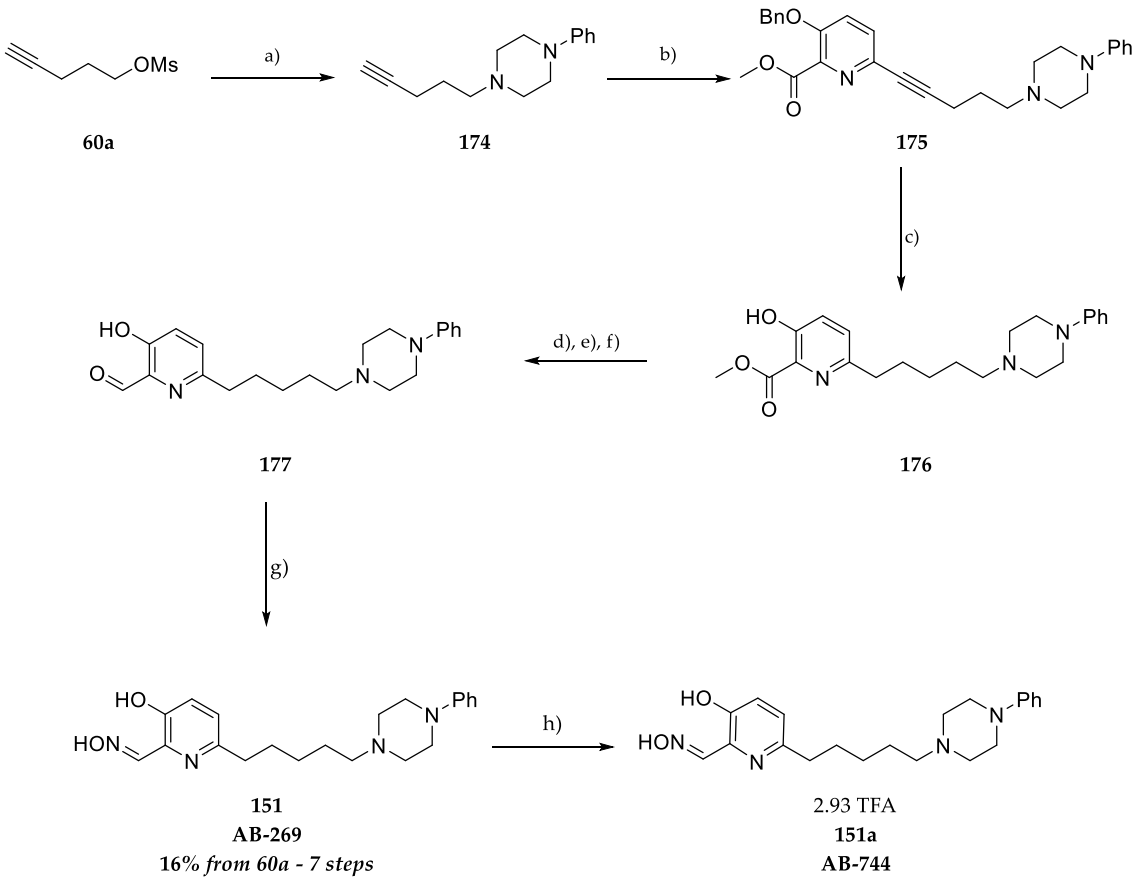



(a) **N-phenylpiperazine**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***78%***; (b) **4**, $Pd(PPh_3)_4$ - 5 mol%, CuI - 10 mol%, DCM: TEA (2:1), rt, 12h, ***32%***, (c) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***99%***; (d) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (e) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (f) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***38% over 3 steps***; (g) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, ***92%***; (h) TFA, MeOH, 30 min, ***46%***.

***Figure 186.*** *Synthèse du réactivateur* ***150***

### *V.2.2.1.2. Synthèse du réactivateur 151*

Le réactivateur **151** a été obtenu selon la même séquence réactionnelle que son analogue **150** (**Figure 187**). La molécule a été isolée sous forme neutre, à hauteur de 29 mg, avec un rendement global non-optimisé de 16 % à partir de l'alcool activé **60a**. Cette molécule faiblement soluble dans l'eau a été transformée en sel de TFA (27 mg) dont le ratio a été déterminé comme précédemment par utilisation d'un étalon interne ($PhCF_3$) en RMN du $^{19}F$. Les rendements obtenus dans les différentes étapes de synthèse sont acceptables mais peuvent être encore optimisés.




(a) **N-phenylpiperazine**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***87%***; (b) **4**, $Pd(PPh_3)_4$ - 5 mol%, CuI - 10 mol%, DCM: TEA (2:1), rt, 12h, ***54%,*** (c) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***quant.***; (d) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (e) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (f) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***50% over 3 steps***; (g) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, ***70%***; (h) TFA, MeOH, 30 min, ***49%.***

***Figure 187.*** *Synthèse du réactivateur* ***151***

### V.2.2.2. Synthèses des réactivateurs portant le motif *N*-benzylpipérazine (152-153)

#### *V.2.2.2.1. Synthèse du réactivateur 153*

La première voie de synthèse envisagée est la voie classique constituant en l'incorporation de l'amine par substitution nucléophile sur le mésylate **57a** (60% - **Figure 188**). Cependant, l'hydrogénation de l'intermédiaire **178** a conduit à un mélange complexe de molécules *O*- et *N*- débenzylées, mélange difficilement séparable par chromatographie. De ce fait, une voie de synthèse alternative a donc été mise en place (**Figure 189**).

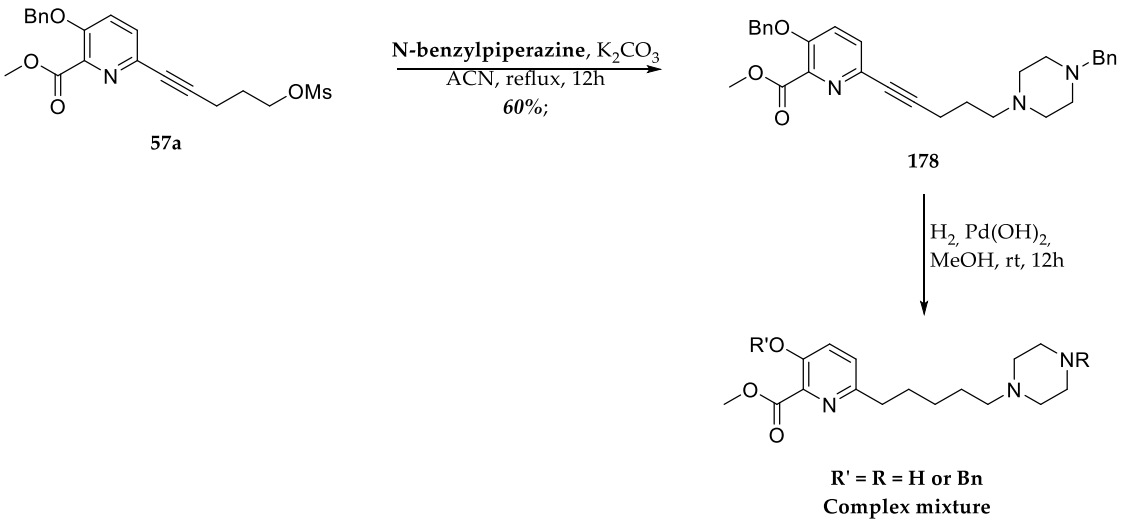
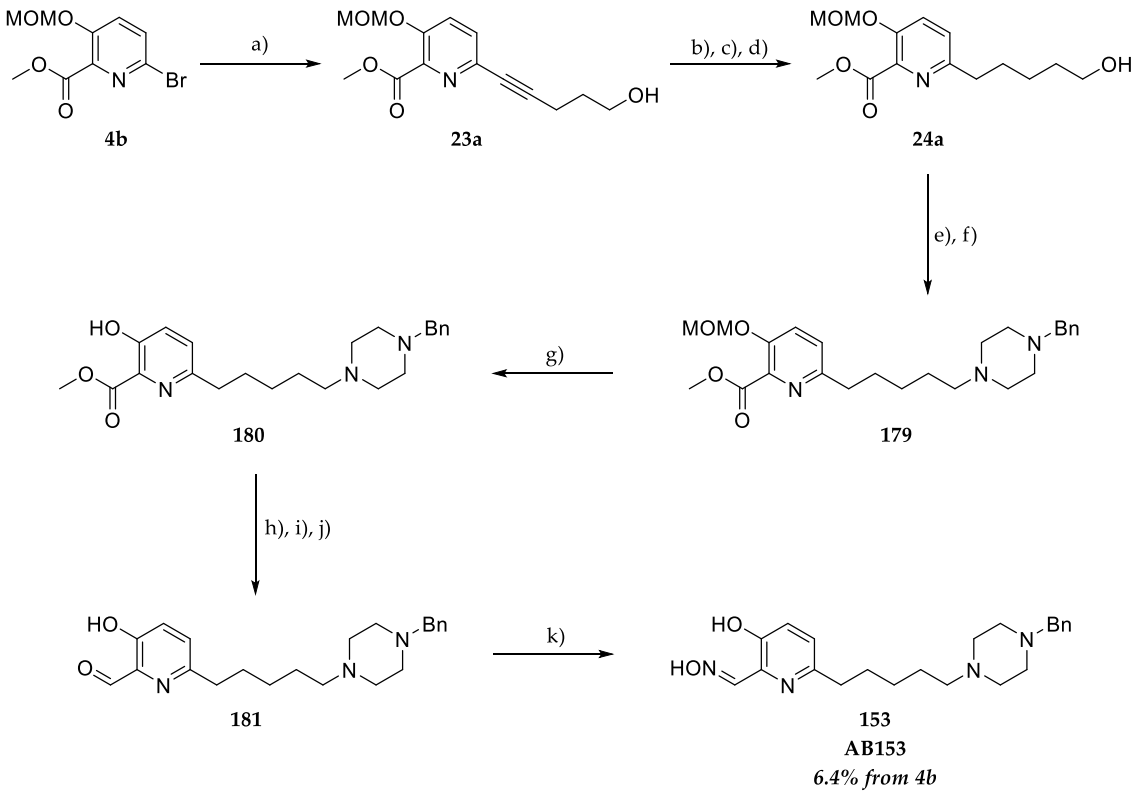



***Figure 188.*** *Voie de synthèse initialement envisagé pour le réactivateur* ***153***

A partir de l'intermédiaire **24a** préalablement activé sous la forme de mésylate, le produit de substitution **179** a été obtenu avec un rendement sur deux étapes de 86%. La déprotection du groupement MOM a été étudiée dans différentes conditions (HCl aq 4 M, HCl aq 6 M, acide citrique 5% dans le THF) qui n'ont pas permis l'obtention de l'intermédiaire **180**. Seul l'utilisation de TFA dans le DCM a permis d'obtenir la molécule désirée avec un rendement de 64%. Par la suite, l'aldéhyde **181** est obtenu avec un rendement sur 3 étapes de 30%. Enfin l'oxime **153** est générée dans les conditions classiques avec un rendement de 82%. Pour conclure, le réactivateur a été obtenu à hauteur de 78 mg, avec un rendement global non-optimisé de 6% à partir de l'intermédiaire **4b**.



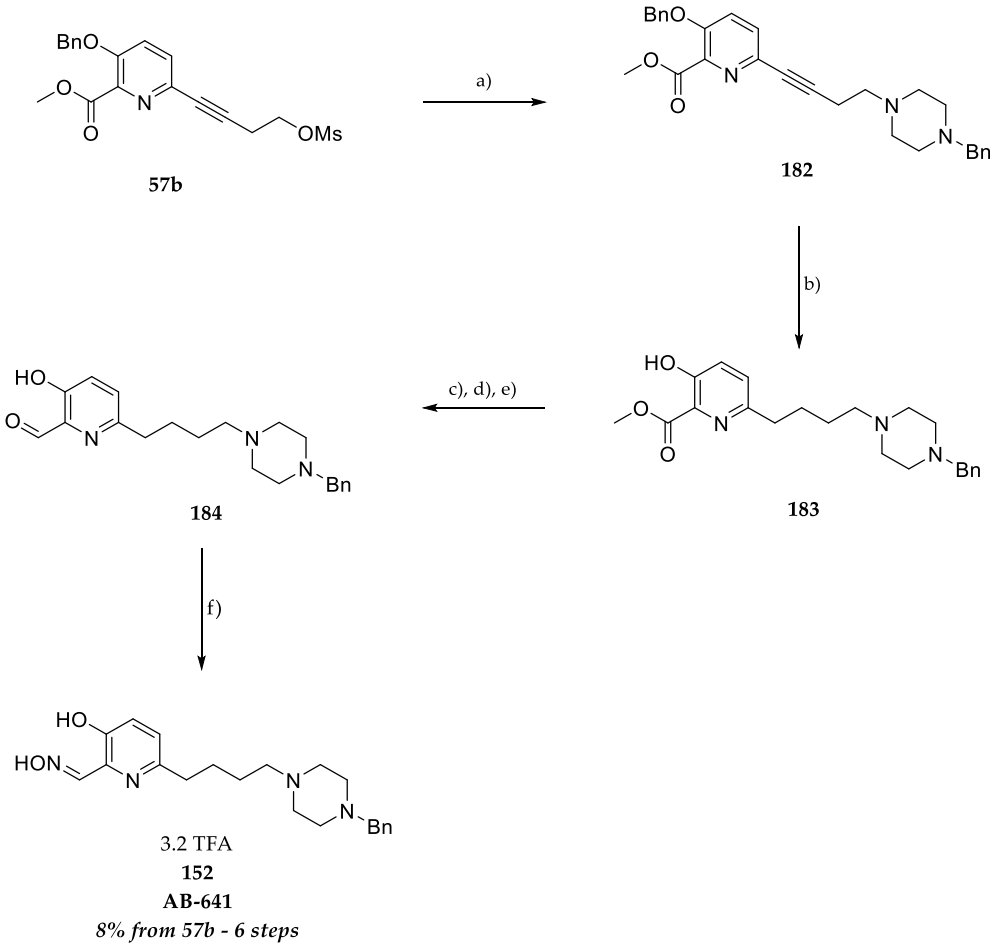

(a) **6a**, $Pd(PPh_3)_4$ - 5 mol%, CuI - 10mol%, TEA:DCM (1:2), rt, 12h, ***80%***; (b) TBSOTf, TEA, DCM, rt, 2h, ***quant.***; (c) $H_2$, Pd/C, MeOH, 2h, ***84%***; (d) TBAF, THF, 0°C, 30 min; ***71%***; (e) MsCl, TEA, DCM, reflux, 1h, ***quant.***; (f) **N-benzylpiperazine**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***86%*** (g) TFA, DCM, rt, 2h, ***64%***; (h) TBSOTf, TEA, DCM, rt, 3h, ***quant.***; (i) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min, ***69%***; (j) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***43%***; (k) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, ***82%***.

***Figure 189.*** *Synthèse du réactivateur* ***153***

### *V.2.2.2.2. Synthèse du réactivateur 152*

Bien que l'utilisation du groupement benzyle ait posé des problèmes lors de la synthèse du réactivateur **153**, les rendements faibles obtenus nous ont encouragé à reprendre la voie de synthèse classique (**Figure 190**).

A partir de l'intermédiaire **57b**, l'incorporation de la *N*-benzyl pipérazine a permis l'obtention de l'intermédiaire **182** avec un rendement de 46%. L'étape d'hydrogénation n'est pas optimale mais permet l'obtention de l'intermédiaire **182** avec un rendement de 58% après purification. La synthèse de l'aldéhyde **184** se fait de la même manière que précédemment avec un rendement sur 3 étapes de 70%. Enfin, l'étape final permet la génération de l'oxime qui est isolée par chromatographie en phase inverse sous forme de sel de TFA avec un rendement isolé de 42% Cette oxime a été synthétisée à hauteur de 190 mg, avec un rendement global de 8% sur 6 étapes à partir de l'intermédiaire **57b**.



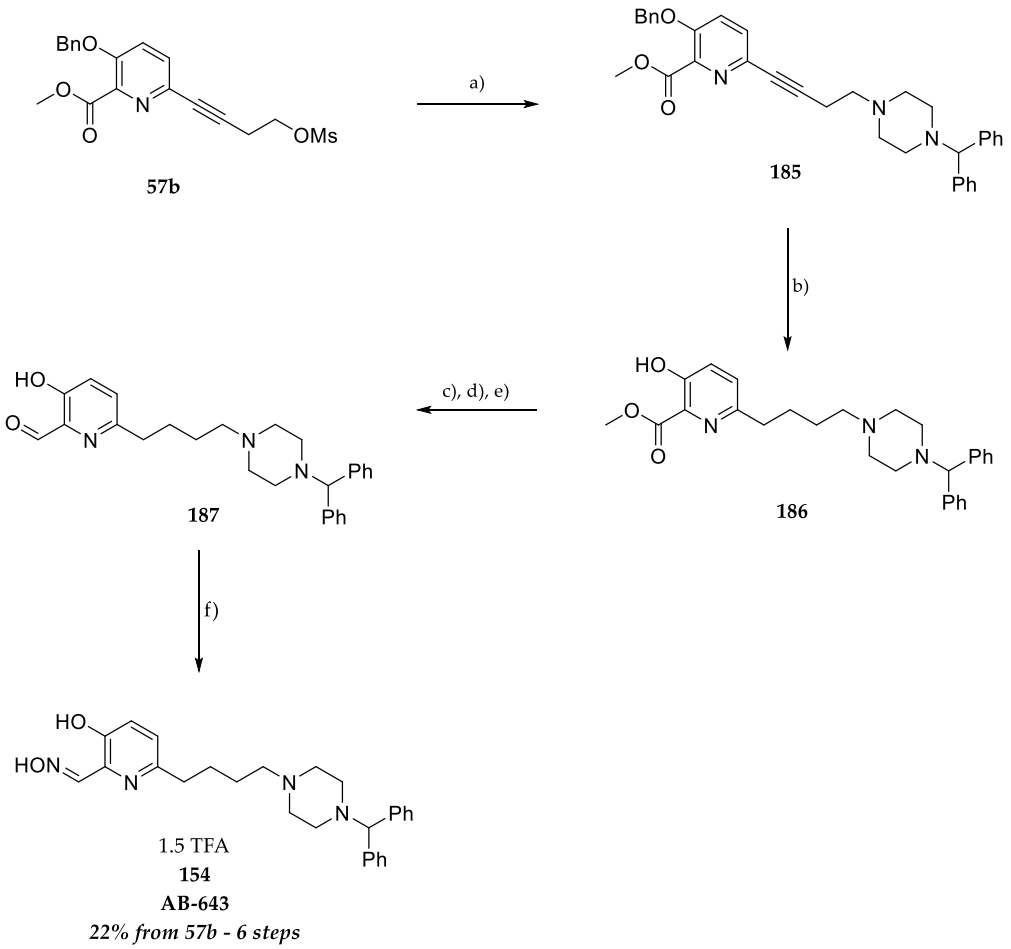

(a)**N-benzylpiperazine**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***46%***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***58%***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***70% over 3 steps***; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, then reverse phase purification, ***42%.***

***Figure 190.*** *Synthèse du réactivateur* ***152***

### V.2.2.3. Synthèse des réactivateurs portant le motif *N*-(diphenyl)methylpipérazine (154-155)

#### *V.2.2.3.1. Synthèse du réactivateur 154*

La synthèse du réactivateur **154** suit la voie linéaire classique (**Figure 191**). Ce réactivateur a été obtenu sous la forme de sel de TFA, à hauteur de 444 mg, avec un rendement global non-optimisé de 22% sur 6 étapes à partir de l'intermédiaire **57b**. La réaction de substitution permet d'obtenir l'intermédiaire **185** avec un rendement isolé de 43%. Ce produit est hydrogéné dans les conditions classiques pour obtenir l'intermédiaire **186** avec un rendement de 89%. La génération de l'aldéhyde **187** se fait de la même façon que précédemment avec un rendement de 93 % sur 3 étapes. Enfin la condensation de l'hydroxylamine suivie d'une purification en phase inverse permet d'avoir le réactivateur **154** avec un rendement isolé de 61%.

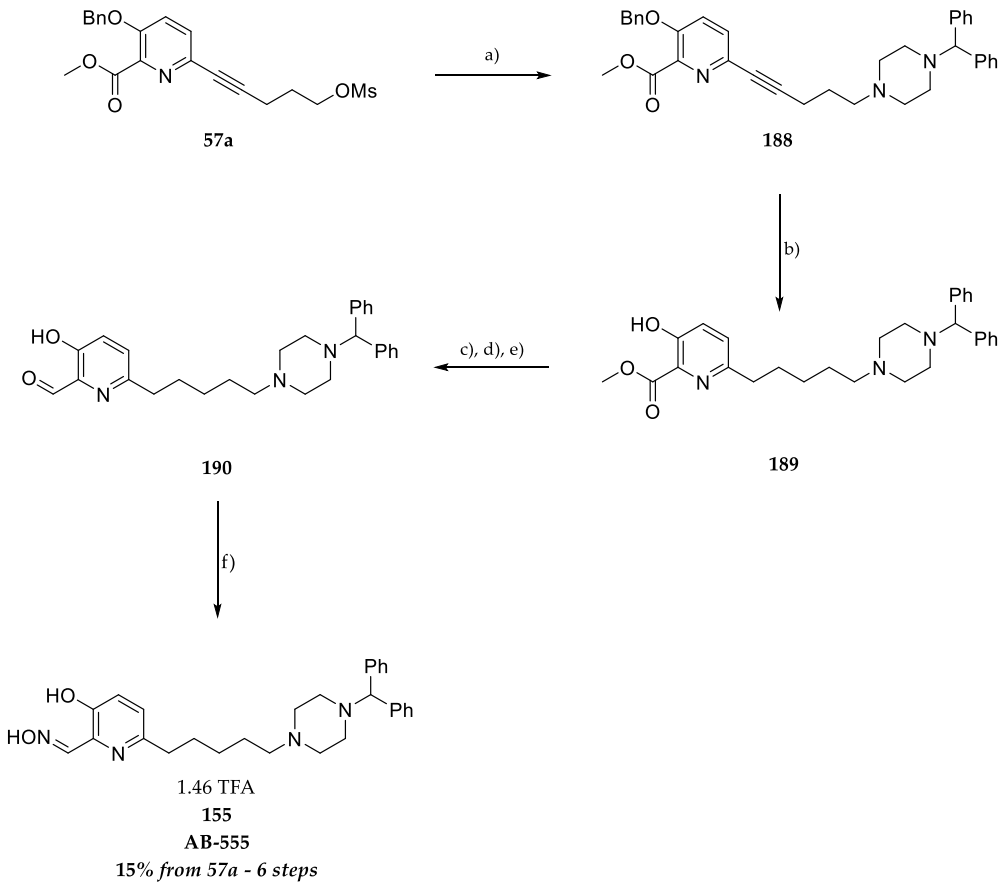



(a)**N-methyldiphenylpiperazine**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***43%***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***89%***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***93% over 3 steps***; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, then reverse phase purification, ***61%***.

***Figure 191.*** *Synthèse du réactivateur* ***154***

### *V.2.2.3.2. Synthèse du réactivateur 155*

La synthèse du réactivateur **155** suit la voie linéaire classique. Ce réactivateur a été obtenu sous la forme de sel de TFA, à hauteur de 416 mg, avec un rendement global non-optimisé de 15% sur 6 étapes à partir de l'intermédiaire **57a** (**Figure 192**). L'intermédiaire **188** est obtenu après substitution nucléophile avec un rendement de 60%. Après hydrogénation catalytique (quant.), l'aldéhyde **190** est généré à partir de l'intermédiaire **189** avec un rendement de 66 % sur 3 étapes. La condensation de l'hydroxylamine suivi d'une phase inverse permet ainsi d'obtenir le réactivateur **190** avec un rendement de 39 %.




(a) **N-methyldiphenylpiperazine**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***60%***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***quant.***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***66% over 3 steps***; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, then reverse phase purification ***39%***;

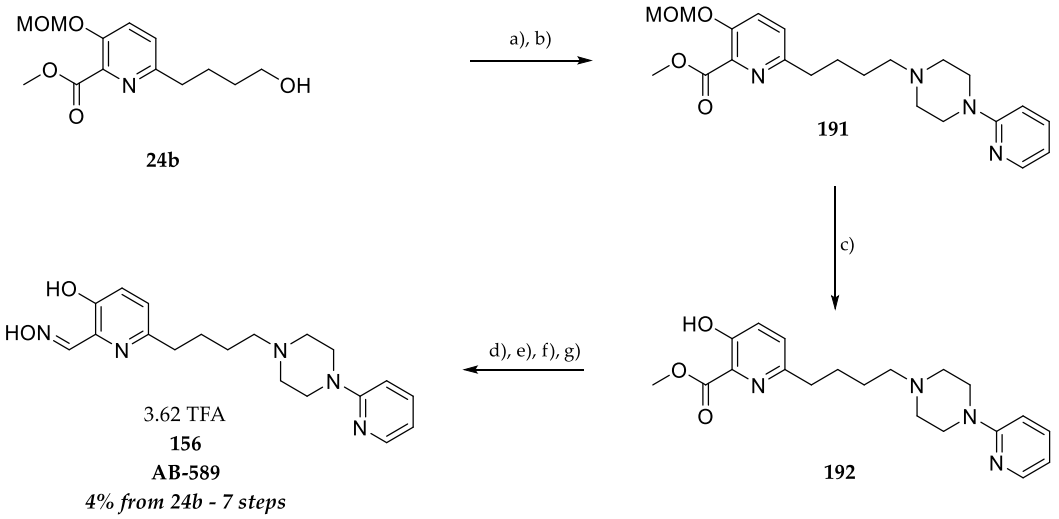
***Figure 192.*** *Synthèse du réactivateur* ***155***

## V.2.3. Synthèses des réactivateurs portant une pipérazine *N*-hétérocyclique

### V.2.3.1. Synthèse des réactivateurs portant le motif *N*-(2-pyridin)pipérazine (156-157)

#### *V.2.3.1.1. Synthèse du réactivateur 156*

Reprenant le même schéma synthétique que pour le réactivateur **153**, l'oxime **156** a été obtenue sous la forme de sel de TFA, à hauteur de 71 mg, avec un rendement global de 4% sur 7 étapes à partir de l'intermédiaire **24b** (**Figure 193**). La substitution nucléophile sur l'alcool réduit **24b**, ne permet l'obtention du produit **191** qu'avec un rendement de 46% probablement dû à une dégradation du MOM dans les conditions de purification. Après déprotection du groupement MOM, l'aldéhyde est généré mais n'a pas pu être obtenu suffisamment pur, et a été engagé tel quel dans l'étape finale. Après condensation de l'hydroxylamine, le réactivateur **156** est obtenu avec un rendement de 27% sur 4 étapes.

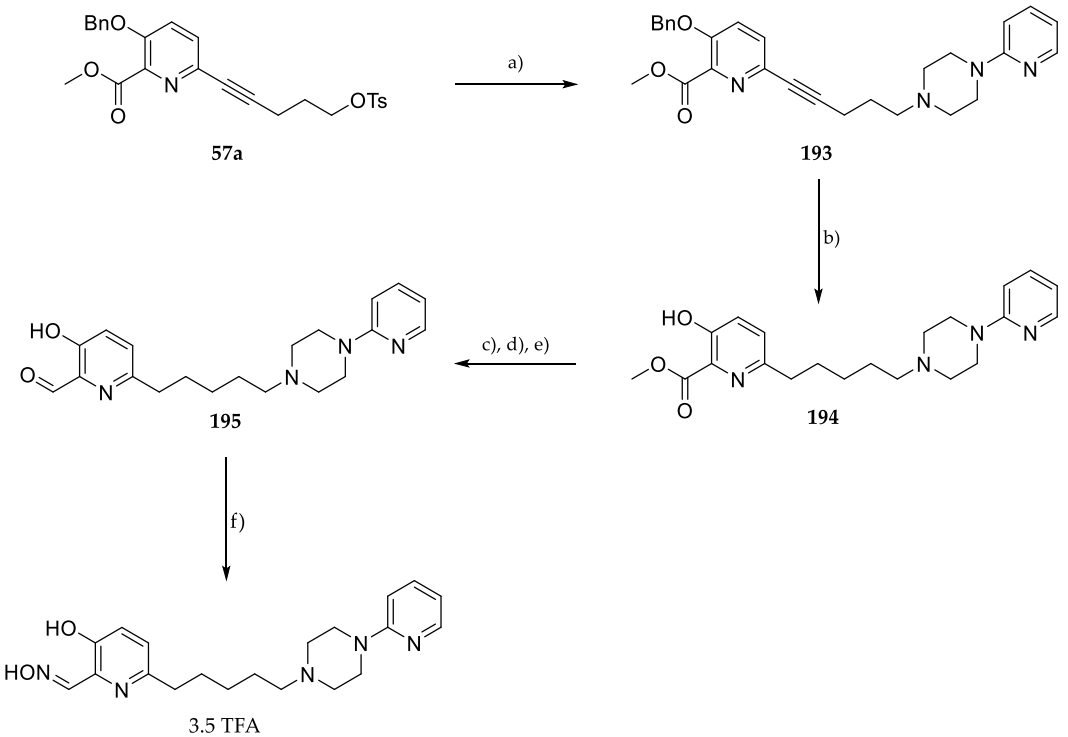



(a) MsCl, TEA, DCM, rt, 2h ;(b) **N-2-pyridinepiperazine**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***46%***; (c) TFA, DCM, rt, 2h, ***31%***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, then reverse phase purification, ***27% over 4 steps.***

***Figure 193.*** *Synthèse du réactivateur* ***156***

### *V.2.3.1.2. Synthèse du réactivateur 157*

Reprenant le schéma synthétique linéaire, l'oxime **157** a été obtenue sous la forme de sel de TFA, à hauteur de 6 mg, avec un rendement global de 0,3% sur 7 étapes à partir de l'intermédiaire **57a** (**Figure 194**). Ce très faible rendement est dû à une avarie lors de la purification par chromatographie en phase inverse finale (fuite au niveau de la colonne, 1% de rendement sur cette étape). L'incorporation de la N-2-pyriridine- pipérazine a été faite par substitution nucléophile sur l'alcool activé **57a** avec un rendement acceptable de 72 %. Après hydrogénation catalytique, l'aldéhyde est généré de la même façon que précédement, avec un rendement isolé de 44% sur 3 étapes. L'oxime **157** est alors généré de la même façon que précédemment.



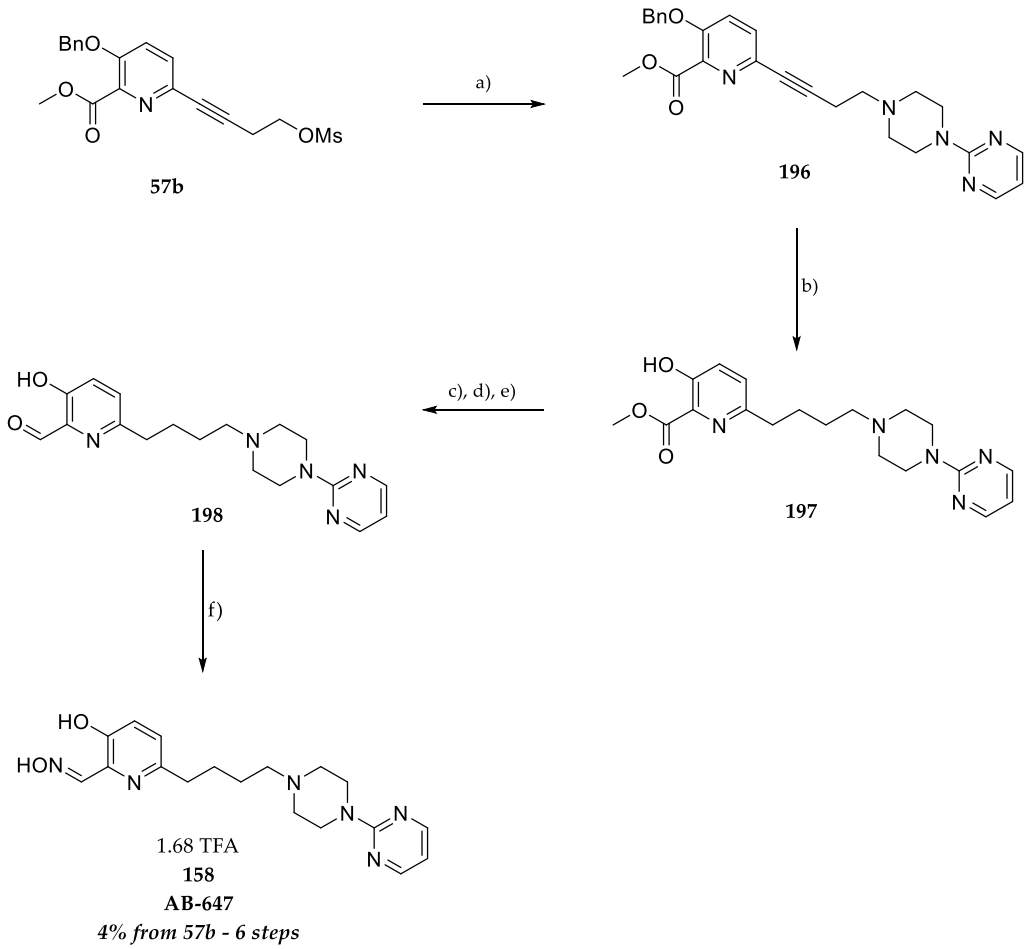

(a) **N-2-pyridinepiperazine**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***72%***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***95%***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min, ; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***44% over 3 steps***; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, then reverse phase purification ***1%***.

***Figure 194.*** *Synthèse du réactivateur* ***157***

### V.2.3.2. Synthèse des réactivateurs portant un motif *N*-(2-pyrimidin)pipérazine (158-159)

#### *V.2.3.2.1. Synthèse du réactivateur 158*

L'oxime **158** a été obtenue sous forme de sel de TFA, à hauteur de 67 mg, avec un rendement global non-optimisé de 4% sur 6 étapes à partir de l'intermédiaire **57b** (**Figure 195**). La pipérazine est greffée par substitution nucléophile sur le mésylate **57b** avec un rendement de 48%. Le produit **196** est alors hydrogéné pour obtenir l'intermédiaire **197**. A noter que le rendement de l'hydrogénation n'est pas représentatif, la majorité du produit ayant été perdu lors du bris du ballon le contenant. L'aldéhyde **198** est alors obtenu comme précédemment avec un rendement de 98 % sur 3 étapes. Enfin, l'oxime **158** est générée puis isolée par phase inverse avec un rendement de 45 %.

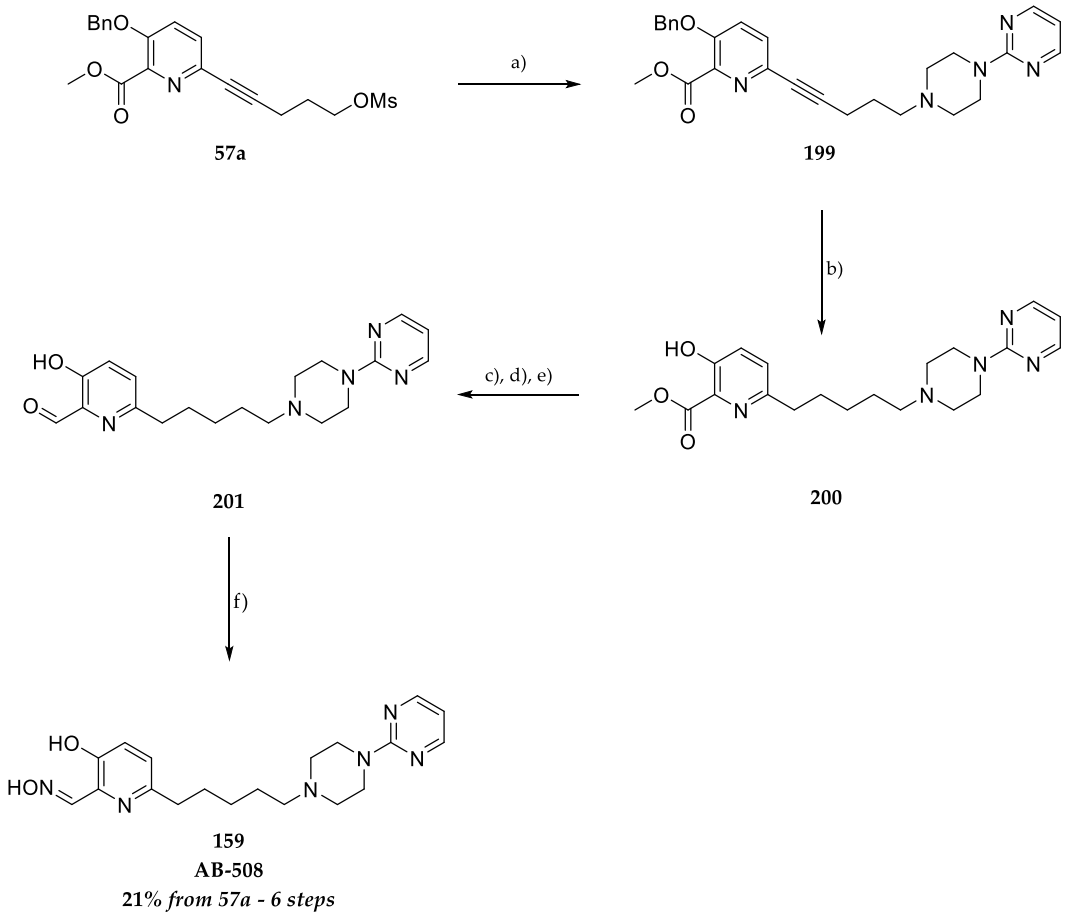



(a)**N-pyrimidinylpiperazine**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***48%***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***19%***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***98% over 3 steps***; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, then reverse phase purification, ***45%.***

***Figure 195.*** *Synthèse du réactivateur* ***158***

### *V.2.3.2.2. Synthèse du réactivateur 159*

L'oxime **159** a été obtenue sous forme neutre, à hauteur de 1.1 g, avec un rendement global non-optimisé de 21% sur 6 étapes à partir de l'intermédiaire **57a** (**Figure 196**). La substitution nucléophile entre la pipérazine et le mesylate permet d'obtenir le produit de substitution avec un rendement de 78%. Après hydrogènation catalytique (rendement quantitatif), l'intermédiaire **200** est protégé, reduit puis déprotégé pour obtenir l'intermédiaire **201** avec un rendement de 40% sur 3 étapes. Enfin, celui-ci est mis en réaction avec l'hydroxylamine pour former l'oxime **159**, isolé par phase normal, avec un rendement de 66%. Par manque de temps, cette molécule n'a pas été formulée sous forme de sel. Cette formulation se fera si les évaluations *in vitro* sont favorables afin d'envisager une étude *in vivo*. Etant donné la quantité de réactivateur disponible, il serait intéressant de mener une véritable étude pharmacologique sur différentes formulations, voire même l'encapsulation dans des nanoparticules à l'image des travaux menés sur le **GM415**.




(a) **N-pyrimidinylpiperazine**, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***78%***; (b) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***quant.***; (c) TBSOTf, TEA, DCM, 0°C; (d) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (e) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***40% over 3 steps***; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, ***66%***.

***Figure 196.*** *Synthèse du réactivateur* ***159***

## V.3. Evaluations biologiques des réactivateurs incorporant une pipérazine

### V.3.1. Evaluations *in vitro*

Les différentes oximes de cette partie ont été envoyées fin 2017 à nos différents partenaire. Certaines données ne sont pas disponibles actuellement.

#### V.3.1.1. Passage de la BHE *in vitro*

Comme précédemment le passage de la BHE a été évalué par le Dr Bélen Pérez au travers des tests PAMPA (**Tableau 70**). La validation du test a été effectuée en comparant les valeurs de perméabilité expérimentales et issues de la littérature de quatorze médicaments commerciaux, donnant une bonne corrélation linéaire ($R^2 = 0{,}9321$) : **$P_e$ (expérimentale) = 1,6601 $P_e$ (littérature) – 1,3856.**

En utilisant cette équation et les limites de perméabilité de la BHE établies par Di et coll,[500] les fourchettes suivantes de perméabilité $P_e$ ont été établies comme précédement ($P_e$ > 5,255 pour les composés à haute perméabilité à la BHE ; $P_e$ < 1,935 pour les composés à faible pénétration de la BHE ; 5,255 > $P_e$ > 1,935 pour les composés à pénétration incertaine de la BHE).

Concernant les N-alkyl pipérazines, le passage de la BHE dépend de la longueur de la chaîne espaceur. L'apport d'un aryl sur la pipérazine permet une nette amélioration du passage. Enfin, les N-hétérocycle pipérazines traverse la BHE à l'exception du **158** dont le passage est ambigu probablement à cause d'un bras espaceur trop court qui ne compense pas la présence de la pyrimidine.

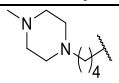
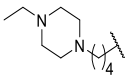
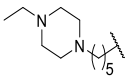
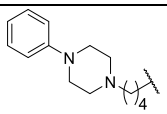
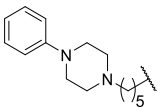
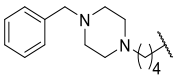
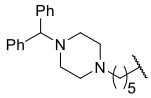
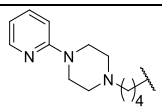
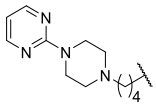
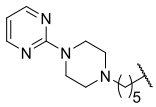
| *Oxime* | *Ligand + espaceur* | *$P_e$ ($10^{-6}$ cm $s^{-1}$)* | *Prédiction CNS* | *Score MPO-CNS* |
|---|---|---|---|---|
| **146 (AB639)** |  | 2,8±0,1 | CNS+/- | 5,5 |
| **148 (AB588)** |  | 2,9±0,2 | CNS+/- | 5,5 |
| **149 (AB557)** |  | 26,4±4,5 | CNS+ | 5,5 |
| **150 (AB744)** |  | 9,8±0,1 | CNS+ | 5,24 |
| **151 (AB745)** |  | 10, 2±0,6 | CNS+ | 4,91 |
| **152 (AB641)** |  | 7,6±0,1 | CNS+ | 5,21 |
| **155 (AB555)** |  | 8,6±0,5 | CNS+ | 2,84 |
| **156 (AB589)** |  | 7,2±0,4 | CNS+ | 5,16 |
| **158 (AB647)** |  | 4,8±0,1 | CNS+/- | 5,24 |
| **159 (AB508)** |  | 12,3±0,7 | CNS+ | 5,12 |

***Tableau 70.*** *Perméabilité à la BHE in vitro ($P_e$) des molécules 90, 91, 93 obtenues lors du test PAMPA*

Globalement, l'ensemble des réactivateurs dérivées de la pipérazine semblent passer la BHE à l'exception des réactivateur **146**, **148** et **158** dont le passage est incertain.

### V.3.1.2. Réactivation de l'*h*AChE inhibée par différents NOPs

Concernant l'évaluation *in vitro* des potentiels réactivateurs de nos oximes, l'étude menée par le Dr José Dias est en cours. Cependant, bien que les constantes cinétiques ne soient pas encore disponibles, des

constantes $k_{obs}$ à 100 µM nous ont été communiquées et nous permettent d'avoir un aperçu de la réactivité *in vitro* des oximes (**Tableau 71**). Parmi l'ensemble de ces molécules, les oximes **146, 148, 150, 151, 152, 154, 155, 156 et 158** réactivent à large spectre, tandis que les autres molécules semblent incapables de réactiver l'*h*AChE inhibée par le NEDPA (analogue du Tabun). Quant à la molécule **149**, celle-ci réactive uniquement l'*h*AChE inhibée par le NEMP (analogue du VX) mais avec une constante supérieure à celles obtenues pour les molécules de références.

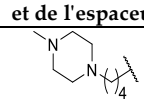
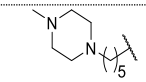
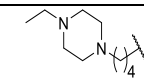
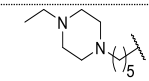
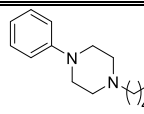
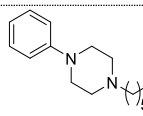
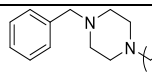
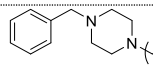
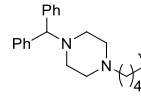
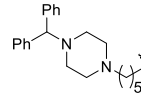
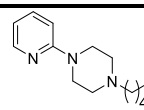
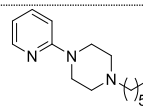
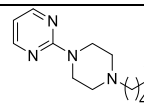
| Oximes | Structure du ligand et de l'espaceur | VX (NEMP) | Sarin (NIMP) | Tabun (NEDPA) | POX |
|---|---|---|---|---|---|
| **146** |  | 0.38 ± 0.006<br>0.38 ± 0.007<br>**0,38** | 0.11 ± 0.001<br>0.12 ± 0.001<br>**0,12** | 0.57 ± 0.08<br>0.57 ± 0.08<br>**0,57** | 0.13 ± 0.001<br>0.14 ± 0.001<br>**0,14** |
| **147** |  | **0,13** | **0,13** | Ø | **0,5** |
| **148** |  | 0.41 ± 0.01<br>0.41 ± 0.01<br>**0,41** | 0.09 ± 0.0007<br>0.09 ± 0.0007<br>**0,09** | 0.49 ± 0.15<br>0.36 ± 0.08<br>**0,43** | 0.12 ± 0.001<br>0.12 ± 0.001<br>**0,12** |
| **149** |  | 0.5 ± 0.03<br>0.51 ± 0.03<br>**0,51** | Ø<br>Ø<br>Ø | Ø<br>Ø<br>Ø | Ø<br>Ø<br>Ø |
| **150** |  | 3.1 ± 0.5<br>3.46 ± 0.6<br>**3,28** | 0.47 ± 0.007<br>0.48 ± 0.007<br>**0,48** | 1.12 ± 0.2<br>1.03 ± 0.2<br>**1,08** | 0.55 ± 0.009<br>0.55 ± 0.009<br>**0,55** |
| **151** |  | 0.52 ± 0.008<br>0.51 ± 0.007<br>**0,52** | 0.015 ± 0.0007<br>0.016 ± 0.0007<br>**0,016** | 0.14 ± 0.002<br>0.08 ± 0.002<br>**0,11** | 0.49 ± 0.016<br>0.50 ± 0.017<br>**0,5** |
| **152** |  | 0.23 ± 0.003<br>0.24 ± 0.003<br>**0,24** | 0.22 ± 0.002<br>0.23 ± 0.002<br>**0,23** | 0.37 ± 0.08<br>0.42 ±0.1<br>**0,4** | 0.27 ± 0.004<br>0.31 ± 0.005<br>**0,29** |
| **153** |  | 0,06 (40 µM) | 0,22 | Ø | 0,04 (40 µM) |
| **154** |  | 0.28 ± 0.003<br>0.29 ± 0.004<br>**0,29** | 0.16 ± 0.002<br>0.18 ± 0.004<br>**0,17** | 0.06 ± 0.004<br>0.1 ± 0.006<br>**0,08** | 0.34 ± 0.006<br>0.36 ± 0.008<br>**0,33** |
| **155** |  | 0.15 ± 0.002<br>0.19 ± 0.004<br>**0,17** | 0.08 ± 0.001<br>0.08 ± 0.001<br>**0,08** | 0.08 ± 0.01<br>0.019 ± 0.004<br>**0,014** | 0.17 ± 0.002<br>0.17 ± 0.002<br>**0,17** |
| **156** |  | 2.98 ± 0.5<br>2.7 ± 0.4<br>**2,84** | 0.46 ± 0.01<br>0.44 ± 0.01<br>**0,45** | 0.46 ± 0.07<br>0.5 ± 0.08<br>**0,48** | 1.54 ± 0.19<br>1.53 ± 0.19<br>**1,54** |
| **157** |  | 0.17 ± 0.0009<br>0.16 ± 0.0007<br>**0,17** | 0.10 ± 0.0006<br>0.08 ± 0.0003<br>**0,09** | Ø<br>Ø<br>Ø | 0.20 ± 0.003<br>0.20 ± 0.003<br>**0,2** |
| **158** |  | 1.7 ± 0.15<br>1.67 ± 0.15<br>**1,69** | 0.47 ± 0.007<br>0.47 ± 0.007<br>**0,47** | 0.7 ± 0.12<br>0.61 ± 0.1<br>**0,66** | 0.87 ± 0.04<br>0.85 ± 0.04<br>**0,86** |
| **HI-6** | | 0.28 ± 0.005 | 0.45 ± 0.002 | Ø | 0.025 ± 0.0002 |
| **2-PAM** | | 0.14 ± 0.001 | 0.2 ± 0.002 | 0.17 ± 0.001 | 0.03 ± 0.0002 |

***Tableau 71.*** *$k_{obs}$ à 100 µM en $min^{-1}$ sur la hAChE inhibée par différents NOPs (expérience en microplaque; en gras la moyenne arrondie; Ø : pas de réactivation).*

Etant donné la somme des données obtenus, par soucis de comparaison, le ratio $\frac{k_{obs\,(réactivateur)}}{k_{obs\,(référence)}}$ a été calculé (**Tableau 72**). Concernant les réactivateurs dont la pipérazine est substituée par une chaîne aliphatique, la longueur de l'espaceur a une influence directe sur les capacités *in vitro*. En effet, dans le cas des molécules **146-147**, l'augmentation de la longueur de l'espaceur provoque une diminution de l'activité sur l'*h*AChE inhibée par le NIMP (analogue du Sarin), le NEMP (analogue du VX) ou le NEDPA (analogue du Tabun). Cependant dans le cas du paraoxon, au contraire, l'activité est augmentée de façon importante : la molécule **147** est 16.7 fois plus efficace que la 2-PAM et 20 fois plus efficace que le HI-6. Ce phénomène n'est pas observé pour les molécules **148-149**. L'élongation du groupement porté par la pipérazine a cependant très peu d'influence sur la réactivation (**146** vs **148**). Lorsque le bras espaceur et la chaîne aliphatique sont allongés (**146** vs **149**), l'activité sur l'*h*AChE inhibée par le VX est augmentée tandis que l'activité sur l'*h*AChE inhibée les autres NOPs est supprimée.

L'apport d'un motif aromatique sur la pipérazine permet une nette amélioration des capacités de réactivation du fait d'une affinité bien plus élevée que dans le cas des chaînes aliphatiques (comme déjà suspecté lors des études de docking). L'influence de la longueur du bras espaceur n'est pas négligeable : l'allongement de cette chaîne provoque la diminution voire la perte d'activité (**150** vs **151**). Le remplacement du phényle par un benzyle provoque aussi une diminution de l'activité (**150** vs **152**), probablement dû à un pouvoir inhibant de l'enzyme native important. Enfin, l'ajout d'un deuxième phényle provoque une perte d'activité dans le cas du NIMP (analogue du Sarin) et du NEDPA (analogue du Tabun), mais paradoxalement une augmentation d'activité dans le cas du NEMP (analogue du VX) et du paraoxon (**154** vs **152**). La molécule la plus efficace de cette série est l'oxime **150** surpassant à la fois la 2-PAM et le HI-6 notamment dans le cas du paraoxon.

Enfin, l'incorporation d'un motif pyridine sur la pipérazine permet de moduler l'activité *in vitro*. En effet, dans le cas du bras espaceur à 4 carbones, la pyridine en place du phényle permet une augmentation importante de la réactivation dans le cas du paraoxon (**150** vs **156**). Cette augmentation n'est pas observée dans le cas du bras espaceur à 5 chaînons (**151** vs **157**). Enfin, l'adjonction d'une pyrimidine, provoque une diminution du potentiel de réactivation en comparaison avec le phényle pour tous les NOPs testés (**150** vs **158**). En comparaison avec la pyridine (**156** vs **158**), les activités sont diminuées dans le cas du NEMP (analogue du VX) et du paraoxon. Cependant, l'activité *in vitro* est augmentée dans les cas du NIMP (analogue du Sarin) et du NEDPA (analogue du Tabun). L'oxime la plus efficace de cette série est le réactivateur **156** notamment dans le cas du paraoxon où cette molécule est 51 fois plus active que la 2-PAM et 62 fois plus que le HI-6 à 100 µM.

| Oximes | | | $k_{obs}$ (réactivateurs)/ $k_{obs}$ (2-PAM) | | | | $k_{obs}$ (réactivateurs) / $k_{obs}$ (HI-6) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| # | Carbones (Espaceur) | R | VX | Sarin | Tabun | POX | VX | Sarin | POX |
| **146** | 4 | Me | **2,7** | 0,6 | **3,4** | **4,7** | **1,4** | 0,3 | **5,6** |
| **147** | 5 | Me | 0,9 | 0,7 | Ø | **16,7** | 0,5 | 0,3 | **20,0** |
| **148** | 4 | Et | **2,9** | 0,5 | **2,5** | 4,0 | **1,5** | 0,2 | **4,8** |
| **149** | 5 | Et | **3,6** | Ø | Ø | Ø | **1,8** | Ø | Ø |
| **150** | 4 | Ph | **23,4** | **2,4** | **6,4** | **18,3** | **11,7** | **1,1** | **22,0** |
| **151** | 5 | Ph | **3,7** | 0,1 | 0,6 | **16,7** | **1,9** | Ø | **20,0** |
| **152** | 4 | Bn | **1,7** | **1,2** | **2,4** | **9,7** | 0,9 | 0,5 | **11,6** |
| **153** | 5 | Bn | 0,4* | **1,1** | Ø | **1,3*** | 0,2 | 0,5 | **1,6** |
| **154** | 4 | $CHPh_2$ | **2,1** | 0,9 | 0,5 | **11,0** | **1,0** | 0,4 | **13,2** |
| **155** | 5 | $CHPh_2$ | **1,2** | 0,4 | 0,1 | **5,7** | 0,6 | 0,2 | **6,8** |
| **156** | 4 | 2-py | **20,3** | **2,3** | **2,8** | **51,3** | **10,1** | **1,0** | **61,6** |
| **157** | 5 | 2-py | **1,2** | 0,5 | Ø | 6,7 | 0,6 | 0,2 | **8,0** |
| **158** | 4 | 2-pyr | **12,1** | **2,4** | **3,9** | **28,7** | **6,0** | **1,0** | **34,4** |

***Tableau 72.*** *Ratio des $k_{obs}$ à 100 µM (*concentration d'oxime égale à 40µM ; Ø : absence de réactivation)*

Ces données sont préliminaires et ne suffissent pas à appréhender le phénomène de réactivation dans sa globalité. Cependant les molécules **147** et **153**, obtenues plus précocement, ont pu faire l'objet d'une étude complète (ce ne sont hélas pas les plus prometteuses vu les $k_{obs}$ obtenus). Les constantes cinétiques de réactivation ont été déterminées *in vitro* sur l'*h*AChE inhibée par différents NOPs ainsi que les $IC_{50}$ sur l'enzyme native (**Tableau 73**).

Concernant les affinités sur l'*h*AChE, la molécule **147** est beaucoup plus affine que les réactivateurs de références. L'ajout du benzyle augmente fortement cette affinité (**153**), ce qui pourrait provoquer des problèmes d'inhibition de l'enzyme native.

Au niveau de la réactivation en elle-même, la constante de dissociation de la molécule **147** n'est pas améliorée dans le cas de l'*h*AChE inhibée par le NEMP (analogue du VX). *A contrario*, dans le cas du NIMP (analogue du Sarin) et du paraoxon, l'affinité est améliorée. L'analogue **153** est plus affin pour l'*h*AChE inhibée par le NEMP (analogue du VX) et le paraoxon, mais dans le cas du NIMP (analogue du Sarin), cette oxime présente une constante de dissociation plus élevée que celles présentées par les réactivateurs de référence. Les cinétiques de réactivation de ces molécules sont équivalentes voire supérieures à celles de la 2-PAM mais restent inférieures à celles du HI-6. Enfin, l'efficacité globale de ces réactivateurs est supérieure aux molécules de références dans le cas du paraoxon mais aussi dans le cas du NEMP (analogue du VX) pour la molécule **153**. Cela est explicable du fait que l'affinité envers l'enzyme inhibée est importante améliorant ainsi l'efficacité globale malgré une cinétique plus lente.

| *Constantes cinétiques* | *NOPs* | *Oximes* | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **147** | **153** | **HI-6** | **2-PAM** |
| $K_D$ (µM) | **VX (NEMP)** | 40 ± 6 | 0.9 ± 0.07 | 19 ± 4 | 26 ± 7 |
| | **Sarin (NIMP)** | 66 ± 19 | 76 ± 9 | 57 ± 11 | 25 ± 7 |
| | **Tabun (NEPDA)** | Ø | Ø | Ø | 211 ± 113 |
| | **Paraoxon** | 49 ± 17 | 36 ± 6 | 290 ± 70 | 68 ± 16 |
| $k_r$ ($min^{-1}$) | **VX (NEMP)** | 0.19 ± 0.01 | 0.06 ± 0.0008 | 0.38 ± 0.02 | 0.19 ± 0.013 |
| | **Sarin (NIMP)** | 0.25 ± 0.03 | 0.41 ± 0.03 | 0.76 ± 0.06 | 0.27 ± 0.02 |
| | **Tabun (NEPDA)** | Ø | Ø | Ø | 0.47 ± 0.19 |
| | **Paraoxon** | 0.09 ± 0.012 | 0.07 ± 0.008 | 0.1 ± 0.01 | 0.066 ± 0.02 |
| $k_{r2}$ ($mM^{-1}min^{-1}$) | **VX (NEMP)** | 4.7 | 66 | 20 | 7.3 |
| | **Sarin (NIMP)** | 3.79 | 5.4 | 13.3 | 10.8 |
| | **Tabun (NEPDA)** | Ø | Ø | Ø | 2.24 |
| | **Paraoxon** | 1.8 | 1.9 | 0.36 | 0.97 |
| $IC_{50}$ (µM) | - | 67 ± 10 | 2.6 ± 0.3 | 82 ± 6 | 580 ± 28 |

***Tableau 73.*** *Cinétique de réactivation in vitro des molécules **147** et **153** sur la hAChE inhibée par différents NOPs (Ø : absence de réactivation).*

### V.3.1.3. Effet sur les récepteurs nicotiniques

Les molécules **147** et **153** ont été évaluées par le Dr Romulo Araoz (Laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologies, CEA Saclay, Institut des Neurosciences Paris-Saclay, UMR 9197 CNRS) avec comme objectif de mettre en évidente un effet antagoniste de nos molécules sur les nAChRs de type $\alpha 7$ (Cf Chapitre 2). L'étude est en cours, cependant quelques résultats préliminaires sont disponibles.

A une concentration de 10 µM des oximes **147** (AB-069) et **153** (AB-153), le pourcentage d'inhibition est d'environ 50% mais est totalement réversible. A 100 µM, les récepteurs sont totalement inhibés (**Figure 197**).

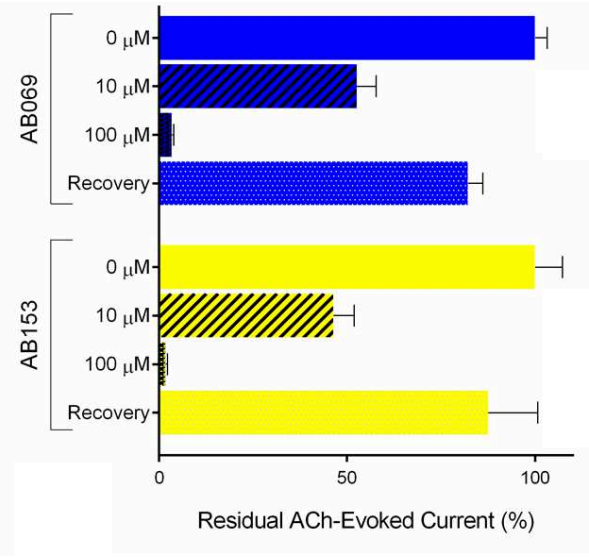



***Figure 197.*** *Effet antagoniste sur le récepteur α7 nAChR humain des oximes **147** et **153** (technique HiClamp)*

La valeur d'$IC_{50}$ a été déterminée dans le cas de la molécules **147**. Celle-ci s'élève à 4.75 µM en concordance avec le premier screening (**Figure 198**).

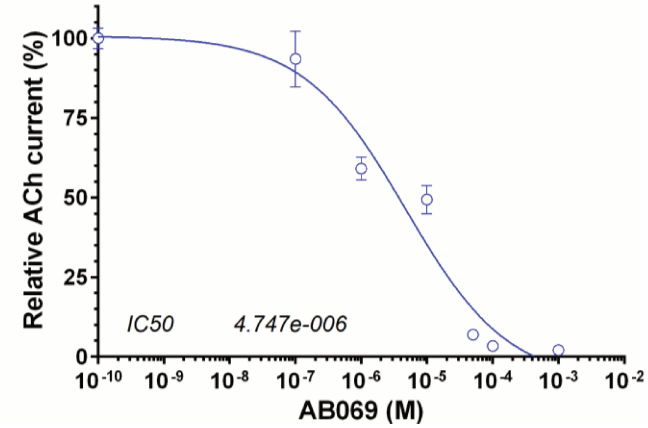



***Figure 198.*** *Inhibition dose-dépendante du courant cholinergique par l'oxime* ***147*** *chez des ovocytes de X. Laevis exprimant le RnACh humain de type α7 (amplitude du pic du courant enregistré à un potentiel imposé de -60 mV en présence de concentrations croissantes de 147 ; les pics d'amplitude ont été normalisés contre des courants induits par 100 µM ACh soit la* $EC_{50}$*)*

L'effet sur le pic de courant induit par l'ACh de cette oxime a été étudié. Contrairement au **RM048**, l'oxime diminue de 50% l'amplitude du pic à une concentration de 1 µM (**Figure 199**).

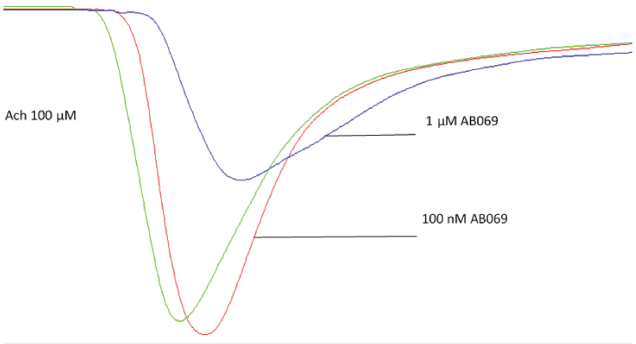



***Figure 199.*** *Effet de l'oxime* ***147*** *sur le nAChR humain de type α7 (temps d'incubation : 5 s ; en vert : courant induit par 100 µM ACh ; en rouge : 100 nM de* ***147*** *; en bleu : 1µM de* ***147****)*

Bien que ces résultats soient préliminaires, ils indiquent que les oximes **147** et **153** sont des antagonistes des nAChR $\alpha$7. A plus long terme, l'effet sur les récepteurs muscariniques M1, beaucoup plus abondants au niveau du SNC, sera évalué. Ces oximes pourront constituer une base pour le développement de réactivateurs « multi-cibles » agissant sur l'AChE aussi bien que sur les récepteurs nicotiniques voire muscariniques.

### V.3.2. Evaluations *in vivo*

L'oxime **147** a fait l'objet d'une étude pharmacocinétique et de survie sur la souris selon les mêmes protocoles que ceux exposés dans le chapitre précédent. Afin d'éviter les problèmes de biodisponibilité, la forme chlorhydrate a été employée.

Les constantes pharmacocinétiques sont résumées dans le **Tableau 74**. Le temps de résidence est de 18 minutes suggérant que les vitesses de diffusion ainsi que la clairance sont plus importantes pour l'oxime **147** comparé à la 2-PAM et au HI-6 (la 2-PAM étant considérée comme la meilleure oxime pour la protection *in vivo* contre une intoxication au paraoxon chez la souris). Le pourcentage de réactivation est inférieur à celui obtenu pour le HI-6, mais est équivalent à celui de la 2-PAM. Enfin, le $t_{max}$ est plus important comparé à celui de la 2-PAM et du HI-6, illustrant une entrée dans le compartiment sanguin plus lente. L'étude a donc été poursuivie avec la survie des souris traitées par ce réactivateur avant exposition au paraoxon.

| Oximes | Concentration (µmol/kg) | MRT (min) | $t_{max}$ (min) | React max (%) |
|---|---|---|---|---|
| HI-6 | 100 | 45,1 ± 1,4 | 5,8 ± 0,3 | 117,7 ± 2,2 |
| 2-PAM | 100 | 31 ± 3 | 4,5 ± 0,5 | 51 ± 2 |
| AB-069 HCl | 100 | 18,8 ± 1,8 | 7 ± 1 | 49 ± 6,2 |

***Tableau 74.*** *Données pharmacocinétiques obtenue in vivo sur la souris*

Malheureusement, l'indice de protection, bien qu'équivalente au HI-6 reste inférieure à celui de la 2-PAM. Face à ce résultat décevant, le développement de l'oxime **147** a été stoppé (**Figure 200**).

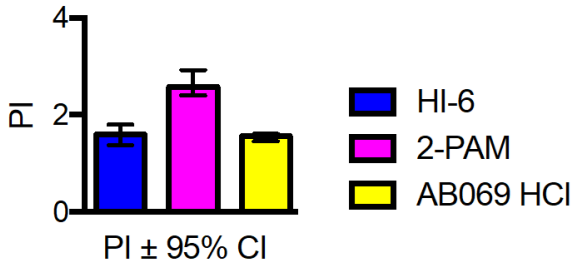
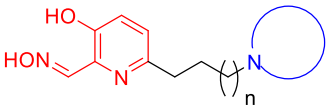
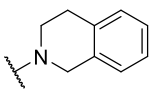



***Figure 200.*** *Indice de protection sur la souris exposée au paraoxon en absence d'atropine*

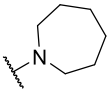
## VI. Conclusion du chapitre 3

L'objectif de cette partie était d'incorporer des amines cycliques en tant que ligand du site périphérique dans nos réactivateurs tripartites. Quatre familles ont été étudiées : les amines dérivées des carbamazépines, les amines simplifiées de la PIQ, les amines cycliques dérivées de la pipéridine et, enfin, les pipérazines *N*-substituées. Vingt-et-un réactivateurs ont été obtenus et les évaluations biologiques sont en cours (**Figure 201**).

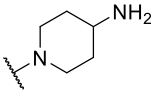


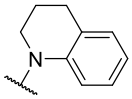
n = 2, **90, AB-558**
n = 3, **91, AB-746**



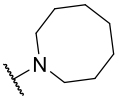
n = 3, **112, AB-152**



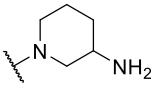

n = 2, **115, AB-740**
n = 3, **116, AB-737**



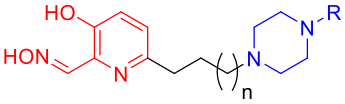
n = 3, **93, AB-392**



n = 2, **113, AB-643**
n = 3, **114, AB-436**




n = 2, **117, AB-738**
n = 3, **118, AB-739**




| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| n = 2, R = Me, | **146, AB-639** | n = 2, R = Ph, | **150, AB-745** | n = 2, R = 2-py, | **156, AB-589** |
| n = 3, R = Me, | **147, AB-069** | n = 3, R = Ph, | **151, AB-744** | n = 3, R = 2-py, | **157, AB-451** |
| n = 2, R = Et, | **148, AB-588** | n = 2, R = Bn, | **152, AB-641** | n = 2, R = 2-pym, | **158, AB-647** |
| n = 3, R = Et, | **149, AB-557** | n = 3, R = Bn, | **153, AB-153** | n = 3, R = 2-pym, | **159, AB-508** |
| | | n = 2, R = -$CHPh_2$, | **154, AB-643** | | |
| | | n = 3, R = -$CHPh_2$, | **155, AB-555** | | |

***Figure 201.*** *Structures des réactivateurs synthétisés dans ce chapitre*

La synthèse des dérivés des carbamazépines, composés très prometteurs *in silico*, n'a pas abouti à l'obtention de produit final. Cependant une voie de synthèse alternative existe et mérite d'être testée au vu des potentiels décelés.

Concernant les dérivés incorporant des amines dérivées de la PIQ, trois réactivateurs sur quatre initialement désirés ont été obtenus et évalués *in vitro*. Ces molécules ont la particularité de réactiver à large spectre. Le réactivateur **90 (AB 558)** est particulièrement intéressant puisqu'il surpasse le HI-6 et la 2-PAM lors de la réactivation de l'*h*AChE inhibée par le NEMP (analogue du VX), le NEDPA (analogue du tabun) et le Paraoxon. Cependant, l'étude des cinétiques permettra une véritable étude SAR.

L'incorporation d'amines cycliques dérivées de la pipéridine a permis l'obtention de 5 réactivateurs sur les 6 envisagés. Parmi ces réactivateurs, trois sont capables de réactiver à large spectre. Les oximes **116** (**AB-740**) et **117** (**AB-738**) présentent des capacités prometteuses bien qu'elles ne traversent pas la BHE *in vitro*. Une encapsulation pourrait s'avérer très bénéfique. Une étude plus poussée a été menée sur la

molécule **112** (**AB-152**) mais elle s'est révélée décevante *in vivo* malgré des capacités de réactivation intéressante *in vitro*, illustrant la difficile extrapolation entre le *in vitro* et le *in vivo.* Afin de finaliser l'étude sur les m-aminopipérazine, la synthèse des deux enantiomères permettrait de mettre en évidence les possibles différences *in vitro*.

Enfin l'incorporation de pipérazines substituées a permis la synthèse de 14 réactivateurs innovants qui traversent tous la BHE *in vitro*. Les molécules **146 (AB-639)**, **150 (AB-745)**, **156 (AB-589)** et **158 (AB-647)** méritent une étude plus approfondie au vu des données préliminaires *in vitro*. Les molécules **147 (AB-069)** et **153 (AB-153)**, obtenues au début de cette thèse ont été évaluées *in vitro* pour leurs potentiels de réactivation mais aussi pour leur effet antagoniste sur les nAChR $\alpha$-7, démontrant un effet antagoniste intéressant dans le cas d'un traitement d'urgence. La molécule **147 (AB-069)** a été évaluée *in vivo* mais les résultats obtenus ne sont pas suffisants pour envisager un développement plus poussé.

La finalisation des évaluations biologiques nous permettra véritablement de juger le potentiel des molécules étudiées dans cette partie. Cependant, d'autres ligands peuvent être envisagés et sont décrits dans la figure suivante. En focalisant sur des ligands potentiels aminés, un nombre infini de ligands est envisageable. Les seules limites sont l'imagination et l'accès synthétique. Quelques structures possibles sont décrites dans la figure suivante (**Figure 202**).

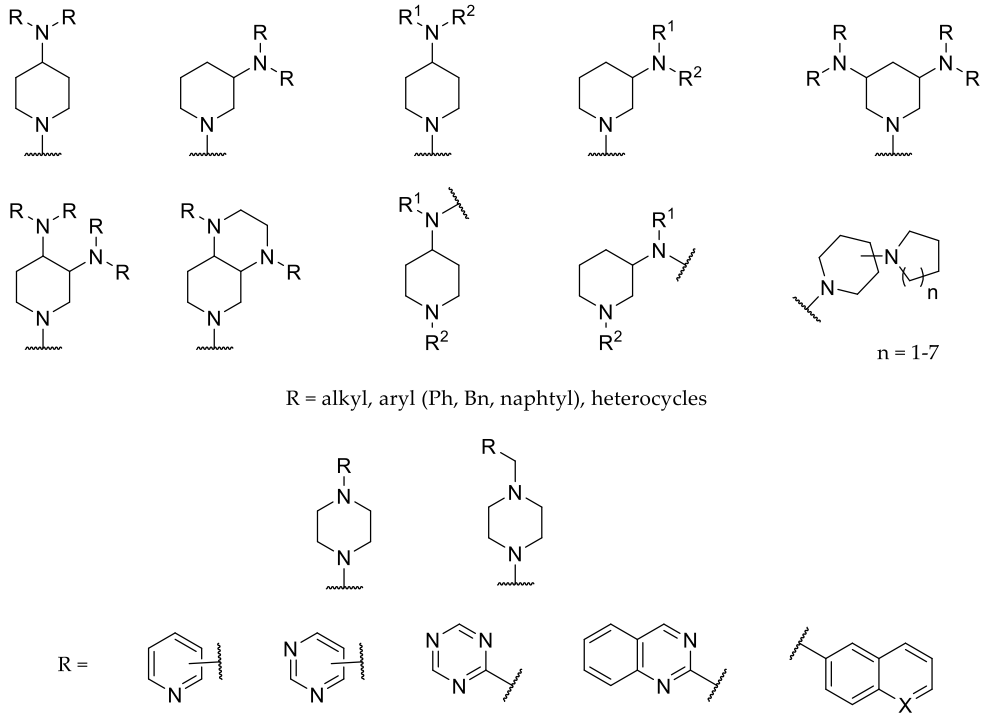
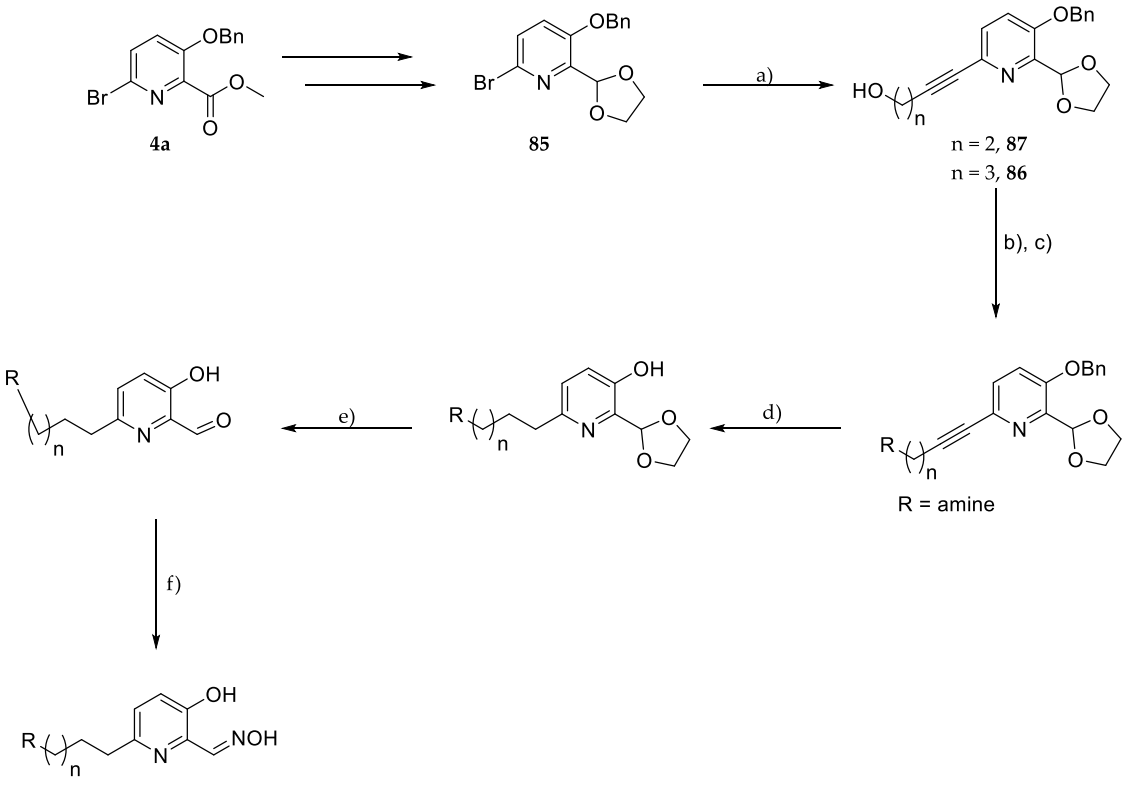



***Figure 202.*** *Amines à envisager comme ligands du site périphérique*

Par ailleurs un analogue de l'oxime **116** portant un motif N,N-dimethyl-4-amino pipéridine, est en cours de synthèse au sein de notre équipe.

Concernant les voies synthétiques utilisées, selon mon expérience, il est nécessaire de revoir la séquence réactionnelle. En effet, la séquence réactionnelle protection – rééduction - déprotection permettant la génération de l'aldéhyde précurseur à partir de l'ester présente de nombreuses limitations. En effet, les deux première étapes (protection puis réduction) ne peuvent être purifiées par chromatographie à cause de l'instabilité des intermédiaires réactionnels. Ces étapes nécessitent des traitements aqueux qui, dans le cas des amines étudiées dans cette partie, provoquent des pertes non négligeables (émulsions, solubilité dans l'eau) diminuant le rendement. L'emploi de TBAF pour cliver la protection de l'éther silylé, bien qu'efficace quand il est de bonne qualité, peut provoquer des problèmes lors des purifications en phase normale comme en phase inverse. Un premier test de remplacement de ce réactif par le $NH_4F$ dans le méthanol a donné des résultats prometteurs mais nécessite une optimisation afin de vérifier la reproductibilité mais aussi son impact sur l'amélioration des purifications, les puretés et donc des rendements finaux. Cependant, selon moi, il est nécessaire de repenser la génération de l'aldéhyde. En effet, comme, nous allons le voir dans le chapitre suivant, l'aldéhyde peut être généré en amont du greffage du ligand, sans conséquence sur les rendements en début de synthèse (**Figure 203**).




(a) **6a** or **6b**, $Pd(PPh_3)_4$, CuI, TEA:DCM (1:1), rt, 12h; (b) MsCl, TEA, DCM, rt, 1h; (c) RH, $K_2CO_3$, ACN, reflux; (d) $H_2$, $Pd(OH)_2$, methanol, 1h; (g) Formic acid, $H_2O$; (f) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt.

***Figure 203.*** *Voie alternative d'accès aux réactivateurs possible*

L'intérêt de cette voie est multiple :

- Il n'y a plus besoin de protéger puis déprotéger le phénol par un éther silylé, limitant les pertes et étapes de purifications non nécessaires ;
- Il n'est plus nécessaire d'ajuster le nombre d'équivalents de DIBAL-H en fonction du nombre d'hétéroatomes en présence (et d'éviter les problèmes de chélation avec l'aluminium) ;
- Plus de problème de sels de tetra-butyl ammonium (issus du TBAF) parfois difficile à séparer du réactivateur par chromatographie en en phase normale ; la déprotection de l'aldéhyde (1,3-dioxolane) se fait en conditions acides aqueuses et l'ensemble des étapes réactionnelles (substitution, couplage pallado-catalysé, hydrogénation, génération de l'oxime) se font en milieux neutre ou basique sous condition anhydre.

Concernant l'obtention des réactivateurs à quatre carbone, les voies testées ne permettent pas d'éviter la réaction parasite d'élimination et donc conduisent à de faibles rendements observés. Cette propension à l'élimination est liée au caractère basique de l'amine employée. Il est nécessaire d'étudier cette réaction de manière plus approfondie. En effet, l'élimination se fait-elle uniquement sur l'alcool activé ou également sur le produit de substitution ? Bien que dépendant de l'amine, le monitoring IR *in situ* pourrait répondre à cette question.

Un autre point à soulever est la génération des sels de réactivateur. Les molécules formulées sont extrêmement hygroscopiques et se présentent généralement sous forme d'huile (notamment quand la quantité de produit est faible). La précipitation dans l'éther est possible, cependant, le solide redevient à son état premier très rapidement. Le séchage de ces produits doit se faire dans un SpeedVac (évaporateur sous vide centrifugé et chauffé) car un dessiccateur classique sous vide (sur $P_2O_5$) ne suffit que rarement. Le choix du TFA s'est donc imposé, afin de faciliter la caractérisation du sel, mais ne constitue pas une solution, les formulations de molécules bioactives se font essentiellement sous forme de chlorhydrate, de lactate, de mésylate ou de tartrate.[527] Pour déterminer avec plus de précision le pKa des amines, la pHmétrie a été utilisée cependant, les amines ont des pKa très proches de ceux de l'oxime et du phénol, ce qui se matérialise par un unique saut de pH duquel nous ne pouvons déduire, notamment dans le cas des sels de pipérazine, l'acidité exacte lié au sel aminé. Le dosage par RMN a été envisagé. Cependant, étant donné la complexité de nos molécules, le dosage par RMN n'est pas possible. Ce volet nécessitera l'intervention d'un véritable spécialiste de la formulation et de la chimie du solide.

# CHAPITRE 4 : VERS UN PASSAGE ACTIF DE LA BHE – SYNTHESE DE REACTIVATEURS COMPORTANT UN MOTIF CARBOHYDRATE

## I. Introduction

La biodistribution et un passage efficace de la BHE des molécules bioactives est, comme présenté dans les précédents chapitres, une problématique majeure des thérapies agissant sur le système nerveux central.

La BHE est constituée de cellules endothéliales liées par des jonctions serrées. De ce fait, les molécules polaires passent difficilement cette barrière.[528] Cependant, des molécules comme le glucose, certains acides aminés ou nucléosides sont capables de traverser aisément cette barrière *via* des transporteurs spécifiques tels que GLUT1, LAT1, CAT1 ou CNT2. Le transport du glucose est médié par les transporteurs de glucose de classe I (GLUT1) présents sur les membranes des cellules endothéliales.[529] Ces transporteurs sont relativement non-spécifiques puisqu'ils sont capables de transporter aussi bien les hexoses que les adduits glycoconjugués.[530,531]

Le greffage d'un carbohydrate sur les fonctions réactivatrices afin de faciliter le passage de la BHE est une stratégie qui a déjà été utilisée précédemment comme le montre les travaux d'Heldman et coll. ainsi que Garcia et coll. Ces travaux décrivent la synthèse et l'évaluation de des pyridinium aldoximes glycoconjugués présentant des activités *in vitro* similaire au 2-PAM.[445,532]

Inspiré par ces travaux, le laboratoire a donc envisagé l'association d'un motif carbohydrate avec la fonction réactivatrice 3-hydroxypyridine aldoxime (**Figure 204**). Une partie de ces travaux a été réalisé par le Dr Pierre Warnault lors de son stage postdoctoral au sein de l'équipe (2014-2015) et dans le contexte du projet ANR Astrid ReCNS-AChE 2013-2017.

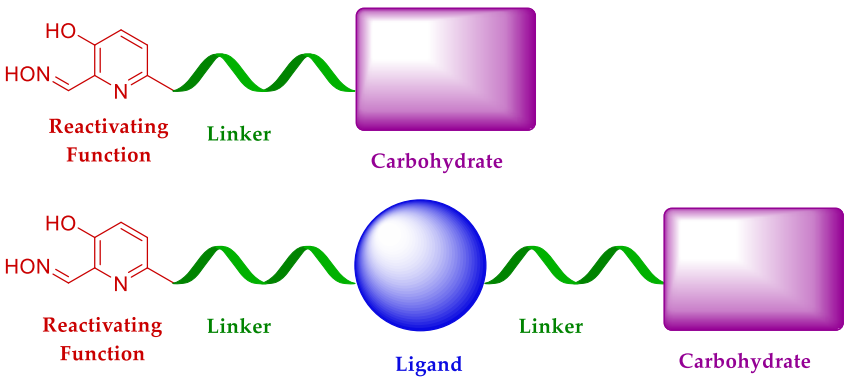
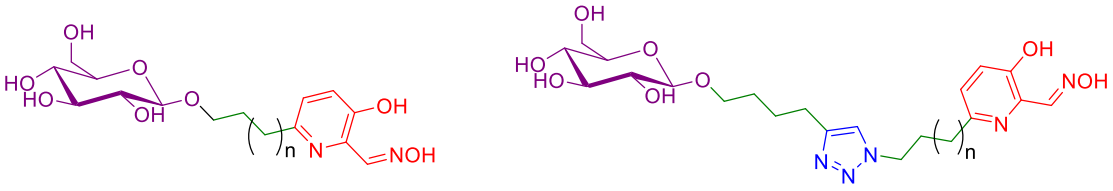



***Figure 204.*** *Structures générales des réactivateurs de ce chapitre*

## II. Conception *in silico* de réactivateurs incorporant un motif carbohydrate

Avec comme objectif l'incorporation du motif β-glucopyranose, quatre structures ont été identifiées et synthétisées (**Figure 205**) :

- Les **PW094** et **PW150**, où la fonction réactivatrice est reliée au motif β-glucopyranose par une chaîne alkyle de 3 ou 4 atomes de carbones (1ère génération) ;
- Les **PW205** et **PW208**, comportant un motif triazole incorporé dans le bras espaceur (2ème génération). Par analogie aux travaux de Sharpless sur le développement d'inhibiteurs dimériques puissants de l'AChE, *anti* et *syn* TZ2-PA6,[487,533] l'insertion d'un motif triazole a pour but d'augmenter les interactions avec certains résidus du site périphérique et de la gorge de l'enzyme (e.g., Tyr 341 et Tyr 337).[504]




n = 1, **202b, PW-150**
n = 2, **202a, PW-094**

n = 1, **203b, PW-205**
n = 2, **203a, PW-208**

***Figure 205.*** *Structures des réactivateurs*

Concernant les **PW094** et **PW150**, le docking statique montre des interactions de type Van Der Waals et hydrogène entre le β-glucopyranose et les résidus du site actif (e.g., Try341 et Arg296 - **Figure 206**). La longueur de la chaîne alkyle est primordiale : la chaîne C3 est trop courte pour que les interactions avec le β-glucopyranose et les résidus du site périphérique soient présentes se traduisant par une énergie de stabilisation faible.

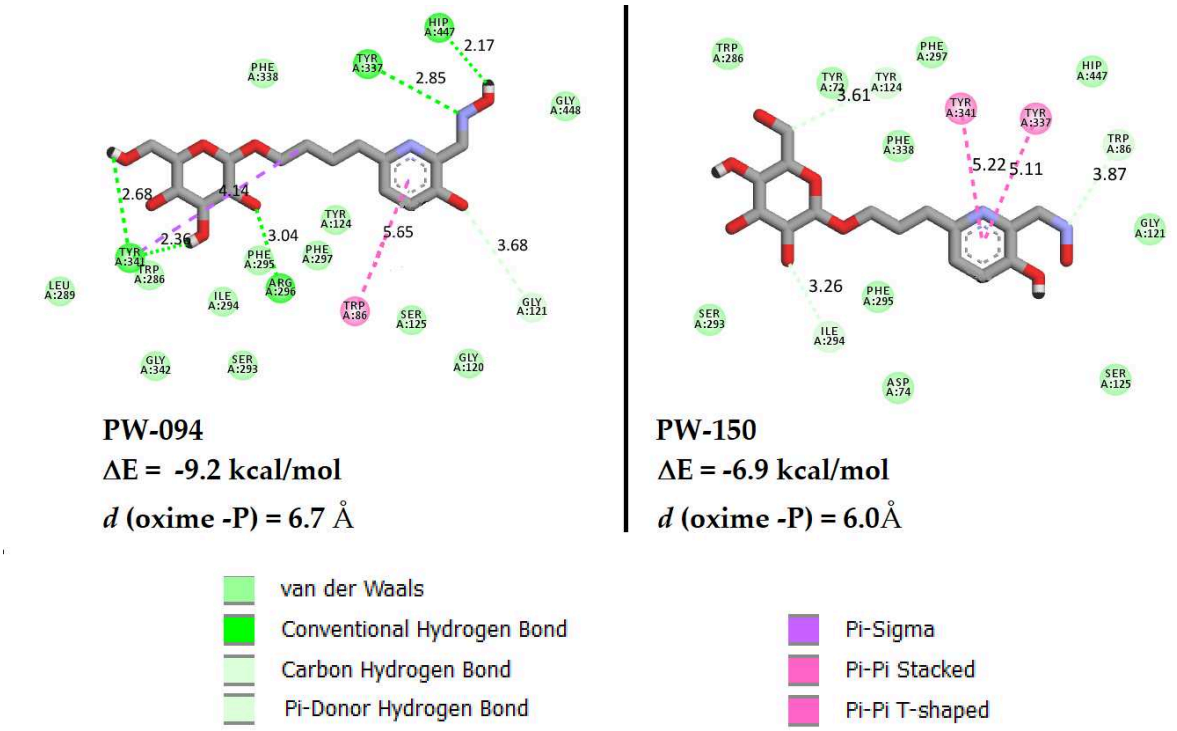



***Figure 206.*** *Interactions du* ***PW094*** *(gauche) et* ***PW150*** *(droite) avec la hAChE inhibée par le VX en docking statique (visualisées sur Discovery)*

Concernant les molécules **PW205** et **PW208**, comme décrit dans la littérature, l'apport du triazole permet une interaction supplémentaire du type π-stacking avec la Tyr341 et le motif β-glucopyranose interagit *via* une liaison hydrogène avec le Trp286 situé dans le site périphérique de l'enzyme (**Figure 207**).

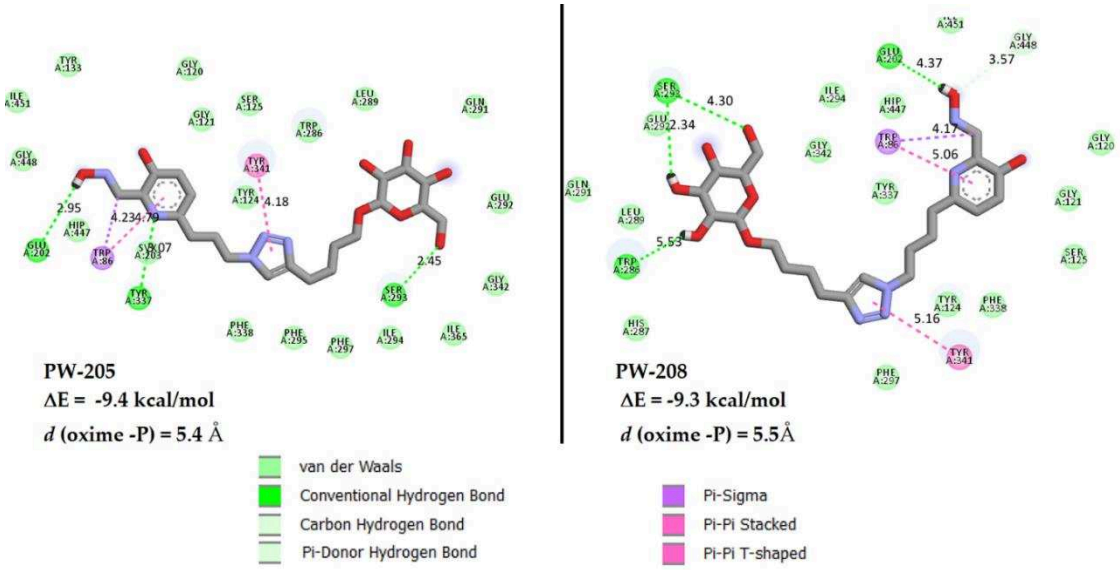



***Figure 207.*** *Interactions du* ***PW205*** *(gauche) et* ***PW208*** *(droite) avec la hAChE inhibée par le VX en docking statique (visualisées sur Discovery)*

## III. Synthèses des réactivateurs incorporant un motif carbohydrate

Cette partie sera consacrée aux synthèses des réactivateurs de première et seconde génération. Après analyse rétrosynthétique, les synthèses seront décrites en détail.

### III.1. Synthèses des réactivateurs de première génération

Ce travail de synthèse a été effectué par le Dr Pierre Warnault. Après analyse rétrosynthétique, les synthèses des **PW094** et **PW150** seront présentées.

#### III.1.1. Analyse rétrosynthétique

Les **PW094** et **PW150** ont en commun la fin de la séquence synthétique à partir du fragment **A** consistant en l'hydrogénation catalytique de la triple liaison, la déprotection de l'aldéhyde, la génération de l'oxime et enfin la déprotection du carbohydrate. La synthèse diverge au niveau de la génération du fragment **A** (**Figure 208**).

Dans le cas du **PW094**, ce fragment est obtenu par *O*-glycosylation de l'alcool primaire porté par le bras espaceur lié au précurseur de la fonction réactivatrice (fragment **B**). Ce fragment est issu du couplage pallado-catalysé de Sonogashira entre le précurseur **D** et le 3-butyn-1-ol. *A contrario*, pour le **PW150**, le fragment **A** est généré par couplage de Sonogashira entre le précurseur **D** et l'espaceur glycosylé **B'**. Celui-ci est synthétisé par simple *O*-glycosylation entre l'alcool propargylique et le glucopyranose activé **C**. Enfin le fragment commun **D** est obtenu après réduction en aldéhyde de la molécule **4a** et protection de celui-ci sous forme d'acétal.

A noter que ces synthèses ont été effectuées par le Dr Pierre Warnaut et présentent des rendements non-optimisés.

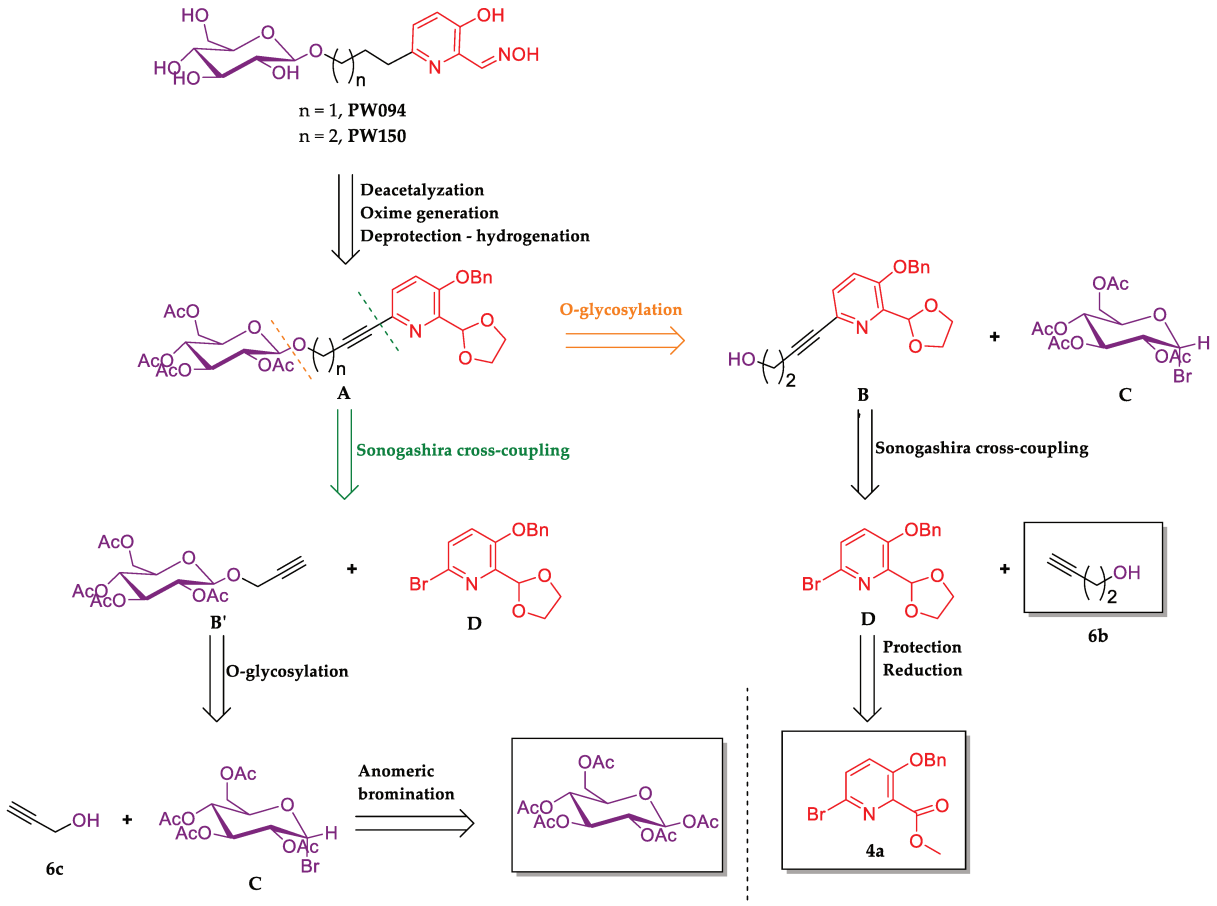
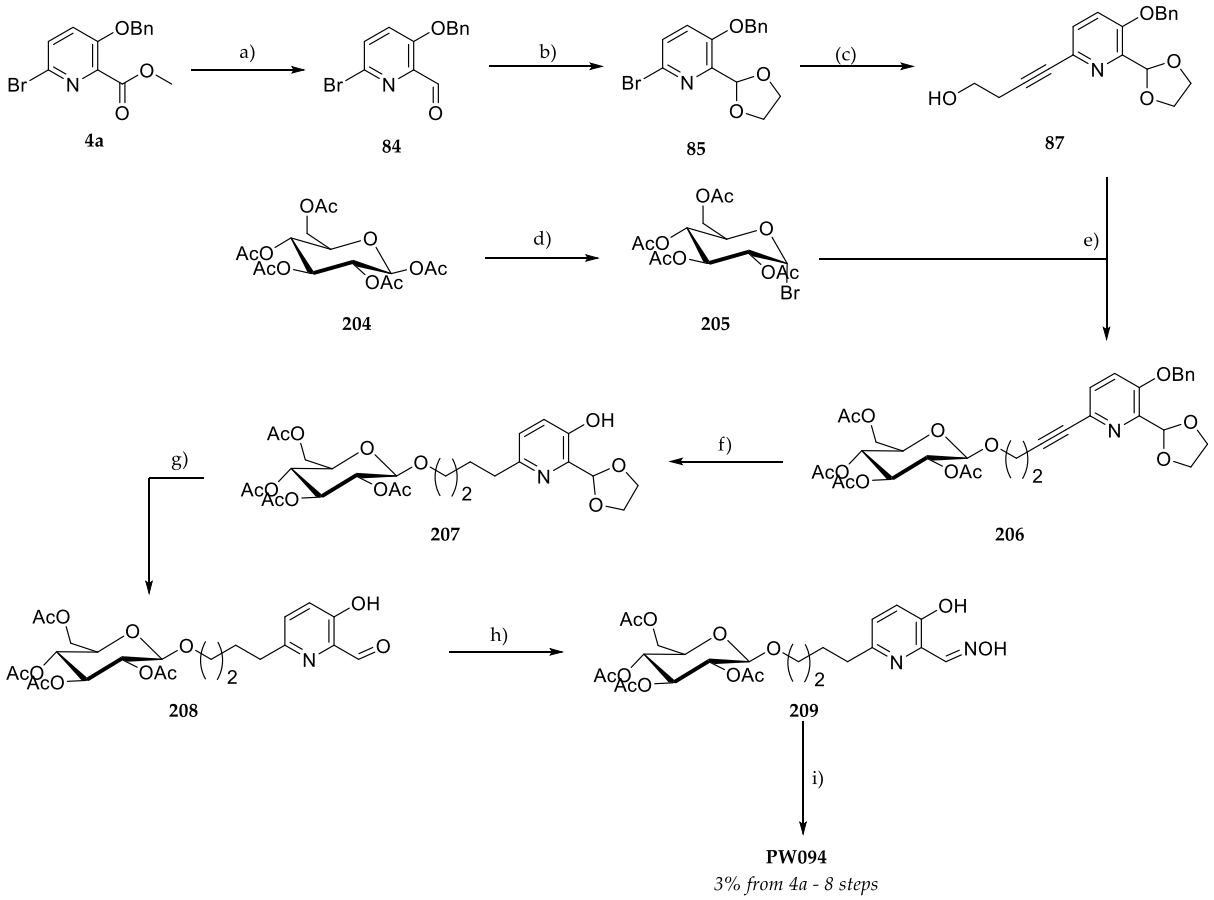



*Figure 208. Analyse rétrosynthétique des molécules* ***PW094*** *et* ***PW150***

### III.1.2. Synthèse du PW094

La synthèse est détaillée dans la Figure 209. L'ester méthylique de la bromopyridine **4a** est réduit en aldéhyde **84** par traitement avec du DIBAL-H de manière quantitative. L'aldéhyde est alors protégé sous forme d'acétal **85** avec l'éthylene glycol en présence de l'acide de Lewis $BF_3$-$Et_2O$ avec un rendement de 95%. Le greffage du premier bras espaceur est effectué par un couplage de Sonogashira avec le 3-butyn-1-ol pour donner l'intermédiaire **87** avec un rendement de 96% après purification en phase normale. En parallèle, le β-D-glucose pentacétate **204** est activé en position anomérique pour former l'intermédiaire **205**. L'incorporation du sucre est réalisée par réaction de glycosylation de l'intermédiaire **87** sur le l'acétobromo glucose **205** avec un rendement de 14%. Ce faible rendement peut être expliqué par le temps trop long alloué à cette réaction (dans le cas du **PW208**, cette étape a été optimisée pour atteindre en 4 h un rendement de 61% après purification en phase normale). L'intermédiaire **206** est alors réduit et *O*-débenzylé de manière quantitative. La déprotection de l'acétal a permis l'obtention de l'aldéhyde **207** avec un rendement de 45%. L'oxime **208** est alors générée de manière quantitative puis le glucopyranose est déprotégé permettant l'obtention du **PW094** avec un

rendement de 52% après purification en phase inverse, soit un rendement global de 3% sur 8 étapes à partir du composé **4a**.

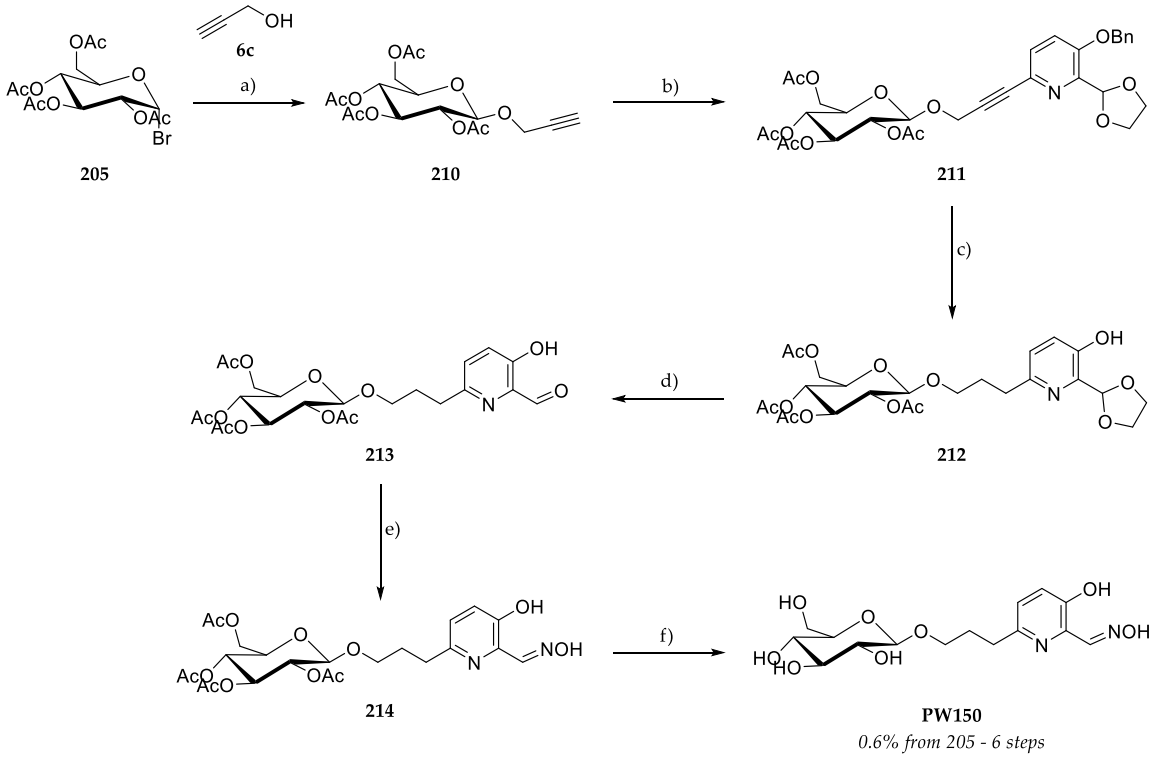



(a) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min, ***quant.***; (b) ethylene glycol, $BF_3.OEt_2$, DCM, 0°C, ***95%***; (c) **6b**, $Pd(PPH_3)_4$ - 5 mol%, CuI - 10 mol%, TEA/DCM (1/2), rt, 12h, ***76%***; (d) HBr/AcOH (33%w/w), DCM, 0°C then rt 3h, ***quant.***; (e) $AgCO_3$, toluene, 75°C, 24h, ***14%***; (f) $H_2$, Pd/C, rt, 1h, ***quant.***; (g) formic acid, $H_2O$, MeOH, 2 days, ***45%***; (h) $NH_2OH.HCl$, AcONa, EtOH, ***quant.***; (i) NaOMe, MeOH, rt, 3h, ***52%***.

***Figure 209.*** *Synthèse du* ***PW094.***

### III.1.3. Synthèse du PW150

La synthèse est détaillée dans la **Figure 210**. Le carbohydrate activé **205** est mis en réaction avec l'alcool **6c** pour générer l'intermédiaire **210** avec un rendement de 34%. La réaction subséquente de couplage de Sonogashira permet d'obtenir le dérivé **211** avec un rendement de 62%. Après hydrogénation (49%), l'acétal **212** est clivé pour donner l'aldéhyde **213** (20%). Enfin la génération de l'oxime (90%) suivie de la déprotection du carbohydrate **214** (34%) permet l'obtention du **PW150** avec un rendement global de 0.6% à partir de l'intermédiaire **205**, sur 6 étapes. Ces rendements ne sont pas optimisés, en effet, les longs temps de réaction appliqués au différents intermédiaires glycosylés ne sont pas compatibles avec leur stabilité.




(a) **6c**, $AgCO_3$, toluene, 75°C, 24h, ***34%*** (b) **85,** $Pd(PPH_3)_4$ - 5 mol%, CuI - 10 mol%, TEA/DCM (1/2), rt, 12h, ***62%***; (c) $H_2$, Pd/C, rt, 24h, ***49%***; (d) formic acid, $H_2O$, MeOH, 3 days, ***20%;*** (e) $NH_2OH.HCl$, AcONa, EtOH, ***90%;*** (f) NaOMe, MeOH, rt, 3h, ***34%.***

***Figure 210.*** *Synthèse du* ***PW150****.*

## III.2. Synthèses des réactivateurs de seconde génération

### III.2.1. Analyse rétrosynthétique

La rétrosynthèse des **PW205** et **PW208** est détaillée dans la **Figure 211**. Le β-glucopyranose sous forme protégé est introduit en fin de synthèse sur le fragment **A**. Celui-ci est issu de la cyclisation [3+2] de Huisgen catalysé au cuivre entre le fragment **B** et le 5-hexyn-1-ol. Le fragment **B** est obtenu par couplage pallado-catalysé de Sonogashira entre le fragment **C** et l'alcyne appropriée. Enfin le fragment **C** est obtenu à partir de l'intermédiaire **4a** par réduction de l'ester en aldéhyde puis protection de l'aldéhyde sous forme d'acétal. La synthèse du **PW205** contrairement au **PW208** n'a pas été optimisée.

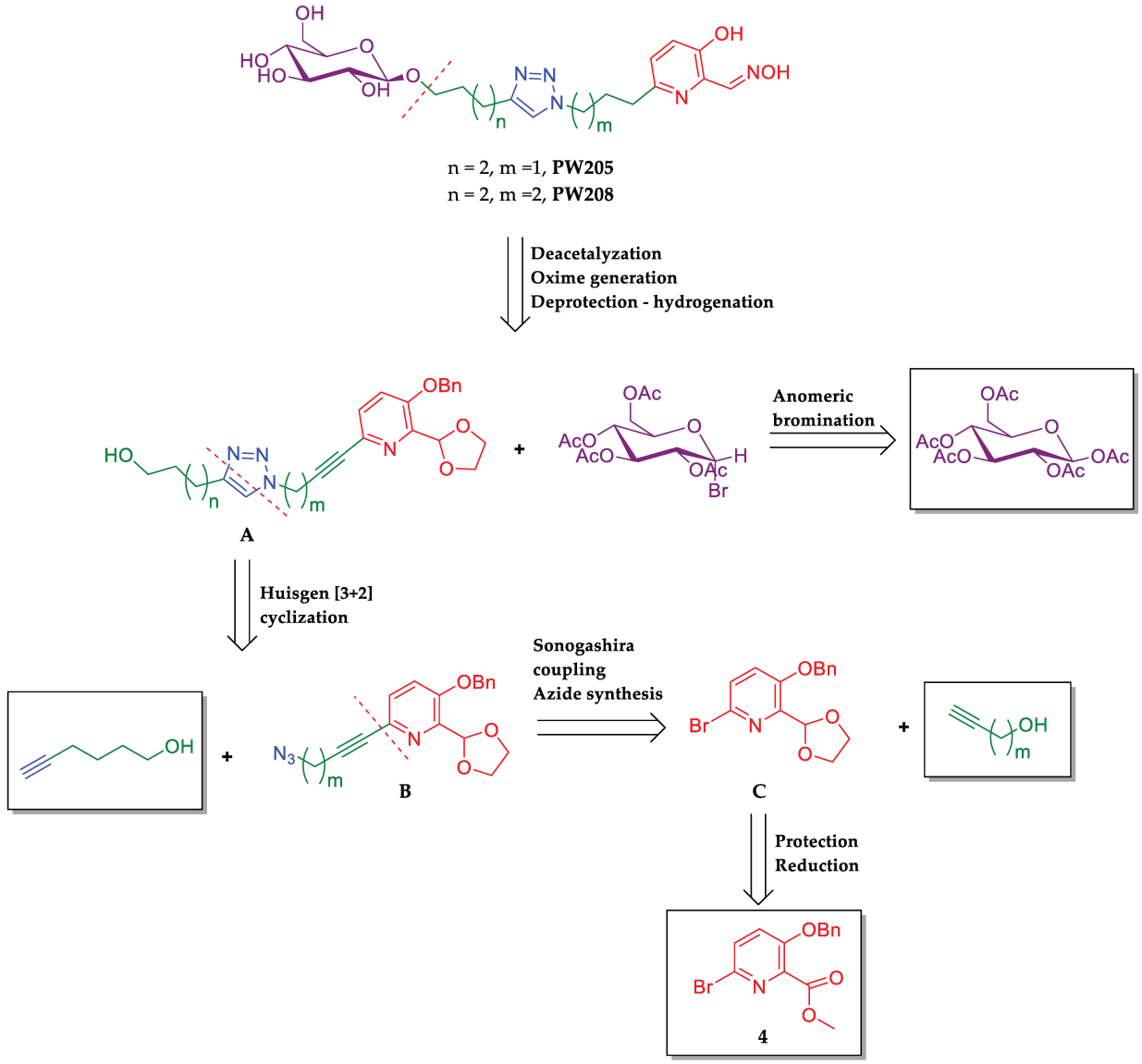
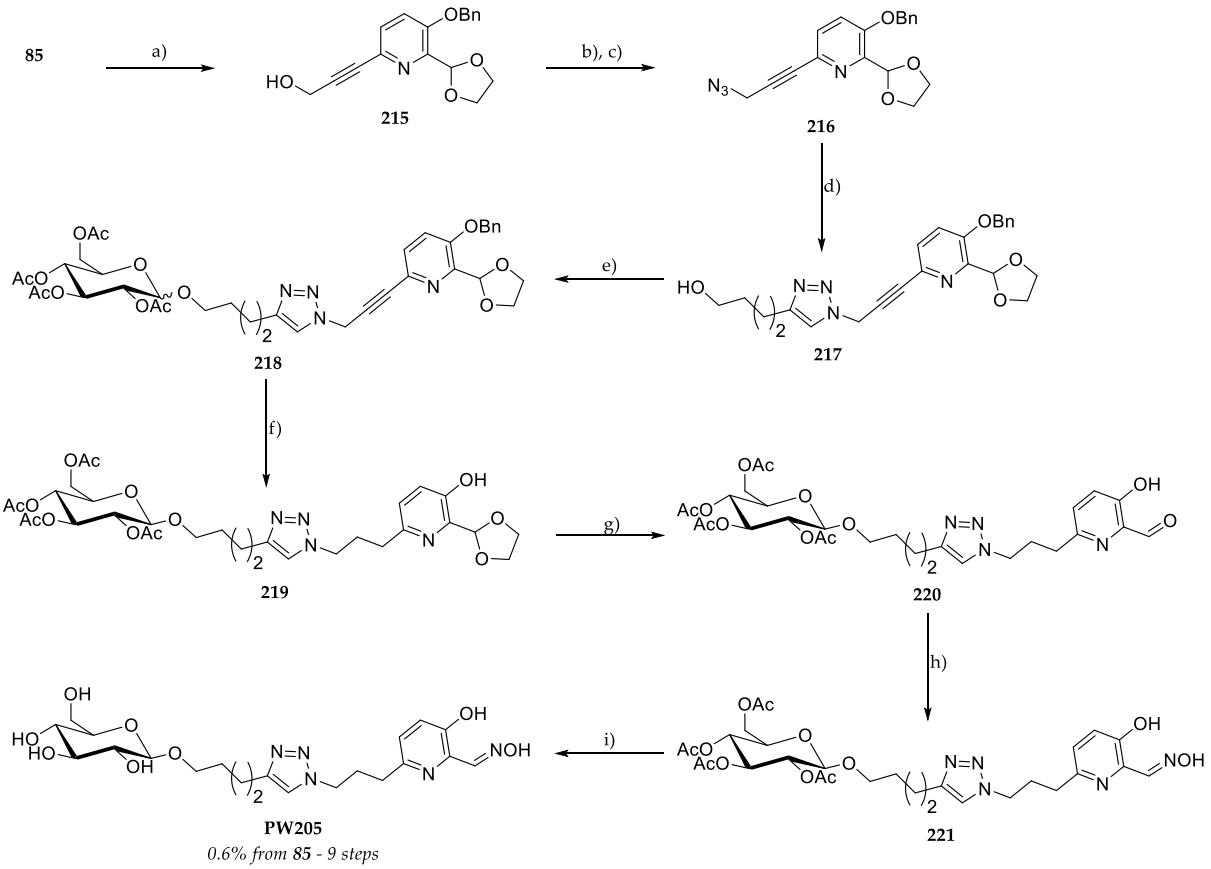



*Figure 211. Rétrosynthèse des PW205 et PW208*

### III.2.2. Synthèse du PW205

La synthèse débute par un couplage de Sonogashira entre l'alcyne **6c** et le dérivé bromé **85** (92% - Figure 212). Par la suite, l'alcool **215** est transformé en azoture, par activation sous forme de mésylate puis substitution nucléophile (83 % sur 2 étapes). La réaction de cyclisation [3+2] permet de générer le triazole **216** avec un rendement de 40%. La O-glycosylation de cet intermédiaire avec le glucopyranose activé **205** permet l'obtention du dérivé **218** avec un rendement de 30% probablement dû au long temps de réaction appliqué. Après hydrogénation catalytique (75%), l'acétal **219** est clivé en milieu acide pour donner l'intermédiaire **220** avec un rendement de 38%. Après génération de l'oxime **221** (56%), le carbohydrate est déprotégé en milieu basique pour donner le **PW205** avec un rendement de 43% soit un rendement global de 0.6 % à partir de l'intermédiaire **85** sur 9 étapes.




(a) **6c**, $Pd(PPh_3)_4$ - 5 mol%, CuI - 10 mol%, TEA/DCM (1/2), rt, 48h, ***92%***; (b) MsCl, TEA, DCM, rt, 1h, ***95%***; (c) $NaN_3$, DMF, rt, 12h, ***88%***; (d) **5-hexyn-1-ol**, TEA/DMF (1/7), rt, 24h, ***40%***; (e) **205**, $AgCO_3$, toluene, 85°C, 24h, ***30%***; (f) $H_2$, Pd/C, MeOH/AcOEt, ***75%***; (g) Formic acid - $H_2O$ (1/1, v/v), 2 days, rt, ***38%***; (h) $NH_2OH.HCl$, NaOH, EtOH, rt, 24h, ***56%***; (i) NaOMe, MeOH, 3h, rt, ***43%***.

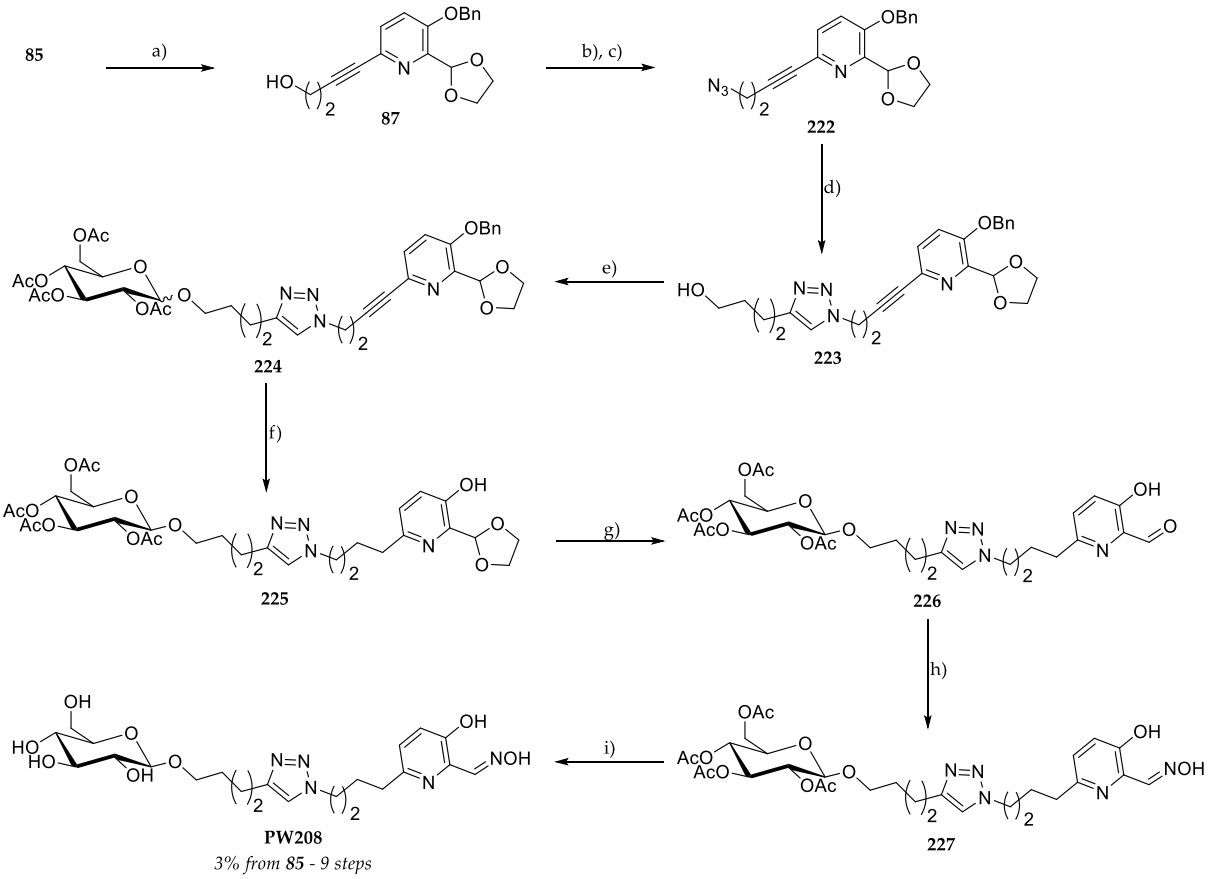
***Figure 212.*** *Synthèse du* ***PW205****.*

### III.2.3. Synthèse du PW208

La première synthèse réalisée par le Dr Pierre Warnault a permis d'obtenir le **PW208** sous la forme d'un mélange des deux anomères $\alpha$ (25%) et $\beta$ (75%). La reconnaissance par les récepteurs GLUT selon la configuration du carbone anomérique est un sujet controversé dans la littérature.[534–536] Bien que le récepteur GLUT3, reconnaissent aussi bien les anomères $\alpha$ et $\beta$, il semblerait que le GLUT1 ait une préférence pour l'anomère $\beta$. Avec comme objectif de faciliter les caractérisations mais aussi de ne pas biaiser les évaluations *in vivo*, l'anomère $\beta$ est désiré. La synthèse présentée a été modifiée (**Figure 213**).

Le greffage du premier bras espaceur est effectué par un couplage de Sonogashira du composé **85** avec le 3-butyn-1-ol (**6b**) pour donner l'intermédiaire **87** avec un rendement de 96% après purification en phase normale (contre 76% précédemment). L'alcool primaire **87** est activé sous la forme d'un mésylate puis une réaction de substitution nucléophile avec $NaN_3$ permet d'obtenir l'azoture **222** avec un rendement de 90%. La cyclisation de Huisgen permet à la fois la création du ligand triazole et

l'incorporation du 2ème bras espaceur. L'intermédiaire **223** est obtenu avec un rendement de 93% après purification en phase normale (contre 90% précédemment).




(a) **6b**, $Pd(PPh_3)_4$ - 5 mol%, CuI - 10 mol%, TEA/DCM (1/2), rt, 12h, ***96%***; (b) MsCl, TEA, DCM, rt, 2h, ***95%***; (c) $NaN_3$, DMF, 60°C, 12h, ***90%;*** (d) **5-hexyn-1-ol**, TEA/DMF (1/7), rt, 12h, ***93%;*** (e) **205**, $AgCO_3$, toluene, 75°C, 4h, ***61%***, α/β (1/1); (f) $H_2$, Pd/C, MeOH, ***61%***, α/β (57/43); (g) Formic acid - $H_2O$ (1/1, v/v), ***64%***, α/β (51/49); (h) $NH_2OH.HCl$, NaOAc, MeOH, rt, 12h, ***47%***, α/β (1/1) ; (i) NaOMe, MeOH, 4h, rt, then Amberlist 120H+, 1h, ***35%***, α/β (0/100).

***Figure 213.*** *Synthèse optimisée du* ***PW208***

La suite de la synthèse consiste à incorporer le motif glucopyranose, à déprotéger les fonctions aldéhyde et phénol de la partie réactivatrice, à générer l'oxime puis à déprotéger le motif glucopyranose. L'incorporation du sucre est réalisée par réaction de glycosylation de l'intermédiaire **223** sur l'intermédiaire **205** avec un rendement de 61%. Bien que ces conditions soient décrites pour favoriser la formation de l'anomère β de la molécule **224**, un mélange 1/1 $\alpha/\beta$ (déterminé par RMN) a été obtenu sans possibilité de les séparer. Ce manque de sélectivité peut être expliquer par le mécanisme de cette réaction. En effet, deux mécanismes peuvent entrer en compétition (**Figure 214**):

- L'addition avec assistance anchimérique en $C_2$, donnant l'anomère de configuration β ;
- L'addition axiale aux oxoniums, donnant l'anomère de configuration $\alpha$.

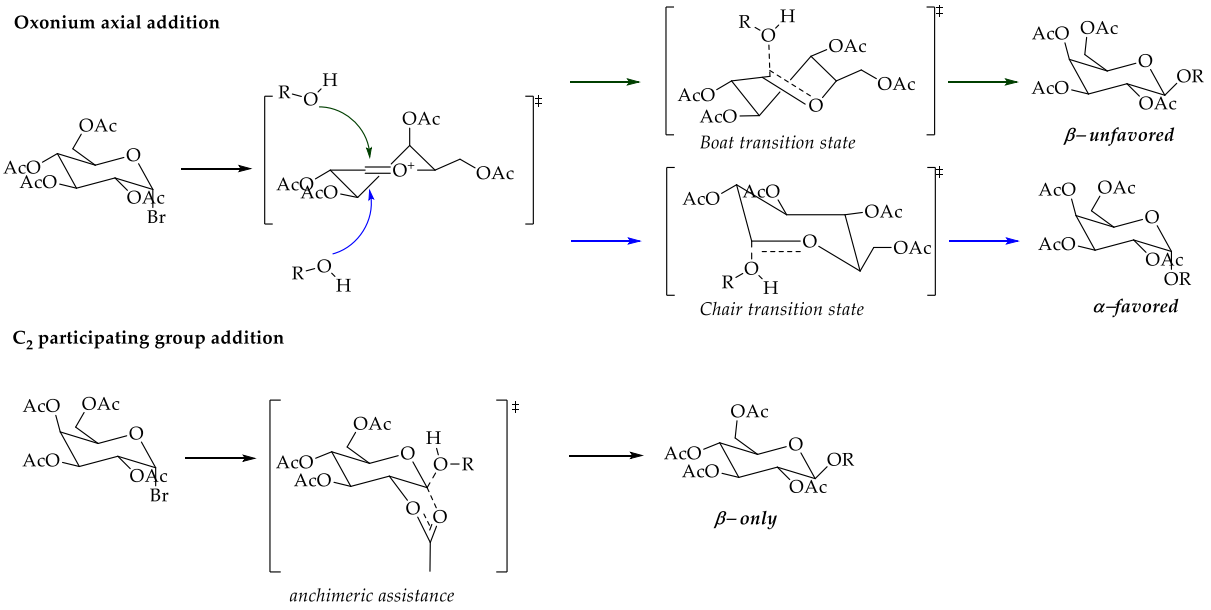



***Figure 214.*** *Mécanismes possibles de O-glycosylation*

Il sera donc nécessaire lors des resynthèses de cette molécule de changer de groupement activant (trichoroacétimidate ou trifluoroacétimidate) afin de limiter la formation de l'oxonium, et de mieux contrôler la configuration de ce carbone anomérique.

La molécule **224** a donc été utilisée comme mélange des deux isomères lors de l'hydrogénation catalytique permettant la réduction de l'alcyne en alcane et la O-débenzylation. Le produit obtenu **225** a été purifié par chromatographie en phase supercritique (SFC, colonne Princeton SFC-60A 2 Ethylpyridine 250*10mm*5 µm, pression = 120 bars, débit = 15 ml/min, isocratique : $CO_2$ + 10% MeOH, détection = 271 nm), cependant, la séparation des deux isomères n'a pu être réalisée et le produit **225** est obtenu en mélange $\alpha$/β 57/43 avec un rendement isolé de 61% (contre 66% précédemment avec une purification en phase normale). L'acétal est alors clivé dans des conditions acides pour obtenir l'aldéhyde déprotégé **226** avec un rendement de 64% et un ratio $\alpha$/β s'élevant à 51/49 (déterminé par RMN) contre 51% précédemment. Après génération de l'oxime **227** (47%), le glucopyranose est déprotégé et une purification en phase inverse (colonne = Thermo scientific Syncronis C18 250*21mm *5 µm, débit = 19 ml/min, isocratique = 80% eau: 20% $CH_3CN$, detection = 290 nm) permet l'obtention de 26 mg de **PW208** sous la forme β pure. L'autre fraction récupérée après purification correspond à l'isomère $\alpha$-glucopyranose en mélange avec la molécule déglycosylée.

Pour conclure, l'anomère β de **PW208** a été obtenu avec un rendement non-optimisé de 3% sur 9 étapes à partir du composé **85** et à hauteur de 26 mg (pureté HPLC de 95.9%). Le pouvoir rotatoire a été mesuré dans le méthanol et s'élève à $\mathbf{[\alpha]^{20}_D = -11.20°}$ (raie D du sodium, $\lambda$ = 589 nm).

## IV. Evaluations biologiques des réactivateurs incorporant un motif carbohydrate

### IV.1. Evaluations *in vitro* des PW094 et PW150

Concernant l'évaluation *in vitro* des **PW094** et **PW150**, nos collaborateurs de l'IRBA ont testé ces molécules pour la réactivation de l'AChE humaine inhibée par le NEMP (analogue du VX), le NIMP (analogue du sarin), le NEDPA (analogue du tabun) et le paraoxon. Les résultats préliminaires (détermination des $k_{obs}$ - **Figure 215**) montrent des capacités à réactiver très inférieures à celle du HI-6 et similaires à celles du 2-PAM. Les déterminations des constantes de cinétique $k_r$ et de second d'ordre $k_{r2}$ ainsi que la constante apparente de dissociation $K_D$ ont été réalisées pour **PW094** (**Tableau 75**). Ces données mettent en avant le manque d'affinité que présente ce type de réactivateurs pour l'enzyme inhibée. En effet, la molécule **PW094** est respectivement 17 fois moins et 51 fois moins affine que le 2-PAM et le HI-6 pour l'*h*AChE inhibée par le NEMP. Néanmoins, il est à noter que la vitesse de réactivation $k_r$ est 2,4 plus élevée que celle du 2-PAM. L'insertion envisagée du motif triazole dans le bras espaceur permettrait donc d'améliorer l'affinité pour l'enzyme inhibée.

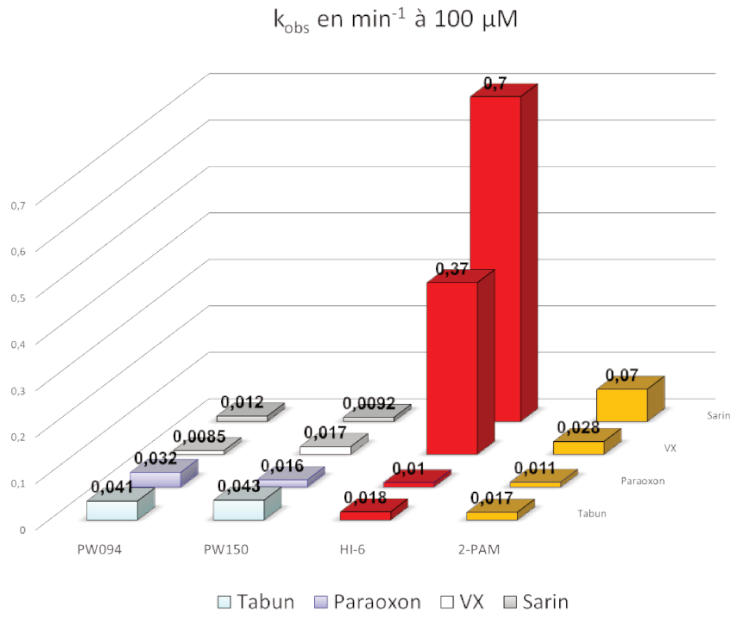



*Figure 215. détermination des constantes $k_{obs}$ de réactivation de la hAChE inhibée par 4 OPs. .*

| oximes | kr (min$^{-1}$) | $K_D$ (mM) | $k_{r2}$ (mM$^{-1}$.min$^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| **PW094** | **0,36** | **3,6** | **0,1** |
| **2-PAM** | **0,15** | **0,211** | **0,51** |
| **HI-6** | **0,65** | **0,07** | **9** |

*Tableau 75. Constantes de réactivation in vitro du réactivateur **PW094** pour l'hAChE inhibée par le NEMP*

### IV.2. Evaluations *in vitro* des PW205 et PW208

En accord avec les études d'amarrage moléculaire, l'insertion du motif triazole permet d'améliorer l'affinité envers l'enzyme inhibée (**Tableau 76**). En effet, les réactivateurs **PW205** et **PW208** sont

respectivement 2,4 et 2,11 fois plus affins que **PW094** envers l'*h*AChE inhibée par le NEMP (analogue du VX). Le gain le plus notable se retrouve au niveau de la constante de vitesse de réactivation de **PW208** (à l'exception du NIMP, analogue du sarin). Elle est jusqu'à 21 fois plus grande que celle du HI-6 pour l'hAChE inhibée par le NEDPA. L'efficacité globale de ces composés **PW205** et **PW208** reste cependant très inférieures à celle du HI-6 (excepté pour le NEDPA, analogue du Tabun) et similaire à celle du 2-PAM. Néanmoins, au vu des constantes de vitesse de réactivation obtenues pour **PW208**, il a été décidé de poursuivre son évaluation *in vivo* et notamment par les tests de protection sur la souris.

| ***NOPs*** | ***constantes*** | ***PW205*** | ***PW208*** | ***HI-6*** | ***2-PAM*** |
|---|---|---|---|---|---|
| NEDPA (tabun) | $k_r$ **(min$^{-1}$)** | 0,23 | **1,09** | **0,05** | 0,15 |
| Paraoxon | | 0,19 | **0,58** | **0,087** | 0,054 |
| NEMP (VX) | | 0,5 | **1,29** | **0,65** | 0,1 |
| NIMP (Sarin) | | 0,45 | **0,57** | **1,16** | 0,24 |
| NEDPA (tabun) | $K_D$ **(mM)** | 2,8 | 5,8 | 0,203 | 0,793 |
| Paraoxon | | 1,8 | 2,3 | 0,8 | 0,398 |
| NEMP (VX) | | 1,5 | 1,7 | 0,07 | 0,211 |
| NIMP (Sarin) | | 2,8 | 5,8 | 0,203 | 0,793 |
| NEDPA (tabun) | $k_{r2}$ **(mM$^{-1}$.min$^{-1}$)** | 0,08 | 0,19 | 0,2 | 0,2 |
| Paraoxon | | 0,1 | 0,25 | 0,1 | 0,14 |
| NEMP (VX) | | 0,34 | 0,73 | 9 | 0,51 |
| NIMP (Sarin) | | 0,16 | 0,31 | 13 | 1,18 |

***Tableau 76.*** *Constantes de réactivation in vitro des composés PW205 et PW208*

## IV.3. Evaluation *in vivo* du PW208

Etant donné la faible quantité obtenue mise à disposition de nos collaborateurs de l'IRBA, seul l'indice de protection sur la souris exposée au paraoxon a été évalué par le Dr Guilhem Calas (**Tableau 77**). Bien que préliminaires car menés sur une cohorte de 3 souris au lieu de 5, les résultats obtenus montrent des indices de protection supérieurs à 2 pour le Paraoxon et le NEMP (analogue du VX). Lors de l'utilisation du NIMP (analogue du sarin), l'indice de protection s'élève à 1.95 soit 1.8 fois supérieur à celui de la 2-PAM.

| **Traitement** | **Paraoxon** | **NEMP** | **NIMP** |
|---|---|---|---|
| aucun réactivateur | 1 | 1 | 1 |
| 2-PAM | 2,58 | 1,43 | 1,07 |
| HI-6 | 1,6 | 3 | 2,63 |
| Obidoxime | 3,79 | 2,27 | 2,85 |
| PW208 | ≥2 | ≥2,5 | 1,95 |

***Tableau 77.*** *Indice deprotection obtenus sur la souris intoxiquée par le paraoxon sans atropine*

Bien qu'inférieures aux capacités de protection du HI-6, les résultats obtenus avec **PW208** sont encourageants et valident le concept de ce type de réactivateurs possédant les motifs carbohydrate et

triazole. Cette molécule va être synthétisée à nouveau afin de finaliser les évaluations *in vivo*, mais aussi d'évaluer cette molécule *in vitro* sur des cellules endothéliales exprimant les transporteurs GLUT1 (collaboration avec le Pr Marie-Pierre Dehouck au Laboratoire de physiopathologie de la barrière hémato-encéphalique, EA 2465, Université d'Artois).

## V. Vers une version améliorée du PW208

### V.1. Conception *in silico*

Les données de réactivation *in vitro* obtenus pour les quatre composés **PW094, PW105, PW205** et **PW208** ont montré que la présence du noyau triazole n'est pas suffisant pour améliorer l'affinité de ces réactivateurs de manière drastique envers l'enzyme phosphylée et la proposition de remplacer le motif triazole par un noyau naphtalène ou quinoléine permettrait d'augmenter de manière significative cette affinité a été émise. En prenant en compte l'accès à ces molécules et en fonction des résultats des études d'amarrage moléculaire (*vide infra*), les structures **229** et **230** ont été envisagées (**Figure 216**).

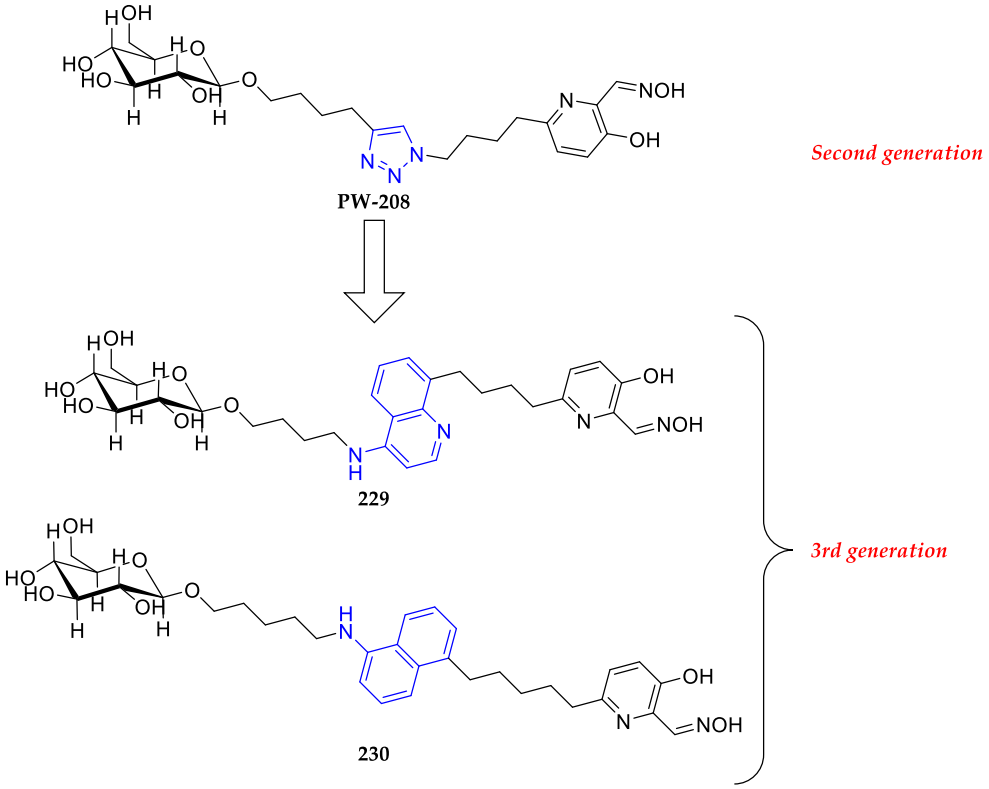



***Figure 216.*** *Structures des réactivateurs envisagés dans cette partie*

Les études de dockings valident ces deux molécules, grâce à l'apport d'interactions supplémentaires listées ci-dessous (**Figure 217**) :

- L'apport du noyau quinoléine permet un double π-stacking avec la Typ341 et le Trp286

- Le noyaux naphtalène, en plus des π-stacking avec la Typ341 et le Trp286, interagit selon ce même mode avec la Tyr124

Pour des raisons de temps et d'accès synthétique au noyau fonctionnalisé, seul l'accès synthétique de la molécule **230** a été étudié.

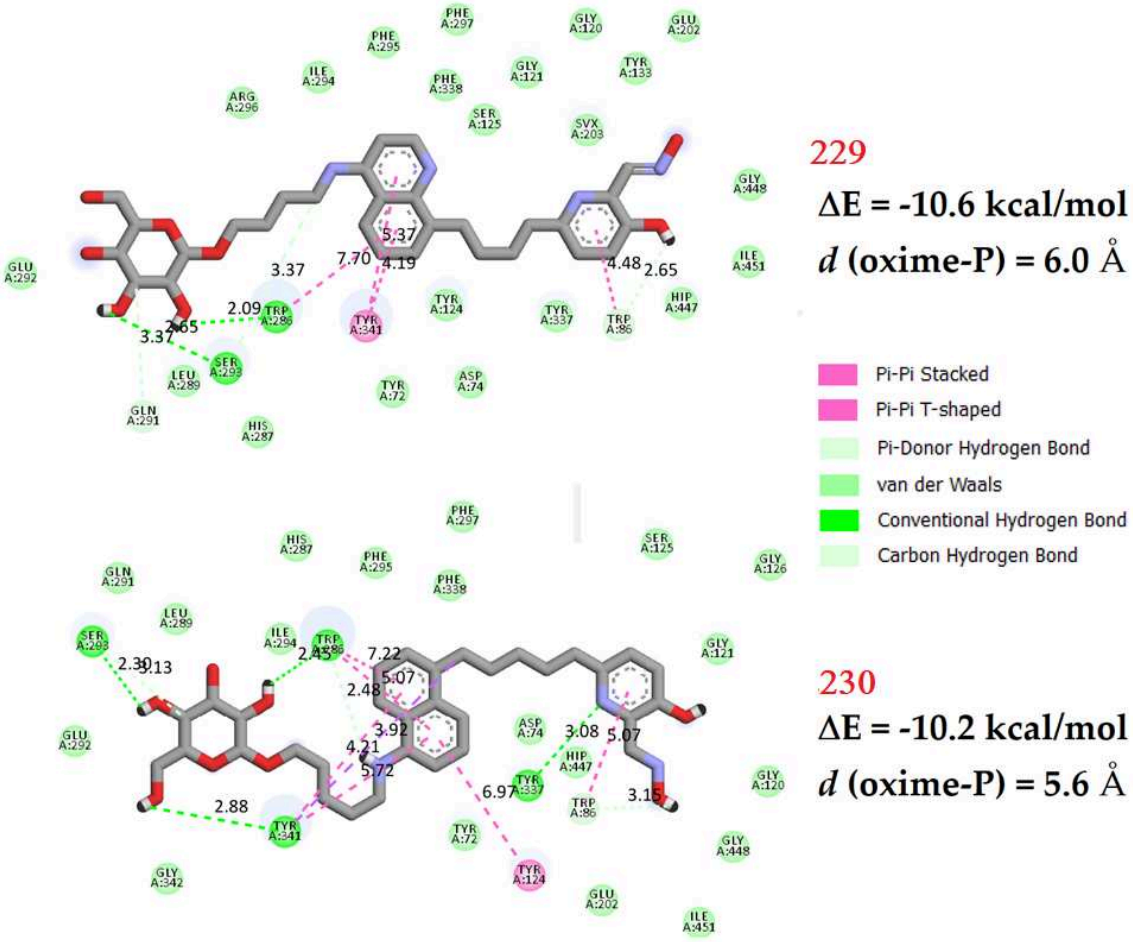



*Figure 217. Interactions entre les molécules **229** et **230** et la hAChE inhibée par le VX (visualisées sur Discovery Studio)*

## V.2. Synthèses de la molécule 230

### V.2.1. Analyse rétrosynthétique

La molécule **230** peut être obtenue à partir du fragment **A**, après déprotection de l'alcool primaire, O-glycosylation suivie d'une étape d'hydrogénation, d'une étape de déprotection de l'aldéhyde, de la formation de l'oxime et de la O-désacétylation du sucre (**Figure 218**).

L'obtention du fragment **A** peut être envisagée selon deux voies :

- A partir d'un couplage de Sonogashira entre la bromopyridine acétal **85** et du fragment **B1**, lui-même obtenu *via* un couplage de type Buchwald-Hartwig entre la 1-pent-4-ynamine avec le

bromonaphalène **C1**. Ce dernier pouvant être obtenu à partir du 1,5-diaminonaphtalène disponible commercialement (voie A) ;

- A partir d'un couplage de Sonogashira entre la bromopyridine acétal **85** et du fragment **B2** (préalablement réduit) ; lui-même obtenu *via* un couplage peptique entre l'acide 1-pen-4-ynoïque et l'aniline **C2**. Cette dernière pouvant être obtenue à partir du 1-nitro-naphtalène disponible commercialement (voie B).

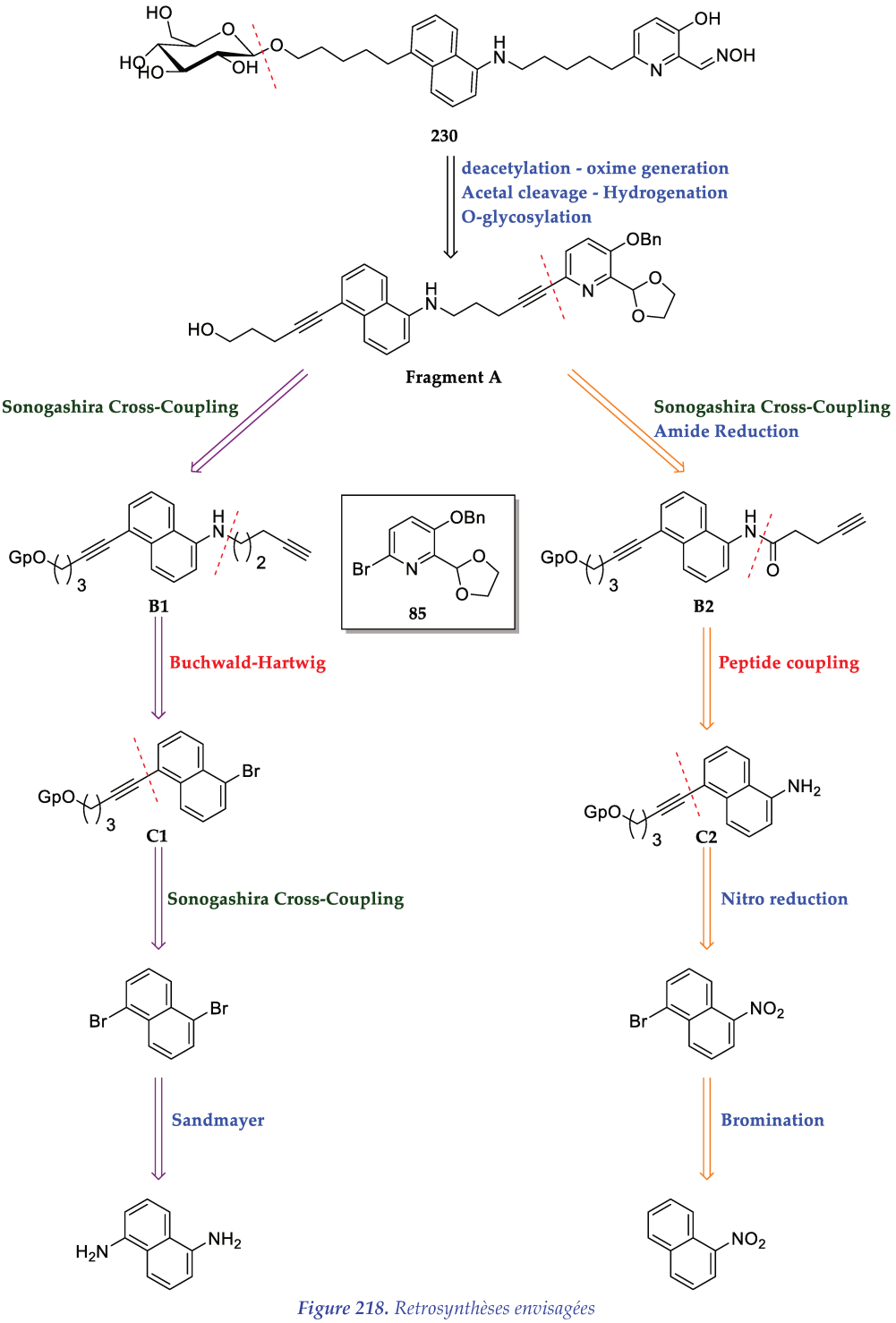
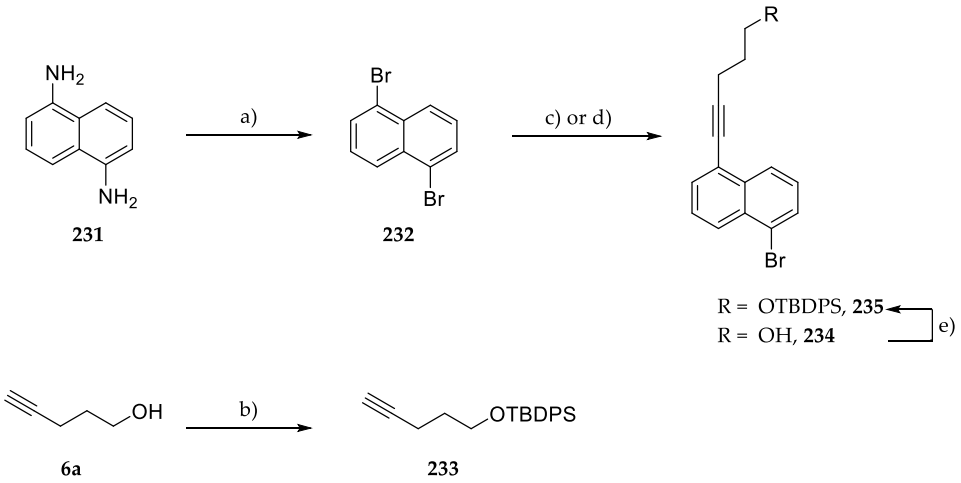



*Figure 218. Retrosynthèses envisagées*

### V.2.2. Voie A : couplage de Buchwald-Hartwig

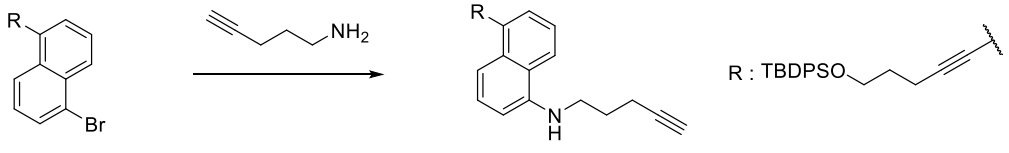
La synthèse débute par la conversion de la 1,5-diaminonaphtalène commercial **231** en 1,5-dibromonaphtalène **232** par la réaction de Sandmeyer (**Figure 219**). Cette réaction a été réalisée avec un rendement de 80% (contre 61% dans la littérature).[537] Ensuite le couplage de Sonogashira entre la molécule **232** et l'alcyne **233** permet l'obtention de la molécule **235** avec un rendement sur 3 étapes de 76%. À noter que pour faciliter la purification du produit de couplage, une voie alternative a été préférée, la molécule **232** est directement couplée avec l'alcool **6a** avec un rendement de 98%. La protection subséquente de l'intermédiaire **234** permet l'obtention de **235** de manière quantitative (soit 78% sur 3 étapes).



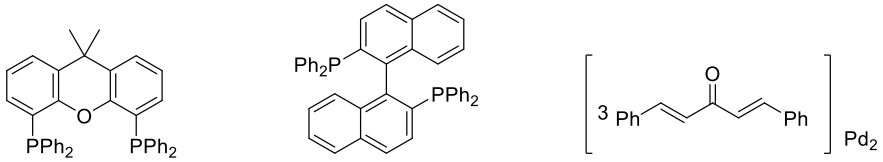

(a) $NaNO_2$, $H_2SO_4$, HBr, CuBr, $H_2O$, O°C, $H_2O$, then rt to 70°C, 3h, ***80%***; (b) TBDPSCl, imidazole, THF, rt, 12h, ***quant.***; (c) **233**, $Pd(PPh_3)_4$ 10%mol, CuI 5%mol, DCM/TEA (1/2), rt, 12h, ***95%***; (d) **6a**, $Pd(PPh_3)_4$ 10%mol, CuI 5%mol, DCM/TEA (1/2), rt, 12h, ***98%***; (e) **234**, TBDPSCl, imidazole, THF, rt, 12h, ***quant.***

***Figure 219.*** *Synthèse de l'intermédiaire 217*

Le couplage de Buchwald-Hartwig est l'étape clef de cette synthèse. Différentes conditions réactionnelles ont donc été testées aussi bien sur la molécule **217** que le bromonaphtalène (**Tableau 78**). Aucune des conditions testées n'a permis d'obtenir le produit attendu probablement dû à un manque de réactivité du cycle naphtyle mais aussi à la dégradation de l'amine. Cette voie de synthèse a donc été abandonnée.

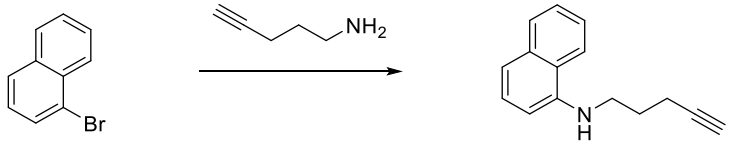



**235** **236**



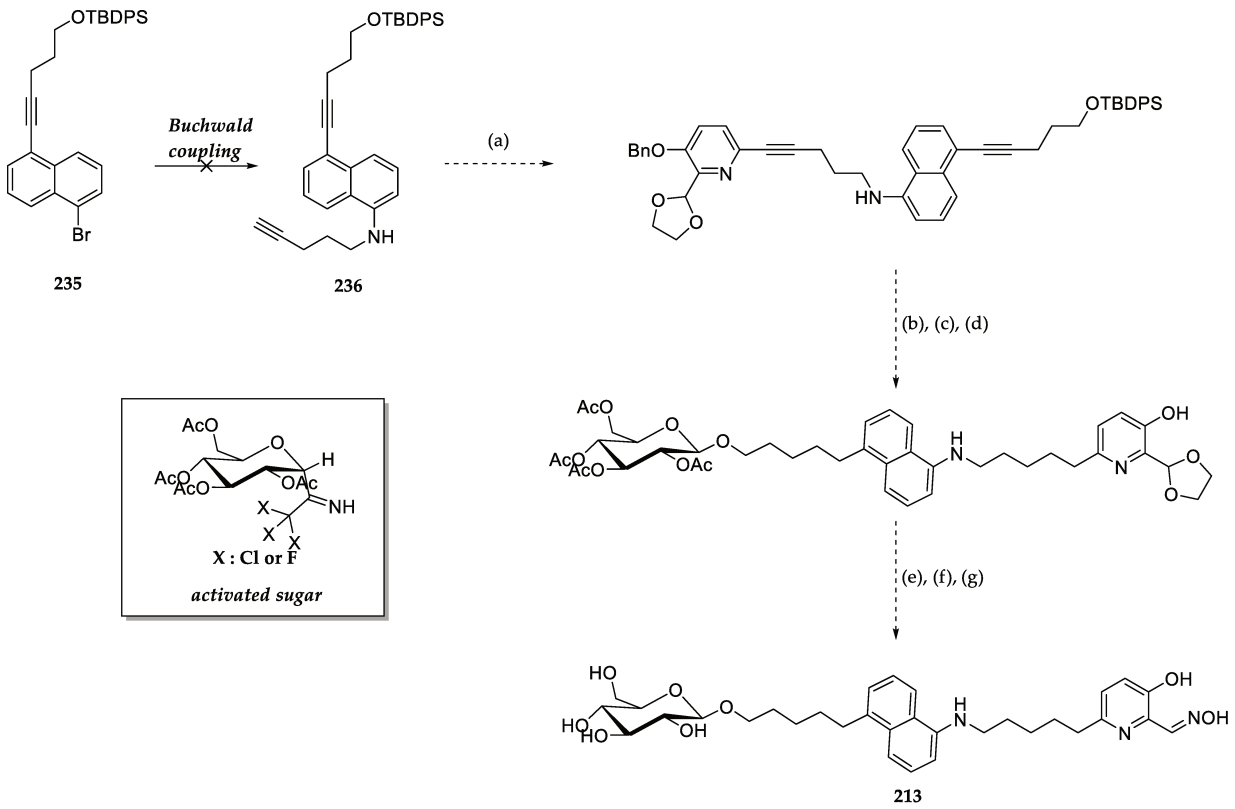

**Xantphos** **BINAP** **$Pd_2(dba)_3$**

| Entrée | Catalyseur | Ligand | Base | Condition | Resultats |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | $Pd_2(dba)_3$ -2%mol | Xantphos – 6%mol | CsCO3 – 2 equiv. | Dioxane, thermique 100°C | Ø |
| 2 | Pd2(dba)3 -2%mol | +/-Binap– 8%mol | CsCO3 – 2 equiv. | Dioxane, thermique 100°C | Ø |
| 3 | Pd2(dba)3 -2%mol | Xantphos – 6%mol | CsCO3 – 2 equiv. | Dioxane, thermique, 150°C | Ø |
| 4 | Pd2(dba)3 -2%mol | Xantphos – 6%mol | CsCO3 – 3 equiv. | Dioxane, MW, 150°C | Ø |




| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 5 | Pd2(dba)3 -5%mol | Xantphos – 10%mol | CsCO3 – 3 equiv. | Dioxane, thermique, 150°C | Ø |
| 6 | Pd2(dba)3 -4%mol | +/-Binap– 8%mol | CsCO3 – 2 equiv. | Dioxane, MW, 150°C | Ø |
| 7 | Pd2(dba)3 -4%mol | +/-Binap– 8%mol | CsCO3 – 2 equiv. | Dioxane, MW, 150°C | Ø |

***Tableau 78.*** *Conditions testées de couplage de Buchwald-Hartwig*

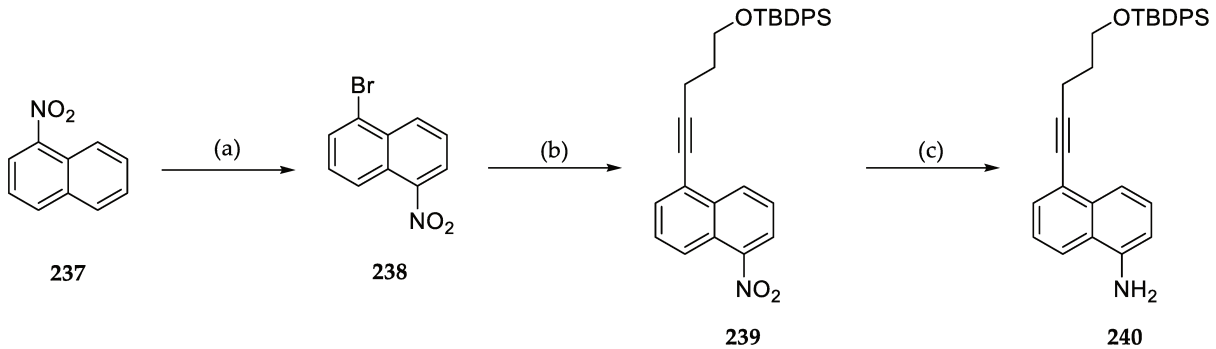



(a) **85,** CuI, $Pd(PPh_3)_4$, TEA, DCM; (b) TBAF, THF, 0°C, 30 min; (c) **activated sugar,** $BF_3.OEt_2$, DCM, 0°C; (d) $H_2$, Pd(C), MeOH, rt; (e) Formic acid/ $H_2O$; (f) $NH_2OH.HCl$, AcONa, MeOH; (g) NaOMe, MeOH then Amberlist $120H^+$.

*Figure 220. Fin de synthèse initialement envisagée*

### V.2.3. Voie B : couplage peptidique

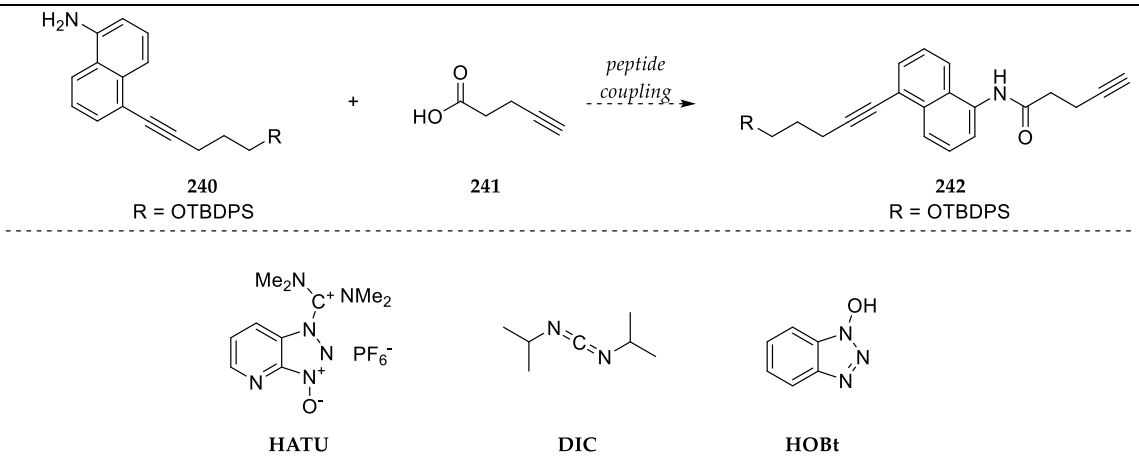
La synthèse commence par la bromation régiosélective du 1-nitronaphtalène **237** (75% - Figure 221). Après couplage de Sonogashira entre l'intermédiaire **238** et l'alcool protégé **236** réalisé avec un rendement de 95%, le groupement nitro est réduit en aniline **240** avec un rendement de 76%, soit un rendement de 54 % sur 3 étapes.




(a) $Br_2$, Fe, neat, *75%*; (b) **236**, CuI, $Pd(PPh_3)_4$,TEA/DCM (1/2), *95 %*; (c) Fe, AcOH, $NH_4Cl$, EtOH, *76%*.

*Figure 221. Synthèse de l'intermédiaire **240**.*

L'intermédiaire **240** a donc été mis en réaction avec l'acide **241** dans différentes conditions (**Tableau 79**). Malheureusement aucune de ces conditions testées n'a été productive. La synthèse de la molécule **230** a donc été abandonnée pour le moment.




| Entrée | Réactifs | conditions | Résultats |
|---|---|---|---|
| 1 | **241** (1.0 equiv.), DIC (1.1 equiv), HOBt (1.1 equiv), DIPEA (3 equiv) | DCM, 0°C -rt | Ø |
| 2 | **241** (1.0 equiv.), $POCl_3$ (1.1 equiv), TEA (3 equiv) | DCM, 0°C -rt | Ø |
| 3 | **241** (1.0 equiv.), $POCl_3$ (2 equiv), DIPEA (4 equiv) | DCM, 0°C -rt | Ø |
| 4 | **241** (1.0 equiv.), $SOCl_2$ (1.1 equiv), TEA (2.2 equiv) | DCM, 0°C -rt | Ø |
| 5 | **241** (1.0 equiv.), HATU (1.1 equiv), TEA (2.2 equiv) | THF, rt | Ø |
| 6 | **241** (1.0 equiv.), HATU (2 equiv), DIPEA (4 equiv), THF | THF, 60°C | Ø |

***Tableau 79.*** *Conditions de couplage peptidique testées*

## VI. Conclusion du chapitre 4

En conclusion, quatre nouveaux réactivateurs incorporant un motif carbohydrate ont été synthétisés par le Dr Pierre Warnaut et moi-même.

Le composé **PW208**, réactivateur de deuxième génération incorporant un motif β-glucopyranose, a été obtenu optiquement pur. L'anomère β a été obtenu avec un rendement global de 3% sur 12 étapes. Les indices de protection préliminaires prometteurs ont permis de valider ce concept de réactivateurs possédant un motif carbohydrate et la fonction réactivatrice 3-hydroxypyridine aldoxime. L'introduction d'un motif triazole a permis d'améliorer légèrement l'affinité envers l'enzyme phosphylée. Cependant, il est nécessaire de vérifier *in vitro* le passage actif de cette molécule au travers de la BHE notamment *via* les transporteurs GLUT1.

Concernant l'introduction du sucre, il est nécessaire de changer l'activation du glucopyranose afin d'obtenir le réactivateur sous la forme d'un seul anomère. Un premier test de O-glycosylation avec le 5-hexyn-1-ol et du trichloroacétimidate **244** a permis l'obtention du produit glycosylé β **245** uniquement (**Figure 222**).[538] Cependant, ce test nécessite une validation avant implémentation dans la synthèse.

Aussi, du fait que la déprotection de l'acétal se fait en milieux acide, il y a un risque que le carbone anomérique se racémise et ce risque est à prendre en compte dans l'effort synthétique.

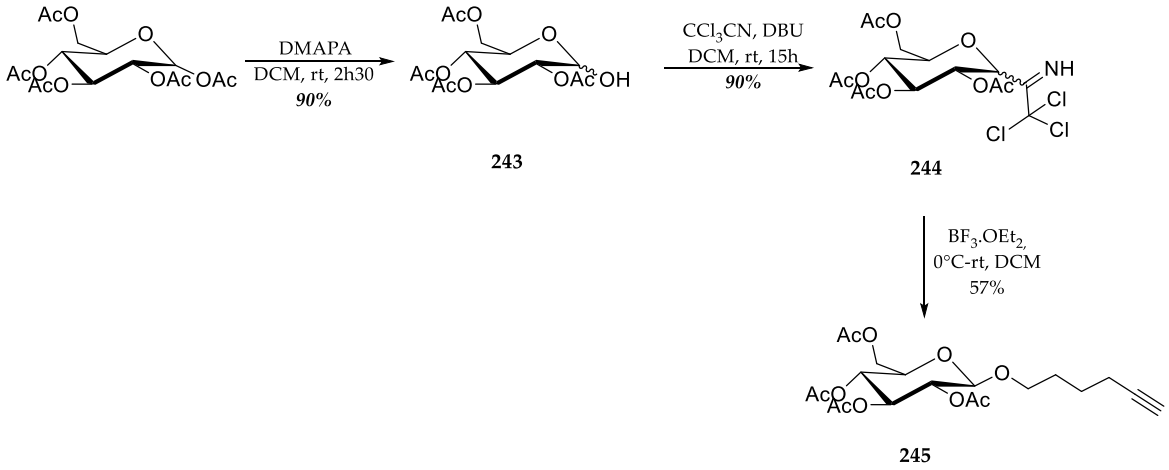



*Figure 222. O-glycosylation testée*

L'élaboration de réactivateur de 3ème génération avec une quinoléine ou un naphtalène en remplacement du noyau triazole en vue d'augmenter l'affinité envers l'enzyme inhibée a donné des résultats encourageants *in silico*. Cependant l'accès synthétique à la molécule **230** a été un échec. Plusieurs possibilités s'offrent à nous :

- Ôter l'amine secondaire du cycle naphtalène qui pourrait simplifier la synthèse et obtenir l'intermédiaire suivant (Y : O, CH - **Figure 223**)

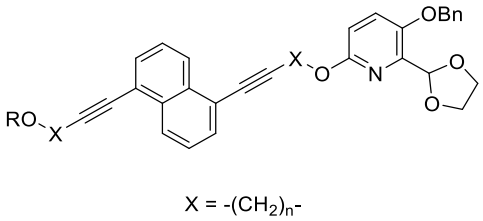
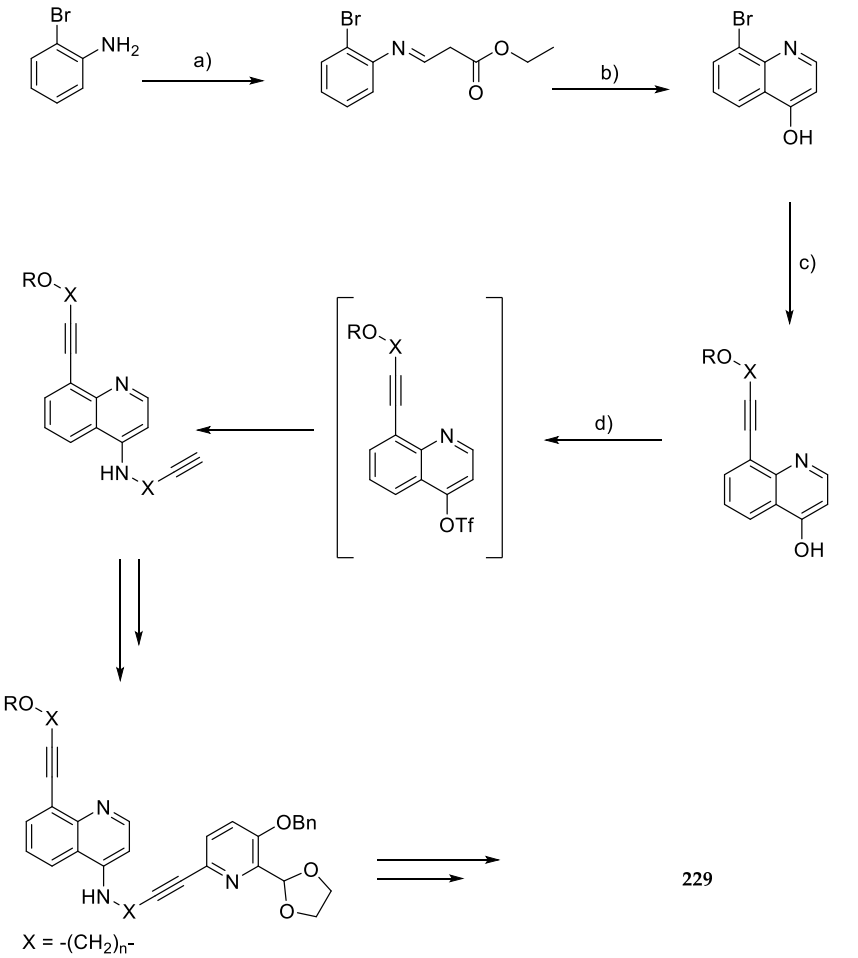



*Figure 223. Intermédiaire incorporant le naphtalène*

- Repartir sur le noyau quinoléine et tenter à nouveau un couplage de type Buchwald-Hartwig (**Figure 224**).[539,540]




(a) Ethyl 3,3-diethoxypropionate, TsOH, 93 °C, 150-210 min, 85%; (b) biphenyl oxide, 230°C, 150 min, 88%; (c) **85,** $Pd(PPh_3)_4$, CuI, TEA/DCM, rt; (d)$Tf_2O$, $Pd_2(dba)_3$, Xantphos, dioxane.

***Figure 224.*** *Voie de synthèse possible de la molécule* ***229***

Ces travaux vont être poursuivis au sein du laboratoire.

# CHAPITRE 5 : DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES FONCTIONS REACTIVATRICES NON CHARGEES

## I. Introduction

Les 3-hydroxypyridinaldoximes, bien que très efficaces, comportent un inconvénient : la fonction réactivatrice est bloquée par le Trp86 *via* un π-stacking, diminuant ainsi la mobilité de la molécule et positionnant l'oxime un peu plus bas que la serine phosphorylée (cf. figure de docking chapitre 3). Par ailleurs, la structure de cette fonction réactivatrice reste assez encombrante, ce qui peut limiter son efficacité de réactivation pour les groupements phosphyles encombrants comme pour le tabun.

L'idée d'utiliser une autre fonction réactivatrice au sein du laboratoire n'est pas nouvelle. En effet, le Dr Julien Renou a tenté d'élaborer des analogues de la MINA : le thio-méthyl-α-oxime et le 2-hydroxyimino acétamide (**Figure 225**).[541] Malheureusement, la synthèse n'a pas abouti concernant le thio-méthyl-α-oxime et les tests de réactivation sur le 2-hydroxyimino acétamide ne montrent aucune capacité à réactiver l'enzyme inhibée.

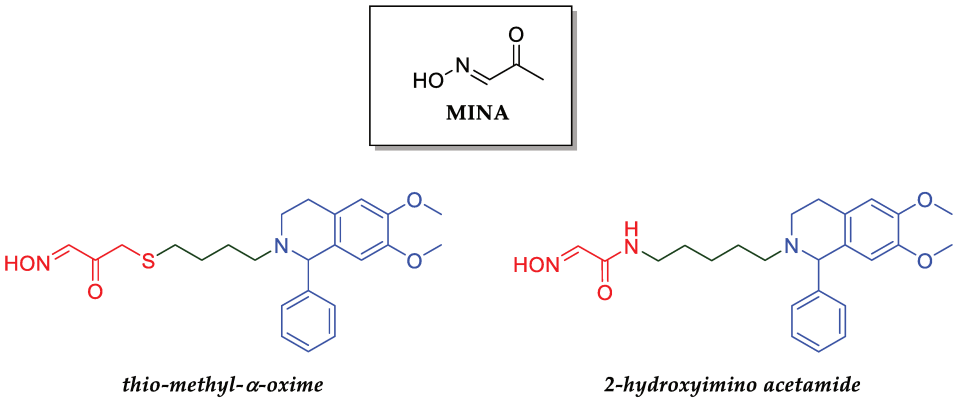



***Figure 225.*** *Nouvelles fonctions réactivatrices étudiées par le Dr Julien Renou*

La littérature de 1970 à 1986[244–249] ainsi que les travaux plus récents de Ribeiro et coll (2012-2013),[472,473] regorgent d'exemples de fonctions réactivatrices hétérocycliques autres que les imidazoles et amidines oximes (**Figure 226**). Ces fonctions réactivatrices sont véritablement sous-exploitées et, malgré des capacités de réactivation intéressantes, le manque d'affinité des réactivateurs synthétisés pour l'enzyme phosphylée les ont fait tomber dans l'oubli. Comme illustré dans les chapitres précédents, l'ajout d'un ligand du site périphérique permet véritablement d'améliorer l'affinité et, *in fine*, l'efficacité globale de ces molécules, d'où l'idée de reprendre les fonctions les plus intéressantes et d'étudier l'effet des modifications structurales sur les capacités de réactivation.

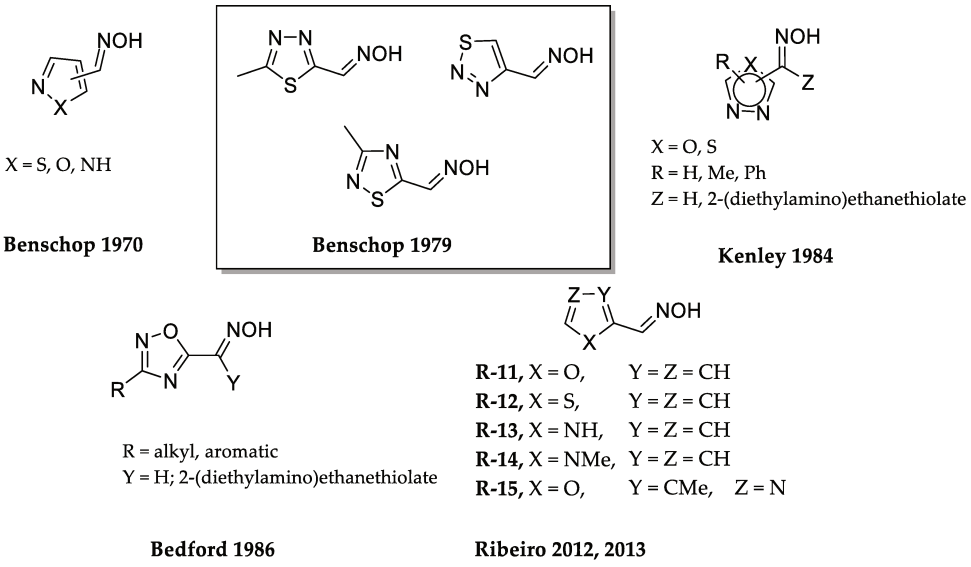



*Figure 226. Structures d'hétérocycles oximes proposées comme fonctions réactivatrices dans la littérature*

Parmi ces fonctions réactivatrices, les 1,2,3-, 1,2,4- et 1,3,4-thiadiazoles-5-aldoximes de Benschop ont attiré notre attention.[244,247] En effet, le cycle thiadiazole est plus petit que celui de la pyridine, ce qui pourrait permettre une meilleure mobilité au sein du site actif par un encombrement stérique moins important. Aussi, la présence du soufre permet d'augmenter considérablement la lipophile de ces molécules. En outre, le p*K*a de l'oxime est voisin de 7. A noter que ce motif thiadiazole est fréquemment rencontré dans des molécules actives au niveau du SNC notamment en tant qu'anticonvulsif et antidépresseur (inhibiteur des récepteurs GABA, cholinergiques, NMDA).[542–547] Ce noyaux permettrait donc une action complète sur l'ensemble des récepteurs biologiques déréglés suite à l'inhibition de l'AChE (**Chapitre 1**). Enfin, un accès synthétique plus simple à la fonction réactivatrice est désirable (produit de départ peu cher, nombre d'étapes réactionnelles limités).

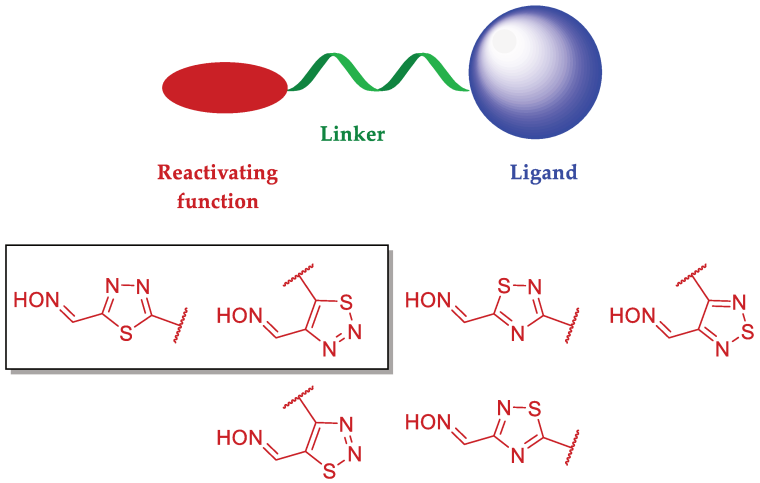
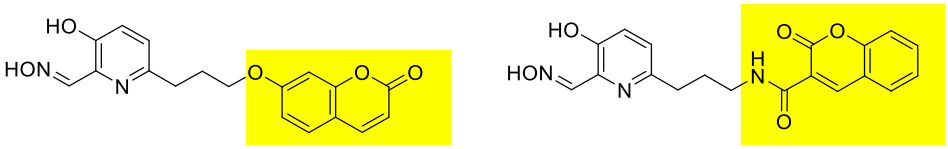



*Figure 227. Structures de fonctions réactivatrices possibles dérivées du thiadiazole (encadrées en noir, les fonctions étudiées dans ce chapitre)*

Parallèlement, le laboratoire recherche activement des moyens de suivre le phénomène de réactivation, notamment par fluorescence. Dans ce cadre, la synthèse d'un réactivateur incorporant une coumarine, motif largement employé dans le cadre des recherches sur la maladie d'Alzheimer,[548] a été étudiée

(**Figure 228**).[541] Malheureusement, le manque de solubilité dans les conditions de réactivation n'a pas permis une évaluation de cette molécule.




*no reactivation*
*due to low hydrosolubility*

***Figure 228.*** *Réactivateurs fluorescents étudiés par le Dr Julien Renou*

En outre, utilisé comme ligand du site périphérique, et peu sujet à des modifications de leurs propriétés physico-chimiques par l'environnement, peu de variations de fluorescence des motifs coumariniques sont attendues lors de la réactivation, le motif n'intervenant pas directement dans la réaction. Ainsi, il serait préférable de développer une fonction réactivatrice pour laquelle les modifications chimiques se traduiront par une variation de la fluorescence. Les naphtyles oximes pourraient permettre ce suivi (**Figure 229**).

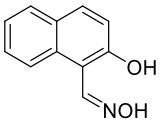



***Figure 229.*** *Structure du 2-hydroxy-1-naphthaldehyde oxime*

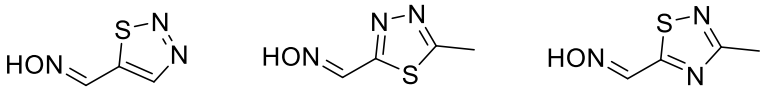
Cette partie sera donc scindée en deux avec comme objectifs respectifs, la synthèse de nouveaux réactivateurs tripartite incorporant des $\alpha$-thiadiazoles aldoximes en tant que fonction réactivatrice et la synthèse d'une oxime dérivée du naphtalène pour application en fluorescence. Pour ce dernier point, l'évaluation du potentiel de réactivation que nous avons observé nous pousseront à remettent les concepts de base de la réactivation en question.

## II. Les thiadiazoles aldoximes

### II.1. Conception *in silico*

Benschop et coll. a rapporté trois thiadiazoles oximes (**Figure 230**) :[247]

- Le 1,2,3-thiadiazole-5-aldoxime (**247**) ;
- Le 5-methyl-1,3,4-thiadiazole-2-aldoxime (**248**) ;
- Le 3-methyl-1,2,4-thiadiazole-5-aldoxime (**249**).




**247** **248** **249**

***Figure 230.*** *Structures des thiadiazoles aldoximes*

Les caractéristiques de ces trois réactivateurs ont été décrites et sont résumées dans le **Tableau 80**.[247] Les p*K*a des molécules **247** à **249** correspondent à la gamme recherchée (7 à 8). Aussi le logP est fortement augmenté en comparaison à celui du 2-PAM, et à moindre mesure, la MINA. Aussi, ces molécules sont capables de réactiver l'*h*AChE inhibée par le sarin. En l'absence des constantes de cinétique ($k_r$, $K_D$ et $k_{r2}$), il est nécessaire de s'appuyer sur leur capacité d'inhibition de l'*h*AChE native. Le manque d'affinité se traduit par un faible pourcentage d'inhibition. Enfin, leur utilisation en combinaison avec l'atropine permet d'obtenir des ratios thérapeutiques ($\frac{LD_{50}\ (sarin)}{LD_{50}\ (sarin+atropine+oxime)}$) élevés comparés au 2-PAM faisant de ces molécules des motifs d'intérêt. A noter que ces motifs présentent des toxicités extrêmement faibles et une biodisponibilité intéressante.

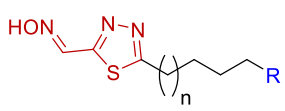
| Oximes | pKa | Log P | %React max (%) in vitro | % hAChE inhibée à 80 µM in vitro | $LD_{50}$ (ip, mg/kg) | Ratio thérapeutique sur la souris | $t_{½}$ souris (min) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **247** | 7.64 | 0.66 | 32 | <5 | 1 250 -1 500 | 5.0 | 9.5 |
| **248** | 8.40 | 0.74 | 16 | <5 | > 1 000 | 4.2 | 10.4 |
| **249** | 6.97 | 0.72 | 82 | <5 | > 1 000 | 5.6 | 7.0 |
| MINA | 8.30 | 0.34 | 74 | <5 | - | - | - |
| 2-PAM (MsO-) | 7.85 | -3.24 | 45 | 12 | - | 3.3 | - |

***Tableau 80.*** *Données in vitro et in vivo rapportés par Benschop et coll.*

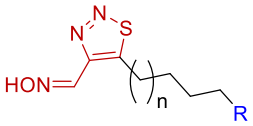
Etant donné le potentiel de ces molécules, le remplacement de la fonction 3-hydroxypyridine aldoxime par ces fonctions a donc été envisagé. Cependant, pour des raisons d'accès synthétiques évidents, seuls les dérivés des molécules **247** et **248** ont fait l'objet de mon attention.

Afin de pouvoir comparer avec nos réactivateurs 3-hydroxy pyridine 2-aldoxime, trois ligands ont été sélectionnés (**Figure 231**):

- La morpholine, à l'image des RM048 et JR595 (**250, 251**, **254**)
- La PIQ, à l'image du GM113 (**253**, **256**)
- La *N*-benzylpipérazine à l'image de l'AB-153 (**252**, **255**)




**250**, n = 1, R = morpholine
**251**, n = 2, R = morpholine
**252**, n = 1, R = N-Benzyl piperazine
**253**, n = 1, R = PIQ




**254**, n = 1, R = morpholine
**255**, n = 1, R = N-Benzyl piperazine
**256**, n = 1, R = PIQ

***Figure 231.*** *Structures des molécules étudiées dans cette partie*

Les différentes structures ont fait l'objet d'études d'amarrage moléculaire en statique et en flexible sur la *m*AChE inhibée par le VX.

Le premier paramètre à prendre en considération est la longueur de la chaîne du bras espaceur **(Figure 232**). En docking flexible, dans le cas du bras espaceur à 5 chaînons, la longueur est trop importante provoquant, certes, des interactions intéressantes avec le Trp86, mais ces interactions placent l'oxime trop bas par rapport à la serine phosphorylée (6.2 Å). Aussi, le ligand du site périphérique interagit essentiellement par des liaisons hydrogènes, aucun π-stacking n'est observé. *A contrario*, dans le cas de la molécule à 4 chaînons, le ligand prend toute son importance : la morpholine est idéalement placée afin de permettre une interaction de type π-cation tandis que le noyau thiadiazole est idéalement placé et présente une distance entre l'oxime et phosphore très faible (3.8 Å). Cette observation est valable pour les autres ligands, la longueur de chaîne idéale semble être de 4 unités méthylène.

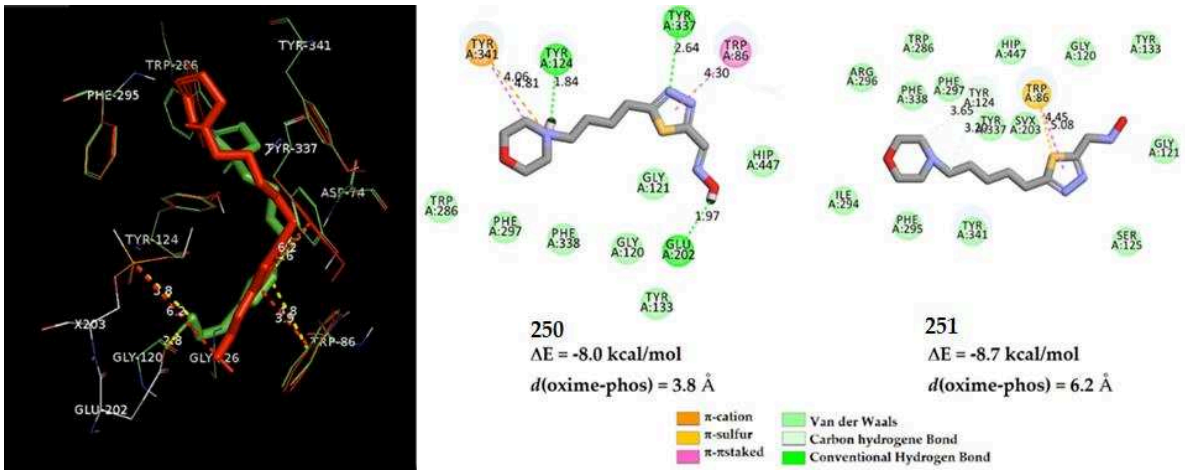



***Figure 232.*** *Superposition des conformations proposées des réactivateurs* ***250*** *en vert et* ***251*** *en rouge (gauche, docking flexible - visualisé sur Pymol version 2.0.7) – Interactions des conformations prédominantes dans la mAChE inhibée par le VX (droite – docking statique – visualisé sur Discovery Studio 17.2.0.16349).*

Concernant les deux régioisomères du thiadiazole, le régioisomère 1,2,3-thiadiazole-5-aldoxime pourrait être moins efficace du fait de l'encombrement inhérent à la position du reste de la molécule vis-à-vis de l'oxime (**Figure 233**).

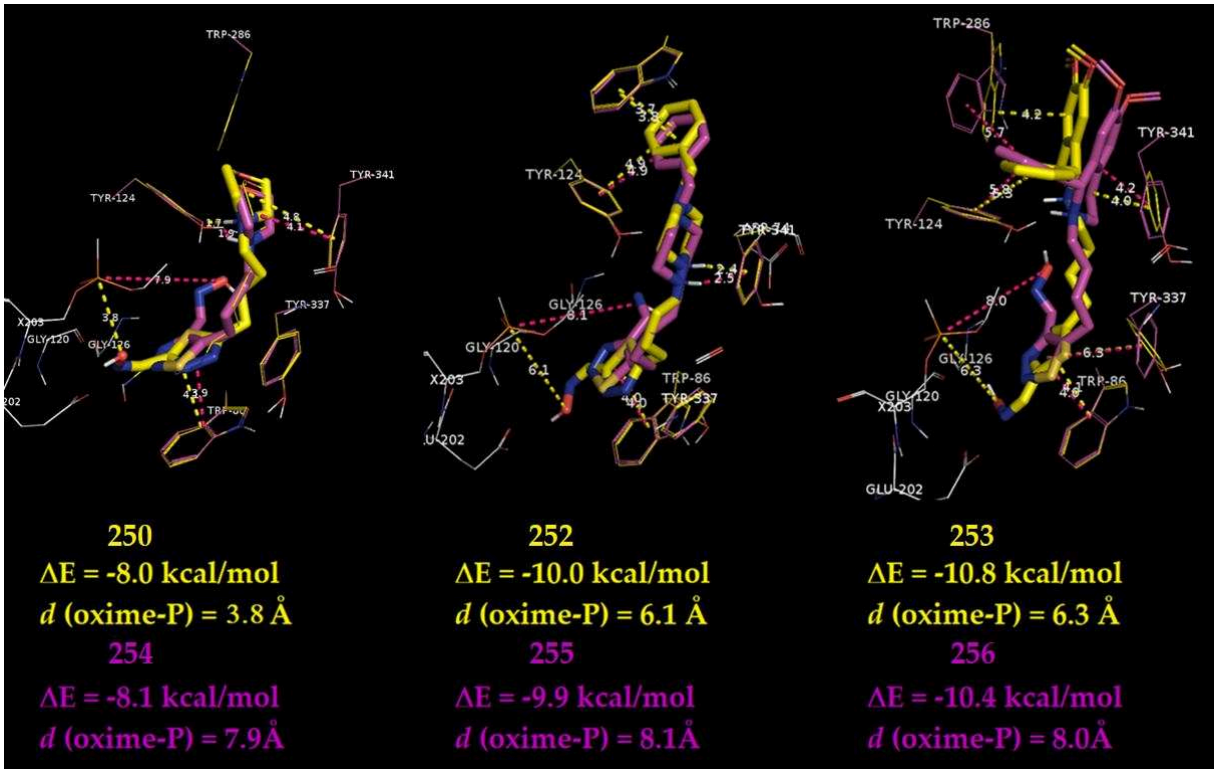



***Figure 233.*** *Superposition des conformations proposées des réactivateurs* ***250****,* ***252*** *à* ***256*** *(Docking flexible - visualisé sur Pymol version 2.0.7) dans la mAChE inhibée par le VX.*

À la vue de ces résultats encourageants, les paramètres physicochimiques ont été simulés en utilisant Chemicalize.com (ChemAxon - https://chemicalize.com - **Tableau 81**). Mis à part les dérivés de la PIQ, toutes ces molécules semblent susceptibles de traverser la BHE.

| Oximes | MW (g/mol) | pKa amine | RB | HBA | HDB | Log P | Log D | PSA (Å²) | MPO score |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **250** | 270.35 | 7.14 | 6 | 6 | 1 | -0.19 | -0.41 | 70.84 | 5.75 |
| **251** | 284.38 | 7.65 | 7 | 6 | 1 | 0.02 | -0.05 | 70.84 | 5.75 |
| **252** | 359.49 | 8.0 (N-Bn)<br>2.10 (N-alkyl) | 8 | 6 | 1 | 1.28 | 1.26 | 64.85 | 5.75 |
| **253** | 452.57 | 8.04 | 9 | 7 | 1 | 2.94 | 2.92 | 80.07 | 4.61 |
| **254** | 270.35 | 7.15 | 6 | 6 | 1 | 1.42 | 1.25 | 70.84 | 5.75 |
| **255** | 359.49 | 8.1 (N-Bn)<br>2.01 (N alkyl) | 8 | 6 | 1 | 2.57 | 2.62 | 64.85 | 5.44 |
| **256** | 452.57 | 8.05 | 9 | 7 | 1 | 4.25 | 4.28 | 80.07 | 3.44 |
| **Max CNS+** | 450 | 10 | 8 | 7 | 3 | 5 | 2 | 70.00 | ≥ 4 |

***Tableau 81.*** *Propriétés physicochimiques simulées par Chemicalize et scores MPO calculés*

La synthèse des molécules **250** à **254** a donc été étudiée. La voie de synthèse de la molécule **254** a par ailleurs été évaluée par Loïc Chêne, stagiaire M2 que j'ai co-encadré au sein du laboratoire.

## II.2. Synthèse du 1,2,3-thiadiazole aldoxime incorporant une morpholine - 254

### II.2.1. Rétrosynthèse

Comme dit précédemment, les résultats de cette partie ont été obtenus par Loïc Chêne, stagiaire M2 que j'ai pu encadrer. La rétrosynthèse que nous avons élaborée est détaillée dans la **Figure 234**. Le greffage de la morpholine et la génération de l'oxime se font en fin de synthèse à partir du fragment **A**. Celui-ci est obtenu par la synthèse de Hurd-Mori : la semicarbazone est générée *in situ* à partir du fragment **B** et du semicarbazide, puis cyclisé en présence de chlorure de thionyle. Le fragment **B** est issu de la C-alkylation de l'énolate provenant du méthyl acétoacétate et du bromo-alkyle correspondant (fragment **C**). Ce dernier fragment est issu de la simple ouverture du THF. Par manque de temps, seule la synthèse du fragment **A** a été réalisée. Cependant, étant donnée la simplicité de la synthèse, celle-ci mériterait d'être reprise par mes successeurs.

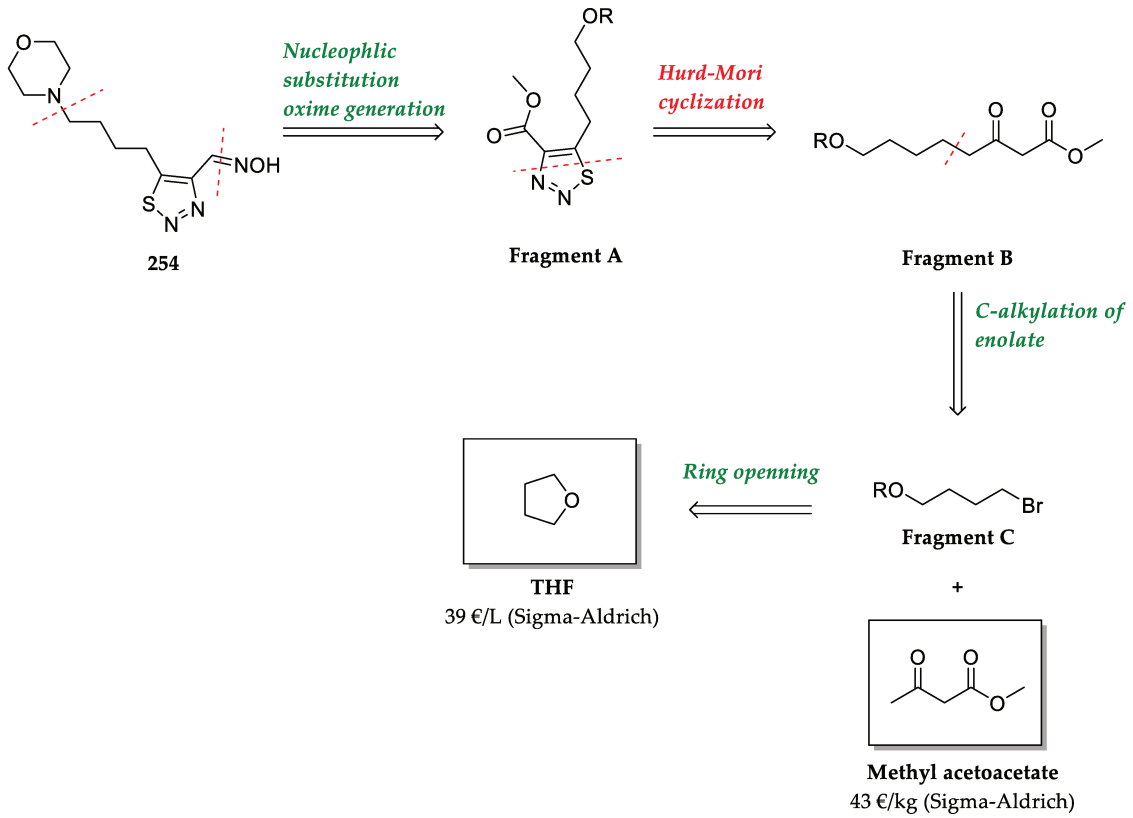
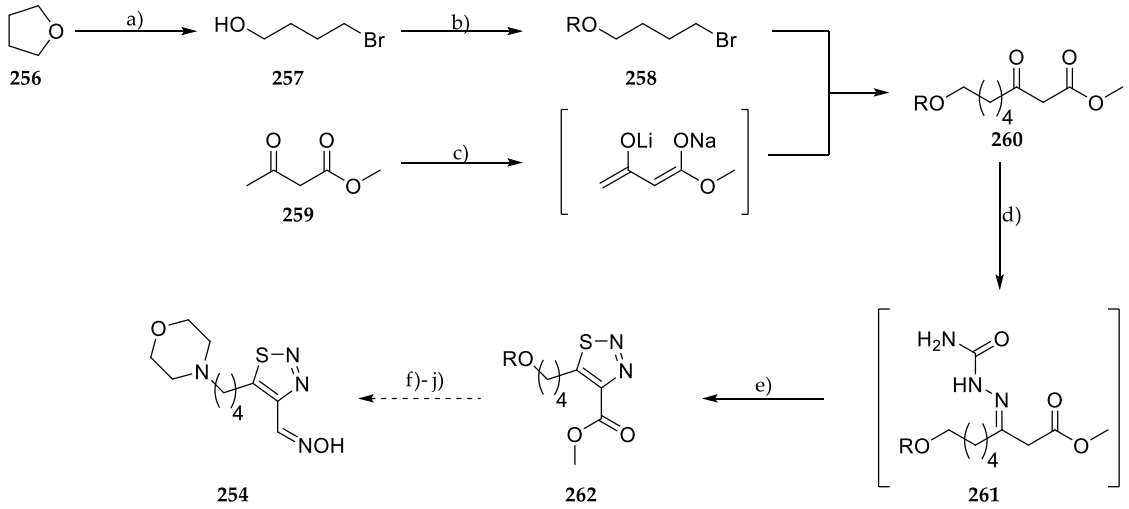



*Figure 234. Rétrosynthèse de la molécule 236*

### II.2.2. Synthèse du fragment A

Le fragment **A** a été obtenu à partir du THF en 5 étapes avec un rendement non-optimisé de 5% (**Figure 235**). La première étape consiste en l'ouverture du THF pour former le 1-bromobutanol **257** avec un rendement de 30%.[549] L'alcool primaire est alors protégé quantitativement sur forme d'éther silylé **258**. Après déprotonation du dérivé β-carbonylé **259**, le di-anion obtenu est condensé sur le dérivé bromé **258** pour obtenir la molécule **260** avec un rendement de 45% après purification.[550] L'addition du semicarbazide sur la cétone du composé **260** permet la formation de la semicarbazone **261**. Le chlorure de thionyle permet alors, par réaction de Hurt-Mori, la formation du 1,2,3-thiadiazole **262**, isolé avec un rendement non-optimisé de 38%.[551] Par manque de temps, la synthèse n'a pas été finalisée.




(a) HBr, $H_2SO_4$, ***30%***; (b) TBDPSCl, imidazole, THF, 12h, ***99%;*** (c) NaH, *n*-BuLi, 0°C, then **258, *45%;*** (d) Semicarbazide, pyridine, MeOH/$H_2O$, 65°C, 5 min, then -20°C, 12h; (e) $SOCl_2$, 0°C, 1h, 38% over 2 steps; (f) TBAF, THF, 0°C, 30 min; (g) TsCl, TEA, DCM, rt, 12h; (h) morpholine, $K_2CO_3$, ACN, reflux; (i) DIBAL-H, DCM, -78°C; (j) $NH_2OH.HCl$, AcONa, MeOH, rt.

***Figure 235.*** *Synthèse de la molécules* ***262****, précurseur avancé du réactivateur* ***254***

## II.3. Synthèses des 1,3,4-thiadiazole aldoximes 250 à 253

### II.3.1. Rétrosynthèses

Deux voies rétrosynthétiques ont été envisagées pour l'accès à ces nouveaux réactivateurs (**Figure 236**).

La voie A (en bleu) a été élaborée par analogie avec la synthèse des 3-hydroxypyridinaldoxime. L'oxime est générée en fin de synthèse après hydrogénation et réduction de l'ester en aldéhyde du fragment **A.** Ce fragment est obtenu par couplage palladocatalysé de Sonogashira entre le fragment **B** et l'alcyne appropriée (**6a** ou **6b**). Le fragment bromé **B** est issu de la réaction de Sandmeyer sur le fragment **C**. Enfin, ce dernier est généré par cyclisation intramoléculaire de la thiosemicarbazone générée *in situ*. Bien que peu adaptée à la présence d'un atome de soufre, comme nous le verrons dans la suite (empoisonnement des catalyseurs à base de métaux de transition), cette voie permettrait l'obtention des réactivateurs en 8 étapes à partir du thiosemicarbazide (37€ les 100g – Sigma-Aldrich) et de l'éthyle chloro oxalate (91€ les 100g – Sigma-Aldrich).

*A contrario*, la voie **B** (en vert), la synthèse a été developpée de manière à éviter toute utilisation de métaux de transition. L'aldéhyde est issu de l'oxydation de l'alcool déprotégé (R = Me, Bn) ou par réduction de l'ester en alcool (R = $CO_2Me$) généré à partir du fragment **A'**. Ce dernier est obtenu par cyclisation de l'acylhydrazide non-symétrique (**B'**). Cet acylhydrazide est issu du couplage entre l'acide carboxylique et acide hydrazide **C'**, ce dernier étant synthétisé par condensation entre l'ester éthylique (**D'**) et l'hydrazine. Enfin, l'ester éthylique substitué est obtenu par simple substitution nucléophile. Cette méthodologie permettrait l'obtention des réactivateur en 7 étapes avec l'avantage d'utiliser des

réactions chimiques plus classiques à partir de réactifs abordables, d'introduire l'amine en début de synthèse et de générer l'hétérocycle en fin de synthèse, évitant toutes réactions parasites liées à la réactivité de ce dernier.

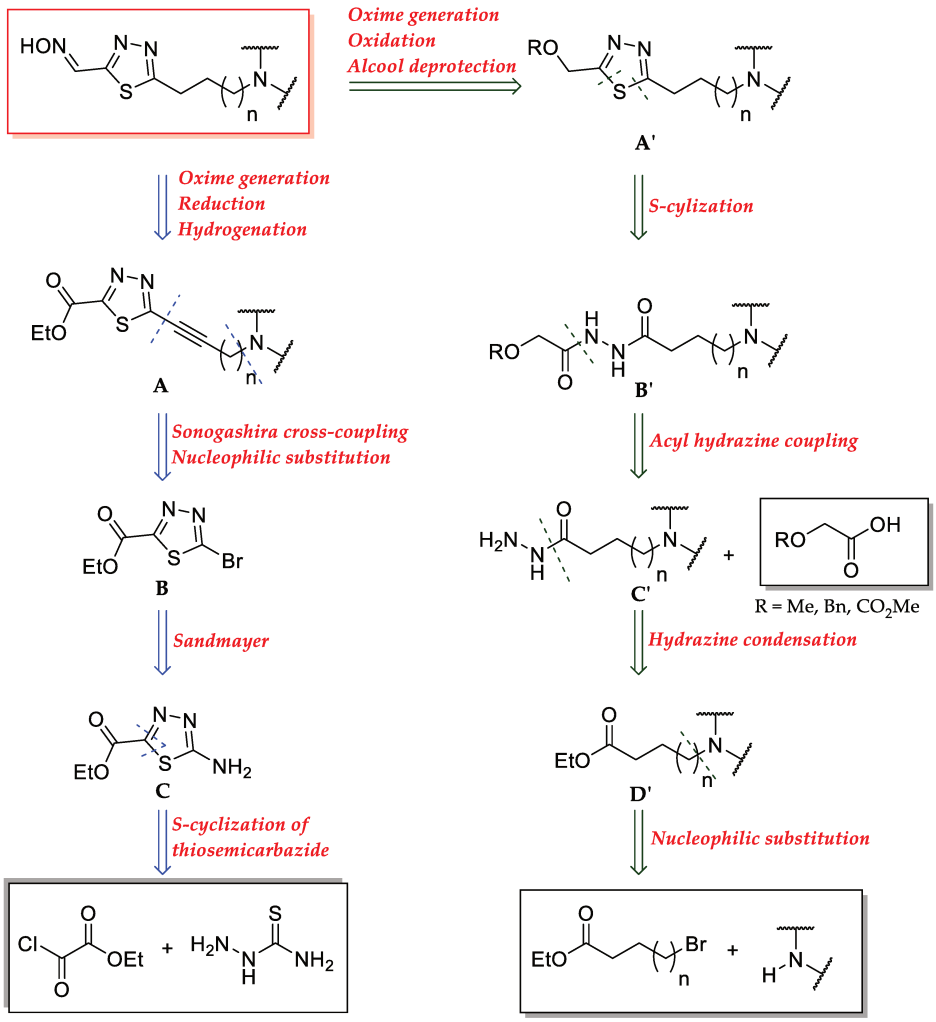
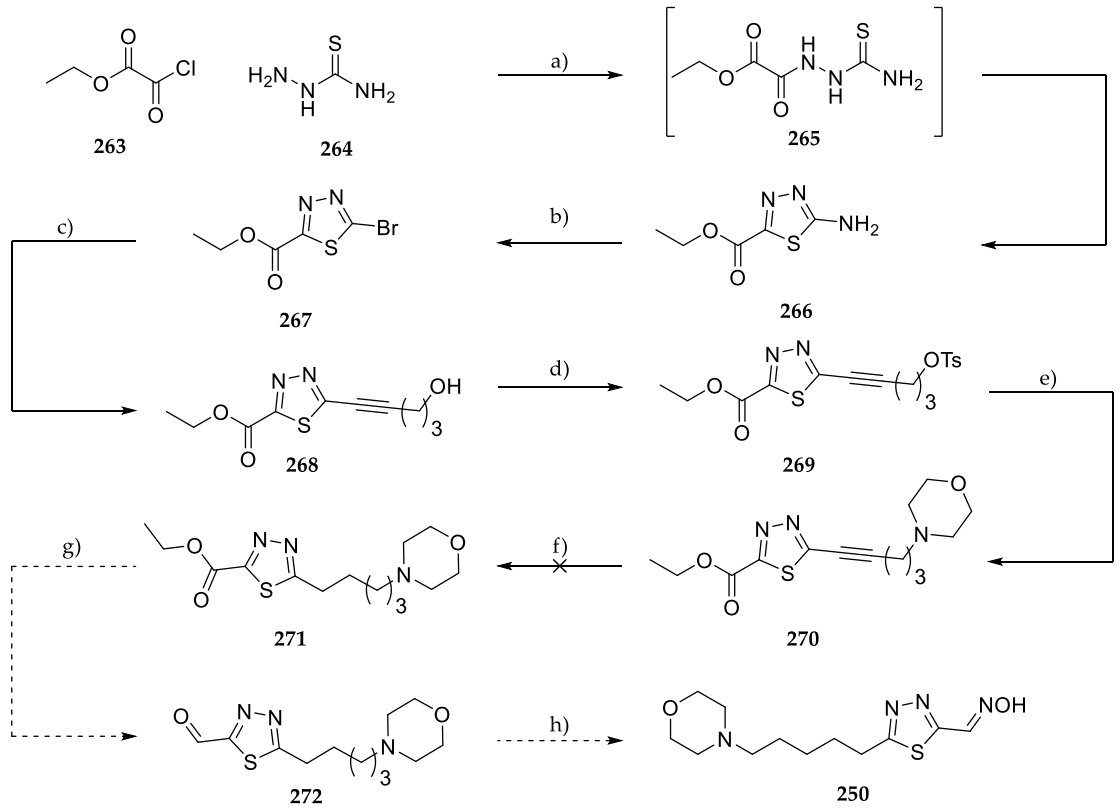



*Figure 236. Rétrosynthèses des 1,3,4-thiadiazoles aldoximes (voie A en bleu, voie B en vert)*

### II.3.2. Voie A – synthèse de la molécule 232

La synthèse débute par la formation du thiosemicarbazide **265** qui cyclise en 5-amino-1,3,4-thiadiazole en milieu acide (52% vs 24% dans la littérature - **Figure 237**).[552] L'aniline **266** est convertie en bromure **267** par réaction de Sandmeyer avec un rendement de 91% (74% litt.).[552] Le couplage de Sonogashira subséquent a nécessité une optimisation. En effet, la charge catalytique classique ne suffisait pas, ce qui n'est *a priori* pas étonnant car le souffre est connu pour empoisonner les métaux de transition. Aussi une diminution du nombre d'équivalents de l'alcyne (1.1 vs 0.9) ainsi qu'un strict suivi par CCM de la réaction est nécessaire (2 h maximum). En effet, le produit d'homocouplage co-élue avec le produit désiré. La formation de ce co-produit est liée à l'addition oxydante qui est l'étape limitante de cette réaction et entraînant le couplage de Glaser indésirable. Ces changements ont permis l'obtention de la molécule **268,** avec un rendement allant de 30 à 98%. Cependant, cette réaction de couplage n'est pas

reproductible : la variation du rendement observée dépend essentiellement de la qualité de $Pd(PPh_3)_4$ (synthétisé au laboratoire). L'activation de l'alcool par tosylation n'a permis l'obtention de l'intermédiaire **269** qu'avec un rendement isolé de 36% probablement dû à la réactivité l'hétérocycle. L'intermédiaire est alors mis en réaction avec la morpholine permettant l'accès à l'intermédiaire **270** avec un rendement de 20%. La réaction suivante consiste en l'hydrogénation catalytique de la triple liaison de la molécule **270**. Malheureusement, le souffre empêche la réaction de se produire malgré l'augmentation de la charge catalytique (0.2 à 2 equiv.). Etant donné l'impossibilité de réduire la triple liaison ainsi que les faibles rendements de greffage de l'amine, cette voie a donc été abandonnée.




(a) $POCl_3$, 70°C, 12h, ***52%;*** (b) $CuBr_2$, ACN, rt; 30 min, then, *t*BuONO, 60°C, 30 min, ***91%;*** (c) **6a** (0.9 equiv), $Pd(PPh_3)_4$ (10 mol%), CuI (20 mol%), TEA/DCM (1/2), rt, 2h, ***98%;*** (d) TsCl, TEA, DCM, rt, 12h, ***36%;*** (e) morpholine, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***20%;*** (f) $H_2$, $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h; (g) DIBAL-H, DCM, -78°C; (h) NaOAc, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt.

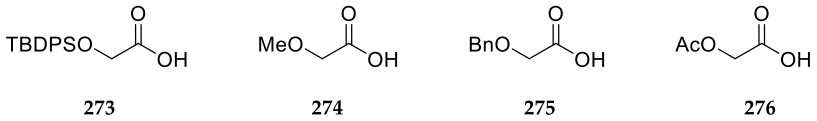
***Figure 237.*** *Synthèse de la molécule 253, précurseur du réactivateur 245*

### II.3.3. Voie B

Cette voie a été initialement élaborée avec comme principal objectif d'éviter l'utilisation de métaux de transition. Seule la synthèse des réactivateurs comprenant un bras espaceur à 4 chaînons a été étudiée. L'étape clef de cette voie de synthèse est le couplage entre les acylhydrazines et l'acide carboxylique. Quatre acides carboxyliques ont été envisagés au cours des synthèses (**Figure 238**) :

- L'acide 2-((tert-butyldiphenylsilyl) oxy) acétique (**273**, non-commercial)
- L'acide methoxy acétique (**274**, 46 € pour 50 g – Sigma-Aldrich)

- L'acide benzyloxy acétique (**275**, 66 € pour 5 g – Accros)
- L'acide acetoxy acétique (**276**, 43 € pour 5 g – Sigma-Aldrich)



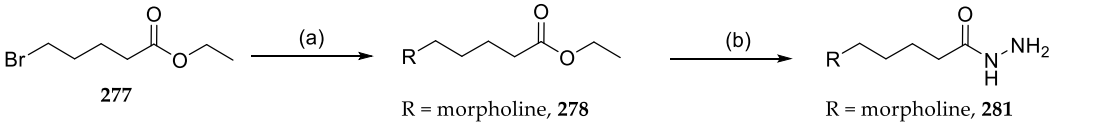

**273** **274** **275** **276**

***Figure 238.*** *Acides carboxyliques envisagés lors de ces synthèses*

Dans un premier temps, la synthèse du fragment **C'** incorporant différentes amines sera présentée. La suite des synthèses seront présentées selon la nature de l'acide carboxylique.

### II.3.3.1. Synthèses des fragments C'

Les fragments C' sont obtenus en deux étapes de manière quantitative (**Figure 239**). La substitution nucléophile a été optimisée : l'absence de solvant et une rapide filtration sur silice permet l'obtention des intermédiaires **278** à **280** de manière quantitative. Les intermédiaires acyl hydrazine synthétisés présentent comme motif aminé la morpholine (**281**), la *N*-benzylpipérazine (**282**) et la PIQ (**283**).




R = morpholine, **278**
R = N-benzylpiperazine, **279**
R = PIQ, **280**

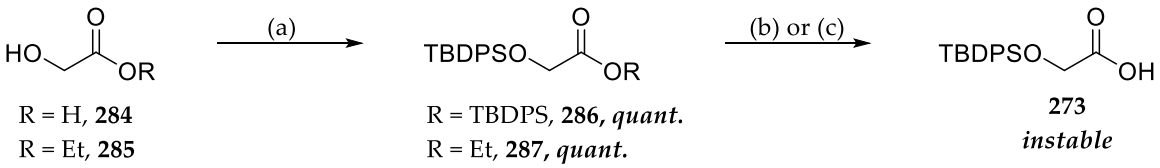
R = morpholine, **281**
R = N-benzylpiperazine, **282**
R = PIQ, **283**

(a) amine, $K_2CO_3$, neat, reflux, 1h, ***quant.;*** (b) hydrazine, MeOH, reflux, 1h, ***quant.***

***Figure 239.*** *Synthèse des intermédiaires acylhydrazone **281** à **283***

### II.3.3.2. Synthèse de l'acide carboxylique 270

La première voie envisagée consiste en la protection du glycoate d'éthyle **285** sous forme d'éther silylé **287** avec un rendement quantitatif (**Figure 240**). Cependant la saponification de l'ester en acide n'a pas fonctionné, la déprotection de l'alcool ayant été systématiquement observée, conduisant à l'acide de départ. De ce fait, l'utilisation de l'acide glycoïque **284** permet d'obtenir le produit bi-silylé **286**. La subséquente saponification de l'ester silylé a conduit au produit désiré **273**. Malheureusement, ce produit est instable malgré un stockage sous atmosphère inerte et à -25°C. Un test de couplage a été effectué avec la morpholine **281**, mais n'a pas conduit au produit de couplage du fait de l'instabilité de l'acide. L'acidité intrinsèque de l'acide semble donc incompatible avec une protection sous forme d'éther silylé.




R = H, **284**
R = Et, **285**

R = TBDPS, **286, *quant.***
R = Et, **287, *quant.***

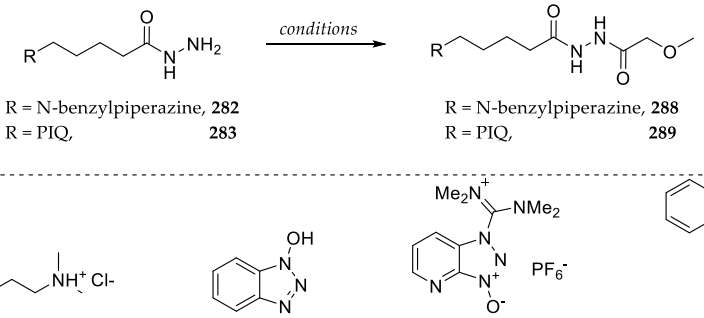
**273**
***instable***

(a) TBDPSCl, imidazole, THF, rt, 12h, ***quant.;*** (b) **286,** $K_2CO_3$, $H_2O$, reflux, ***quant.;*** (c) **287,** NaOH or $K_2CO_3$, $H_2O$, reflux, *degradation.*

***Figure 240.*** *Synthèse de l'acide* ***273***

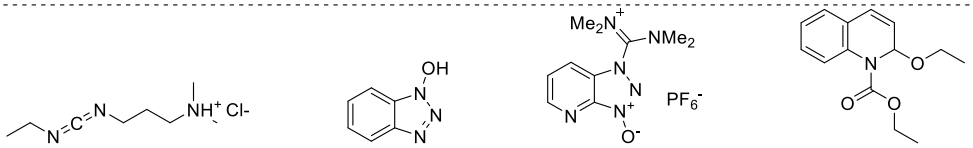
### II.3.3.3. Couplage des fragments C' avec l'acide methoxy acétique 271

Ce couplage a nécessité une étude méthodologique dont les résultats sont résumés dans le **Tableau 82**. La réaction a été suivie par spectrométrie de masse et par HPLC. Parmi les conditions testées, seul l'utilisation de l'EEDQ[553–555] permet d'obtenir les produits désirés avec des rendements non-optimisés allant de 75 à 77%.




R = N-benzylpiperazine, **282**
R = PIQ, **283**

R = N-benzylpiperazine, **288**
R = PIQ, **289**

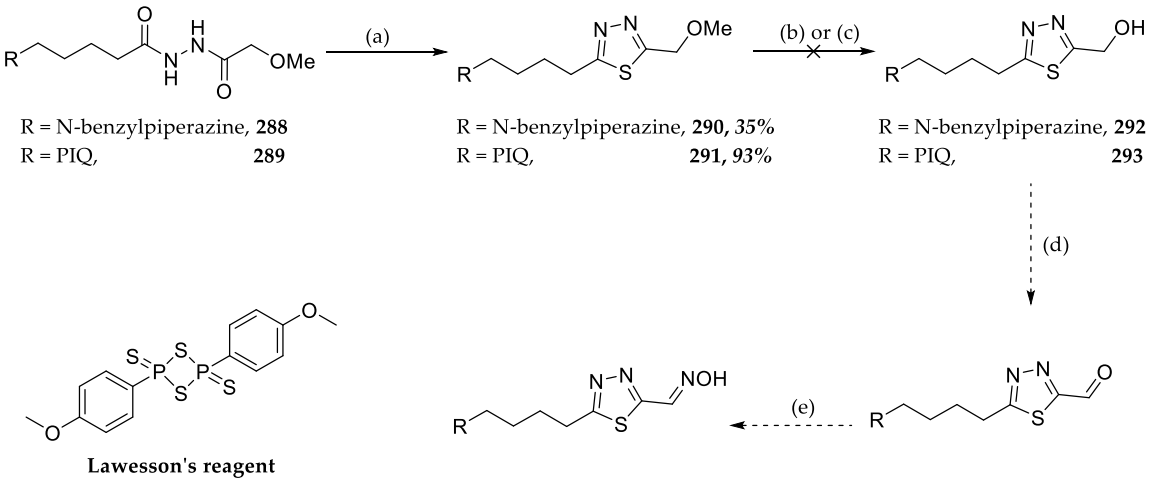


EDC.HCl HOBt HATU EEDQ

| Entrée | Substrat | Conditions | Rendement isolé (%) |
|---|---|---|---|
| 1 | 282 | EDC.HCl, HOBt, DIPEA, THF, rt, 24 h | 0 |
| 2 | 282 | HATU, DIPEA, DMF, rt, 24 h | 5 |
| 3 | 282 | EtOH, reflux, 24 h | 0 |
| **4** | **282** | **EEDQ, THF, rt, 12 h** | **75** |
| 5 | 283 | EDC.HCl, HOBt, DIPEA, THF, rt, 24 h | 0 |
| 6 | 283 | HATU, DIPEA, DMF, rt, 24 h | 0 |
| 7 | 283 | EtOH, reflux, 24 h | 0 |
| **8** | **283** | **EEDQ, THF, rt, 12 h** | **77** |

***Tableau 82.*** *Conditions de réaction de couplage*

La cyclisation des intermédiaires **288** et **289** a été effectuée avec succès en présence du réactif de Lawesson avec des rendements non-optimisés allant de 35% à 93% (**Figure 241**). Enfin, la déprotection de l'alcool a été testée en présence de $BCl_3$ et $BBr_3$. L'utilisation de $BCl_3$ n'a pas permis l'obtention des produits désirés (pas de conversion) tandis que l'emploi de $BBr_3$ n'a provoqué que le clivage des methoxy du ligand dans le cas de la PIQ. Dans le cas de la *N*-benzyle pipérazine, l'hétérocycle a été clivé selon les analyses en spectrométrie de masse. De ce fait, le groupement protecteur a été changé.

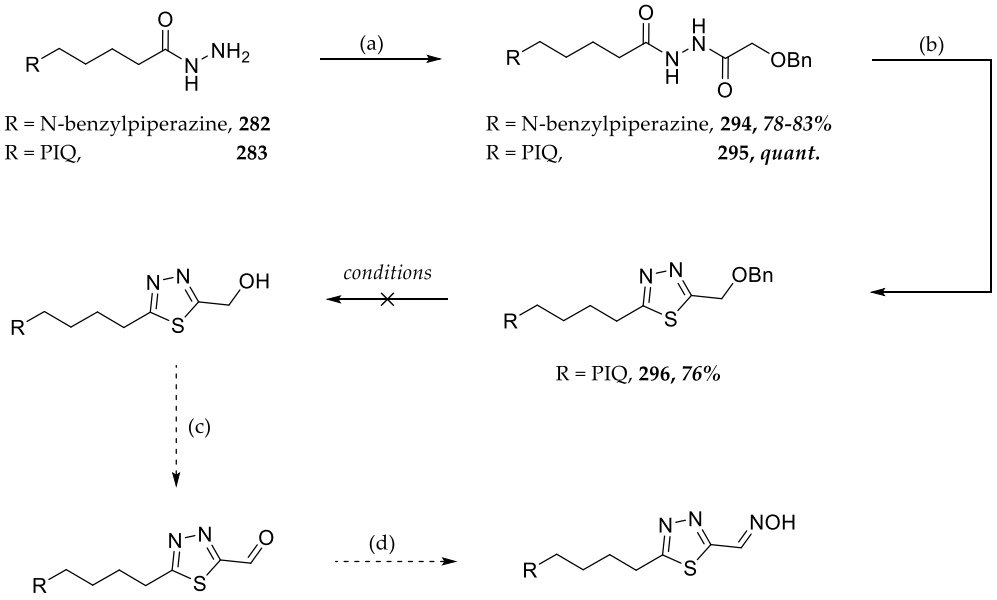



(a) Lawesson, THF, reflux, 4h; (b) $BCl_3$, DCM, 0°C, 24h, ***no conversion***; (c) $BBr_3$, DCM, 0°C, 24h, ***degradation***; (d) $MnO_2$, 1h, rt; (e) $NH_2OH.HCl$, AcONa, MeOH, rt.

***Figure 241.*** *Suite de la synthèse des réactivateurs* ***247*** *et* ***248*** *partir des intermédiaires* ***288*** *et* ***289****.*

### II.3.3.4. Couplage des fragments C' avec l'acide benzyloxy acétique 275

Cette synthèse a été appliquée essentiellement sur l'acylhydrazine portant la PIQ (**283** - **Figure 242**). Comme précédemment, celui-ci a été couplé avec l'acide benzyloxy acétique **275** avec un rendement allant de 78 à 83% pour l'hydrazine portant la pipérazine **282**, et un rendement quantitatif pour **283**. La cyclisation à l'aide du réactif de Lawesson s'est faite avec un rendement de 76% pour le dérivé portant la PIQ comme ligand du site périphérique.




(a) **275**, EEDQ, THF, 12h; (b) Lawesson, THF, reflux, 4h, 76%; (c) $MnO_2$, 1h, rt; (d) $NH_2OH.HCl$, AcONa, MeOH, rt.

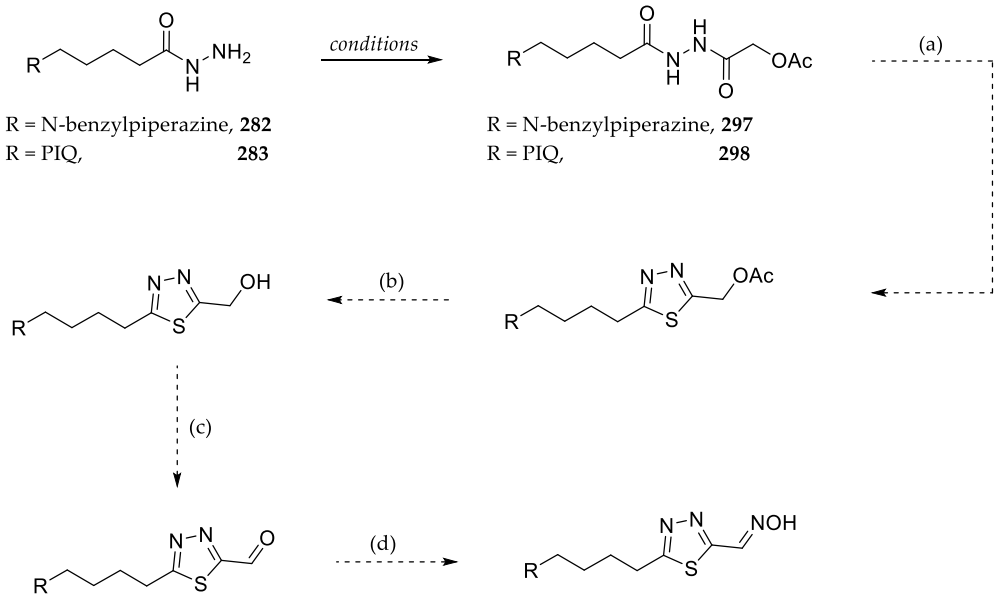
***Figure 242.*** *Synthèses des réactivateurs à partir de l'acide benzyloxy acétique* ***275***

Le clivage du groupement éther benzylique de la molécule **296** par hydrogénolyse a fait l'objet d'une étude méthodologique résumée dans le **Tableau 83**. L'ensemble des réactions testées ont été suivies par spectrométrie de masse. Malgré l'emploi de conditions drastiques (60 °C sous 30 bars d'hydrogène), aucune réaction n'a été observée. De ce fait, cette voie de synthèse a été abandonnée.

| Entrée | Catalyseur | Température (temps) | Pression | Solvant | Conversion |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Pd/C (20 % w/w) | rt (24 h) | 1 atm | MeOH | Ø |
| 2 | Pd/C (1 equiv.) | rt (12 h) puis 60 °C (12 h) | 7.5 bars | MeOH | Ø |
| 3 | $Pd(OH)_2$ (20 % w/w) | rt (72 h) | 1 atm | MeOH | Ø |
| 4 | $Pd(OH)_2$ (1.1 equiv) | rt (24 h) | 1 atm | MeOH | Ø |
| 5 | $Pd(OH)_2$ (2 equiv) | rt, 72 h | 1 atm | AcOH | Ø |
| 6 | $Pd(OH)_2$ (2 equiv) | rt (12 h), 60 °C (48 h) | 30 bars | MeOH | Ø |
| 7 | $Pd(OH)_2$ (2 equiv) | rt (12 h), 60 °C (48 h) | 30 bars | THF | Ø |
| 8 | $Pd(OH)_2$ (2 equiv) | rt (12 h), 60 °C (48 h) | 30 bars | AcOH | Ø |

***Tableau 83.*** *Conditions d'hydrogénation testées*

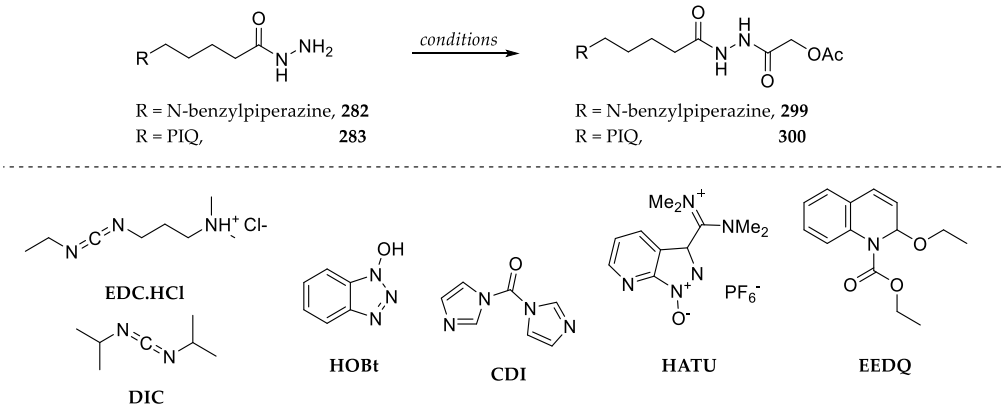
### II.3.3.5. Couplage des fragments C' avec l'acide acetoxy acétique 276




(a) Lawesson, THF, reflux, 4h; (b) LiOH or $K_2CO_3$ (c) $MnO_2$, 1h, rt; (d) $NH_2OH.HCl$, AcONa, MeOH, rt.

***Figure 243.*** *Voie de synthèse utilisant l'acide acetoxy acétique* ***259***

Le couplage entre les acylhydrazines **282** et **283** et l'acide acetoxy acétique **276** a fait l'objet d'une rapide étude méthodologique (**Figure 243 - Tableau 84**). Cependant, aucune des conditions testées n'a abouti à la formation des produits désirés. La présence d'un ester en alpha de l'acide carboxylique semble influencer la réaction. À noter qu'aucune réaction sur cet ester n'a été observée (RMN et masse), les substrats de départ étant inchangés.




| entrée | Substrat | Conditions | Conversion |
|---|---|---|---|
| 1 | 282 | EEDQ, THF, rt | Ø |
| 2 | 282 | DIC, CDI, THF, rt | Ø |
| 3 | 282 | HATU, DIPEA, DMF, rt, | Ø |
| 4 | 283 | EEDQ, THF, rt | Ø |
| 5 | 283 | DIC, CDI, THF, rt | Ø |
| 6 | 283 | $SOCl_2$, TEA, DCM rt à 40°C | Ø |
| 7 | 283 | EDC.HCl, HOBt, DIPEA, THF, rt, | Ø |
| 8 | 283 | HATU, DIPEA, DMF, rt, | Ø |

***Tableau 84.*** *Conditions de couplage testées*

Comme perspective à cette partie, une dernière voie envisageable serait de revoir la séquence réactionnelle de manière à générer l'acyl hydrazide sur le diéthyle oxalate (**Figure 244**). Après couplage avec les acides préalablement synthétisés par simple saponification, la cyclisation avec le réactif de Lawesson ou le $P_2S_5$ permettrait de former l'hétérocycle. Enfin, les esters résultants seraient réduits en alcool par du $NaBH_4$, puis oxydés en aldéhyde à partir desquels seraient générées les oximes.

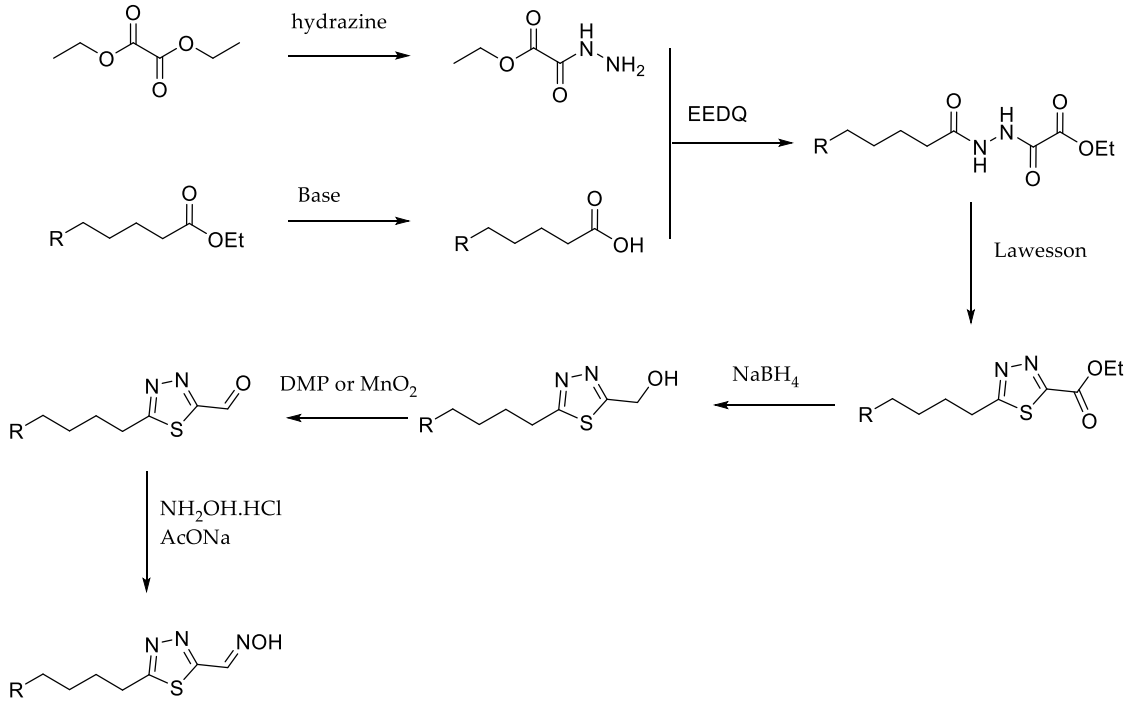



***Figure 244.*** *Voie alternative possible*

Pour conclure cette partie, différentes voies de synthèse ont été envisagées. Des intermédiaires avancés ont été obtenus, cependant, aucun nouveau réactivateur n'a pu être synthétisé. Ces synthèses serviront de base à mes successeurs dans l'obtention de ces nouveaux réactivateurs.

## III. Le naphtaldoxime – une découverte inattendue ouvrant un large champ de possibilités

Le 2-hydroxy-1-naphtaldoxime en raison de potentielles propriétés de fluorescence du noyau naphtol a été envisagé dans un premier temps afin d'évaluer son application en spectroscopie.[448,556] Bien que le pKa de l'oxime soit faible (6.61). Cette molécule a été évaluée *in silico*. Sans surprise, le motif s'est révélé affin du site catalytique grâce à une stabilisation par π-stacking avec le Trp86 (**Figure 245**).

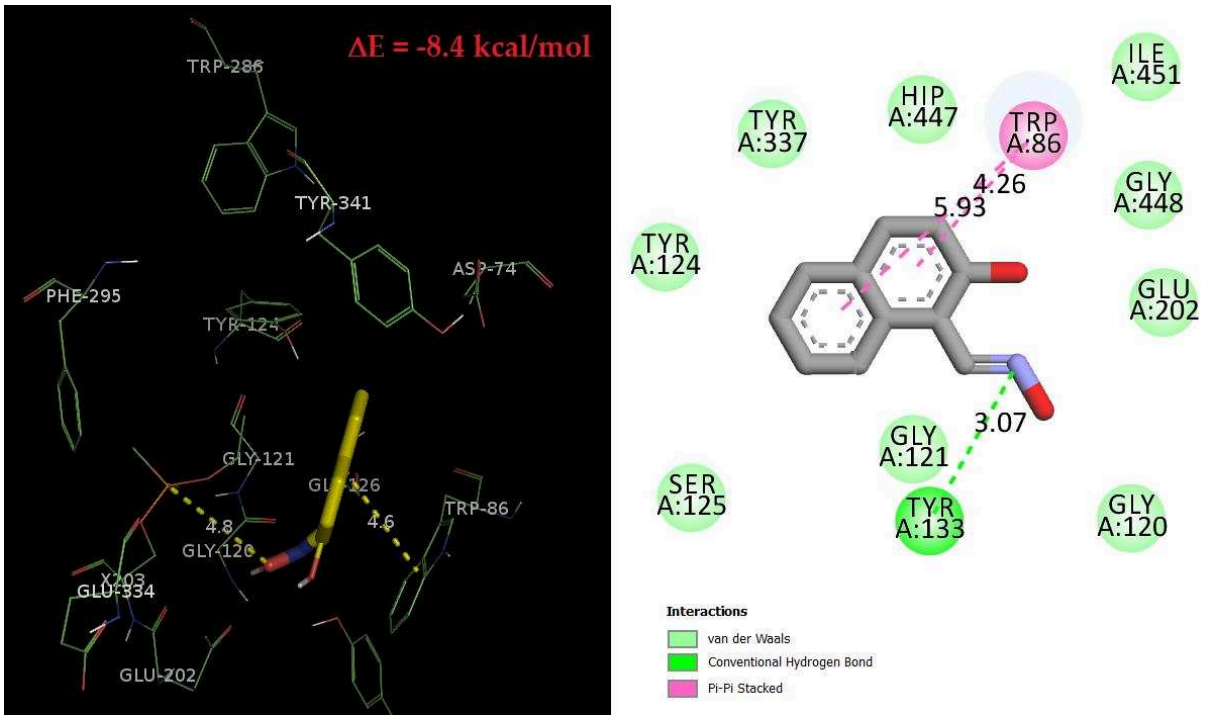
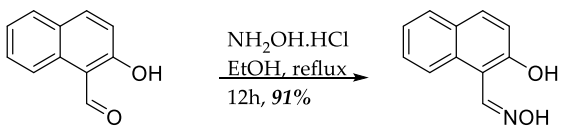



***Figure 245.*** *Conformation prédominante obtenue dans la mAChE inhibée par le VX (Docking flexible à gauche visualisation sur Pymol et docking statique à droite visualisé sur Discovery Studio)*

La synthèse de la molécule **302** a donc été effectuée avec succès à partir de l'aldéhyde commercial **301** avec un rendement après purification de 91% (82% litt. - **Figure 246**).[449]




**301** **302**
**AB-359**

***Figure 246.*** *Synthèse du réactivateur 302*

Cette molécule a été initialement conçue comme sonde pro-fluorescente pour détecter les NOP, et sa réactivité *in vitro* avec le DFP a été déterminée.[448] L'addition de l'oxime **302** sur le DFP conduit à une

cyclisation intramoléculaire, qui conduit à l'isoxazole **303**, dont les propriétés de fluorescence diffèrent de l'oxime de départ (à noter qu'il est possible également que cet isoxazole **303** s'ouvre *via* une réaction de Kemp, ou que l'élimination de l'oxime conduise directement au dérivé nitrile **304** correspondant, ce qui a été observé au laboratoire dans le cadre d'autres études, ces trois processus étant en compétition suivant les conditions réactionnelles mises en jeu- **Figure 247**).

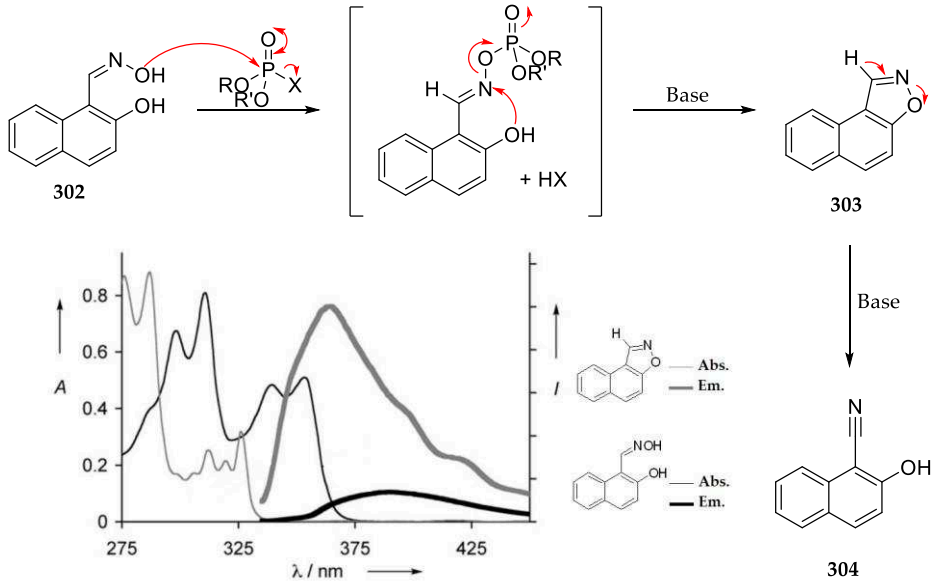


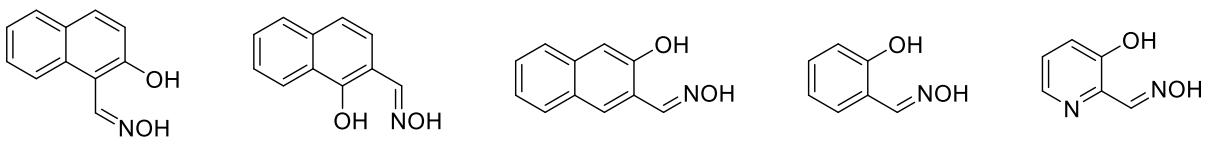

***Figure 247.*** *Mécanismes de réaction et spectres UV-Vis et de fluorescence du réactivateur* ***302*** *(noir, trait fin abseorption, trait épais emission) et de l'isoxazole* ***303*** *(gris, trait fin abseorption, trait épais emission).*[448]

Comme l'illustre la **Figure 247**, les différences de spectre de fluorescence entre l'oxime **302** et l'isoxazole **303** sont nettes, cependant, son potentiel de réactivation sur l'*h*AChE empoisonnée n'est pas connu. Malgré une très faible hydrosolubilité, cette molécule a été évaluée *in vitro* par le Dr José Dias (**Tableau 85**). À notre grande surprise, cette molécule est capable, non seulement de réactiver l'*h*AChE inhibée (à l'exception de celle phosphylée par le NEPDA, analogue du Tabun), mais avec des efficacités supérieures aux molécules de référence (HI-6 et 2-PAM). Le point faible de cette molécule réside en son affinité, qui est certes meilleure que celles de la 2-PAM mais inférieure à celle du HI-6. Enfin, cette molécule inhibe faiblement l'AChE contrairement à la 2-PAM et au HI-6.

| Molécules | | 302 (AB359) | HI6 | 2PAM |
|---|---|---|---|---|
| *KD (µM)* | VX (NEMP) | nd | 19 ± 4 | 26 ± 7 |
| | Sarin (NIMP) | nd | 57 ± 11 | 24,8 ± 7,12 |
| | Tabun (NEDPA) | 0 | 0 | 211 ± 113 |
| | Paraoxon | 124 ± 15 | 290 ± 70 | 68 ± 16 |
| *kr (min-1)* | VX (NEMP) | nd | 0.38 ± 0.02 | 0.19 ± 0.013 |
| | Sarin (NIMP) | nd | 0,76 ± 0,06 | 0,27 ± 0,02 |
| | Tabun (NEDPA) | 0 | 0 | 0,47 ± 0.19 |
| | Paraoxon | 6,4 ± 0.44 | 0.1 ± 0.01 | 0.066 ± 0.02 |
| *kr2 (mM-1min-1)* | VX (NEMP) | 36,7 | 20 | 7,3 |
| | Sarin (NIMP) | 11,7 | 13,3 | 10,8 |
| | Tabun (NEDPA) | 0 | 0 | 2,24 |
| | Paraoxon | 51,5 | 0,36 | 0,97 |
| **IC50 (µM)** | | 695 ± 177 | 82 ± 6 | 580 ± 28 |

***Tableau 85.*** *Réactivation in vitro de l'hAChE inhibée par différents NOPs (si [oxime] ≪ KD, alors kobs = (kr/ KD)[oxime] ; kr et KD ne peuvent être déterminé)*

La synthèse d'analogues de l'**AB359** ainsi que la détermination des pKa sont en cours au sein du laboratoire. En effet, si le pKa de l'oxime est bien de 6.6, comment expliquer qu'il y ait une réactivité aussi élevée ? Est-ce lié à l'environnement particulier au sein du site catalytique de l'enzyme ? aux contraintes stériques liées à la taille du réactivateur ? ceci pourrait expliquer des données de la littérature contradictoires avec certains de nos résultats. La confirmation et la rationalisation de ce résultat préliminaire sont nécessaires afin de comprendre les raisons de ce bon potentiel réactivateur (**Figure 248**).




**AB-359** **305** **306** **307** **308**

***Figure 248.*** *Analogues en cours de synthèse*

## IV. Conclusion du chapitre 5

La conception de nouveau réactivateurs tripartites incorporant des thiadiazoles aldoximes en tant que fonction réactivatrice a permis l'identification de 7 réactivateurs potentiels qui pourraient donner accès à de plus larges familles de réactivateurs innovants. D'un point de vue chimique, bien que la synthèse soit théoriquement simple, de nombreux verrous synthétiques ont été rencontrés. Plusieurs alternatives ont été envisagées et des intermédiaires de synthèse avancés ont été obtenus. Malgré cet effort de synthèse, aucun nouveau réactivateur n'a pu être finalisé. Cependant, des voies alternatives existent et seront étudiées au sein du laboratoire.

Parallèlement à cela, la découverte d'une nouvelle fonction réactivatrice au travers du réactivateur **AB-359** remet en cause la nécessité d'avoir un pKa de l'oxime aux alentours de 8. Aucun exemple de réactivation efficace d'une oxime aussi acide n'a été rapportée dans la littérature. Certes, ce résultat nécessite une rationalisation qui passe par la synthèse d'analogues mais aussi la vérification de la valeur du pKa simulé *in silico* par des expériences de spectroscopie UV-Vis et par RMN. A plus long terme, l'incorporation de cette fonction réactivatrice dans nos réactivateurs tripartites pourrait être envisagée, mais en incorporant un groupement hydrosolubilisant sur le naphtalène comme un ammonium (pour une interaction cation-π favorable), en ayant pris soin d'étudier l'accès synthétique et les conséquences sur la réactivation (**Figure 249**).

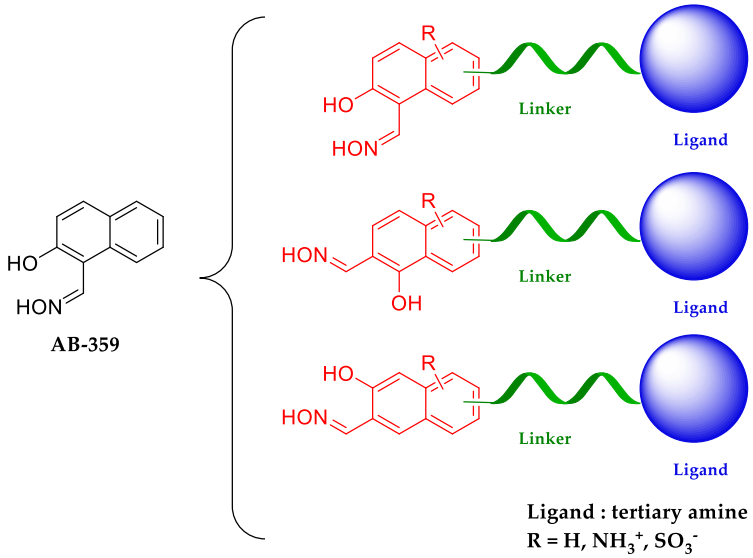



***Figure 249.*** *Nouvelle classe de réactivateurs potentiels découlant de l'AB-359*

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les neurotoxiques organophosphorés sont des inhibiteurs irréversibles de l'acétylcholinestérase, une enzyme ayant un rôle clé dans la transmission de l'influx nerveux. Une intoxication par ces substances provoque de graves symptômes pouvant aboutir au décès des sujets empoisonnés. Bien qu'interdits par une convention internationale ratifiée par 190 pays, le contexte géopolitique actuel ravive la hantise d'une menace chimique contre des populations civiles, renouvelant l'intérêt de développer de nouveaux remèdes contre une intoxication aux NOP.

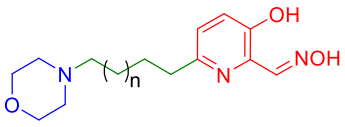
A l'heure actuelle, les antidotes utilisés contre ces intoxications sont les mono- et bis- pyridinium aldoximes portant une ou deux charge(s) positive(s) permanente(s), qui présentent de nombreuses limitations, dont leur très faible capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique et à réactiver efficacement les AChEs inhibées par les NOP dans le système nerveux central (SNC). Par ailleurs, leur efficacité est très dépendante de la nature du NOP utilisé, et il n'existe pas, aujourd'hui, de réactivateur universel. Dans ce contexte, le développement de nouveaux réactivateurs efficaces est un réel défit.

Les objectifs de cette thèse financée par la Direction Générale de l'Armement (DGA), réalisée au sein de l'équipe de chimie bio-organique du Pr Pierre-Yves Renard (Université de Rouen) et sous la codirection du Dr Ludovic Jean, consistaient à :

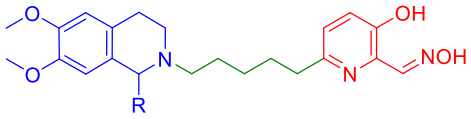
- Développer les candidats réactivateurs « lead » découverts au laboratoire consistants en 3-hydroxypyridine aldoxime non-chargés associée à différents ligands aminés pour un passage passif de la BHE (**Chapitre 2**) ;
- Concevoir et synthétiser de nouveaux réactivateurs non-chargés comprenant différents ligands aminés inédits associés à la 3-hydroxypyridine aldoxime pour un passage passif de la BHE (**Chapitre 3**) ;
- Concevoir et synthétiser de nouveaux réactivateurs non-chargés comprenant un motif carbohydrate associés à la 3-hydroxypyridine aldoxime pour un passage actif de la BHE (**Chapitre 4**)
- Concevoir et synthétiser de nouvelles fonctions réactivatrice non-chargés susceptible d'être fixées à un ligand du site périphérique de l'enzyme (**Chapitre 5**).

Dans un premier temps, une étude bibliographique approfondie des recherches menées depuis la découverte des organophosphorés (soit plus de 70 ans de recherche) a permis de mettre en exergue les limitations des contre-mesures médicales actuelles et des réactivateurs nouvellement développés. Bien que de grandes avancées aient été faites dans ce domaine, les résultats obtenus sont loin d'être satisfaisants (**Chapitre 1**).

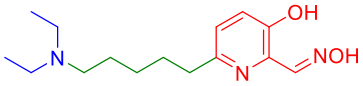
Le **Chapitre 2** était consacré à l'optimiser les synthèses à l'échelle du gramme des réactivateurs **RM048, JR595, GM113, GM415** et **CG193** déjà développés en vue de poursuivre leurs évaluations *in vitro* et *in vivo* (Figure 250). Ces optimisations ont permis d'une part, l'accès à l'intermédiaire **4a**, intermédiaire clef de nos réactivateurs de manière quasi quantitative (contre 37% auparavant) et robuste. À l'exception des **GM113** et **CG193**, les rendements des **RM048**, **JR595** et **GM415** ont été sensiblement améliorés. Dans le but d'augmenté la biodisponibilité, la préparation de sels (chlorhydrate, methanesulfonate et trifluoroacétate) a pu être mise en œuvre pour l'ensemble des réactivateurs.




n = 1, **JR595**
n = 2, **RM048**




R = Ph, **GM113**
R = H, **GM415**




**CG193**

***Figure 250.*** *Réactivateurs présentés dans le chapitre 2*

Evalués par l'équipe du Dr. Zrinka Kovarik sur les véritables NOPs,[491] les **JR595**, **GM415** et **RM048** se sont révélés bien plus efficaces que les oximes actuellement sur le marché. L'utilisation du **JR595** associé aux choline-ésterases circulantes en tant que bioépurateur pseudo-catalytique a donné des résultats constituant une avancé réelle dans le domaine de la prophylaxie. Les résultats obtenus montrent que le **RM048** et le **GM415** agiraient aussi au niveau des récepteurs nicotiniques, ouvrant la voie au développement de réactivateurs dits « *Multi-Target* » agissant aussi bien sur l'AChE que sur les récepteurs nicotiniques voire muscariniques. Enfin, l'apport de l'encapsulation du **GM415** en combinaison avec la **2-PAM** permet d'atteindre des pourcentages de réactivation au niveau du SNC jamais rapportés dans la littérature (publication soumise). L'ensemble de ces résultats permettent de valider la structure de ces réactivateurs possédant une amine tertiaire (cyclique ou aliphatique) et la fonction 3-hydroxypyridine aldoxime reliés entre eux par un bras espaceur d'une longueur de 4 ou 5 atomes de carbone.

Sur la continuité du **Chapitre 2**, le **Chapitre 3** était consacré à la conception et la synthèse de réactivateurs tripartites incorporant des amines inédites en tant que ligands du site périphérique. Cette conception s'est faite in *silico* en alliant imagination, simulation des propriétés physicochimiques et étude d'amarrage moléculaire sur l'enzyme inhibée. Quatre familles ont été étudiées : les amines dérivées des carbamazépines (**A**), les amines simplifiées de la PIQ (**B**), les amines cycliques dérivées de la pipéridine (**C**) et, enfin, les pipérazines *N*-substituées (**D - Figure 251**).

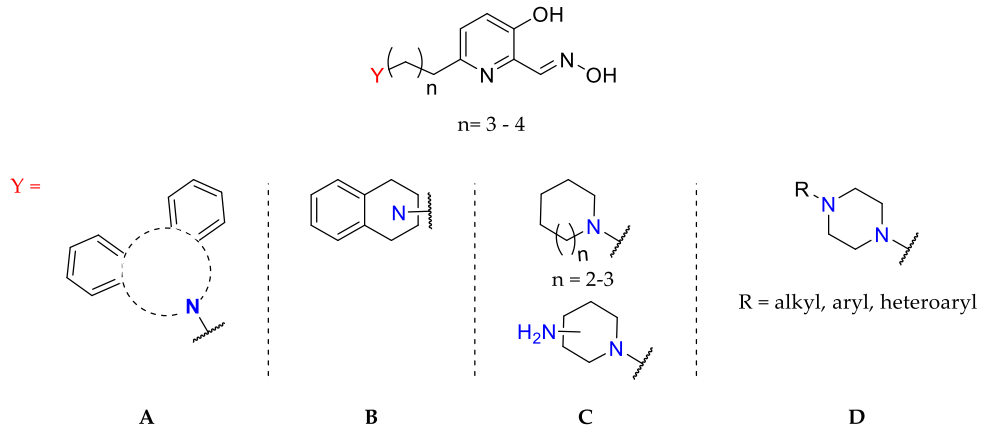
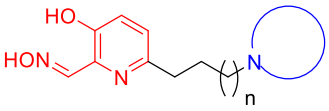
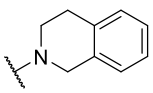



***Figure 251.*** *Réactivateurs présentés dans le chapitre 3*

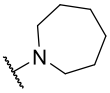
Vingt-et-un réactivateurs ont été obtenus et les évaluations biologiques sont en cours. Les résultats préliminaires permettent d'identifier de potentiels nouveaux réactivateurs :

- Le réactivateur **90** (AB 558) est particulièrement intéressant puisqu'il surpasse le HI-6 et la 2-PAM lors de la réactivation de l'hAChE inhibée par le NEMP (analogue du VX), le NEDPA (analogue du tabun) et le Paraoxon.
- Les oximes **116** (AB-740) et **117** (AB-738) présentent des capacités prometteuses puisqu'elles surpassent le HI-6 et la 2-PAM lors de la réactivation de l'hAChE inhibée par le NEMP (analogue du VX), le NEDPA (analogue du tabun) et le Paraoxon.
- Les molécules **146** (AB-639), **150** (AB-745), **156** (AB-589) et **158** (AB-647) méritent une étude plus approfondie, leurs capacités de réactivation surpassant la 2-PAM et le HI-6 lors de la réactivation de l'*h*AChE inhibée par le NEMP (analogue du VX), le NEDPA (analogue du tabun), le NIMP (analogue du Sarin) et le Paraoxon.
- Les molécules **147** (AB-069) et **153** (AB-153), dont le potentiel *in vitro* est moindre, ont été évaluées *in vitro* pour leur effet antagoniste sur les récepteurs nAChR $\alpha$-7, démontrant un effet antagoniste intéressant dans le cas d'un traitement d'urgence, effet attendu pour leur analogue.

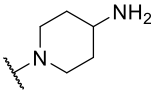


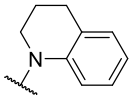

n = 2, **90, AB-558**
n = 3, **91, AB-746**



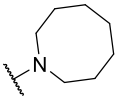

n = 3, **112, AB-152**



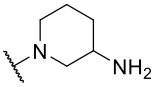

n = 2, **115, AB-740**
n = 3, **116, AB-737**



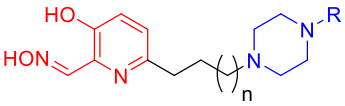

n = 3, **93, AB-392**




n = 2, **113, AB-643**
n = 3, **114, AB-436**




n = 2, **117, AB-738**
n = 3, **118, AB-739**




| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| n = 2, R = Me, | **146, AB-639** | n = 2, R = Ph, | **150, AB-745** | n = 2, R = 2-py, | **156, AB-589** |
| n = 3, R = Me, | **147, AB-069** | n = 3, R = Ph, | **151, AB-744** | n = 3, R = 2-py, | **157, AB-451** |
| n = 2, R = Et, | **148, AB-588** | n = 2, R = Bn, | **152, AB-641** | n = 2, R = 2-pym, | **158, AB-647** |
| n = 3, R = Et, | **149, AB-557** | n = 3, R = Bn, | **153, AB-153** | n = 3, R = 2-pym, | **159, AB-508** |
| | | n = 2, R = -$CHPh_2$, | **154, AB-643** | | |
| | | n = 3, R = -$CHPh_2$, | **155, AB-555** | | |

***Figure 252.*** *Réactivateurs synthétisés dans le chapitre 3*

La finalisation des évaluations biologiques nous permettra véritablement de comparer le potentiel des molécules étudiées dans ce chapitre et de finaliser une riche étude SAR. Comme perspectives à ce projet, un nombre incommensurable de ligands inédits peuvent être envisagés ; ce projet ne prendra pas fin avant longtemps (**Figure 253**).

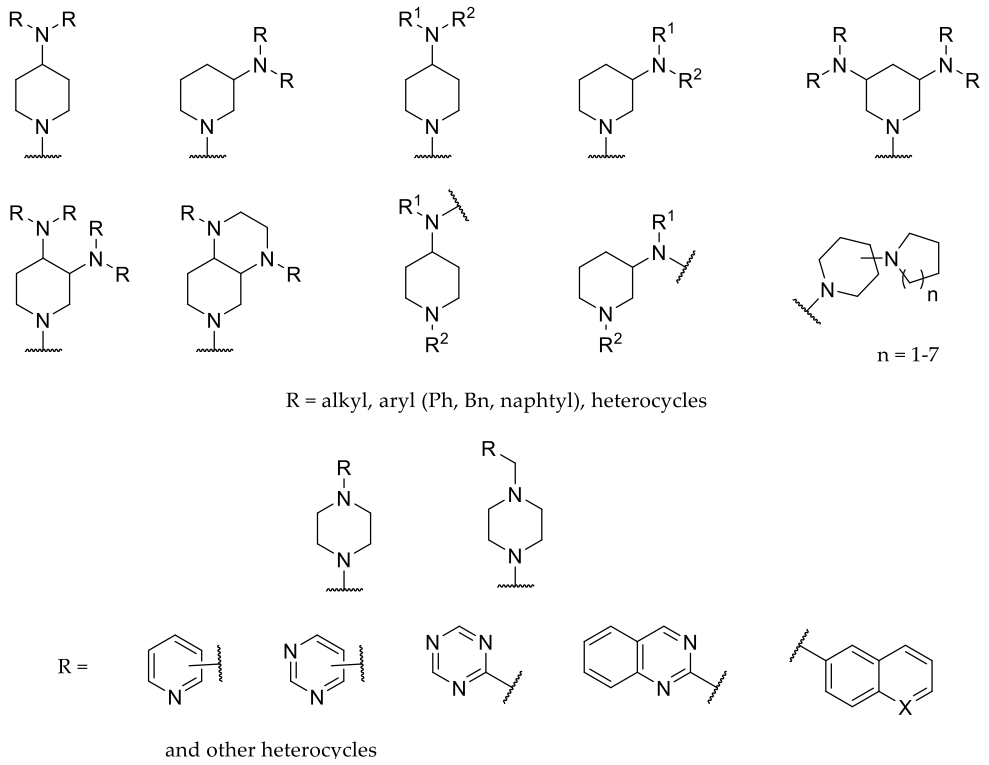
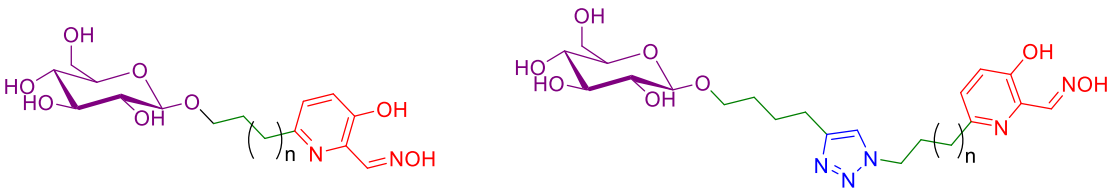



***Figure 253.*** *Exemple d'amine à incorporer*

Le **Chapitre 4** avait comme objectif d'associer un motif carbohydrate avec notre fonction réactivatrice, en absence (1ère génération) ou en présence (2ème génération) d'un ligand du site périphérique (**Figure 254**). Quatre nouveaux réactivateurs ont été synthétisés et évalués *in vitro*.



n = 1, **PW-150**
n = 2, **PW-094**

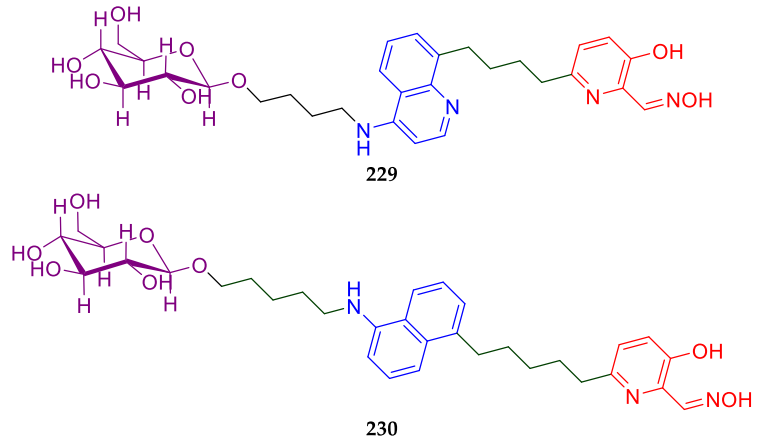
*1st generation*

n = 1, **PW-205**
n = 2, **PW-208**

*2nd generation*

***Figure 254.*** *Réactivateurs présentés dans le chapitre 4 – 1° et 2°générations*

Parmi ces quatre réactivateurs, le **PW208** a été obtenu optiquement pur et a fait l'objet d'une étude *in vivo* préliminaire, exhibant des indices de protection sur la souris équivalents voire supérieurs aux réactivateurs de référence en absence d'atropine. Sur ces résultats prometteurs, la synthèse de réactivateurs de 3ème génération a été entreprise mais s'est soldée par un échec (Figure 255). Cependant des voies alternatives existent et le travail de synthèse sera poursuivi.



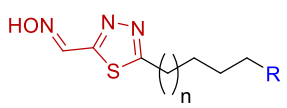

*3rd generation*

***Figure 255.*** *Réactivateurs présentés dans le chapitre 4 – 3° génération*

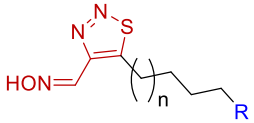
Enfin, le dernier chapitre était dédié à la synthèse de nouveaux réactivateurs tripartites incorporant un motif thiadiazole aldoxime comme fonction réactivatrice avec comme effets attendus :

- une diminution de l'encombrement stérique de la fonction réactivatrice,
- une augmentation de la lipophilie de la molécule pour un meilleur passage au travers de la BHE,
- la possibilité d'agir sur d'autres récepteurs biologiques afin de pallier les conséquences de l'inhibition de l'AChE (réactivateur « Multi-Target »),
- une synthèse plus courte utilisant des réactifs de départ abordables.

Sept réactivateurs inédits ont été conçus *in silico* (**Figure 256**). Plusieurs alternatives synthétiques ont été envisagées et des intermédiaires de synthèse avancés ont été obtenus. Malgré cet effort de synthèse, aucun nouveau réactivateur n'a pu être finalisé. Cependant, des voies alternatives existent et seront étudiées au sein du laboratoire étant donnés le potentiel décelé de ces réactivateurs.



**250**, n = 1, R = morpholine
**251**, n = 2, R = morpholine
**252**, n = 1, R = N-Benzyl piperazine
**253**, n = 1, R = PIQ



**254**, n = 1, R = morpholine
**255**, n = 1, R = N-Benzyl piperazine
**256**, n = 1, R = PIQ

***Figure 256.*** *Réactivateurs présentés dans le chapitre 5*

Parallèlement à cela, la recherche d'une fonction réactivatrice pro-fluorophore en vue d'une détection des NOPs mais aussi du suivi de la réactivation par fluorescence a été étudiée. La découverte d'une nouvelle fonction réactivatrice au travers du réactivateur **AB-359**, évalué *in vitro*, remet en cause la

nécessité d'avoir un p*K*a de l'oxime aux alentours de 8 (**Figure 257**). Aucun exemple de réactivation efficace utilisant une oxime aussi acide n'a été rapporté dans la littérature. Ce résultat nécessite une rationalisation qui passe par la synthèse d'analogues mais aussi la vérification de la valeur du p*K*a simulé *in silico* (en cours). L'étude cristallographique nous permettrait aussi de mieux comprendre ce phénomène. A plus long terme, l'incorporation de cette fonction réactivatrice dans nos réactivateurs tripartites pourrait être envisagée, mais en incorporant un groupement hydrosolubilisant sur le naphtalène comme un ammonium (pour une interaction cation-π favorable), en ayant pris soin d'étudier l'accès synthétique et les conséquences sur la réactivation

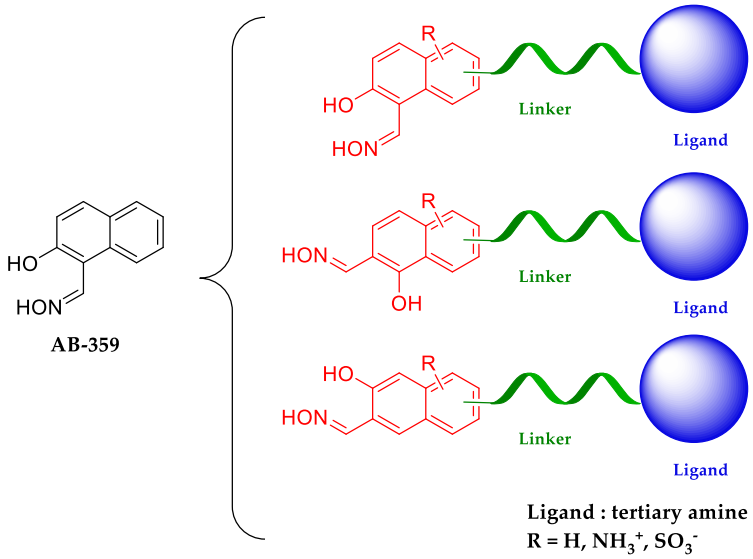



***Figure 257.*** *Reactivateurs découlant de l'AB-359*

L'avenir des réactivateurs passe par leur capacité à agir sur plusieurs cibles d'intérêts biologique. Au vu des résultats préliminaires obtenus dans cette thèse, les réactivateurs « Multi-target » sont en passe de devenir une réalité.

# PARTIE EXPERIMENTALE

I. Chemistry ..... 314
I.1. Chemical and reagents ..... 314
I.2. Instruments ..... 314
I.3. Methods ..... 315
I.3.1. Analytic HPLC ..... 315
I.3.1.1. Method A ..... 315
I.3.1.2. Method B ..... 315
I.3.1.3. Method C ..... 315
I.3.2. Prep HPLC ..... 316
I.3.2.1. Method D ..... 316
I.3.2.2. Method E ..... 316
I.3.3. SFC – Method F ..... 316
I.4. General procedure ..... 316
I.4.1. Sonogashira Cross-coupling reaction – Procedure A ..... 316
I.4.2. Mesyl activation – Procedure B ..... 316
I.4.3. Tosyl activation – Procedure C ..... 317
I.4.4. Nucleophilic substitution – Procedure D ..... 317
I.4.5. Hydrogenation – Procedure E ..... 317
I.4.6. Aldehyde generation (protection -reduction- deprotection) – Procedure F ..... 317
I.4.7. Oxime generation – Procedure G ..... 318
I.5. Methyl 3-hydroxypicolinate - 8 ..... 318
I.6. Methyl 6-bromo-3-hydroxypicolinate - 9a ..... 319
I.7. Methyl 3-(benzyloxy)-6-bromopicolinate - 4a ..... 319
I.8. 6,7-dimethoxy-1-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline -PIQ ..... 320
I.9. Activated alkyne alcohols ..... 320
I.9.1. Mesylates ..... 320
I.9.1.1. Pent-4-yn-1-yl methanesulfonate – 60a ..... 320
I.9.1.2. But-3-yn-1-yl 4-methanesulfonate - 60b ..... 321
I.9.2. Tosylates ..... 321
I.9.2.1. Pent-4-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate - 62a ..... 321
I.9.2.2. But-3-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate - 62b ..... 321
I.10. 6,7-dimethoxy-2-(pent-4-yn-1-yl)-1-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline - 10 ..... 322
I.11. methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 11 ..... 322

I.12. Methyl-6-(5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate -11' ..... 323
I.13. 6-(5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde – 12 ..... 324
I.14. GM113 -13 ..... 325
I.15. GM113 chlorhydrate – 13a ..... 325
I.16. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)picolinate - 14a ..... 326
I.17. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)picolinate – 14b ..... 326
I.18. Activated bromopyridine methyl ester alcool ..... 327
I.18.1. methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-((methylsulfonyl)oxy)pent-1-yn-1-yl)picolinate – 57a ..... 327
I.18.2. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-((methylsulfonyl)oxy)but-1-yn-1-yl)picolinate – 57b ..... 327
I.18.3. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(tosyloxy)pent-1-yn-1-yl)picolinate – 59a ..... 328
I.18.4. methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(tosyloxy)but-1-yn-1-yl)picolinate – 59 b ..... 328
I.19. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 15 ..... 329
I.20. Methyl 6-(5-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate - 16 ..... 329
I.21. 6-(5-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde - 17330
I.22. Synthesis of GM415 – 18 ..... 331
I.23. GM415 chlorhydrate– 18a ..... 331
I.24. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-morpholinopent-1-yn-1-yl)picolinate - 19 ..... 332
I.25. Methyl 3-hydroxy-6-(5-morpholinopentyl)picolinate - 20 ..... 332
I.26. 3-hydroxy-6-(5-morpholinopentyl)picolinaldehyde - 21 ..... 333
I.27. Synthesis of RM048 -22 ..... 333
I.28. RM048 chlorhydrate – 22a ..... 334
I.29. RM048 mesylate– 22b ..... 334
I.30. Methyl 6-bromo-3-(methoxymethoxy)picolinate - 4b ..... 335
I.31. Methyl 6-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)-3-(methoxymethoxy)picolinate - 23b ..... 335
I.32. methyl 6-(4-hydroxybutyl)-3-(methoxymethoxy)picolinate - 24b ..... 336
I.33. Methyl 3-(methoxymethoxy)-6-(4-morpholinobutyl)picolinate - 25 ..... 337
I.34. 3-(methoxymethoxy)-6-(4-morpholinobutyl)picolinaldehyde - 26 ..... 337
I.35. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-morpholinobut-1-yn-1-yl)picolinate - 29 ..... 338
I.36. Methyl 3-hydroxy-6-(4-morpholinobutyl)picolinate - 30 ..... 338
I.37. 3-hydroxy-6-(4-morpholinobutyl)picolinaldehyde - 27 ..... 339
I.38. JR595 – 28 ..... 339

I.39. JR595 TFA salt - 28a ..... 340
I.40. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(diethylamino)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 31 ..... 340
I.41. Methyl 6-(5-(diethylamino)pentyl)-3-hydroxypicolinate - 32 ..... 341
I.42. 6-(5-(diethylamino)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde - 33 ..... 341
I.43. CG193 – 34 ..... 342
I.44. CG193 TFA salt – 34a ..... 343
I.45. 4-(5-(5-(benzyloxy)-6-(methoxycarbonyl)pyridin-2-yl)pent-4-yn-1-yl)-4-methylmorpholin-4-ium 4-methylbenzenesulfonate - 19a ..... 343
I.46. 4-(5-(5-hydroxy-6-(methoxycarbonyl)pyridin-2-yl)pentyl)-4-methylmorpholin-4-ium 4-methylbenzenesulfonate - 20a ..... 344
I.47. 2-benzyl-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione - 49 ..... 344
I.48. 2-benzyl-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinoline - 50 ..... 345
I.49. 2,3-Dihydro-1H-benz[de]isoquinoline ..... 345
I.50. 2-benzylisoindoline-1,3-dione - 55 ..... 346
I.51. 2-benzylisoindoline - 56 ..... 346
I.52. Pent-4-ynal - 63 ..... 347
I.53. Alkynyl azide 66a - 66b ..... 348
I.54. Alkynyl amine - 67 ..... 348
I.55. Naphthalene-1,8-diyldimethanol - 69 ..... 349
I.56. 1,8-bis(bromomethyl)naphthalene - 70 ..... 349
I.57. [1,1'-biphenyl]-2,2'-diyldimethanol - 71 ..... 350
I.58. 2,2'-bis(bromomethyl)-1,1'-biphenyl - 72 ..... 350
I.59. 5H-dibenzo[a,d][7]annulene - 73 ..... 351
I.60. 2-(pent-4-yn-1-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinoline - 63 ..... 351
I.61. 2-(but-3-yn-1-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinoline - 76 ..... 352
I.62. 6-(but-3-yn-1-yl)-6,7-dihydro-5H-dibenzo[c,e]azepine - 77 ..... 352
I.63. 6-(pent-4-yn-1-yl)-6,7-dihydro-5H-dibenzo[c,e]azepine - 78 ..... 353
I.64. Methyl 6-(4-(1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)but-1-yn-1-yl)-3-(benzyloxy)picolinate - 79 ..... 353
I.65. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(5,7-dihydro-6H-dibenzo[c,e]azepin-6-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate ..... 354
I.66. Methyl 6-(5-(5,7-dihydro-6H-dibenzo[c,e]azepin-6-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate ..... 355
I.67. 3-(benzyloxy)-6-bromopicolinaldehyde - 84 ..... 355
I.68. 3-(benzyloxy)-6-bromo-2-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridine - 85 ..... 356
I.69. 1-(but-3-yn-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline - 95 ..... 356
I.70. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(3,4-dihydroquinolin-1(2H)-yl)but-1-yn-1-yl)picolinate – 99 ..... 357

I.71. methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(3,4-dihydroquinolin-1(2H)-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 100 ..... 357
I.72. Methyl 6-(5-(3,4-dihydroquinolin-1(2H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate -101 ..... 358
I.73. 6-(5-(3,4-dihydroquinolin-1(2H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde - 102 ..... 359
I.74. 6-(5-(3,4-dihydroquinolin-1(2H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde oxime – 93 (AB-392) .. 360
I.75. 2-(but-3-yn-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline -104 ..... 360
I.76. methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)but-1-yn-1-yl)picolinate -105 .... 361
I.77. Methyl 6-(4-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)butyl)-3-hydroxypicolinate - 106 ..... 361
I.78. 6-(4-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)butyl)-3-hydroxypicolinaldehyde – 107 ..... 362
I.79. AB558 - 90..... 363
I.80. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 108. 363
I.81. Methyl 6-(5-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate - 109 ..... 364
I.82. 6-(5-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde - 110..... 364
I.83. AB746 - 91..... 365
I.84. Methyl 6-(5-(azepan-1-yl)pent-1-yn-1-yl)-3-(benzyloxy)picolinate – 121..... 366
I.85. methyl 6-(5-(azepan-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate - 122 ..... 366
I.86. 6-(5-(azepan-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde - 123 ..... 367
I.87. AB152 – 112 & 112a ..... 368
I.88. Methyl 6-(4-(azocan-1-yl)but-1-yn-1-yl)-3-(benzyloxy)picolinate- 125..... 369
I.89. Methyl 6-(4-(azocan-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinate -126..... 369
I.90. 6-(4-(azocan-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinaldehyde -127..... 370
I.91. Methyl 6-(5-(azocan-1-yl)pent-1-yn-1-yl)-3-(benzyloxy)picolinate - 128..... 371
I.92. Methyl 6-(5-(azocan-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate -129 ..... 371
I.93. AB-436 - 114 ..... 372
I.94. *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*-(4-piperidyl)amine - 132 ..... 373
I.95. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)piperidin-1-yl)but-1-yn-1-yl)picolinate - 133 ..... 374
I.96. methyl 6-(4-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)piperidin-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinate ..... 374
I.97. tert-butyl (1-(4-(6-formyl-5-hydroxypyridin-2-yl)butyl)piperidin-4-yl)carbamate -135..... 375
I.98. AB-740 – 115..... 376
I.99. methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)piperidin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 136 ..... 376
I.100. methyl 6-(5-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)piperidin-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate - 137 ..... 377
I.101. tert-butyl (1-(5-(6-formyl-5-hydroxypyridin-2-yl)pentyl)piperidin-4-yl)carbamate - 138 ..... 377
I.102. AB-737 - 116..... 378

I.103. methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)piperidin-1-yl)but-1-yn-1-yl)picolinate - 140 ..... 379
I.104. methyl 6-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)piperidin-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinate ..... 379
I.105. tert-butyl (1-(4-(6-formyl-5-hydroxypyridin-2-yl)butyl)piperidin-3-yl)carbamate - 142 ..... 380
I.106. AB-738 - 117 ..... 380
I.107. methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)piperidin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate -143 ..... 381
I.108. tert-butyl (1-(4-(6-formyl-5-hydroxypyridin-2-yl)butyl)piperidin-3-yl)carbamate - 144 ..... 381
I.109. tert-butyl (1-(5-(6-formyl-5-hydroxypyridin-2-yl)pentyl)piperidin-3-yl)carbamate - 145 ..... 382
I.110. AB739 - 118 ..... 382
I.111. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)but-1-yn-1-yl)picolinate - 160 ..... 383
I.112. methyl 3-hydroxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)picolinate - 161 ..... 383
I.113. 3-hydroxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)picolinaldehyde -162 ..... 384
I.114. 3-hydroxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)picolinaldehyde oxime – AB639 ..... 384
I.115. methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(4-methylpiperazin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 163 ..... 385
I.116. methyl 3-hydroxy-6-(5-(4-methylpiperazin-1-yl)pentyl)picolinate - 164 ..... 385
I.117. 3-hydroxy-6-(5-(4-methylpiperazin-1-yl)pentyl)picolinaldehyde - 165 ..... 386
I.118. 3-hydroxy-6-(5-(4-methylpiperazin-1-yl)pentyl)picolinaldehyde oxime - AB-069 ..... 386
I.119. 3-hydroxy-6-(5-(4-methylpiperazin-1-yl)pentyl)picolinaldehyde oxime hydrochloride - AB-069 HCl ..... 387
I.120. methyl 6-(4-(4-ethylpiperazin-1-yl)butyl)-3-(methoxymethoxy)picolinate -166 ..... 387
I.121. Methyl 6-(4-(4-ethylpiperazin-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinate - 167 ..... 388
I.122. AB588 - 148 ..... 388
I.123. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(4-ethylpiperazin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 168 ..... 389
I.124. Methyl 6-(5-(4-ethylpiperazin-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate - 169 ..... 389
I.125. AB-557 - 149 ..... 390
I.126. 1-(but-3-yn-1-yl)-4-phenylpiperazine - 170 ..... 390
I.127. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(4-phenylpiperazin-1-yl)but-1-yn-1-yl)picolinate - 171 ..... 391
I.128. methyl 3-hydroxy-6-(4-(4-phenylpiperazin-1-yl)butyl)picolinate - 172 ..... 391
I.129. 3-hydroxy-6-(4-(4-phenylpiperazin-1-yl)butyl)picolinaldehyde – 173 ..... 392
I.130. AB277 - 150 ..... 392
I.131. AB745 – 150a ..... 393
I.132. 1-(pent-4-yn-1-yl)-4-phenylpiperazine -174 ..... 393
I.133. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(4-phenylpiperazin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 175 ..... 394
I.134. methyl 3-hydroxy-6-(5-(4-phenylpiperazin-1-yl)pentyl)picolinate -176 ..... 394

I.135. 3-hydroxy-6-(5-(4-phenylpiperazin-1-yl)pentyl)picolinaldehyde - 177 ..... 395
I.136. AB269- 151 ..... 395
I.137. AB-744 – 151a ..... 396
I.138. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(4-benzylpiperazin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 173 ..... 396
I.139. Methyl 6-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)-3-(methoxymethoxy)picolinate – 23a ..... 397
I.140. Methyl 6-(5-hydroxypentyl)-3-(methoxymethoxy)picolinate – 24a ..... 397
I.141. Methyl 6-(5-(4-benzylpiperazin-1-yl)pentyl)-3-(methoxymethoxy)picolinate - 179 ..... 398
I.142. Methyl 6-(5-(4-benzylpiperazin-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate - 180 ..... 398
I.143. 6-(5-(4-benzylpiperazin-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde - 181 ..... 399
I.144. AB-153 – 153 ..... 399
I.145. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(4-benzylpiperazin-1-yl)but-1-yn-1-yl)picolinate -152 ..... 400
I.146. Methyl 6-(4-(4-benzylpiperazin-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinate -183 ..... 400
I.147. 6-(4-(4-benzylpiperazin-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinaldehyde -184 ..... 401
I.148. AB641 – 152 ..... 401
I.149. Methyl 6-(4-(4-benzhydrylpiperazin-1-yl)but-1-yn-1-yl)-3-(benzyloxy)picolinate - 185 ..... 402
I.150. methyl 6-(4-(4-benzhydrylpiperazin-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinate - 186 ..... 402
I.151. 6-(4-(4-benzhydrylpiperazin-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinaldehyde - 187 ..... 403
I.152. AB643 - 154 ..... 403
I.153. Methyl 6-(5-(4-benzhydrylpiperazin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)-3-(benzyloxy)picolinate - 188 ..... 404
I.154. methyl 6-(5-(4-benzhydrylpiperazin-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate - 189 ..... 404
I.155. 6-(5-(4-benzhydrylpiperazin-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde - 190 ..... 405
I.156. AB555 -155 ..... 405
I.157. Methyl 3-(methoxymethoxy)-6-(4-(4-(pyridin-2-yl)piperazin-1-yl)butyl)picolinate - 191 ..... 406
I.158. Methyl 3-hydroxy-6-(4-(4-(pyridin-2-yl)piperazin-1-yl)butyl)picolinate -192 ..... 406
I.159. AB589 - 156 ..... 407
I.160. methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(4-(pyridin-2-yl)piperazin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 193 ..... 407
I.161. methyl 3-hydroxy-6-(5-(4-(pyridin-2-yl)piperazin-1-yl)pentyl)picolinate -194 ..... 408
I.162. 3-hydroxy-6-(5-(4-(pyridin-2-yl)piperazin-1-yl)pentyl)picolinaldehyde - 195 ..... 408
I.163. AB451- 157 ..... 409
I.164. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)but-1-yn-1-yl)picolinate - 196. 409
I.165. Methyl 3-hydroxy-6-(4-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)butyl)picolinate - 197 ..... 410
I.166. 3-Hydroxy-6-(4-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)butyl)picolinaldehyde - 198 ..... 410
I.167. AB647 - 158 ..... 411
I.168. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 199411
I.169. Methyl 3-hydroxy-6-(5-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)pentyl)picolinate - 200 ..... 412

I.170. 3-Hydroxy-6-(5-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)pentyl)picolinaldehyde - 201 ..... 412
I.171. AB508 - 159 ..... 413
I.172. 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-$\alpha$-D-glucopyranosyl bromide - 205 ..... 413
I.173. 4-(5-(benzyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin-2-yl)but-3-yn-1-ol - 215 ..... 414
I.174. 4-(1-(4-(5-(benzyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin-2-yl)but-3-yn-1-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butan-1-ol - 223 ..... 414
I.175. Molecule 224 ..... 415
I.176. Molecule 225 ..... 416
I.177. Molecule 226 ..... 417
I.178. Molecule 227 ..... 418
I.179. PW208 ..... 418
I.180. 1,5-dibromonaphthalene - 232 ..... 419
I.181. tert-butyl(pent-4-yn-1-yloxy)diphenylsilane - 233 ..... 419
I.182. 5-(5-bromonaphthalen-1-yl)pent-4-yn-1-ol - 234 ..... 420
I.183. ((5-(5-bromonaphthalen-1-yl)pent-4-yn-1-yl)oxy)(tert-butyl)diphenylsilane - 235 ..... 420
I.184. 1-bromo-5-nitronaphthalene - 238 ..... 421
I.185. tert-butyl((5-(5-nitronaphthalen-1-yl)pent-4-yn-1-yl)oxy)diphenylsilane - 239 ..... 421
I.186. 5-(5-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)pent-1-yn-1-yl)naphthalen-1-amine - 240 ..... 422
I.187. Compound 243 ..... 422
I.188. Compound 244 ..... 423
I.189. Compound 245 ..... 423
I.190. 4-bromobutan-1-ol - 257 ..... 424
I.191. (4-bromobutoxy)(tert-butyl)diphenylsilane ..... 424
I.192. Methyl 7-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)-3-oxoheptanoate - 258 ..... 425
I.193. Methyl 5-(4-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)butyl)-1,2,3-thiadiazole-4-carboxylate - 262 ..... 425
I.194. Ethyl 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-carboxylate - 266 ..... 426
I.195. Ethyl 5-bromo-1,3,4-thiadiazole-2-carboxylate - 267 ..... 426
I.196. Ethyl 5-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)-1,3,4-thiadiazole-2-carboxylate - 268 ..... 427
I.197. Ethyl 5-(5-(tosyloxy)pent-1-yn-1-yl)-1,3,4-thiadiazole-2-carboxylate - 269 ..... 427
I.198. Ethyl 5-(5-morpholinopent-1-yn-1-yl)-1,3,4-thiadiazole-2-carboxylate - 270 ..... 428
I.199. Nucleophilic substitution on Ethyl bromovalerate ..... 428
I.199.1. Ethyl 5-morpholinopentanoate - 278 ..... 428
I.199.2. ethyl 5-(4-benzylpiperazin-1-yl)pentanoate - 279 ..... 429
I.199.3. ethyl 5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentanoate - 280 ..... 429
I.200. Acyl hydrazine generation ..... 429

I.200.1. 5-morpholinopentanehydrazide - 281 ..... 430
I.200.2. 5-(4-benzylpiperazin-1-yl)pentanehydrazide - 282 ..... 430
I.200.3. 5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentanehydrazide - 283 ..... 431
I.201. tert-butyldiphenylsilyl 2-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)acetate - 286 ..... 431
I.202. Ethyl 2-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)acetate - 287 ..... 432
I.203. 2-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)acetic acid - 273 ..... 432
I.204. Acyl hydrazine peptide coupling ..... 433
I.204.1. 5-(4-benzylpiperazin-1-yl)-N'-(2-methoxyacetyl)pentanehydrazide - 288 ..... 433
I.204.2. 5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)-N'-(2-methoxyacetyl)pentane hydrazide - 289 ..... 433
I.204.3. N'-(2-(benzyloxy)acetyl)-5-(4-benzylpiperazin-1-yl)pentanehydrazide - 294 ..... 434
I.204.4. N'-(2-(benzyloxy)acetyl)-5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentane hydrazide - 295 ..... 434
I.205. Thiadiazole cyclization ..... 435
I.205.1. 2-(4-(4-benzylpiperazin-1-yl)butyl)-5-(methoxymethyl)-1,3,4-thiadiazole – 290 ..... 435
I.205.2. 2-(4-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)butyl)-5-(methoxymethyl)-1,3,4-thiadiazole - 291 ..... 435
I.205.3. 2-((benzyloxy)methyl)-5-(4-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)butyl)-1,3,4-thiadiazole - 296 ..... 436
I.206. AB359 - 302 ..... 436

II. Biochemistry ..... 437
II.1. In vitro evaluations ..... 437
II.1.1. PAMPA-BBB (Dr Pérez) ..... 437
II.1.2. Reversible inhibition and reactivation measurements (Dr Kovarik) ..... 437
II.1.3. In vitro inhibition and reactivation (Dr Dias) ..... 438
II.1.3.1. Inhibition of hAChE and hBChE by OPNAs ..... 438
II.1.3.2. IC50 measurements ..... 439
II.1.3.3. Reactivation of hAChE and hBChE inhibited by OPNAs ..... 439
II.1.4. RnAChE -α-7 (Dr Araoz) ..... 440
II.1.4.1. Voltage-Clamp Recording on Ovocytes. ..... 440
II.1.4.2. Concentration - Inhibition Analysis of ACh Currents. ..... 440
II.1.5. Crystallization and structure determination ..... 440
II.2. Ex vivo scavenging assay (Dr Kovarik) ..... 441
II.3. In vivo (Dr Guilhem Calas) ..... 441

II.3.1. Inhibition of hAChE by VX ..... 441
II.3.2. Plasma test protocol ..... 442
II.3.2.1. Standard reactivation curves ..... 442
II.3.2.2. Blood samples ..... 442
II.3.3. LD50 estimation using the up-and-down method ..... 443

# I. Chemistry

## I.1. Chemical and reagents

Flash-column chromatography purifications were performed either on Geduran® Si 60 silica gel (40-63 µm) from Merck Millipore or Macherey-Nagel and/or automated flash purification system (Biotage, Si-HP – 15µm). TLC were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminium sheets. The spots were visualized by illumination with a UV lamp (L = 254/365 nm) and/or staining with KMnO4, phosphomolybdic acid, ninhydrin, Dragendorf reagent or 2,4-DNP. Unless otherwise need, all chemicals were used as received from commercial sources without further purification. All solvents were dried by standard procedures (1,2-DCE: distillation over CaH; THF: distillation over sodium benzophenone, *N*,*N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) and triethylamine: distillation over KOH and storage over BaO or KOH. MeCN, THF, toluene, dichloromethane and $Et_2O$ are dried over alumina cartridges using a solvent purification system MBRAUN MB SPS-800®. HPLC gradient-grade acetonitrile (MeCN) and Methanol (MeOH) were purchased from VWR. Mobile phases for Preparative-HPLC were prepared with ultrapure water (18.2 MΩ.cm) provides by MilliQ system (Merck Millipore) or PURELAB® flex 1 (Elga Veolia).

## I.2. Instruments

$^1H$ and $^{13}C$ NMR spectra were recorded on a Bruker DPX 300 spectrometer (Bruker, Wissembourg, France). Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) from $CDCl_3$ ($\delta_H$ = 7.26, $\delta_C$ = 77.16), $CD_3OD$ ($\delta_H$ = 3.31, $\delta_C$ = 49.00), DMSO-$d_6$ ($\delta_H$ = 2.50, $\delta_C$ = 39.52), $CD_2Cl_2$ ($\delta_H$ = 5.32, $\delta_C$ = 53.84) and $D_2O$ ($\delta_H$ = 4.79). Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm), and the residual solvent peak was used for calibration. *J* values are expressed in Hz. Internal reference $PhCF_3$ was used for characterisation of TFA salts. Purification steps by semi-preparative HPLC were performed using automated flash purification (puriflash® 430, PF-15C18HP/120G) with aq. 0.1% TFA as aq. mobile phase [0% MeCN (5 min), linear gradient from 0 to 25% (30 min) MeCN, then linear gradient from 25 to 100% (30 min) MeCN, 100% MeCN (15 min)] at a flow rate of 35.0 $mL.min^{-1}$. Dual UV-detection was achieved at 254 and 330 nm. Reverse phase using an automated flash purification system (Biotage, Interchim). Analytical RP-HPLC was performed on a Thermo Scientific Surveyor Plus instrument equipped with a PDA detector. Melting points were measured with a Stuart SMP30 melting-point apparatus. Mass spectra were obtained with a Finnigan LCQ Advantage MAX (ion trap) apparatus equipped with an electrospray source. All analyses were performed in the positive or negative mode. TLC-MS (low resolution) was achieved using an Acquity QDa performance (ESI+, Waters) coupled with TLC interface Camay (Waters) with an ISM pump (isocratic, 180µL/min-1, ethanol/ formic acid as eluent, 100/0.1, v/v).

High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded either with a Thermo LTQ Orbitrap XL apparatus equipped with an ESI source. Microanalyses were carried out on Carlo-Erba 1106.

## I.3. Methods

Several chromatographic systems were used for the analytical experiments and purification steps (by Preparative HPLC or automated flash purification system).

### I.3.1. Analytic HPLC

#### I.3.1.1. Method A

Analytic HPLC (Thermo Hypersil GOLD C18 column, 5 µm, 2.1 × 100 mm) with MeOH and trifluoroacetic acid (aq. 0.1%; pH 2.0) as eluents [100% aq. TFA (5 min), then linear gradient from 0% to 100% (45 min) MeOH, then 100% MeOH (5 min)] at a flow rate of 0.25 mL/min. UV/Vis detection (220-400 nm) was achieved with "Max Plot" (i.e., chromatogram at absorbance maximum for each compound) mode.

#### I.3.1.2. Method B

Analytic HPLC (Thermo Hypersil GOLD C18 column, 5 µm, 2.1 × 100 mm) with MeCN and trifluoroacetic acid (aq. 0.1%; pH 2.0) as eluents [100% aq. TFA (5 min), then linear gradient from 0% to 100% (45 min) MeCN, then 100% MeCN (5 min)] at a flow rate of 0.25 mL/min. UV/Vis detection (220-700 nm) was achieved with "Max Plot".

#### I.3.1.3. Method C

Analytic HPLC (Thermo Hypersil GOLD C18 column, 5 µm, 2.1 × 100 mm) with MeCN and water as eluents [100% water (5 min), then linear gradient from 0% to 100% (45 min) MeCN, then 100% MeCN (5 min)] at a flow rate of 0.25 mL/min. UV/Vis detection (220-700 nm) was achieved with "Max Plot" (i.e., chromatogram at absorbance maximum for each compound) mode.

### I.3.2. Prep HPLC

#### I.3.2.1. Method D

Automated flash purification (Biotage, Interchim - Puriflash® 430, PF-15C18HP/120G) with aq. 0.1% TFA as aq. mobile phase [0% MeCN (5 min), then linear gradient from 0 to 50% (70 min) MeCN] at a flow rate of 35.0 mL/min. Dual UV-detection was achieved at 254 and 330 nm.

#### I.3.2.2. Method E

Semi-preparative HPLC (Thermo scientific Syncronis C18 250*21mm, 5µm) with isocratic mobile phase (water/MeCN [80/20]), at a flow rate of 19 ml/min. UV-detection was achieved at 290 nm.

### I.3.3. SFC – Method F

Supercritic flash chromatography (Princeton SFC-60A, 2 Ethylpyridine, 250*10 mm, 5 µm) was performed with $CO_2$ +10% MeOH as mobile phase at 120 bars and at flow rate of 15.0 mL/min. UV-detection was achieved at 271 nm.

## I.4. General procedure

### I.4.1. Sonogashira Cross-coupling reaction – Procedure A

To an argon degassed solution of bromo aryl (1 equiv.) in dry dichloromethane/triethylamine (2/1, v/v, 0.1M) and alkyne (0.9-0.9-1.1 equiv) were poured $Pd(PPh_3)_4$ (0.05 equiv.) CuI (0.1 equiv.) and the solution was stirred under argon at rt overnight in absence of light. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography (Petroleum ether/EtOAc) to give the desired cross-coupling product.

### I.4.2. Mesyl activation – Procedure B

Primary alcohol (1 equiv.) was dissolved in dry dichloromethane (0.1 M) and the resulting mixture was cooled down to 0°C. triethylamine (3 equiv.) followed by Mesyl chloride (1.5 equiv.) were added dropwise in this order. The resulting mixture was stirred 1 to 3 hours at rt. The crude mixture is dilluted in dichloromethane, washed with water and brine. Organic layer was dried over magnesium sulfate and concentated under reduced pressure. The mesylate was directly used in following step whitout further purification.

### I.4.3. Tosyl activation – Procedure C

Primary alcohol (1 equiv.) was dissolved in dry dichloromethane (0.1 M) under argon atmosphere and the resulting mixture was cooled down to 0 °C. Triethylamine (3 equiv.) followed by tosyl chloride (1.5 equiv.) were added in this order. The resulting mixture was stirred overnight at rt. The crude mixture was concentrated under reduced pressure and purified using flash chromatography (Petroleum ether/EtOAc).

### I.4.4. Nucleophilic substitution – Procedure D

Activated alcohol (1.0-1.1 equiv) was dissolved in dry MeCN (0.1 M) under argon atmosphere and the resulting mixture was cooled down to 0°C. Amine (1 equiv.) followed by potassium carbonate (1.5 equiv.) were added in this order. The resulting heterogenous mixture was reflux overnight. Salt were removed by filtration and solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified using flash chromatography on silica gel.

### I.4.5. Hydrogenation – Procedure E

Dry benzyl ether was dissolved in MeOH or EtOAc (0.05 M) and the homogenous solution was degased 20 min using argon. $Pd(OH)_2/C$ or Pd/C (20% w/w) was added. After 10 min of degasing using argon, baloon of hydrogene gas was bubbled and the mixture was stirred under hydrogen atmosphere at rt until completion. The crude mixture was filtered over celite®, solvents were removed under vacuum. If needed, the crude can be purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH).

### I.4.6. Aldehyde generation (protection -reduction- deprotection) – Procedure F

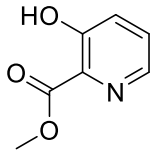
Unprotected 3-hydroxypyridine-2-methyl ester was dissolved in dry dichloromethane (0.1 M), then triethylamine (2.2 equiv) and TBSOTf (1.1equiv) were added dropwise at 0 °C. The mixture was stirred at rt until completion (30 min to 3 h). Resulting mixture was diluted in dichloromethane, washed with water, brine and dried under sodium sulfate. Dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyle ether that was dissolved in dry dichloromethane (0.1 M) and cooled down to -78 °C. DIBAL-H (n equiv = 2 + heteroatome number on ligand*0.5) was added dropwised and the mixture was stirred at -78 °C during 15 min. Methanol was added and the crude mixture was heat up to rt. After dilution with dichloromethane, the organic layer was washed using aqueous NaOH (1 M), water and brine. After dring under sodium sulfate or magnesium sulfate, dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyl ether aldehyde used without further purification in the next step. Crude product was dissolved in dry THF and cooled down to 0 °C. TBAF (1.05- 1.1 equiv, 1.0 M in THF) was added

dropwise and the mixture was stirred at 0 °C during 30 min. THF was removed under vacuum and the crude product was purified by flash chromatography on silica gel.

### I.4.7. Oxime generation – Procedure G

Aldehyde was dissolved in dry MeOH under argon. Hydroxylamine hydrochloride (1.1-3 equiv) and sodium acetate (1.2-3.1 equiv) were added and the mixture was stirred at rt until completion (3-4 h). Methanol was removed under vacuum and the crude oxime was purified using either normal or reverse phase chromatography.

## I.5. Methyl 3-hydroxypicolinate - 8

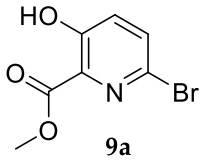



**8**

Chemical Formula: $C_7H_7NO_3$
Exact Mass: 153,04
Molecular Weight: 153,14

To a suspension of 3-hydroxypicolinic acid (10 g, 72 mmol, 1 equiv) in methanol (150 mL, 0.5 M) was added dropwise at 0 °C concentrated sulfuric acid (12 mL, 216 mmol, 3 equiv.). The obtained solution was stirred at reflux 6 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The pH was adjusted at 8.5 with an aqueous solution of saturated $NaHCO_3$ and solid $NaHCO_3$. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure to give **8** as a white solid (10.9 g, 99%). *Rf* = 0.3 (Petroleum ether/EtOAc 1/1, v/v). m.p. = 74 °C. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 4.06 (s, 3H, Me), 7.34 (dd, *J* = 3.9, 8.4 Hz, 1H), 7.38 (dd, *J* = 1.5, 8.4 Hz, 1H), 8.38 (dd, *J* = 1.5, 3.9 Hz, 1H), 10.64 (s, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 53.2, 126.3, 129.8, 130.2, 141.6, 158.9, 169.9. MS (ESI+): *m/z* (%): 154 (100) $[M+H]^+$.

### I.6. Methyl 6-bromo-3-hydroxypicolinate - 9a

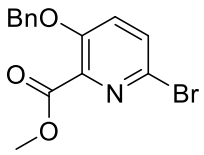



**9a**

Chemical Formula: $C_7H_6BrNO_3$
Exact Mass: 230,95
Molecular Weight: 232,03

To a solution of methyl 3-hydroxypicolinate **8** (10 g, 65.36 mmol) in osmosed water (0.1 M) with crushed ice at 0 °C, was added portionwise bromine (4 x 1.02 mL every 30 min, 78.4 mmol, 1.2 equiv) under vigorous stirring. The mixture was vigorously stirred at 0 °C for 1-2 h. The solution was extracted by dichloromethane and the combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure to give **9a** as a white-off solid (15.08 g, 99%). *Rf* = 0.3 (Petroleum ether/EtOAc 6/4, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 4.07 (s, 3H), 7.29 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 0.3, 8.7 Hz, 1H), 10.72 (br s, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 53.5, 129.5, 130.0, 130.7, 134.5, 158.5, 169.1. MS (ESI+): *m*/*z* (%): 234 (85) and 232 (100) $[M+H]^+$.

### I.7. Methyl 3-(benzyloxy)-6-bromopicolinate - 4a

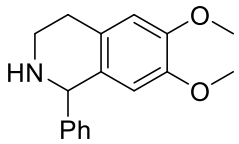



**4a**

Chemical Formula:
$C_{14}H_{12}BrNO_3$
Exact Mass: 321,00
Molecular Weight: 322,16

To a solution of methyl 3-hydroxy-6-bromopicolinate **9a** (11.6 g, 49.8 mmol), in acetone (200 mL, 0.25 M) was added successively potassium carbonate (21 g, 149 mmol, 3 equiv) and benzyl bromide (12 mL, 100 mmol, 2.0 equiv). The heterogeneous reaction mixture was reflux overnight. Salts were removed by filtration and the crude product was concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc 95/5 to 60/40, v/v) afforded the desired product **4a** as a white solid (15.2 g, 95%). *Rf* = 0.4 (Petroleum ether/EtOAc 8/2, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 3.97 (s, 3H), 5.21 (s, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.47-7.34 (m, 5H), 7.51 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 52.9, 71.2, 125.0, 126.9, 128.4, 128.8, 131.2, 131.4, 135.2, 139.8, 154.0, 164.0. MS (ESI+): *m*/*z* (%): 324 (85) and 322 (100) $[M+H]^+$.

## I.8. 6,7-dimethoxy-1-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline -PIQ



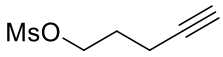

Chemical Formula: $C_{17}H_{19}NO_2$
Exact Mass: 269,14
Molecular Weight: 269,34

2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethanamine (10 g, 55.2 mmol), benzaldehyde (6.4 g, 61 mmol, 1.1 equiv.) and magnesium sulfate were added in absolute ethanol (200 mL) and the resulting mixture was refluxed for 4 h. After cooling at rt, the mixture was filtrated through celite® and the solvent was removed under vacuum. The crude residue was then added to TFA (65 mL) and the reaction mixture was refluxed for 3 h. TFA was evaporated with a water pump and the residue was dissolved in aqueous saturated solution of potassium carbonate. The aqueous layer was extracted five times with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine and concentrated under reduced pressure. A rapid filtration on silica gel with EtOAc as eluant afforded the desired compound (11.2 g, 75%) as yellow solid. $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 1.82 (br s), 2.71-2.79 (m, 1H), 2.88-3.10 (m, 2H), 3.18-3.25 (m, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 5.05 (s, 1H), 6.24 (s, 1H,), 6.63 (s, 1H), 7.24-7.33 (m, 5H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 29.1, 41.7, 55.8, 61.3, 110.9, 111.4, 127.4, 127.5, 128.4, 128.9, 129.6, 144.6, 147.1, 147.6. MS (ESI+): *m/z* (%): 270 (100) $[M+H]^+$.

## I.9. Activated alkyne alcohols

### I.9.1. Mesylates

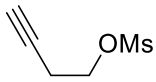
#### I.9.1.1. Pent-4-yn-1-yl methanesulfonate – 60a




Chemical Formula: $C_6H_{10}O_3S$
Exact Mass: 162,04
Molecular Weight: 162,20

Pent-4-yn-1-yl methanesulfonate was synthetized using **Procedure A** on pent-4-yn-1-ol and was used without purification (colorless liquid, yield: quant.). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 4.36 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.37 (td, J = 6.8, 2.7 Hz, 2H), 2.08 – 1.85 (m, 3H). NMR spectra are in accordance with those reported in literature.[557]

### I.9.1.2. But-3-yn-1-yl 4-methanesulfonate - 60b

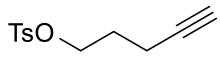



Chemical Formula: $C_5H_8O_3S$
Exact Mass: 148,02
Molecular Weight: 148,18

Pent-4-yn-1-yl methanesulfonate was synthetized using **Procedure A** on but-3-yn-1-ol and was used without purification (colorless liquid, yield: quant.). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 4.36 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.37 (td, J = 6.8, 2.7 Hz, 2H), 2.08 – 1.85 [558](m, 3H). NMR data are in accordance with those reported in literature.[558]

## I.9.2. Tosylates

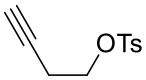
### I.9.2.1. Pent-4-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate - 62a




Chemical Formula: $C_{12}H_{14}O_3S$
Exact Mass: 238,07
Molecular Weight: 238,30

Pent-4-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate was synthetized using **Procedure B** on pent-4-yn-1-ol and was isolated using Silica gel purification (Petroleum ether/EtOAc, 90/10, v/v) as a colorless liquid (yield: 96-100%). *Rf* = 0.33 (Petroleum ether/EtOAc 9/1, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.80 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.15 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.26 (td, *J* = 6.9, 2.6 Hz, 2H), 1.95 – 1.77 (m, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 145.1, 132.9, 130.0, 128.1, 78.5, 70.5, 67.5, 21.8, 19.5. NMR data are in accordance with those reported in literature.[558]

### I.9.2.2. But-3-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate - 62b

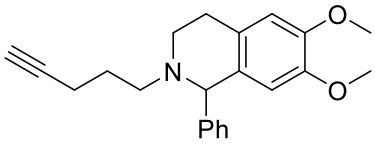



Chemical Formula: $C_{11}H_{12}O_3S$
Exact Mass: 224,05
Molecular Weight: 224,27

But-3-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate was synthetized following **Procedure B** using but-3-yn-1-ol and **62b** was isolated after purification by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 90/10, v/v) as a colorless liquid (***quant.***). *Rf* = 0.4 (Petroleum ether/EtOAc 9/1, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.80 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.10 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.55 (td, *J* = 7.1, 2.7

Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 1.97 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 144.9, 133.0, 129.9, 128.1, 82.2, 69.6, 68.8, 27.8, 21.8, 14.8. NMR data are in accordance with those reported in literature.[559]

### I.10. 6,7-dimethoxy-2-(pent-4-yn-1-yl)-1-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline - 10

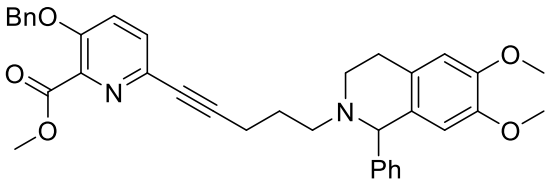



**10**

Chemical Formula: $C_{22}H_{25}NO_2$
Exact Mass: 335,19
Molecular Weight: 335,45

A mixture of 6,7-dimethoxy-1-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (1.08 g, 4.0 mmol), 4-pentynyl-4-methylbenzenesulfonate (1 g, 1.1 equiv.) and potassium carbonate (1.7 g, 3 equiv.) in dry MeCN (41 mL) was refluxed for 15 h. The crude mixture was filtered, concentrated under reduced pressure and purified by chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc 8/2, v/v) to give **10** (980 mg, 70 %) as a white solid. *Rf* = 0.3 (cyclohexane/EtOAc 8/2, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 1.65 – 1.80 (m, 2H), 1.88 (t, J = 2.7 Hz, 1H), 1.97 – 2.10 (m, 1H), 2.18 – 2.31 (m, 1H), 2.37 – 2.46 (m, 1H), 2.53 – 2.65 (m, 2H), 2.78 (dt, J = 4.5, 16.0 Hz, 1H), 2.94 – 3.06 (m, 1H), 3.17 (dt, J = 4.5, 11.5 Hz, 1H), 3.61 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 4.50 (s, 1H), 6.19 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 7.24 – 7.31 (m, 5H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 16.2, 26.1, 28.2, 46.9, 52.9, 55.7, 55.8, 68.1, 68.2, 84.6, 110.7, 111.6, 126.9, 127.1, 128.1, 129.6, 130.1, 144.2, 147.0, 147.3. MS (ESI+): *m/z* (%): 336 (100) $[M+H]^+$ .

### I.11. methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 11



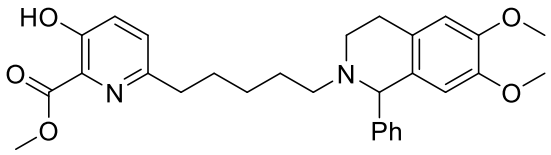

**11**

Chemical Formula: $C_{36}H_{36}N_2O_5$
Exact Mass: 576,26
Molecular Weight: 576,69

To a degassed solution of 6,7-dimethoxy-2-(pent-4-yn-1-yl)-1-phenyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (500 mg, 1.5 mmol) and **4a** (484 mg, 1.0 equiv.) in dichloromethane/triethylamine (2/1, v/v) were added CuI (29 mg, 0.1 equiv.) and $Pd(PPh_3)_4$ (87 mg, 0.05 equiv.). The resulting mixture was stirred at room

temperature overnight under argon atmosphere in absence of light. After concentration under reduced pressure, the residue was purified by flash chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc, 6/4, v/v) to give **11** (647 mg, 75%) as a light brown solid. *Rf* = 0.25 (cyclohexane/EtOAc 6/4, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ= 1.74 – 1.80 (m, 2H), 2.15 – 2.28 (m, 1H), 2.36 – 2.48 (m, 2H), 2.52 – 2.64 (m, 2H), 2.76 (dt, J = 3.9, 15.8 Hz, 1H), 2.92 – 3.05 (m, 1H), 3.15 (dt, J = 5.2, 11.7 Hz, 1H), 3.59 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.48 (s, 1H), 5.20 (s, 2H), 6.16 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 7.15 – 7.28 (m, 5H), 7.30 – 7.46 (m, 7H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 17.1, 25.9, 28.3, 47.0, 52.7, 53.1, 55.7, 55.8, 68.1, 70.7, 79.2, 90.5, 110.8, 111.6, 121.7, 126.9, 126.9, 127.1, 128.1, 128.2, 128.7, 129.5, 130.0, 130.2, 135.5, 135.6, 139.9, 144.2, 146.9, 147.3, 152.8, 164.9. MS (ESI+): *m/z* (%): 577 (100) $[M+H]^+$.

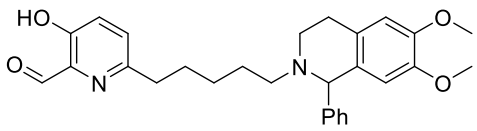
## I.12. Methyl-6-(5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate -11'




Chemical Formula: $C_{29}H_{34}N_2O_5$
Exact Mass: 490,25
Molecular Weight: 490,60

To a solution of **11** (400 mg, 0.69 mmol) in degassed EtOAc (10 mL) was added Pearlman's catalyst (200 mg, 0.2 equiv., 20% Pd, moisture 50%). The solution was bubbled with hydrogene gas and the reaction was stirred at rt under hydrogene gas atmosphere overnight. The mixture was filtrated through celite® and concentrated under reduce pressure to furnish the desired product (310 mg, 92%) as a light brown solid. $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 1.22 – 1.32 (m, 2H), 1.47 – 1.62 (m, 4H), 2.23 – 2.35 (m, 1H), 2.43 – 2.62 (m, 2H), 2.68 – 2.82 (m, 3H), 2.91 – 3.04 (m, 1H), 2.76 (dt, J = 5.1, 11.7 Hz, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 4.03 (s, 3H), 4.49 (s, 1H), 6.17 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 7.21 – 7.30 (m, 7H), 10.55 (br s, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, CDCl3) δ (ppm) 26.6, 27.0, 28.1, 29.9, 37.6, 46.7, 53.2, 53.9, 55.7, 55.8, 67.9, 110.7, 111.6, 126.6, 126.9, 127.0, 128.1, 128.7, 129.2, 129.6, 130.1, 144.3, 147.0, 147.3, 154.2, 157.2, 170.2. MS (ESI+): *m/z* (%): 491 (100) $[M+H]^+$.

## I.13. 6-(5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde – 12

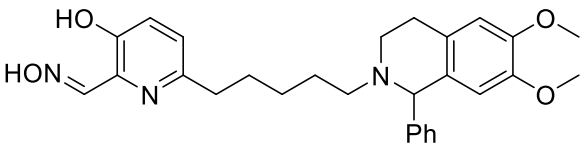



**12**

Chemical Formula: $C_{28}H_{32}N_2O_4$
Exact Mass: 460,24
Molecular Weight: 460,57

To a solution of **11'** (290 mg, 0.60 mmol) in dry dichloromethane (6 mL) were successively added imidazole (122 mg, 3 equiv.) and TBDMSCl (196 mg, 2.2 equiv.). The mixture was stirred at rt for 2 h under argon atmosphere. EtOAc (30 mL) was added and the organic layer was washed with water, dried over magnesium sulfate and concentrated under reduce pressure. To a solution of the resulting residue in dry dichloromethane (6 mL) was added dropwise DIBAL-H (1.2 mL, 1M in dichloromethane, 2 equiv.) at -78 °C. Then, the reaction mixture was stirred at this temperature for 10 min. The reaction was quenched with MeOH (1.2 mL) and the mixture was allowed to warm at room temperature. The organic layer was washed with an aqueous solution of NaOH (1 M), dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. Then, TBAF (660 µL, 1M in THF, 1.1 equiv.) was added at 0 °C to the residue in dry THF (20 mL) and the mixture was stirred for 30 min at this temperature. After concentration under reduce pressure, a flash chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 5/5, v/v) afforded compound **12** (149 mg, 53 %) as a pale-yellow oil. *Rf* = 0.3 (cyclohexane/EtOAc 5/5, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, CDCl3) δ (ppm) 1.20 – 1.33 (m, 2H), 1.47 – 1.66 (m, 4H), 2.25 – 2.33 (m, 1H), 2.45 – 2.60 (m, 2H), 2.69 – 2.79 (m, 3H), 2.90 – 3.02 (m, 1H), 3.13 (dt, J = 5.1, 11.7 Hz, 1H), 3.59 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.47 (s, 1H), 6.16 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 7.18 – 7.30 (m, 7H), 10.00 (s, 1H), 10.64 (br s, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, CDCl3) δ (ppm) 26.6, 26.9, 28.2, 29.6, 37.3, 46.8, 54.0, 55.7, 55.8, 68.0, 110.7, 111.6, 126.3, 126.9, 127.0, 128.1, 129.6, 129.8, 130.2, 135.7, 144.4, 147.0, 147.3, 155.1, 157.0, 198.8. MS (ESI+): *m/z* (%): 461 (100) $[M+H]^+$.

## I.14. GM113 -13

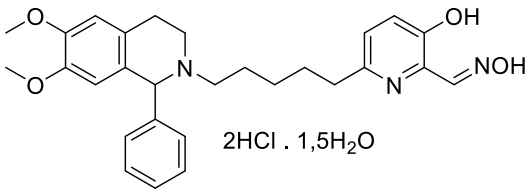



**13**
**GM113**

Chemical Formula: $C_{28}H_{33}N_3O_4$
Exact Mass: 475,25
Molecular Weight: 475,59

To a solution of **12** (76 mg, 0.17 mmol) in absolute EtOH (5 mL) were added successively hydroxylamine hydrochloride (17 mg, 1.5 equiv.) and NaOAc (21 mg, 1.5 equiv.). The mixture was stirred at rt for 1 h under argon atmosphere. After concentration under reduced pressure, the residue was purified by flash chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 5/5, v/v) to give **13** (56 mg, 71%) as a white solid. *Rf* = 0.2 (cyclohexane/EtOAc 5/5, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, CDCl3) δ (ppm) 1.20 – 1.35 (m, 2H), 1.53 – 1.68 (m, 4H), 2.39 – 2.51 (m, 1H), 2.52 – 2.61 (m, 1H), 2.62 – 2.71 (m, 2H), 2.72 – 2.83 (m, 1H), 2.83 – 2.95 (m, 1H), 2.95 – 3.18 (m, 1H), 2.82 (dt, J = 4.9, 16.2 Hz, 1H), 3.59 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.73 (s, 1H), 6.16 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.93 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.10 – 7.29 (m, 5H), 8.36 (s, 1H), 10.74 (br s, 1H), 10.76 (br s, 1H). 13C NMR (75 MHz, CDCl3) δ (ppm) 25.7, 26.9, 29.9, 36.9, 45.9, 53.9, 55.7, 55.8, 67.2, 110.7, 111.4, 123.7, 124.6, 126.0, 127.7, 128.3, 128.4, 130.0, 135.1, 141.5, 147.3, 147.8, 152.5, 152.8, 153.1. MS (ESI+) *m/z* (%): 476 (100) [M+H]+. HRMS (ESI+): calcd. for C28H34N3O4 476.2540; found 476.2549. HPLC (Method A): $t_R$ = 22.7 min (purity = 97.83%).

## I.15. GM113 chlorhydrate – 13a

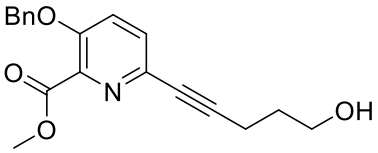



**GM113.HCl**
**(AB-178)**
**13a**

Chemical Formula: $C_{28}H_{38}Cl_2N_3O_{6.5}$
Molecular Weight: 591.53

**GM113** (57 mg, 0.12 mmol) was dissolved in MeOH/dichloromethane (1/9, v/v) and aqueous solution of HCl (1M, 2.0 equiv) was added at 0 °C. The mixture was stirred 30 min at rt and evaporated under vacuum. The resulting solid was dried in a vacuum desiccator under $P_2O_5$ (71 mg, *quant.*). Microanalysis: calculated %N: 7.30, %C58.43, %H 6.65; found %N: 7.02, %C: 58.77, %H: 6.84. HPLC (Method A): $t_R$ = 14.27 min (purity = 97%).

## I.16. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)picolinate - 14a

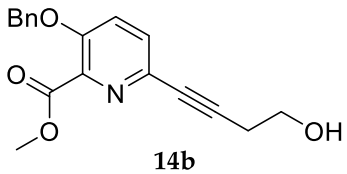



**14a**

Chemical Formula: $C_{19}H_{19}NO_4$
Exact Mass: 325,13
Molecular Weight: 325,36

To a solution of methyl 3-(benzyloxy)-6-bromopicolinate **4a** (3.19 g, 9.90 mmol) in dry dichloromethane (66 mL) and triethylamine (33 mL) was added 4-pentyn-1-ol (650 µL, 9.93 mmol, 1 equiv). The resulting mixture was degassed for 20 min with argon. CuI (200 mg, 1.02 mmol, 0.1 equiv.) and $Pd(PPh_3)_4$ (527 mg, 0.50 mmol, 0.05 equiv.) were then poured and the solution was stirred under argon at rt overnight. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Petroleum ether/EtOAc 7/3 to 3/7, v/v) afforded the desired product **14** as a yellow oil that crystallized upon standing (3.1 g, 96%). *Rf* = 0.33 (Petroleum ether/EtOAc 3/7, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 1.86 (qt, J = 6.4 Hz, 2H), 2.38 (br s, 1H), 2.54 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.78 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 5.20 (s, 2H), 7.30-7.45 (m, 7H). 13C NMR (75 MHz, CDCl3) δ (ppm) 15.9, 31.0, 52.7, 61.4, 70.9, 79.6, 89.8, 121.9, 127.0, 128.3, 128.8, 130.1, 135.4, 135.6, 140.0, 153.0, 164.9. MS (ESI+): *m/z* (%): 673 (100) $[2M + Na]^+$, 348 (95) $[M+Na]^+$ and 326 (100) $[M+H]^+$.

## I.17. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)picolinate – 14b




**14b**

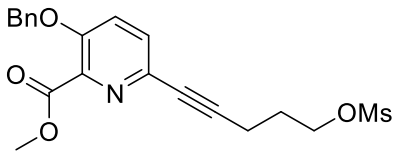
Chemical Formula: $C_{18}H_{17}NO_4$
Exact Mass: 311,12
Molecular Weight: 311,34

To a solution of methyl 3-(benzyloxy)-6-bromopicolinate **4a** (2.0 g, 6.20 mmol, 1 equiv) in dry dichloromethane (53 mL) and triethylamine (27 mL) was added 4-pentyn-1-ol (485 µL, 6.21 mmol, 1 equiv). The resulting mixture was degassed for 20 min with argon. CuI (200 mg, 0.1 equiv.) and $Pd(PPh_3)_4$ (330 mg, 0.05 equiv.) were then poured and the solution was stirred under argon at rt overnight. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (Petroleum ether/EtOAc 7/3 to 3/7, v/v) afforded the desired product **14b** as a yellow oil that crystallized upon standing (1.8 g, 94%). *Rf* = 0.3 (Petroleum ether/EtOAc 4/6, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 2.66 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.00 (br s, 1H), 3.82 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 4.29-4.35

(m, 1H), 5.18 (s, 2H), 7.28-7.44 (m, 7H). 13C NMR (75 MHz, CDCl3) δ (ppm) 23.8, 52.7, 60.7, 70.9, 80.6, 87.4, 121.9, 126.9, 128.3, 128.8, 130.1, 135.0, 135.5, 139.9, 153.2, 164.8. MS (ESI+): *m/z* (%): 312 (100) $[M+H]^+$.

## I.18. Activated bromopyridine methyl ester alcool

### I.18.1. methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-((methylsulfonyl)oxy)pent-1-yn-1-yl)picolinate – 57a

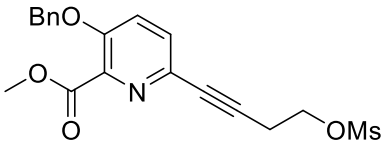



**57a**

Chemical Formula: $C_{20}H_{21}NO_6S$
Exact Mass: 403,11
Molecular Weight: 403,45

Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-((methylsulfonyl)oxy)pent-1-yn-1-yl)picolinate was synthetized following **Procedure A** using **14a** and **57a** was used without further purification in the next step (orangeous oil, yield: *quant.*). Caution: must be used within 12 h. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.46 – 7.26 (m, 7H), 5.20 (s, 2H), 4.39 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), 2.58 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.14 – 1.97 (m, 2H).

### I.18.2. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-((methylsulfonyl)oxy)but-1-yn-1-yl)picolinate – 57b

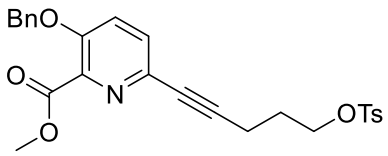



**57b**

Chemical Formula: $C_{19}H_{19}NO_6S$
Exact Mass: 389,09
Molecular Weight: 389,42

Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-((methylsulfonyl)oxy)but-1-yn-1-yl)picolinate was synthetized folowing **Procedure A** using **14b 57b** and was used without purification in the next step (orangeous oil, yield: *quant.*). Caution: must be used within 6 h. *Rf* = 0.5 (dichloromethane/MeOH, 1/1, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.51 – 7.27 (m, 7H), 5.21 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.82 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.69 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.56 (s, 3H).

### I.18.3. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(tosyloxy)pent-1-yn-1-yl)picolinate – 59a

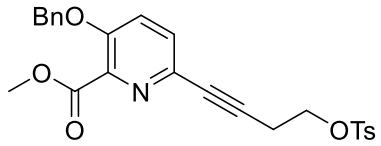



**59a**

Chemical Formula: $C_{26}H_{25}NO_6S$
Exact Mass: 479,14
Molecular Weight: 479,55

Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-((methylsulfonyl)oxy)pent-1-yn-1-yl)picolinate was synthetized following **Procedure B** using **14a** and **59a** was isolated after purification by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 60/40, v/v) as a yellow oil (yield: *quant.*). Caution: must be stored at -25°C under argon, must be used within a week. *Rf* = 0.4 (Petroleum ether/EtOAc, 60/40, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.47 – 7.27 (m, 9H), 5.21 (s, 2H), 4.17 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 2.47 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.98 – 1.84 (m, 2H).

### I.18.4. methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(tosyloxy)but-1-yn-1-yl)picolinate – 59 b

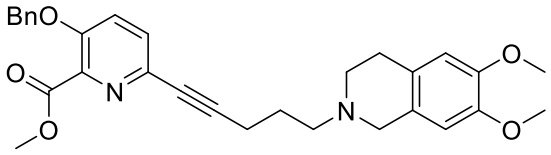



**59b**

Chemical Formula: $C_{25}H_{23}NO_6S$
Exact Mass: 465,12
Molecular Weight: 465,52

Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(tosyloxy)but-1-yn-1-yl)picolinate **59b** was synthetized following **Procedure B** using **14b** and was isolated after purification by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 60/40, v/v) as a yellow oil (yield: *quant.*). *Rf* = 0.42 (Petroleum ether/EtOAc, 60/40, v/v). Caution: must be used within 12 h. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.84 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.56 – 7.19 (m, 9H), 5.22 (s, 2H), 4.21 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.98 (s, 3H), 2.80 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.44 (s, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.5, 152.9, 152.9, 144.9, 142.8, 141.1. 139.9, 135.2, 134.4, 134.1, 132.4, 129.9, 129.7, 129.5, 128.4, 127.9, 127.6, 126.7, 125.0, 121.4, 83.6, 80.9, 70.4, 67.1, 52.4, 21.3, 20.0.

## I.19. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 15

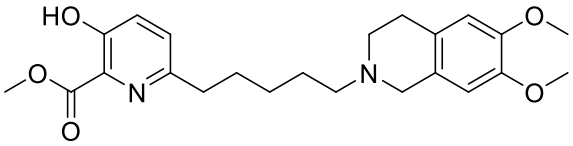


**15**

Chemical Formula: $C_{30}H_{32}N_2O_5$
Exact Mass: 500,23
Molecular Weight: 500,60

To a solution of the crude product **57a** (5.5 g, 13.63 mmol) in dry MeCN (0.1 M) were added 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline hydrochloride (TIQ.HCl, 2.1 g, 1.5 equiv.) and potassium carbonate (3.4 g, 3 equiv.). The mixture was refluxed overnight. The crude mixture was filtered, concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography on silica gel ($CH_2Cl_2$/MeOH, 100/0 to 95:5, v/v) to give the desired product **15** (2.86 g, 74%) as an orangeous oil. *Rf* = 0.2 ($CH_2Cl_2$/MeOH 95/5). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 1.93 (qt, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.51 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.63 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.72 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.83 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.57 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 5.19 (s, 2H), 6.53 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 7.25–7.45 (m, 7H).$^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 17.4, 26.0, 28.7, 51.0, 52.7, 55.7, 55.8, 55.9, 57.2, 70.7, 79.5, 90.1, 109.4, 112.3, 121.7, 126.2, 126.6, 126.9, 128.2, 128.7, 130.0, 135.4, 135.5, 139.9, 147.1, 147.4, 152.9, 164.8. MS (ESI$^+$): *m/z* (%): 501 (100) $[M+H]^+$.

## I.20. Methyl 6-(5-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate - 16



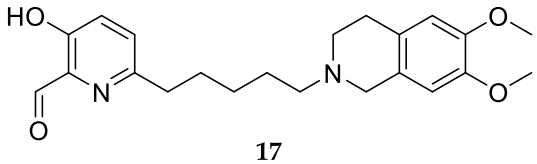
**16**

Chemical Formula: $C_{23}H_{30}N_2O_5$
Exact Mass: 414,22
Molecular Weight: 414,50

To a solution of **15** (2.5 g, 5 mmol) in degassed MeOH (0.05 M) was added Pearlman's catalyst (500 mg, 20% Pd, moisture 50%). The solution was bubbled with hydrogene gas and the reaction was stirred overnight at rt under hydrogene gas atmosphere (1 atm). The mixture was filtrated through celite® and concentrated under reduced pressure to give the desired product **16** as a orangeous oil that crystallized upon standing (2.07 g, 99%). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.59 (s, 1H), 7.30 (br s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 4.04 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.53 (s, 2H), 2.87 – 2.74 (m, 4H), 2.68

(t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.55 – 2.42 (m, 2H), 1.67 (m, 4H), 1.53 – 1.35 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 169.8, 156.9, 153.6, 147.7, 147.3, 129.0, 128.5, 126.4, 124.9, 111.1, 109.2, 56.9, 55.7, 55.6, 54.4, 52.9, 50.1, 37.2, 29.6, 27.0, 26.8, 25.9. MS (ESI$^+$): *m*/*z* (%): 415 (100) $[M+H]^+$.

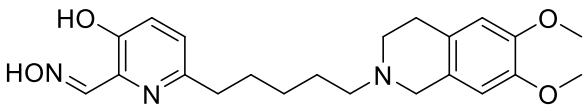
### I.21. 6-(5-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde - 17




**17**
Chemical Formula: $C_{22}H_{28}N_2O_4$
Exact Mass: 384,20
Molecular Weight: 384,48

To an ice-bath cooled solution of methyl 6-(5-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate **16** (2.07 g, 5.0 mmol, 1 equiv) in dry $CH_2Cl_2$ (0.05 M) were successively added dry triethylamine (1.6 mL, 11 mmol, 2.2 equiv.) and TBDMSOTf (1.3 mL, 5.5 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred at rt for 2 h under argon atmosphere. The organic layer was washed with brine, dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. To a solution of the resulting residue in dry DCM (0.05 M) at -78 °C, was added dropwise DIBAL-H (12.5 mL, 1 M in DCM, 12.5 mmol, 2.5 equiv.). Then, the reaction mixture was stirred at this temperature for 15 min. The reaction was quenched with MeOH (12.5 mL) and the mixture was allowed to warm at rt. The organic layer was washed with an aqueous solution of NaOH (1 M), dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. Then, TBAF (5.5 mL, 1.1 equiv., 1 M in THF) was added at 0 °C to the residue in dry THF (0.1 M) and the mixture was stirred for 30 min at 0-5 °C. After concentration under reduced pressure, a purification by flash chromatography on silica gel (DCM/MeOH 100:0 to 95:5, v/v) afforded **17** (1.29 g, 67%) as a yellow oil. *Rf* = 0.27 (DCM/MeOH, 95 :5). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.03 (br s, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 3.84 (d, *J* = 1.6 Hz, 6H), 3.59 (s, 2H), 2.95 – 2.67 (m, 6H), 2.63 – 2.41 (m, 2H), 1.90 – 1.57 (m, 4H), 1.46 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.5, 156.8, 154.7, 147.4, 147.1, 135.6, 129.6, 126.2, 126.1, 125.9, 111.2, 109.4, 77.1, 57.9, 55.8, 55.7, 55.5, 50.7, 37.1, 29.5, 28.3, 27.0, 26.8. MS (ESI+): *m*/*z* (%): 385 (100) $[M+H]^+$.

## I.22. Synthesis of GM415 – 18

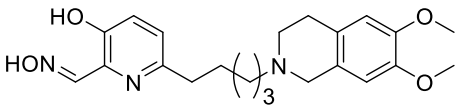


**18**
**GM415**

Chemical Formula: $C_{22}H_{29}N_3O_4$
Exact Mass: 399,22
Molecular Weight: 399,49

To a solution of aldehyde **17** (1.29 g, 3.35 mmol) in MeOH (stored on MS 3 Å, under argon, 0.1 M) were added successively hydroxyl amine hydrochloride(245 mg, 3.52 mmol, 1.05 equiv.) and NaOAc (305 mg, 3.68 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred at rt under argon atmosphere until completion (3-4 h). After concentration under reduced pressure, the residue was purified by flash chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 98 :2 to 90 :10) to give the desired oxime as a white solid (976 mg, 73%). *Rf* = 0.2 (DCM/MeOH 95:5). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 1.33–1.43 (m, 2H), 1.55–1.73 (m, 4H), 2.55–2.72 (m, 2H), 2.85–2.96 (m, 4H), 3.74 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 6.51 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.28 (s, 1H), 9.88 (br s, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, CDCl3) δ (ppm) 14.2, 22.7, 26.1, 26.9, 37.1, 50.3, 54.7, 55.8, 55.9, 57.3, 76.6, 109.3, 111.2, 123.8, 124.3, 125.1, 135.1, 147.5, 147.8, 152.4, 153.7, 160.6, 171.9. MS (ESI+): *m/z* (%): 400 (100) $[M+H]^+$. HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{22}H_{30}N_3O_4$ 400.2236; found: 400.2230. HPLC (Method B): $t_R$ = 19.15 min (purity = 97.83%).

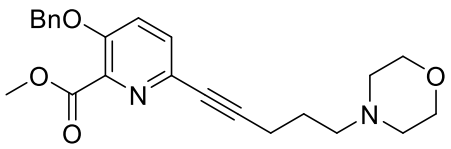
## I.23. GM415 chlorhydrate– 18a



HCl + 4.3$H_2O$ (0.2EtOH)
**18a**
**GM415.HCl**
**(AB-715)**

To a solution of aldoxime **18** (633 mg, 15.85 mmol, 1.0 equiv) in MeOH (16 mL, 1 M) was added a solution of HCl in Ethanol (15.05 mL, 1.016 M, 1.0 equiv) at rt. After 30 min, the solution was evaporated to give a goldish cristalin solid that was stored in a vacuum desiccator under $P_2O_5$ (677 mg, 98%). HPLC (Method B): $t_R$ = 19.11 min (purity = 98.30%). MS (ESI+) *m/z* (%): 400 (100) $[M+H]^+$,Elemental analysis calcd for $C_{22}H_{30}N_3O_4$ +HCl +4.3 $H_2O$ + 0.2 EtOH : %C 51.48 ; %N : 7.68 ; %H : 8.04 ; found %C 51.70; %N : 7.59 ; %H : 7.60.

## I.24. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-morpholinopent-1-yn-1-yl)picolinate - 19

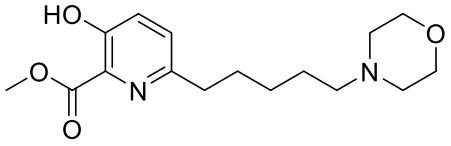



**19**

Chemical Formula: $C_{23}H_{26}N_2O_4$
Exact Mass: 394,19
Molecular Weight: 394,47

To a solution of the crude **57a** (3.03g, 7.53 mmol) in $CH_3CN$ (76 mL) were added morpholine (610 µL, 7.55 mmol, 1.0 equiv) and potassium carbonate (3.2 g, 22.59 mmol, 3 equiv.). The solution was heated under reflux overnight and then cooled at rt. Salts were removed by filtration. Concentration under reduced pressure and purification by flash chromatography (DCM/MeOH, 98:2, v/v) gave the desired product **19** as light orange oil (2.18 g, 74%). *Rf* = 0.25 (DCM/MeOH 98/2, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.77 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.41−2.48 (m, 8H), 3.67−3.71 (m, 4H), 3.93 (s, 3H, $H_7$), 5.16 (s, 2H), 7.28−7.44 (m, 7H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 16.8, 24.9, 52.2, 53.2, 57.3, 66.5, 70.3, 79.2, 89.5, 121.4, 126.5, 127.7, 128.2

## I.25. Methyl 3-hydroxy-6-(5-morpholinopentyl)picolinate - 20

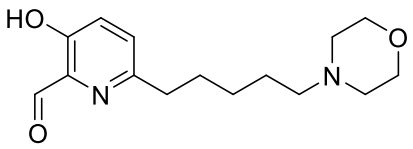



**20**

Chemical Formula: $C_{16}H_{24}N_2O_4$
Exact Mass: 308,17
Molecular Weight: 308,38

To a solution of **19** (1.26 g, 3.2 mmol) in degassed MeOH (150 mL) was added Pearlman's catalyst (250 mg). The solution was bubbled with hydrogene gas and the reaction was stirred at rt under hydrogene gas atmosphere (1 atm) for 14 h. The mixture was filtrated through celite® and concentrated under reduced pressure to furnish the desired product **20** as orangeous oil (989 mg, quant.) *Rf* = 0.1 (DCM/MeOH 98/2 + 1% solution of $NH_3$ 30%, v/v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.21−1.32 (m, 2H), 1.39−1.47 (m, 2H), 1.54−1.64 (m, 2H), 2.22 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.33−2.33 (m, 4H), 2.67 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 3.57-3.60 (m, 4H), 3.91 (s, 3H), 7.17 (s, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 26.1, 27.0, 29.8, 37.4, 53.0, 53.6, 58.8, 66.7, 126.5, 128.6, 129.0, 153.8, 157.0, 170.0. MS (ESI+): *m/z* (%): 309 (100) $[M+H]^+$.

## I.26. 3-hydroxy-6-(5-morpholinopentyl)picolinaldehyde - 21

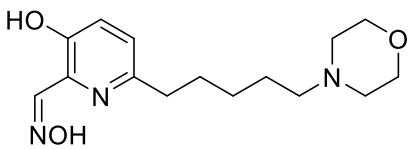


**21**

Chemical Formula: $C_{15}H_{22}N_2O_3$
Exact Mass: 278,16
Molecular Weight: 278,35

To a solution of compound **20** (1.6 g, 5.2 mmol) in dry DCM (70 mL) were successively added 2,6-lutidine (1.5 mL, 15.8 mmol, 3 equiv.) and TBDMSOTf (4.6 mL, 15.8 mmol, 3 equiv.). The mixture was stirred at rt overnight under argon atmosphere. The mixture was washed with NaCl sat., dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. To a solution of the resulting residue in dry DCM (100 mL) was added dropwise DIBAL-H (13 mL, 1M in DCM, 13 mmol, 2.5 equiv.) at -78 °C. Then, the reaction mixture was stirred at this temperature for 15 min. The reaction was quenched with MeOH (13 mL) and the mixture was allowed to warm at room temperature. The organic layer was washed with an aqueous solution of NaOH (1 M), dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. Then, TBAF (5.7 mL, 1 M in THF, 5.7 mmol, 1.1 equiv.) was added at 0 °C to the residue in dry THF (65 mL) and the mixture was stirred overnight at this temperature. After concentration under reduced pressure, a flash chromatography on silica gel (DCM/MeOH 99/1 to 95/5, v/v) afforded the desired compound **21** as yellow oil (573 mg, 40%). *Rf* = 0.1 (DCM/MeOH 95/5, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.06 (s, 1H), 7.33 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H), 3.73 (m, 4H), 2.82 (dd, *J* = 10.3, 5.2 Hz, 2H), 2.52–2.42 (m, 4H), 2.42–2.30 (m, 2H), 1.88–1.69 (m, 2H), 1.69–1.51 (m, 2H), 1.51–1.35 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 199.1, 157.3, 155.3, 136.1, 130.1, 126.7, 77.2, 67.3, 59.4, 54.1, 37.6, 29.9, 27.5, 26.7. MS (ESI+): *m*/*z* (%): 279 (100) $[M+H]^+$. HRMS (ESI+): *m*/*z* calcd for $C_{15}H_{23}N_2O_3$ 279.1709; found: 279.1707.

## I.27. Synthesis of RM048 -22



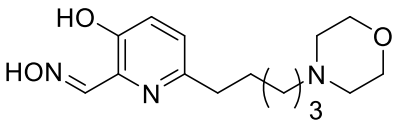
**22 - RM048**

Chemical Formula: $C_{15}H_{23}N_3O_3$
Exact Mass: 293,17
Molecular Weight: 293,37

To a solution of aldehyde **21** (573 mg, 2.06 mmol) in dry MeOH (50 mL) were successively added hydroxyl amine hydrochloride(170 mg, 2.43 mmol, 1.2 equiv.) and NaOAc (217 mg, 2.62 mmol, 1.3

equiv.). The mixture was stirred at rt for 1 h under argon atmosphere. Concentration under reduced pressure and purification by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH 99/1 to 94/6, v/v) afforded the desired oxime **22** as white solid (461 mg, 76%). *Rf* = 0.7 (EtOAc/MeOH 8/2, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.15 (s, 1H), 7.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.66–3.40 (m, 4H), 2.71–2.47 (m, 2H), 2.31 (s, 4H), 2.25–2.08 (m, 2H), 1.67–1.48 (m, 2H), 1.40 (m, 2H), 1.21 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 154.6, 153.8, 152.9, 136.2, 126.0, 125.3, 67.5, 60.0, 54.7, 37.8, 31.1, 28.1, 26.9. MS (ESI+): *m/z* (%): 294 (100) $[M+H]^+$. HRMS (ESI+): *m/z* calcd for C15H24N3O3 294.1818; found: 294.1821. HPLC (Method A): $t_R$ = 15.5 min, purity = 97.9%.

## I.28. RM048 chlorhydrate – 22a




1.5HCl, 0.6$H_2O$

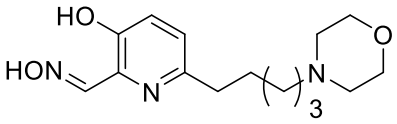
**22a**

**RM048.HCl**

**(AB-190)**

To a solution of aldoxime **22** (65 mg, 0.22 mmol, 1.0 equiv) in MeOH (1.1 mL, 0.2 M) was added a solution of HCl solution (440 µL, 1.0 M, 2.0 equiv) at rt. After 30 min, the solution was evaporated to give a hydroscopic white-off solid that was stored in a vacuum desiccator under $P_2O_5$ (80mg, 94%). HPLC (Method B): $t_R$ = 15.53 min (purity = 97.93%). Elemental analysis calcd: %C : 50.20 ; %N : 11.71 ; %H : 7.22 found %C : 51.04 ; %N : 11.83 ; %H : 6.97.

## I.29. RM048 mesylate– 22b




$MeSO_3H$, 0.5$H_2O$

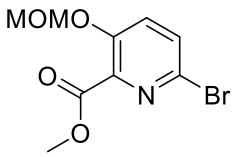
**22b**

**RM048.$MeSO_3H$**

**(AB-220)**

To a solution of aldoxime **22** (50 mg, 0.17 mmol, 1.0 equiv) in MeOH (3 mL) was added $MeSO_3H$ (17 mL, 1.0 equiv) at rt. After 30 min, the solution was evaporated to give a white-off solid that was stored in a vacuum desiccator under $P_2O_5$ (62 mg, 90%). HPLC (Method B): $t_R$ = 15.53 min (purity = 98%). Elemental analysis calcd : %C : 48.23 ; %N : 10.55 ; %H : 7.08 ; %S : 8.05; found %C : 48.43 ; %N : 10.98 ; %H : 6.91 ; %S 8.43.

## I.30. Methyl 6-bromo-3-(methoxymethoxy)picolinate - 4b



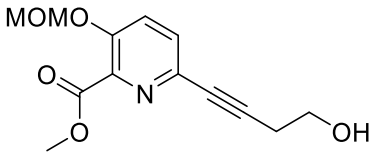

**4b**

Chemical Formula: $C_9H_{10}BrNO_4$
Exact Mass: 274,98
Molecular Weight: 276,09

To a solution of **9a** (4.84 g, 20.87 mmol) in acetone (100 mL) was slowly added potassium carbonate (5.8 g, 2 equiv.) and MOMCl (20 mL, 41.74 mmol, 2 equiv.) under argon at 0 °C. The mixture was stirred heated to reflux overnight. Salts were removed by filtration and the crude was concentrated under vacuum. The desired product was obtained after purification by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 60/40, v/v) as a colourless oil (1.70 g, 94%).

To a solution of **9a** (1 g, 6.5 mmol) in DMF (65 mL) was slowly added NaH (230 mg, 9.75 mmol, 1.2 equiv.) and MOMCl (3 mL, 6.5 mmol, 1.0 equiv.) under argon at 0 °C. The mixture was stirred 1 h and quenched with aq. $NH_4Cl$. The cooled reaction mixture was washed extracted with dichloromethane, washed with water, dried under magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. The desired product was obtained without further purification as a colourless oil (5.18 g, 95%). *Rf* = 0.25 (Petroleum ether/EtOAc 60/40, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.53 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.25 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.50 (s, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 52.7, 56.6, 95.1, 127.1, 131.3, 132.1, 140.1, 152.4, 163.9. MS (ESI+): *m/z* (%): 276 (85) $[M+H]^+$ and 278 (100).

## I.31. Methyl 6-(4-hydroxybut-1-yn-1-yl)-3-(methoxymethoxy)picolinate - 23b



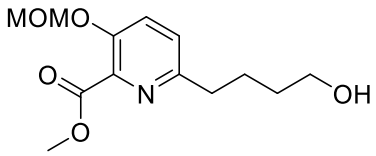

**23b**

Chemical Formula: $C_{13}H_{15}NO_5$
Exact Mass: 265,10
Molecular Weight: 265,26

To a degassed solution of **4b** (1.25 g, 4.55 mmol, **1** equiv.) in dry dichloromethane/triethylamine (2/1, v/v, 0.1M) and but-3-yn-1-ol (345 µL, 4.55 mmol, 1.0 equiv) were added $Pd(PPh_3)_4$ (263 mg, 0.23 mmol 0.05 equiv.) CuI (87 mg, 0.46 mmol, 0.1 equiv.) and the solution was stirred under argon at rt overnight in absence of light. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and purifided by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 60/40 to 30/70, v/v) to give the desired

product as a yellow solid (1.13 g, 94%). *Rf* = 0.25 (Petroleum ether/EtOAc, 40/60, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.54 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.26 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.83 (dd, *J* = 11.8, 5.9 Hz, 2H), 3.51 (s, 3H), 2.70 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.92 (s, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.9, 151.8, 140.5, 136.1, 130.2, 124.2, 95.1, 87.1, 81.0, 77.1, 60.9, 56.7, 52.9, 23.9. MS (ESI+): *m/z* (%): 266 (100) $[M+H]^+$.

### I.32. methyl 6-(4-hydroxybutyl)-3-(methoxymethoxy)picolinate - 24b




**24b**

Chemical Formula: $C_{13}H_{19}NO_5$

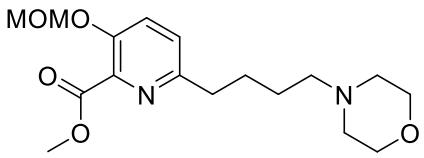
Exact Mass: 269,13

Molecular Weight: 269,30

To a solution of **23b** (550 mg, 1.97 mmol) in dry DMF (20 mL) were added imidazole (410 mg, 7.03 mmol, 3.5 equiv.) and TBDMSCl (460 mg, 3 mmol, 1.5 equiv.). The mixture was stirred at rt overnight. The DMF was removed and the product was dissolved in EtOAc. The organic layer was washed with brine and dried over magnesium sulfate. Concentration under reduced pressure furnished the desired product as orange oil (775 mg, quant.). $^{1}$H NMR (300 MHz, CDCl3) δ (ppm) 7.52 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.26 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.72 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.50 (s, 3H), 2.50 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.92 – 1.68 (m, 2H), 0.90 (s, 9H), 0.06 (s, 6H).

To a solution of silyl ether in degazed MeOH was added Perlman's catalyst (155mg, 20% w/w). The hetogeneous solution was degazed with argon, and hydrogene gas was bubled into the slution. The reaction was stirred at rt, under hydrogene gas atm (1 atm) during 2 h. Subsequent filtration on celite® gave the crude product as an orangeous oil (658 mg, 84%) that was used without further purification in the next step. To a solution of crude product in dry THF was added TBAF (2.2 mL, 1M in dichloromethane, 1.1 equiv) at 0 °C. The mixture was stired at rt overnight. After concentration under vacuum, the crude product was purified using flash chromatography on silica gel (EtOAc/PE, 60/40 to 90/10, v/v) to give the desired compound as yellow oil that crystallized upon standing (413 mg, 78% over 3 steps).*Rf* = 0.5 (EtOAc/PE, 90/10, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.65 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.50 (s, 3H), 2.89 – 2.76 (m, 2H), 1.91 (s, 1H), 1.86 – 1.71 (m, 2H), 1.70 – 1.53 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 165.8, 155.1, 151.0, 139.5, 126.0, 125.1, 95.3, 62.5, 56.5, 52.7, 36.8, 32.2, 25.9. MS (ESI+): *m/z* (%): 270 (100) $[M+H]^+$.

### I.33. Methyl 3-(methoxymethoxy)-6-(4-morpholinobutyl)picolinate - 25

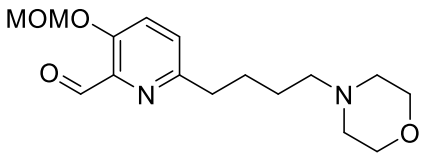



**25**

Chemical Formula: $C_{17}H_{26}N_2O_5$
Exact Mass: 338,18
Molecular Weight: 338,40

To a solution of **24b** (855 mg, 3.2 mmol, 1 equiv) in dry dichloromethane was added triethylamine (1.3 mL, 3 equiv) and mesyl chloride (372 µL, 1.5 equiv). The resulting mixture was heated at 40 °C during 3 h. After filtration on silica plug (100% EtOAc) the resulting crude product was dissolved in MeCN. Morpholine (513 µL, 2 equiv) and potassium carbonate (3.1 g, 4 equiv.) were added and the resuting mixture was reflux overnight. Salts were removed by filtration and crude product was evaporated until dryness. Flash chromatography gave the desired product as an orange oil (353 mg, 33%). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.81 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.52 (s, 2H), 4.25 (s, 3H), 4.13 – 3.84 (m, 4H), 3.79 (s, 3H), 3.17 – 3.02 (m, 2H), 2.80 (m, 4H), 2.02 (m, 2H), 1.89 (m, 2H), 1.72 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 165.4, 154.4, 150.2, 139.3, 128.2, 125.3, 124.5, 94.8, 66.5, 66.1, 58.2, 56.0, 53.1, 52.2, 51.5, 36.6, 27.2, 25.3. MS (ESI+): *m/z* (%): 339 (100) $[M+H]^+$.

### I.34. 3-(methoxymethoxy)-6-(4-morpholinobutyl)picolinaldehyde - 26

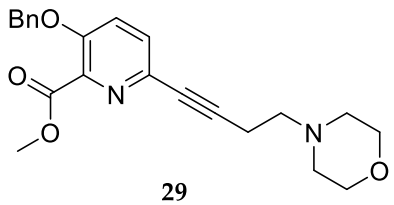



**26**

Chemical Formula: $C_{16}H_{24}N_2O_4$
Exact Mass: 308,17
Molecular Weight: 308,38

To a cooled solution of **25** (314 mg, 0.93 mmol, 1 equiv.) in dry dichloromethane was added DIBAL-H (2.32 mL, 2.5 equiv) at -78°C. The reaction was stired at this temperature during 1.5 min. The reaction was quenched with methanol (3 mL), warmed up to rt and washed with NaOH (1 M) and brine. After drying under magnesium sulfate, solvent was removed under vacuum to give the desired product as an orange oil that was used in next step without purification (219 mg, 76%). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.33 (s, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.30 (s, 2H), 3.78 – 3.65 (m, 4H), 3.52 (s, 3H), 2.89 – 2.78 (m, 2H), 2.46 – 2.29 (m, 4H), 1.74 (dd, *J* = 15.7, 7.6 Hz, 2H), 1.63 – 1.46 (m, 2H), 1.01 – 0.80 (m, 2H). MS (ESI+): *m/z* (%): 309 (100) $[M+H]^+$.

### I.35. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-morpholinobut-1-yn-1-yl)picolinate - 29

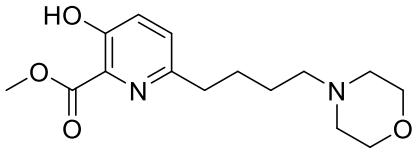


**29**

Chemical Formula: $C_{22}H_{24}N_2O_4$
Exact Mass: 380,17
Molecular Weight: 380,44

To a mixture of alcohol **14b** (2.3 g, 7.39 mmol) in dry DCM (75 mL) was added $Et_3N$ (3.1 mL, 3 equiv.) and mesyl chloride (870 µL, 1.5 equiv.). The mixture was refluxed for 4 h. The resulting solution was cooled to rt, filtrated under celite® and concentrated under reduced pressure. To a solution of the crude product in $CH_3CN$ (75 mL) were added morpholine (650 µL, 1.02 equiv) and potassium carbonate (1.5 g, 1.5 equiv.). The solution was heated under reflux for 14 h and then cooled at rt. Salts were removed by filtration. Concentration under reduced pressure and purification by flash chromatography (Petroleum ether/EtOAc 8/2 + 1% solution of $NH_3$ 30%, v/v/v) gave the desired product as yellow oil (1.6 g, 58%). *Rf* = 0.2 (dichloromethane/MeOH 8/2 + 1% solution of $NH_3$ 30%, v/v/v). $^1H$ NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.49-2.52 (m, 4H), 2.57–2.69 (m, 4H), 3.71–3.74 (m, 4H), 3.96 (s, 3H), 5.20 (s, 2H), 7.27–7.46 (m, 7H). $^{13}C$ NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 17.4, 52.6, 53.3, 57.1, 66.8, 67.0, 70.8, 80.0, 88.2, 121.8, 126.9, 128.2, 128.7, 129.9, 135.2, 135.5, 140.1, 152.9, 164.8. MS (ESI+): *m/z* (%): 381 (100) $[M+H]^+$.

### I.36. Methyl 3-hydroxy-6-(4-morpholinobutyl)picolinate - 30

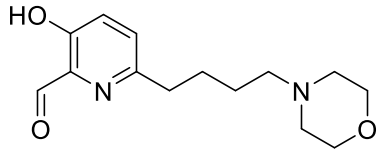


**30**

Chemical Formula: $C_{15}H_{22}N_2O_4$
Exact Mass: 294,16
Molecular Weight: 294,35

To a solution of **29** (1.6 g, 4.3 mmol) in degassed mixture of MeOH (86 mL) was added Pearlman's catalyst (240 mg, 15% w/w). The solution was bubbled with hydrogene gas and the reaction was stirred at rt under hydrogene gas atmosphere (1 atm) overnight. The mixture was filtrated through celite® and concentrated under reduced pressure to furnish the desired product **30** as orange oil (1.21 g, 95%). $^1H$ NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 1.68 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H), 2.56-2.61 (m, 2H), 2.68–2.79 (m, 6H), 3.83 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 3.96 (s, 3H), 7.23 (s, 2H). $^{13}C$ NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 24.3, 27.3, 36.8, 52.7, 53.1, 58.1, 65.2, 126.8, 128.8, 129.2, 153.1, 157.2, 170.0. MS (ESI+): *m/z* (%): 295 (100) $[M+H]^+$.

## I.37. 3-hydroxy-6-(4-morpholinobutyl)picolinaldehyde - 27

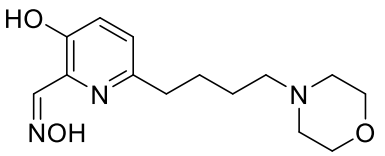


**27**

Chemical Formula: $C_{14}H_{20}N_2O_3$
Exact Mass: 264,15
Molecular Weight: 264,32

To a solution of methyl ester **26** (1.2 g, 4.8 mmol) in dry dichloromethane (41 mL) were successively added 2,6-lutidine (1.2 mL, 2.5 equiv.) and TBDMSOTf (1.1 mL, 1.1 equiv.). The mixture was stirred at rt for 2.5 h under argon atmosphere. The mixture was washed with a saturated aqueous solution of NaCl, dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. To a solution of the resulting residue in dry DCM (41 mL) was added dropwise DIBAL-H (10.2 mL, 1 M in dichloromethane, 2.1 equiv.) at -78 °C. Then, the reaction mixture was stirred at this temperature for 15 min. The reaction was quenched with MeOH (10.2 mL) and the mixture was allowed to warm at room temperature. The organic layer was washed with an aqueous solution of NaOH (1 M), dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. Then, TBAF (4.8 mL, 1M in THF, 1.0 equiv.) was added at 0 °C to the residue in dry THF (40 mL) and the mixture was stirred overnight at this temperature. After concentration under reduced pressure, a flash chromatography on silica gel (Dichloromethane/MeOH 95/5, v/v) afforded access to the desired product **27** as yellow solid (608 mg, 48%). *Rf* = 0.23 (DCM/MeOH 95/5, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.56–1.61 (m, 2H), 1.70–1.80 (m, 2H), 2.39 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.44 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 2.79 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.71 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 7.25-7.31 (m, 2H), 10.01 (s, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 26.1, 27.6, 37.2, 53.8, 58.9, 66.9, 126.5, 129.8, 135.8, 154.7, 157.1, 198.8. MS (ESI+): *m*/*z* (%): 265 (100) $[M+H]^+$.

## I.38. JR595 – 28



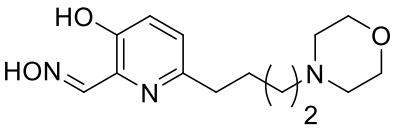
**28 - JR595**

Chemical Formula: $C_{14}H_{21}N_3O_3$
Exact Mass: 279,16
Molecular Weight: 279,34

To a solution of aldehyde **27** (261 mg, 0.99 mmol) in dry MeOH (10 mL) were successively added hydroxyl amine hydrochloride (211 mg, 3 equiv.) and NaOAc (292 mg, 3.5 equiv.). The mixture was

stirred at rt overnight under argon atmosphere. After concentration under reduced pressure, chromatography on silica gel (Dichloromethane/MeOH 95/5 to 90/10, v/v) afforded access to oxime **28** as yellow solid (202 mg, 86%). *Rf* = 0.3 (Dichloromethane/MeOH 90/10, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$): δ (ppm) 1.53–1.63 (m, 2H), 1.67–1.75 (m, 2H), 2.50 (t, *J* = 6 Hz, 2H), 2.57 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 2.75 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.71 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 7.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$): δ (ppm) 26.3, 28.8, 54.5, 59.6, 67.2, 125.4, 126.0, 136.3, 152.8, 153.8, 154.3. MS (ESI+): *m*/z (%): 280 (100) $[M+H]^+$. HRMS (ESI+): *m*/z calcd for $C_{14}H_{22}N_3O_3$ 280.1620; found: 280.1624. HPLC (method B): $t_R$ = 14.79 min, purity = 98.05%.

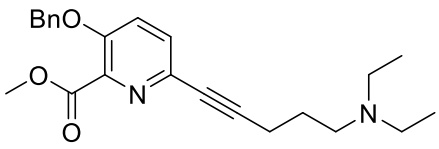
## I.39. JR595 TFA salt - 28a




1.5 TFA, $H_2O$
**28a**
**JR595.TFA**
**(AB-362)**

Aldoxime **28** (100 mg, 0.35 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in MeOH/ TFAaq 0.1% (1/9 mL) and purified using reverse phase (Method D), to give after lyophylisation, a hydroscopic white-off solid that was stored in a vacuum desiccator under $P_2O_5$ (168 mg, 50%). HPLC (Method B): $t_R$ = 10.47 min (purity = 98%). Elemental analysis calcd: %N : 8.97 ; %C : 43.59 ; %H : 5.27; found: %N : 8.70 ; %C : 43.79 ; %H : 5.16.

## I.40. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(diethylamino)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 31

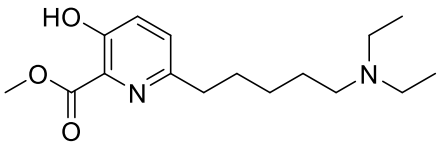



**31**
Chemical Formula: $C_{23}H_{28}N_2O_3$
Exact Mass: 380,21
Molecular Weight: 380,49

To a solution of the crude **59a** (2.39 g, 4.99 mmol, 1.1 equiv.) in $CH_3CN$ (50 mL) were added diethylamine (500 µL, 4.53 mmol, 1.0 equiv) and potassium carbonate (2.1 g, 3 equiv.). The solution was heated under reflux overnight and then cooled at rt. Salts were removed by filtration. Concentration under reduced pressure and purification by flash chromatography (dichloromethane/MeOH +1 %triethylamine, 95/5/1, v/v/v) gave the desired product as a yellow oil (788 mg, 41%). *Rf* = 0.28 (dichloromethane/MeOH +1 %

triethylamine, 95/5/1, v/v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 0.91 (t, J = 7.2 Hz, 6H), 1.62 (qt, J = 7.3 Hz, 2H), 2.30-2.36 (m, 4H, $H_{17,19}$), 2.40 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 3.83 (s, 3H), 5.07 (s, 2H), 7.29-7.12 (m, 7H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.9, 152.9, 140.1, 135.7, 135.6, 130.0, 128.8, 128.3, 127.0, 121.9, 90.5, 79.4, 70.9, 52.7, 52.0, 47.0, 26.1, 17.5, 11.9. MS (ESI+): *m/z* (%): 381 (100) $[M+H]^+$.

### I.41. Methyl 6-(5-(diethylamino)pentyl)-3-hydroxypicolinate - 32

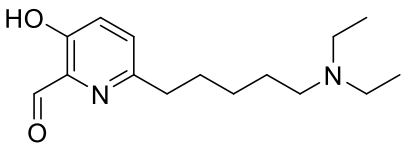



**32**

Chemical Formula: $C_{16}H_{26}N_2O_3$
Exact Mass: 294,19
Molecular Weight: 294,39

Compound **31** (788 mg, 2.07 mmol) was dissolved in MeOH (0.05 M) and the homogenous solution was degased 20 min using argon. $Pd(OH)_2/C$ (158 mg, 20% w/w) was added. After 10 min of degasing using argon, baloon of hydrogene gas was bubbled and the mixture was stirred under hydrogen atmosphere at rt overnight. The mixture was filtered over celite®, solvents were removed under vacuum to gave **32** as an yellow oil (608 mg, quant.). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 9.24 (s, 1H), 7.30 – 7.19 (s, 2H), 4.00 (s, 3H), 2.79 (dd, *J* = 21.6, 13.9 Hz, 2H), 2.66 – 2.50 (m, 4H), 2.51 – 2.36 (m, 2H), 1.82 – 1.60 (m, 2H), 1.59 – 1.42 (m, 2H), 1.43 – 1.26 (m, 2H), 1.03 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 11.4, 26.5, 27.4, 30.1, 37.7, 46.8, 52.7, 53.2, 126.7, 128.8, 129.2, 154.1, 157.2, 170.2. MS (ESI+): *m/z* (%): 295 (100) $[M+H]^+$.

### I.42. 6-(5-(diethylamino)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde - 33

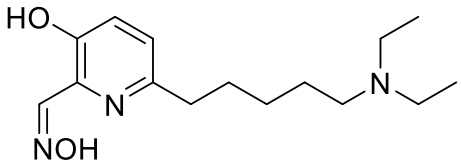



**33**
Chemical Formula: $C_{15}H_{24}N_2O_2$
Exact Mass: 264,18
Molecular Weight: 264,37

To a solution of **32** (608 mg, 2.07 mmol) in dry dichloromethane (20 mL) were successively added triethylamine (900 µL, 3 equiv.) and TBDMSOTf (1.2 mL, 3 equiv.). The mixture was stirred at rt for overnight under argon atmosphere. The mixture was washed with water, brine, dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure to give the crude silyle ether as a red oil (845 mg,

quant.) and was used without further purification in the next step. To a solution of the resulting residue in dry dichloromethane (40 mL) was added dropwise DIBAL-H (4.14 L, 1M in dichloromethane, 2 equiv.) at -78°C. Then, the reaction mixture was stirred at this temperature for 15 min. The reaction was quenched with MeOH (5 mL) and the mixture was allowed to warm at rt. The organic layer was washed with an aqueous solution of NaOH (1 M), dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure to give an orangeous oil. Then, TBAF (2.1 mL, 1 M in THF, 2.0 mmol, 1.01 equiv.) was added at 0 °C to the residue in dry THF (40 mL) and the mixture was stirred for 14 h at this temperature. Concentration until dryness gave the crude product that was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/ MeOH +1%triethylamine, 90/10/1, v/v/v) to give the desired product as an light orange oil with traces of TBAF (200 mg, 36 % over 3 steps). *Rf* = 0.25 (dichloromethane/ MeOH +1%triethylamine, 90/10/1, v/v/v).$^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 9.95 (s, 1H), 7.23 (s, 2H), 3.35 – 3.15 (m, 4H), 3.06 (q, *J* = 7.3 Hz, 4H), 2.99 – 2.83 (m, 2H), 2.80 – 2.58 (m, 2H), 1.89 – 1.48 (m, 8H), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H). MS (ESI+): *m*/*z* (%): 265 (100) [M+H]+ and 242 (5) $[TBA]^+$.

### I.43. CG193 – 34




**34 - CG193**

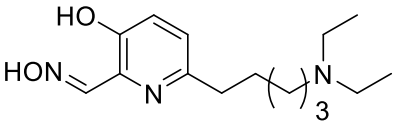
Chemical Formula: $C_{30}H_{47}N_5O_5$

Exact Mass: 557,36

Molecular Weight: 557,74

To a solution of aldehyde **23** (199 mg, 0.75 mmol) in dry MeOH (10 mL) were successively added hydroxyl amine hydrochloride (107 mg, 2 equiv.) and NaOAc (126 mg, 2 equiv.). The mixture was stirred at rt overnight under argon atmosphere. After concentration under reduced pressure, normal phase chromatography (biotage, HP, 15µm, 25g, 25 mL/min, dichloromethane/MeOH, 100:0 to 90:10) afforded the oxime **28** as white off solid (209 mg, 50%). *Rf* = 0.3 (DCM/MeOH +1%triethylamine 90/10/1, v/v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$): δ (ppm) 1.33 (t, J = 7.2 Hz, 6H,), 1.64-1.83 (m, 6H), 2.65 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.86-2.92 (m, 2H), 3.04 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 6.96 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H$_7$).$^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$): δ (ppm) 8.9, 23.5, 26.5, 29.4, 36.8, 46.5, 51.5, 123.9, 124.7, 135.4, 152.6, 152.7, 153.1. HPLC (Method B): $t_R$ = 16.63 min (99%). MS (ESI+): *m*/*z* (%): 280 (100) $[M+H]^+$.

## I.44. CG193 TFA salt – 34a




1.6 TFA

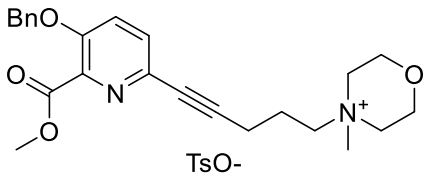
**34a**

**CG193.TFA**

**(AB-382)**

Subsequent reverse phase (Method D) gave the TFA salt version (200 mg, 45 %). HPLC (Method B): $t_R$ = 15.28 min (98%). Elemental analysis calcd : %N : 9.46 ; %C : 53.87 ; %H : 6.62; found %N : 9.20 ; %C : 54.44 ; %H: 6.23.

## I.45. 4-(5-(5-(benzyloxy)-6-(methoxycarbonyl)pyridin-2-yl)pent-4-yn-1-yl)-4-methylmorpholin-4-ium 4-methylbenzenesulfonate - 19a




**19a**

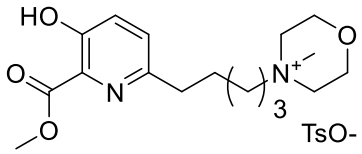
Chemical Formula: $C_{24}H_{29}N_2O_4^+$

Exact Mass: 409,21

Molecular Weight: 409,51

In a scelled round-bottom flask, tosylate **59a** (780 mg, 1.63 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in $CH_3CN$ (3 mL). *N*-methylmorpholine (200 µL, 3 equiv) was added. The solution was heated at 90 °C for 14 h and then cooled at rt. Concentration under reduced pressure gave the desired product as brown foam (945 mg, quant.). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 7.78 – 7.52 (m, 4H), 7.52 – 7.30 (m, 6H), 7.30 – 7.20 (m, 2H), 5.28 (s, 2H), 4.03 (d, J = 3.9 Hz, 4H), 3.99 – 3.90 (m, 3H), 3.75 – 3.65 (m, 2H), 3.64 – 3.45 (m, 4H), 3.26 (s, 3H), 2.66 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.23 – 2.06 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 154.41, 143.67, 141.65, 137.64, 137.21, 135.62, 131.46, 129.81, 129.67, 129.30, 128.41, 126.97, 123.99, 88.50, 81.38, 71.97, 65.50, 61.59, 61.24, 53.15, 21.61, 21.29, 16.94. MS (ESI+): *m/z* (%): 409 (100) $[M+H]^+$.

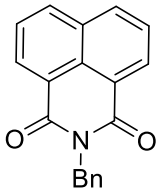
### I.46. 4-(5-(5-hydroxy-6-(methoxycarbonyl)pyridin-2-yl)pentyl)-4-methylmorpholin-4-ium 4-methylbenzenesulfonate - 20a




**20a**

Procedure E : **19a** (5 mg, 8.62 µmol, 1.0 equiv), Pearlman catalyst (1 mg, 20% w/w), MeOH (500 µL), rt, 4h. Brown foam (4.3 mg, quant.). MS (ESI+): *m/z* (%): 324 (100) $[M+H]^+$.

### I.47. 2-benzyl-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione - 49

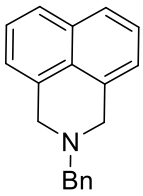



**49**

Chemical Formula: $C_{19}H_{13}NO_2$
Exact Mass: 287,09
Molecular Weight: 287,32

A mixture of naphthalic anhydride (2.98 g, 14.73 mmol, 1 equiv) and benzylamine (1.65 mL, 15 mmol, 1.05 equiv) in ethanol (100 mL) was refluxed for 3 h. The formed compound separated out on cooling and was filtered through a Büchner funnel and washed twice with cooled ethanol (white-off crystal, 3.85 g, 91%). m.p. 192-193°C (Lit. 192 °C).[560] $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.58 (dd, *J* = 7.3, 0.9 Hz, 2H), 8.17 (dd, *J* = 8.3, 0.8 Hz, 2H), 7.76 – 7.67 (m, 2H), 7.53 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.36 – 7.15 (m, 4H), 5.37 (s, 2H). NMR data are in accordance with those diescribed in literature.[561]

### I.48. 2-benzyl-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinoline - 50

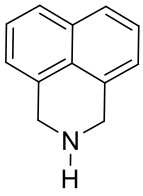



**50**

Chemical Formula: $C_{19}H_{17}N$
Exact Mass: 259,14
Molecular Weight: 259,35

Anhydrous aluminum chloride (1.87 g, 13.9 mmol, 4 equiv) and $LiAlH_4$ (539 mg, 13.9 mmol, 4 equiv) were added to 55 mL of cold, dry THF (ice bath) with stirring. *N*-benzylnaphthalimide (1 g, 3.5 mmol) was added in small portions at 0°C. The mixture was stirred at 40 °C for 12 h. The resulting mixture was poured into 55 mL of cold aqueous 2 N HCl and stirred for 1 hat 0 °C. After filtration, the filtrate was basified with aqueous saturated KOH up to pH = 14, and then the amine was extracted with diethyl. The organic layer was dried with magnesium sulfate and purified by filtration through a pad of silica gel (dichloromethane/EtOAc, 90/10, v/v) to give compound **50** as a yellow crystal (861 mg, 95%, litt. 89%).[522] Mp 69-70 °C. *Rf* = 0.5 (dichloromethane/EtOAc, 90/10, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 7.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.47 – 7.22 (m, 7H), 7.17 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.95 (s, 4H), 3.80 (s, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 138.95, 134.34, 133.67, 129.70, 128.88, 128.82, 127.74, 126.49, 126.17, 122.46, 62.64, 57.10.

### I.49. 2,3-Dihydro-1H-benz[de]isoquinoline



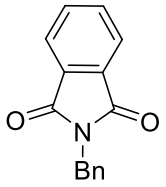

**43**

Chemical Formula: $C_{12}H_{11}N$
Exact Mass: 169,09
Molecular Weight: 169,23

To a solution of compound **50** (800 mg, 3.08 mmol, 1 equiv) in 10 mL of dry dichloromethane was added ethyl chloroformate (395 µL, 4.1 mmol, 1.3 equiv), and the mixture was refluxed for 12 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and, to the residue, was added 24 mL of an ethylene glycol solution of KOH (4.6 g, 82 mmol, 26.6 equiv) and hydrazine monohydrate (800 µL, 22 mmol, 7.3 equv). The mixture was heated under reflux for 4 h (160 °C), and then poured into water and extracted with diethyl ether. The organic layer was dried with magnesium sulfate. Column chromatography (EtOAc,

then MeOH) gave compound **43** as a light-yellow solid that darken at light (436 mg, 84%, litt. 89%). mp 58-59 °C. $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 2.61 (br s, 1H), 4.10 (s, 4H), 7.04 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 7.44 - 7.28 (m, 2H), 7.64 (d, J = 8.2 Hz, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 49.8, 121.2, 125.6, 126.3, 128.3, 133.5, 134.4.

### I.50. 2-benzylisoindoline-1,3-dione - 55

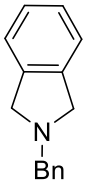



**55**

Chemical Formula: $C_{15}H_{11}NO_2$
Exact Mass: 237,08
Molecular Weight: 237,26

A mixture of benzylamine (4 mL, 36 mmol, 1.1 equiv) and phthalic anhydride (5 g, 33 mmol, 1 equiv) were heated under reflux in acetic acid (70 mL) for 12 h. The reaction was allowed to cool to room temperature, water (200 mL) was added and the precipitated product was collected by filtration. Desired product was recrystallized from 95% ethanol (896 mg, 89%, *litt 96%*).[562] $^{1}$H NMR (300 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 7.86 – 7.73 (m, 2H), 7.73 – 7.59 (m, 2H), 7.33 (dt, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 2H), 7.30 – 7.19 (m, 3H), 4.77 (s, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 168.53, 137.25, 134.57, 132.74, 128.80, 128.24, 123.71, 41.99. NMR data are in accordance with those reported in literature.[563,564]

### I.51. 2-benzylisoindoline - 56



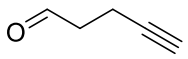

**56**

Chemical Formula: $C_{15}H_{15}N$
Exact Mass: 209,12
Molecular Weight: 209,29

Anhydrous aluminum chloride (11.4 g, 84.3 mmol, 4 equiv) and $LiAlH_4$ (3.26 g, 84.3 mmol, 4 equiv) were added to 330 mL of cold, dry THF (ice bath) with stirring. *N*-benzylphthalimide (5 g, 21 mmol, 1 equiv) was added in small portions at 0 °C. The mixture was stirred at 40 °C for 12 h. The resulting mixture was poured into 350 mL of cold aqueous 2 N HCl and stirred for 1 h at 0 °C. After filtration, the filtrate was basified with aqueous saturated KOH up to pH = 14, and then the amine was extracted with

diethyl. The organic layer was dried with Magnesium sulfate and purified by chromatographic filtration through a pad of silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 80/20, v/v) to give compound **56** as an orange oil that crystalysed upon standind (861 mg, 95%, litt. 89%).[522] Mp 69-70 °C. *Rf* = 0.4 (Petroleum ether/EtOAc, 80/20, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.54 – 7.22 (m, 9H), 4.02 (s, 4H), 4.02 (s, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 168.0, 136.3, 133.9, 132.1, 128.6, 127.8, 123.3, 41.6. NMR data are in accordance with those reported in literature.[565]

### I.52. Pent-4-ynal - 63

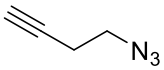


**63**

Chemical Formula: $C_5H_6O$
Exact Mass: 82,04
Molecular Weight: 82,10

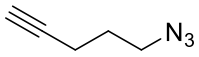
Oxalyl chloride (2.5 mL, 29 mmol, 1.1 eq) in dichloromethane (58 mL) was added to a flame dried round bottom, equipped with a stir bar and cooled to -80°C. DMSO (3.9 mL, 54 mmol, 2.2 eq) was dissolved into dichloromethane (11 mL) and added over a 20 min period. After addition, the reaction was stirred for a further 30 minutes. 4-pentynol (2.4 mL, 25 mmol, 1.0 eq) was dissolved into DCM (21 mL) and added to the stirring reaction over a 10-minutes period then stirred for a further hour. Lastly, triethylamine (17 mL, 120 mmol, 5 eq.) was added and the reaction stirred for another hour at -80 °C before allowing to warm to room temperature overweekend. The reaction mixture was diluted with DCM and quenched by the addition of water. After layer separation, the aqueous portion was acidified with a aqueous HCl 2 Nsolution and extracted with DCM. The organic layers were combined and washed with a 1% aqueous HCl solution in saturated aqueous NaCl, followed by a 5 % $NaHCO_3$ solution. The aqueous layers were back extracted with dichloromethane. Combined organic layers were washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and carefully concentrated to give the title product as a volatil oil (1.83 g, 89%, *litt. 87* %).[566] 1H-NMR (300 MHz, CDCl3); δ (ppm) 9.59 (s, 1H), 2.52(t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.36-2.26 (m, 2H), 1.88 (t, J = 2.7 Hz, 1H). NMR data are in accordance with those reported in literature.[567]

## I.53. Alkynyl azide 66a - 66b



**66b**

Chemical Formula: $C_4H_5N_3$
Exact Mass: 95,05
Molecular Weight: 95,10



**66a**

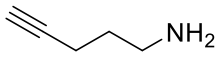
Chemical Formula: $C_5H_7N_3$
Exact Mass: 109,06
Molecular Weight: 109,13

Theses compounds were prepared following published procedure.[557] Appropriate mesylate (1 equiv) was dissolved in dry DMF (1.3M) and sodum azide (2.5 equiv) was added under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at 80°C during 3-12 h. The mixture mixture was poured into water and extracted with diethyl ether. The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to yield desired azide as a volatile light-yellow liquid (quant.).

**66a**. $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 3.43 (dd, *J* = 8.0, 5.3 Hz, 2H), 2.32 (td, *J* = 6.9, 2.7 Hz, 2H), 1.99 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 1.80 (p, *J* = 6.8 Hz, 2H). $^{13}$C NMR (CDCl3, 75 MHz) δ (ppm) 15.8, 27.7, 50.1, 69.4, 82.7. ESI-MS *m*/*z*: 110 [M+H]+. NMR data are in accordance with those reported in literature.[557]

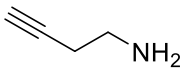
**66b**. $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 3.40 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.48-2.44 (m, 2H), 2.04 (t, J=2.8 Hz, 1H); $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 80.29, 70.44, 49.62, 19.39. NMR data are in accordance with those reported in literature.[557]

## I.54. Alkynyl amine - 67



**67a**

Chemical Formula: $C_5H_9N$
Exact Mass: 83,07
Molecular Weight: 83,13



**67b**

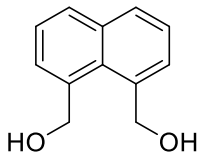
Chemical Formula: $C_4H_7N$
Exact Mass: 69,06
Molecular Weight: 69,11

Theses compounds were prepared using published procedure.[557] To a solution of appropriated azide (1 equiv) in anhydrous diethyl ether (1.5 M) at 0 °C, $PPh_3$ (1.5 equiv) was added and allowed to stirred for 3 h. Water (3.5 equiv) was then added to the reaction mixture and stirred overnight. The reaction mixture was poured into 10% aq HCl and extracted with diethyl ether. The aqueous layer was then adjusted to aqueous basic solution (pH = 10) with NaOH (4 N) and extracted with diethyl ether. The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated to yield desired amine as a volatile colorless liquid.

**67a** (60%). $^{1}$H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm) 1.19-1.28 (m, 4H), 2.18 (br s, 1H), 3.48 (t, 2H, J = 7.2 Hz). $^{13}$C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ (ppm) 15.8, 32.1, 41.0, 65.9, 84.0. MS (ESI+): *m*/*z* = 84.0 $[M+H]^+$. NMR data are in accordance with those reported in literature.[568]

**67b** (55%). $^{1}$H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm) 1.9 (br s, 1H), 2.49 (dt, J= 6.9, 2.7 Hz, 1H), 2.70 (dt, 2H, J = 6.9, 2.7 Hz), 3.25 (t, 2H, J = 6.9 Hz). $^{13}$C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ (ppm) 16.8, 47.28, 73.39, 79.25. NMR data are in accordance with those reported in literature.[557]

## I.55. Naphthalene-1,8-diyldimethanol - 69

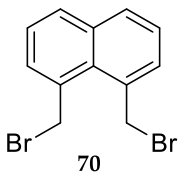



**69**

Chemical Formula: $C_{12}H_{12}O_2$
Exact Mass: 188,08
Molecular Weight: 188,23

The product was prepared using reported procedure.[569] Naphthalic anhydride (1 g, 5 mmol, 1 equiv) in anhydrous THF (15 mL) was added dropwise to a solution of $LiAlH_4$ (330 mg, 12 mmol, 2.4 equiv.) in anhydrous THF (10 mL). The result reaction mixture was refluxed for 5 h, then allowed to cool. Water and 10% aq. NaOH was added dropwise and filtered. The filtrate was concentrated in vacuum to give a white solid, which was used directly without purification (940 mg, quant.). mp = 160°C. $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.81 (d, J=8.1 Hz, 2H,), 7.50 (d, J=8.1 Hz, 2H), 7.40 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 5.23 (s, 4H), 2.94 (br s, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 63.65, 124.89, 128.08, 129.00, 130.03, 135.07, 138.50. NMR data are in accordance with those reposted in literature.[570]

## I.56. 1,8-bis(bromomethyl)naphthalene - 70



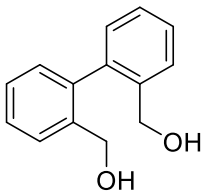

**70**

Chemical Formula: $C_{12}H_{10}Br_2$
Exact Mass: 311,91
Molecular Weight: 314,02

The title product was prepared using publied procedure.[569] A mixture of naphthalene-1,8-diyldimethanol (1.15 g, 6 mmol, 1 equiv.) and DCM (10 mL) was stirred mechanically and PBr3 (2.1 equiv) added dropwise over 20 mins. During the first half of the addition the solution refluxed spontaneously. After stirring overnight at room temperature, water was added dropwise with stirring over 20 min, which again caused refluxing (evolution of HBr). After stirring for an additional 2 h, water was added, and the layers separated, and the organic layer washed with water. The organic layer was evaporated to give a white solid, which was used directly without purification (1.86 g, quant.). mp = 130

°C. $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.14 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.89 (d, J= 8.1 Hz, 2H), 7.52 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 5.30 (s, 4H). $^{13}$C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 37.14, 119.96, 121.51, 125.68, 126.56, 131.90, 133.38. NMR data are in accordance with those reposted in literature.[571]

### I.57. [1,1'-biphenyl]-2,2'-diyldimethanol - 71

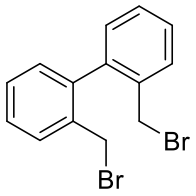



**71**

Chemical Formula: $C_{14}H_{14}O_2$
Exact Mass: 214,10
Molecular Weight: 214,26

Same procedure as **69**. White solid (500 mg, quant.). mp = 110°C. $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.51-7.49 (dd, J = 6.4, 1.2 Hz, 2H), 7.44-7.39 (td, J = 6.0, 1.6 Hz, 2H), 7.38-7.34 (td, J = 6.0, 1.6 Hz, 2H), 7.18-7.16 (dd, J = 6.0, 1.2 Hz, 2H), 4.35 (broad s, 4H), 3.07 (s, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 139.9, 138.6, 129.5, 129.4, 128.0, 127.5, 62.6. NMR data are in accordance with those reported in literature.[572]

### I.58. 2,2'-bis(bromomethyl)-1,1'-biphenyl - 72

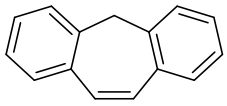



**72**

Chemical Formula: $C_{14}H_{12}Br_2$
Exact Mass: 337,93
Molecular Weight: 340,06

Same procedure as 70. White solide (790 mg, quant.). mp = 89 °C. $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.57 (dd, J = 7.6, 1.6 Hz), 7.45 (td, J = 7.6, 1.6 Hz, 2H), 7.40 (td, J = 7.6, 1.6 Hz, 2H), 7.30(dd, J = 7.6, 1.6 Hz, 2H), 4.37 (d, J = 10 Hz, 2H), 4.22 (d, J = 10 Hz, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 139.4, 135.9, 130.7, 130.2, 128.7, 128.3, 32.0. NMR data are in accordance with those reported in literature.[573]

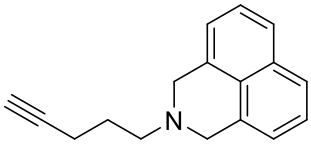
### I.59. 5H-dibenzo[a,d][7]annulene - 73



**73**
Chemical Formula: $C_{15}H_{12}$
Exact Mass: 192,09
Molecular Weight: 192,26

Same procedure as **50**. White solide (119 mg, quant.). Mp = 132 °C. $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.60 – 7.35 (m, 8H), 7.26 (s, 2H), 3.97 (s, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 137.86, 134.91, 131.25, 128.13, 127.82, 127.59, 125.78, 77.16, 41.36.

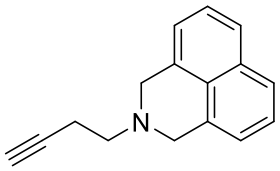
### I.60. 2-(pent-4-yn-1-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinoline - 63




**63**
Chemical Formula: $C_{17}H_{17}N$
Exact Mass: 235,14
Molecular Weight: 235,33

Compound **70** (685 mg, 1.7 mmol, 1.0 equiv) and amine **67a** (155 mg, 1.87 mmol, 1.1 equiv) were dissolved in dry MeCN (0.05 M) under argon atmosphere followed by potassium carbonate (718 mg, 5.1 mmol, 3 equiv.). The resulting heterogenous mixture was reflux overnight. Salt were removed by filtration and solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 90/10, v/v) to afford the title compound as a yellow oil that solidify upon standing (400 mg, quant.). *Rf* = 0.5 (Petroleum ether/EtOAc, 80/20, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 7.55 – 7.48 (m, 2H), 7.48 – 7.41 (m, 2H), 7.41 – 7.34 (m, 2H), 3.36 (s, 4H), 2.70 – 2.54 (m, 2H), 2.33 (td, *J* = 7.1, 2.6 Hz, 2H), 2.04 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 1.83 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 141.73, 135.54, 130.15, 128.46, 128.15, 128.07, 84.97, 68.78, 55.87, 54.51, 27.50, 16.76. MS (ESI+): *m/z* (%): 236 (100) [M+H].

### I.61. 2-(but-3-yn-1-yl)-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinoline - 76

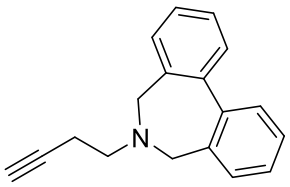


**76**

Chemical Formula: $C_{16}H_{15}N$
Exact Mass: 221,12
Molecular Weight: 221,30

Compound **70** (580 mg, 1.86 mmol, 1.1 equiv) and amine **67b** (147 µL, 1.7 mmol, 1.0 equiv) were dissolved in dry MeCN (0.05 M) under Argon atmosphere followed by potassium carbonate (470 mg, 1.86 mmol, 1.1 equiv.). The resulting heterogenous mixture was reflux 2 h. Salt were removed by filtration and solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified bu flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 90/10, v/v) to afford the title compound as a yellow solid (375 mg, quant.). *Rf* = 0.6 (Petroleum ether/EtOAc, 80/20, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.70 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.40 (dd, *J* = 8.3, 7.0 Hz, 2H), 7.20 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.03 (s, 4H), 2.86 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.55 (td, *J* = 7.5, 2.7 Hz, 3H), 2.03 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 133.18, 132.87, 128.13, 126.31, 125.74, 122.25, 82.67, 69.43, 56.55, 55.83, 17.58. MS (ESI+): *m/z* (%): 222 (100) [M+H].

### I.62. 6-(but-3-yn-1-yl)-6,7-dihydro-5H-dibenzo[c,e]azepine - 77



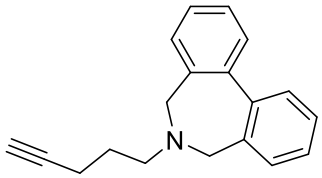
**77**

Chemical Formula: $C_{18}H_{17}N$
Exact Mass: 247,14
Molecular Weight: 247,34

Compound **72** (697 mg, 2.05 mmol, 1.1 equiv) and amine **67b** (1.86 mmol, 1.0 equiv) were dissolved in dry MeCN (0.05 M) under Argon atmosphere followed by potassium carbonate (515 mg, 3.72 mmol, 2 equiv.). The resulting heterogenous mixture was reflux overnight. Salt were removed by filtration and solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 92/8, v/v) to afford the title compound as an orange oil (915 mg, quant.). *Rf* = 0.18 (Petroleum ether/EtOAc, 92/8, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.54 – 7.39 (m, 4H), 7.39 – 7.33 (m, 4H), 3.43 (s, 4H), 2.80 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.52 (td, *J* = 7.4, 2.6 Hz,

2H), 2.03 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 141.25, 134.61, 129.89, 128.25, 127.86, 127.78, 77.16, 69.36, 55.51, 54.23, 18.36. MS (ESI+): *m/z* (%): 248 (100) [M+H].

### I.63. 6-(pent-4-yn-1-yl)-6,7-dihydro-5H-dibenzo[c,e]azepine - 78

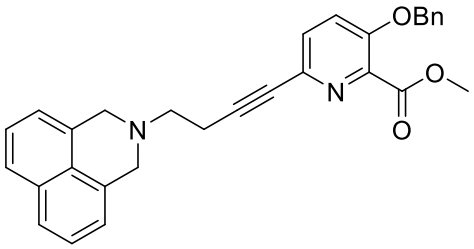


**78**

Chemical Formula: $C_{19}H_{19}N$
Exact Mass: 261,15
Molecular Weight: 261,37

Compound **72** (1 g, 3.1 mmol, 1.0 equiv) and amine **67a** (3.1 mmol, 1.0 equiv) were dissolved in dry MeCN (0.05 M) under argon atmosphere followed by potassium carbonate (860 mg, 6.2 mmol, 2 equiv.). The resulting heterogenous mixture was reflux overnight. Salt were removed by filtration and solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 95/5, v/v) to afford the title compound as an orange oil (839 mg, quant.). *Rf* = 0.4 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.57 – 7.30 (m, 8H), 3.40 (s, 4H), 2.74 – 2.57 (m, 2H), 2.32 (td, *J* = 7.1, 2.6 Hz, 2H), 1.99 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.95 – 1.77 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 139.4, 135.9, 130.7, 130.2, 128.7, 128.3, 82.75, 69.22, 56.28, 55.76, 17.25. MS (ESI+): *m/z* (%): 262 (100) [M+H].

### I.64. Methyl 6-(4-(1H-benzo[de]isoquinolin-2(3H)-yl)but-1-yn-1-yl)-3-(benzyloxy)picolinate - 79



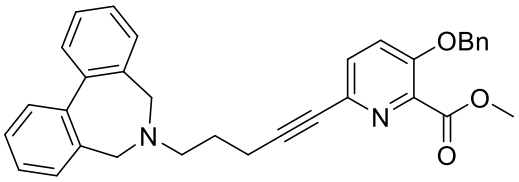

**79**

Chemical Formula: $C_{30}H_{26}N_2O_3$
Exact Mass: 462,19
Molecular Weight: 462,55

To an degassed solution of bromo pyridine **4a** (580 mg, 1.81 mmol, 1 equiv.) and alkyne **76** (400 mg, 1.81 mmol, 1 equiv) in dry dichloromethane/triethylamine (40/20, v/v) were added $Pd(PPh_3)_4$ (100 mg, 0.09 mmol, 0.05 equiv.) CuI (35 mg, 0.18 mmol, 0.1 equiv.) and the solution was stirred under argon at rt overnight in absence of light. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and

purifided by flash chromatography (Petroleum ether/EtOAc, 40/60, v/v) to give **79** as a orange solid (35.7 mg, 4%, trace of $PPh_3$). *Rf* = 0.42 (Petroleum ether/EtOAc, 40/60, v/v). $^1H$ NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.60 (d, *J* = 1.0 Hz, 2H), 8.20 (dd, *J* = 8.3, 1.0 Hz, 2H), 7.74 (dd, *J* = 8.2, 7.3 Hz, 2H), 7.45 – 7.30 (m, 8H), 5.18 (s, 2H), 4.50 – 4.42 (m, 2H), 3.93 (s, 7H), 2.87 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 463 $[M+H]^+$, 485 $[M+Na]^+$.

## I.65. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(5,7-dihydro-6H-dibenzo[c,e]azepin-6-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate

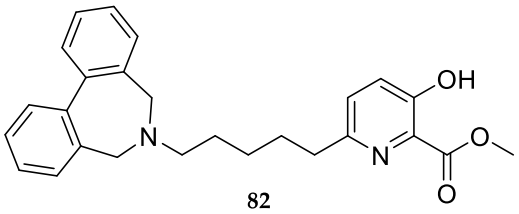



**81**

Chemical Formula: $C_{33}H_{30}N_2O_3$
Exact Mass: 502,23
Molecular Weight: 502,61

To an degassed solution of bromo pyridine **4a** (1.1 g, 3.01 mmol, 1 equiv.) and alkyne **78** (813 mg, 3.01 mmol, 1 equiv) in dry dichloromethane/triethylamine (40/20, v/v) were poured $Pd(PPh_3)_4$ (162 mg, 0.14 mmol, 0.05 equiv.) CuI (57 mg, 0.3 mmol, 0.1 equiv.) and the solution was stirred under argon at rt overnight in absence of light. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and purifided by flash chromatography (Petroleum ether/EtOAc + 1% triethylamine, 60/40/1 to 40/60/1, v/v/v) to give **81** as a brown foam (450 mg, 30%, trace of $PPh_3$). *Rf* = 0.29 (Petroleum ether/EtOAc + 1% triethylamine, 1/1/0.1, v/v/v). $^1H$ NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.54 – 7.22 (m, 15H), 5.13 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.38 (s, 4H), 2.67 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.53 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.98 – 1.84 (m, 2H). $^{13}C$ NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.58, 152.51, 140.77, 139.81, 135.27, 135.12, 134.35, 132.95, 131.78, 131.65, 131.58, 129.70, 129.44, 128.38, 128.29, 128.13, 127.87, 127.70, 127.35, 127.22, 126.61, 121.48, 89.82, 79.38, 70.41, 55.04, 53.89, 52.28, 26.48, 20.70, 17.06. MS (ESI+): *m/z* (%): 503 (100) [M+H].

## I.66. Methyl 6-(5-(5,7-dihydro-6H-dibenzo[c,e]azepin-6-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate

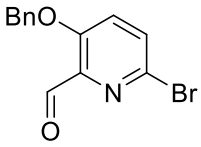



**82**

Chemical Formula: $C_{26}H_{28}N_2O_3$
Exact Mass: 416,21
Molecular Weight: 416,52

Compound **81** (450 mg, 0.9 mmol) was dissolved in MeOH (20 mL, 0.05 M) and the homogenous solution was degased 20 min using argon. $Pd(OH)_2/C$ (90 mg, 20% w/w) was added. After 10 min of degasing using Argon, baloon of hydrogene gas was bubbled and the mixture was stirred under hydrogen atmosphere at rt overnight. The crude mixture was filtered over celite®, solvents were removed under vacuum. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc+ 1% triethylamine, 10/90/1, v/v/v) to give the desired product with toluene and PPh3 trace (338 mg, 90%). *Rf* = 0.13 (Petroleum ether/EtOAc+ 2% triethylamine, 20/80/2, v/v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 10.52 (s, 1H), 7.74 – 7.20 (m, 10H), 3.99 (s, 3H), 3.35 (s, 4H), 2.86 – 2.71 (m, 2H), 2.62 – 2.45 (m, 2H), 1.70 (m, 4H), 1.55 – 1.34 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 170.83, 157.55, 154.48, 141.69, 135.57, 134.19, 132.82, 132.52, 132.39, 132.36, 130.12, 129.61, 129.40, 129.09, 128.94, 128.37, 128.07, 128.00, 126.79, 55.79, 55.69, 53.35, 37.99, 30.50, 28.36, 27.71. MS (ESI+): *m/z* (%): 417 [M+H].

## I.67. 3-(benzyloxy)-6-bromopicolinaldehyde - 84



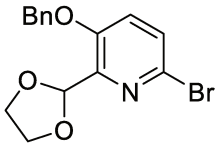

**84**

Chemical Formula: $C_{13}H_{10}BrNO_2$
Exact Mass: 290,99
Molecular Weight: 292,13

Compound **4a** (1.43 g, 4.46 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dry dichloromethane (30 mL), the solution was cooled down to -78 °C, DIBAL (8.92 mL, 8.92 mmol, 2 eq.) was slowly added. This mixture was stirred at -78 °C for 15 min. MeOH (9 mL) was slowly added, then the mixture was allowed to warm to rt. The reaction mixture was diluted with dichloromethane, washed with aqueous NaOH (1 M), water and brine. Organic layer was dried over magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure to give **84** as a white powder (1.3 g, quant.). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 10.18 (s, 1H), 7.49 (d, J =

8.8 Hz, 1H), 7.39 – 7.22 (m, 6H), 5.19 (s, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 189.2, 157.0, 143.6, 139.8, 134.7, 129.0, 128.8, 127.3, 126.1, 124.6, 71.1. MS (ESI+): *m/z* (%): 293 [M+H].

### I.68. 3-(benzyloxy)-6-bromo-2-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridine - 85

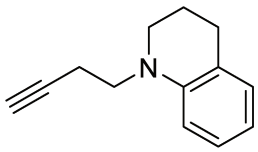



**85**

Chemical Formula: $C_{15}H_{14}BrNO_3$
Exact Mass: 335,02
Molecular Weight: 336,19

A bed of molecular sieves previously activated was put in a round bottom flask under argon. dichloromethane (80 mL) was added and **84** (1.3 g, 4.45 mmol) was dissolved. After cooling at 0 °C, ethylene glycol (1.23 mL, 22.25 mmol, 5 eq.), then dropwise $BF_3.Et_2O$ (1.1 mL, 8.9 mmol, 2 eq.) were added in this order. The mixture was allowed to warm at rt overnight. Molecular sieves were filtered off and the filtrate was washed with water. Organic layer was dried over magnesium sulfate and evaporated to give **85** as a white powder (1.42 g, 95%). *Rf* = 0.5 (Petroleum ether/EtOAc, 8/2, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 7.39 – 7.21 (m, 7H), 7.05 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.21 (s, 1H), 5.04 (s, 2H), 4.24 – 4.06 (m, 2H), 4.06 – 3.91 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$):@@@= 65.9, 71.0, 99.9, 123.3, 127.5, 128.5, 128.8, 128.9, 131.4, 135.6, 147.5, 152.9. MS (ESI+): *m/z* (%): 336 (85) and 338 (100) $[M+H]^+$.

### I.69. 1-(but-3-yn-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline - 95



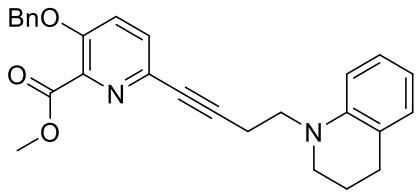

**95**

Chemical Formula: $C_{13}H_{15}N$
Exact Mass: 185,12
Molecular Weight: 185,27

Tosylate **62b** (1.12g, 5 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry MeCN (80 mL, 0.05 M) under argon atmosphere and the resulting mixture was cooled down to 0 °C. 1,2,3,4-tetrahydroquinoline (660 µL, 5.05 mmol, 1.01 equiv.) followed by potassium carbonate (800 mg, 5.7 mmol, 1.2 equiv.) were added in this order. The resulting heterogenous mixture was reflux overnight. Salt were removed by filtration and solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 100/0 to 96/4, v/v) to give the 95 as a yellow oil

(86 mg, 9%). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.13 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 6.65 (dd, *J* = 6.7, 7.1 Hz, 2H), 3.56 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.41 (m, 2H), 2.82 (m, 2H), 2.53 (m, 2H), 2.15 – 1.90 (m, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 144.45, 129.48, 127.30, 122.59, 116.14, 110.49, 82.52, 69.63, 50.55, 49.75, 28.20, 22.27, 16.06.

### I.70. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(3,4-dihydroquinolin-1(2H)-yl)but-1-yn-1-yl)picolinate – 99

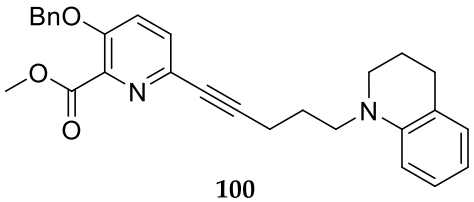



**99**

Chemical Formula: $C_{27}H_{26}N_2O_3$
Exact Mass: 426,19
Molecular Weight: 426,52

To an degassed solution of bromo pyridine **4a** (149 mg, 0.46 mmol, 1 equiv.) in dry dichloromethane/triethylamine (2/1, v/v, 0.1M) and **95** (86 mg, 0.46 mmol, 1 equiv) were poured $Pd(PPh_3)_4$ (27 mg, 0.023 mmol, 0.05 equiv.) CuI (9.5 mg, 0.046 mmol, 0.1 equiv.) and the solution was stirred under argon at rt overnight in absence of light. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and purifided by flash chromatography (Petroleum ether/EtOAc, 100/0 to 70/30, v/v) to give 99 as an orange oil (35 mg, 14%). *Rf* = 0.30 (Petroleum ether/EtOAc, 80/20, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.36 (m, 7H), 7.05 (m, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.60 (m, 2H), 5.21 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.57 (m, 2H), 3.34 (m, 2H), 2.74 (m, 2H), 2.66 (m, 2H), 1.95 (m, 2H). MS (ESI+): *m/z* (%): 427 $[M+H]^+$.

### I.71. methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(3,4-dihydroquinolin-1(2H)-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 100



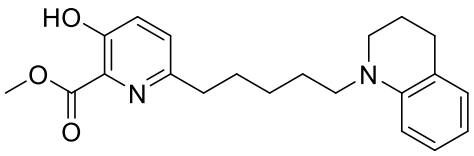

**100**

Chemical Formula: $C_{28}H_{28}N_2O_3$
Exact Mass: 440,21
Molecular Weight: 440,54

Tosylate **59b** (993 mg, 2.07 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry MeCN (20 mL, 0.1 M) under Argon atmosphere and the resulting mixture was cooled down to 0 °C. 1,2,3,4-tetrahydroquinoline (300 µL, 2.5 mmol, 1.2 equiv.) followed by potassium carbonate (575 mg, 5.7 mmol, 2 equiv.) were added in this order. The resulting heterogenous mixture was reflux overnight. Salt were removed by filtration and

solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified byflash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 100/0 to 50/50, v/v) to give the 95 as an orange oil (212 mg, 24%). *Rf* = 0.5 (Petroleum ether/EtOAc, 50/50, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.49 – 7.28 (m, 7H), 7.03 (td, *J* = 8.3, 1.7 Hz, 1H), 6.94 (dd, *J* = 7.3, 1.4 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.56 (td, *J* = 7.3, 1.0 Hz, 1H), 5.20 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.46 – 3.35 (m, 2H), 3.33 – 3.24 (m, 2H), 2.75 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.48 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.01 – 1.80 (m, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.90, 152.99, 145.26, 140.21, 135.59, 135.44, 129.99, 129.25, 128.80, 128.29, 127.14, 126.97, 122.41, 121.84, 115.63, 110.63, 89.73, 79.86, 70.89, 52.73, 50.48, 49.79, 28.20, 25.18, 22.31, 17.13. MS (ESI+): *m*/*z* (%): 441 $[M+H]^+$.

## I.72. Methyl 6-(5-(3,4-dihydroquinolin-1(2H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate -101

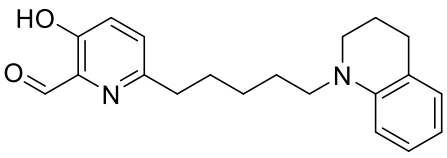



**101**

Chemical Formula: $C_{21}H_{26}N_2O_3$
Exact Mass: 354,19
Molecular Weight: 354,45

Benzyl ether **100** (210 mg, 0.5 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in MeOH (0.05 M) and the homogenous solution was degased 20 min using argon. $Pd(OH)_2/C$ (42 mg, 20% w/w) was added. After 10 min of degasing using Argon, baloon of hydrogene gas was bubbled and the mixture was stirred under hydrogen atmosphere at rt until completion. The crude mixture was filtered over celite®, solvents were removed under vacuum to give **101** as a red oil (171 mg, 96%). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.34 – 7.25 (m, 2H), 7.04 (td, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 6.99 – 6.87 (m, 1H), 6.58 – 6.51 (m, 2H), 4.05 (s, 3H), 3.25 (dd, *J* = 13.1, 6.9 Hz, 4H), 2.86 – 2.71 (m, 4H), 1.99 – 1.88 (m, 2H), 1.70 (ddt, *J* = 23.0, 11.7, 7.6 Hz, 6H), 1.47 – 1.35 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.18, 157.20, 153.95, 145.28, 129.17, 129.14, 128.84, 127.04, 126.64, 122.19, 115.28, 110.44, 53.14, 51.34, 49.47, 37.62, 29.99, 28.21, 26.92, 26.09, 22.26. MS (ESI+): *m*/*z* (%): 355 $[M+H]^+$.

## I.73. 6-(5-(3,4-dihydroquinolin-1(2H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde - 102

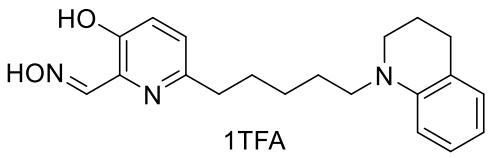



**102**

Chemical Formula: $C_{20}H_{24}N_2O_2$
Exact Mass: 324,18
Molecular Weight: 324,42

Compound **101** (169 mg, 0.48 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry dichloromethane (10 mL, 0.05 M), then triethylamine (192 µL, 1.2 mmol, 2.5 equiv) and TBSOTf (143 µL, 0.53 mmol, 1.1 equiv) were added dropwise at 0°C. The mixture was stirred at rt 1 h. Resulting mixture was diluted in dichloromethane, washed with water, brine and dried under sodium sulfate. dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyle ether that was dissolved in dry dichloromethane (10 mL, 0.05 M) and cooled down to -78°C. DIBAL-H (1.2 mL, 1.2 mmol, 2.5 equiv.) was added dropwised and the mixture was stirred at -78°C during 15 min. Methanol (1.2 mL) was added and the crude mixture was heat up to rt. After dilution with dichloromethane, the organic layer was washed using aqueous NaOH (1M), water and brine. After dring under sodium sulfate, dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyl ether aldehyde moety that was dissolved in dry THF (20 mL) and cooled down to 0°C. TBAF (350 µL, 1 equiv) was added dropwise and the mixture was stirred at 0 °C during 30 min. THF was removed under vacuum and the crude was purified by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 80/20, v/v) to give the title product as a red oil (81 mg, 52% over 3 steps). *Rf* = 0.62 (Petroleum ether/EtOAc, 80/20, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.08 (s, 1H), 7.32 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 7.07 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.68 – 6.53 (m, 2H), 3.29 (dd, *J* = 12.5, 5.5 Hz, 4H), 2.82 (dt, *J* = 12.2, 6.8 Hz, 4H), 1.97 (dt, *J* = 12.6, 6.2 Hz, 2H), 1.83 (dt, *J* = 15.6, 7.9 Hz, 2H), 1.76 – 1.60 (m, 2H), 1.56 – 1.38 (m, 2H). MS (ESI+) *m/z* = 325 $[M+H]^+$.

### I.74. 6-(5-(3,4-dihydroquinolin-1(2H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde oxime – 93 (AB-392)

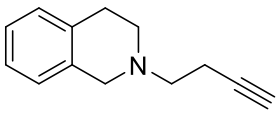



**93 (AB-392)**

Chemical Formula: $C_{20}H_{25}N_3O_2$
Exact Mass: 339,19
Molecular Weight: 339,44

Aldehyde **102** (81 mg, 0.25 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry MeOH under argon. Hydroxylamine hydrochloride (19 mg, 0.26 mmol, 1.1 equiv) and sodium acetate (25 mg, 0.3 mmol, 1.2 equiv) were added and the mixture was stirred at rt 4h. Methanol was removed under vacuum and the crude oxime was purified using reverse phase chromatography (method D) to give the TFA salt of the title compound as a white-off solid (81.6 mg, 72%). 1H NMR (300 MHz, CDCl3) δ (ppm) 10.57 (br s, 3H), 8.37 (s, 1H), 8.15 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 7.47 (dd, J = 11.3, 4.2 Hz, 1H), 7.14 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.67 – 6.55 (m, 2H), 3.65-3.50 (m, 4H), 2.77-2.61 (m, 6H), 2.51 – 2.39 (m, 2H), 1.76 – 1.53 (m, 4H), 1.42-1.28 (m, 2H). 13C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 159.25, 153.13, 152.56, 147.82, 137.79, 135.30, 124.52, 123.68, 113.74, 107.45, 58.40, 52.63, 44.62, 37.02, 29.89, 27.04, 25.8, 22.78. HRMS (ESI+): *m/z* calcd for C20H26N3O2 340.2025; found: 340.2027. HPLC (Method B): $t_R$ = 15.70 min, purity = 98.34%. MS (ESI+): *m/z* (%): 340 $[M+H]^+$.

### I.75. 2-(but-3-yn-1-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline -104



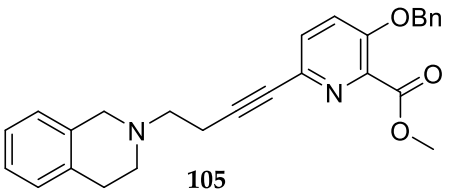

**104**

Chemical Formula: $C_{13}H_{15}N$
Exact Mass: 185,12
Molecular Weight: 185,27

Mesylate **57b** (740 mg, 5 mmol, 2.0 equiv) was dissolved in dry MeCN (50 mL, 0.1 M) under argon atmosphere and the resulting mixture was cooled down to 0 °C. 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (330 µL, 2.5 mmol, 1 equiv.) followed by potassium carbonate (766 mg, 5.5 mmol, 2.2 equiv.) were added in this order. The resulting heterogenous mixture was reflux overnight. Salt were removed by filtration and solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (Petroleum ether/EtOAc, 80/20, v/v) to give the title compound as a yellow oil (408.4 mg, 88%). *Rf* = 0.36 (Petroleum ether/EtOAc, 80/20, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.24 – 7.06 (m, 3H), 7.06 – 6.97 (m, 1H), 3.69 (s, 2H), 2.91 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.85 – 2.70 (m, 4H), 2.56 – 2.43 (m, 2H),

2.00 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 134.60, 134.24, 128.80, 126.71, 126.30, 125.76, 82.85, 69.24, 56.85, 55.85, 50.82, 29.10, 17.34. MS (ESI+): *m*/*z* (%): 186 $[M+H]^+$.

### I.76. methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)but-1-yn-1-yl)picolinate -105

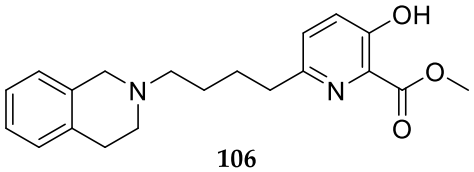



**105**

Chemical Formula: $C_{27}H_{26}N_2O_3$
Exact Mass: 426,19
Molecular Weight: 426,52

To an argon degassed solution of 4a (509 mg, 1.58 mmol, 1 equiv.) in dry dichloromethane/triethylamine (2/1, v/v, 0.1M) and alkyne 104 (293 mg, 1.58 mmol, 1 equiv) were poured $Pd(PPh_3)_4$ (91 mg, 0.079 mmol, 0.05 equiv.) CuI (30 mg, 0.158 mmol, 0.1 equiv.) and the solution was stirred under argon at rt overnight in absence of light. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and purifided by flash chromatography (Petroleum ether/EtOAc, 40/60, v/v) to give the desired cross-coupling product 105 as an orange oil (300 mg, 45 %, trace of $PPh_3$ remaining). *Rf* = 0.25 (Petroleum ether/EtOAc, 1/1, v/v). MS (ESI+): *m*/*z* = 427 $[M+H]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.51 – 7.31 (m, 7H), 7.18 – 6.97 (m, 4H), 5.20 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.70 (s, 2H), 2.95 – 2.76 (m, 5H), 2.76 – 2.63 (m, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.90, 153.06, 140.23, 135.62, 135.43, 134.57, 134.19, 130.05, 128.83, 128.76, 128.33, 127.00, 126.68, 126.26, 125.73, 121.86, 88.50, 80.16, 70.94, 56.63, 55.78, 52.76, 50.80, 29.14, 18.18.

### I.77. Methyl 6-(4-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)butyl)-3-hydroxypicolinate - 106



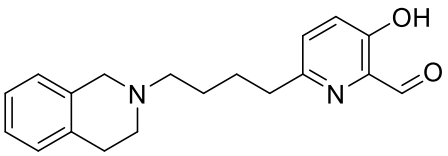

**106**

Chemical Formula: $C_{20}H_{24}N_2O_3$
Exact Mass: 340,18
Molecular Weight: 340,42

Compound **105** (279 mg, 0.63 mmol) was dissolved in MeOH (13 mL, 0.05 M) and the homogenous solution was degased 20 min using argon. $Pd(OH)_2/C$ (56 mg, 20% w/w) was added. After 10 min of degasing using Argon, baloon of hydrogene gas was bubbled and the mixture was stirred under hydrogen atmosphere at rt overnight. The crude mixture was filtered over celite®, solvents were removed under vacuum to give compound 106 as a brown oil (203 mg, 97%). MS (ESI+): *m*/*z* (%): 341

$[M+H]^+$. $^1H$ NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.59 (s, 1H), 7.34 – 7.27 (m, 2H), 7.15 – 6.98 (m, 4H), 4.02 (s, 3H), 3.48 (s, 2H), 2.99 – 2.68 (m, 6H), 2.59 (s, 2H), 1.83 – 1.62 (m, 4H). $^{13}C$ NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 169.69, 156.77, 153.33, 133.60, 133.54, 131.72, 131.59, 128.82, 128.43, 128.24, 126.26, 126.20, 125.92, 125.36, 57.43, 55.37, 52.70, 50.36, 36.96, 28.22, 27.46, 26.04.

### I.78. 6-(4-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)butyl)-3-hydroxypicolinaldehyde – 107




**107**
Chemical Formula: $C_{19}H_{22}N_2O_2$
Exact Mass: 310,17
Molecular Weight: 310,40

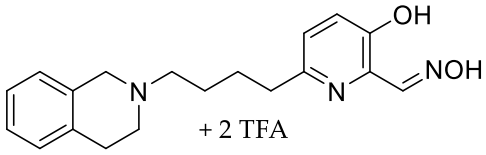
Compound **106** (690 mg, 2.03 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dry dichloromethane (20 mL, 0.1 M), then triethylamine (850 µL, 6.09 mmol, 3 equiv) and TBSOTf (550 µL, 3.05, 2.5 equiv) were added dropwise at 0°C. The mixture was stirred at rt 3 h. Resulting mixture was diluted in dichloromethane, washed with water, brine and dried under sodium sulfate. dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyle ether. $^1H$ NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.18 – 6.98 (m, 6H), 3.92 (s, 3H), 3.60 (s, 2H), 2.89 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.85 – 2.77 (m, 2H), 2.58 – 2.46 (m, 4H), 1.85 – 1.58 (m, 4H), 1.02 – 0.97 (m, 9H), 0.22 – 0.18 (m, 6H).

The crude silyl ether (880 mg, 2.03 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry dichloromethane (20 mL, 0.1 M) and cooled down to -78°C. DIBAL-H (5.07 mL, 5.07 mmol, 2.5 equiv) was added dropwised and the mixture was stirred at -78°C during 15 min. Methanol (5 mL) was added and the crude mixture was heat up to rt. After dilution with dichloromethane, the organic layer was washed using aqueous NaOH (1M), water and brine. After dring under sodium sulfate, dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyl ether aldehyde moety used without purification in the next step. $^1H$ NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.33 (s, 1H), 7.18 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.12 – 6.98 (m, 4H), 3.60 (s, 2H), 2.92 – 2.82 (m, 4H), 2.71 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.57 – 2.48 (m, 2H), 1.85 – 1.62 (m, 4H), 1.01 (s, 9H), 0.25 (s, 6H).

Crude product was dissolved in dry THF (20 mL) and cooled down to 0 °C. TBAF (2.44 mL, 2.44 mmol, 1.2 equiv) was added dropwise and the mixture was stirred at 0 °C during 30 min. THF was removed under vacuum and the crude was purified using silica gel flash chromatography (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v) to give the title compound as an orange oil (180 mg, 28%). *Rf* = 0.28 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v). $^1H$ NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.02 (s, 1H), 7.31 – 7.20 (m, 2H), 7.15 – 6.94 (m, 4H), 3.61 (s, 2H), 2.94 – 2.76 (m, 4H), 2.72 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.61 – 2.50 (m, 2H), 1.87 – 1.60 (m, 4H). $^{13}C$ NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.59, 156.87, 154.65, 135.63, 134.61, 134.17, 129.64,

128.54, 126.47, 126.25, 126.03, 125.51, 58.01, 56.08, 50.88, 37.06, 28.95, 27.47, 26.64. MS (ESI+): *m/z* (%): 311 $[M+H]^+$.

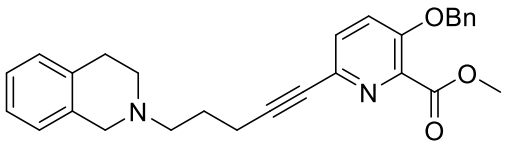
### I.79. AB558 - 90




**90 - AB558**
Chemical Formula: $C_{19}H_{23}N_3O_2$
Exact Mass: 325,18
Molecular Weight: 325,41

Aldehyde **107** (179 mg, 0.58 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry methanol (5.8 mL, 0.1 M). Hydroxylamine hydrochloride (84 mg, 1.2 mmol, 2 equiv) and sodium acetate (123 mg, 1.5 mmol, 2.5 equiv) were added and the mixture was stirred atrt during 3 h. Concentration until dryness and subsequent reverse phase purification (Method D) gave TFA salt of title compound as a white-off solid (242 mg, 75%). $^{13}C$ NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 161.13 (q, J = 37 Hz), 154.26, 152.30, 148.51, 135.30, 132.10, 129.86, 129.46, 129.10, 128.85, 128.27, 127.85, 126.62, 56.96, 54.20, 51.14, 35.37, 27.72, 26.33, 24.64. HPLC (Method B): $t_R$ = 18.5 min (> 99%). MS (ESI+): *m/z* (%): 326 (100) $[M+H]^+$. HRMS (ESI+): *m/z* calcd for C19H24N3O2 326.1869; found: 326.1863.

### I.80. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 108



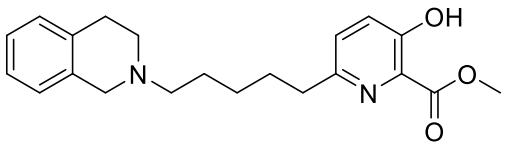

**108**

Chemical Formula: $C_{28}H_{28}N_2O_3$
Exact Mass: 440,21
Molecular Weight: 440,54

Tosylate **59a** (992 mg, 2.07 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry MeCN (20 mL, 0.1 M) under Argon atmosphere and the resulting mixture was cooled down to 0°C. 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (300 µL, 2.28 mmol, 1.1 equiv.) followed by potassium carbonate (575 g, 4.14 mmol, 2 equiv.) were added in this order. The resulting heterogenous mixture was reflux overnight. Salt were removed by filtration and solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH, 98/2, v/v) to afford 108 as a yellow oil (662 mg, 72%). *Rf* = 0.24 (dichloromethane/MeOH, 98/2, v/v). $^1H$ NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.45 – 7.24 (m, 6H), 7.14 – 6.99

(m, 4H), 5.20 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.64 (s, 2H), 2.90 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.74 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.67 – 2.59 (m, 2H), 2.51 (dd, *J* = 12.1, 4.9 Hz, 2H), 1.96 – 1.84 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.94, 152.98, 140.18, 135.65, 134.93, 134.46, 132.10, 130.06, 128.61, 127.01, 126.67, 126.17, 125.66, 121.90, 90.26, 79.58, 70.95, 57.37, 56.28, 52.76, 51.02, 29.24, 26.10, 17.50

### I.81. Methyl 6-(5-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate - 109

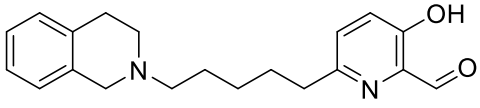



**109**

Chemical Formula: $C_{21}H_{26}N_2O_3$
Exact Mass: 354,19
Molecular Weight: 354,45

Compound **108** (660 mg, 1.5 mmol) was dissolved in MeOH (30 mL, 0.05 M) and the homogenous solution was degased 20 min using argon. $Pd(OH)_2/C$ (132 mg, 20% w/w) was added. After 10 min of degasing using Argon, baloon of hydrogene gas was bubbled and the mixture was stirred under hydrogen atmosphere at rt until completion. The crude mixture was filtered over celite®, solvents were removed under vacuum to afford the product as orange oil (510 mg, 97%). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.25 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 7.11 – 6.95 (m, 4H), 4.01 (s, *J* = 6.3 Hz, 3H), 3.61 (s, 2H), 2.88 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.83 – 2.75 (m, 2H), 2.71 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.54 – 2.46 (m, 2H), 1.80 – 1.69 (m, 2H), 1.68 – 1.58 (m, 2H), 1.48 – 1.35 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.01, 157.04, 153.86, 134.47, 134.08, 129.01, 128.58, 126.45, 125.99, 125.47, 58.07, 55.97, 52.97, 50.73, 37.46, 29.87, 28.83, 27.13, 26.82.

### I.82. 6-(5-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde - 110



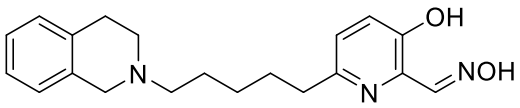

**110**

Chemical Formula: $C_{20}H_{24}N_2O_2$
Exact Mass: 324,18
Molecular Weight: 324,42

Compound **109** (462 mg, 1.65 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry dichloromethane (0.1 M), then triethylamine (500µL, 3.5 mmol, 2.1 equiv) and TBSOTf (360µL, 1.98 mmol, 1.2 equiv) were added dropwise at 0 °C. The mixture was stirred at rt 4 h. Resulting mixture was diluted in dichloromethane, washed with water, brine and dried under sodium sulfate. dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyle ether that was dissolved in dry dichloromethane (0.1 M) and cooled

down to -78°C. DIBAL-H (4.2 mL, 4.2 mmol, 2.5 equiv.) was added dropwised and the mixture was stirred at -78°C during 15 min. Methanol was added and the crude mixture was heat up to rt. After dilution with dichloromethane, the organic layer was washed using aqueous NaOH (1M), water and brine. After dring under sodium sulfate or magnesium sulfate, dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyl ether aldehyde moety used without purification in the next step. Crude reduced silyl ether was dissolved in dry THF (0.1 M) and cooled down to 0°C. TBAF (1.66 mL, 1.66 mmol, 1.2 equiv.) was added dropwise and the mixture was stirred at 0°C during 60 min. THF was removed under vacuum and the crude was purified using flash chromatography (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v) to afford the product as a pale-yellow oil (322 mg, 60 % over 3 steps). *Rf* = 0.43 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.02 (s, 1H), 7.30 – 7.21 (m, 2H), 7.14 – 6.91 (m, 4H), 3.62 (s, 2H), 2.89 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.83 – 2.66 (m, 4H), 2.55 – 2.46 (m, 2H), 1.84 – 1.58 (m, 4H), 1.50 – 1.34 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.7, 156.94, 154.91, 135.71, 134.70, 134.25, 129.71, 128.62, 126.32, 126.31, 126.10, 125.58, 58.22, 56.16, 50.91, 37.26, 29.62, 29.00, 27.19, 26.97.

## I.83. AB746 - 91




2.05 TFA

**91 - AB-746**

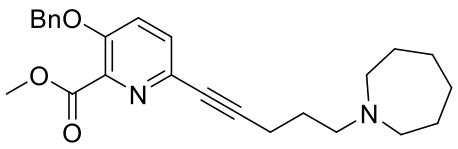
Chemical Formula: $C_{20}H_{25}N_3O_2$

Exact Mass: 339,19

Molecular Weight: 339,44

Aldehyde 110 (322 mg, 0.99 mmol, 1 equiv) was dissolved in dry MeOH (10 mL) under argon. Hydroxylamine hydrochloride (75 mg, 1.08 mmol, 1.1 equiv) and sodium acetate (110 mg, 1.35 mmol, 1.5 equiv) were added and the mixture was stirred at 4h. Methanol was removed under vacuum and the crude oxime was purified using reverse phase chromatography (Method D) to give the title compound as a yellow solid (227.1 mg, 64%). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.37 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.33 – 7.02 (m, 4H), 5.60 (s, 3H), 4.54 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H), 4.26 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H), 3.73 (s, 1H), 3.45-3.15 (m, 4H), 3.12 – 2.81 (m, 3H), 2.00 – 1.60 (m, 4H), 1.56-1.38 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 162.74 (q, *J* = 34.9 Hz, $CF_3$), 154.41, 151.33, 143.78, 133.32, 132.48, 132.01, 129.70, 129.26, 128.76, 128.10, 127.72, 123.78, 119.90, 116.02, 112.14, 57.03, 53.99, 50.95, 49.00, 33.97, 30.05, 26.86, 26.23, 24.71. HPLC (Method B): $t_R$ = 19.07 min (95%). MS (ESI+): *m*/*z* (%): 340 (100) $[M+H]^+$. HRMS (ESI+): *m*/*z* calcd for C20H26N3O2 340.2029; found: 340.2025.

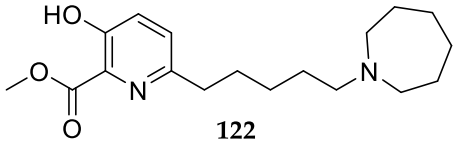
### I.84. Methyl 6-(5-(azepan-1-yl)pent-1-yn-1-yl)-3-(benzyloxy)picolinate – 121




**121**
Chemical Formula: $C_{25}H_{30}N_2O_3$
Exact Mass: 406,23
Molecular Weight: 406,53

Mesylate **57a** (581 mg, 1.8 mmol, 1.03 equiv) was dissolved in dry MeCN (20 mL, 0.1 M) under Argon atmosphere and the resulting mixture was cooled down to 0°C. Azepane (200 µL, 1.74 mmol, 1.0 equiv.) followed by potassium carbonate (745 mg, 5.4 mmol, 1.5 equiv.) were added in this order. The resulting heterogenous mixture was reflux overnight. Salt were removed by filtration and solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v) to afford the desired product as a brown oil (438 mg, 62%). *Rf* = 0.27 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v).$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.54 – 7.14 (m, 7H), 5.18 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 2.78 – 2.50 (m, 6H), 2.44 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.85 – 1.68 (m, 2H), 1.59 (s, 8H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.74, 152.68, 139.88, 135.45, 129.85, 128.56, 128.05, 126.78, 121.69, 90.34, 79.20, 70.65, 57.01, 55.33, 52.48, 28.07, 26.89, 26.40, 17.18.

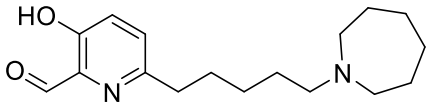
### I.85. methyl 6-(5-(azepan-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate - 122




**122**
Chemical Formula: $C_{18}H_{28}N_2O_3$
Exact Mass: 320,21
Molecular Weight: 320,43

Compound **121** (369 mg, 0.91 mmol, 1 equiv) was dissolved in MeOH (18 mL, 0.05 M) and the homogenous solution was degased 20 min using argon. $Pd(OH)_2/C$ (147 mg, 20% w/w) was added. After 10 min of degasing using Argon, baloon of hydrogene gas was bubbled and the mixture was stirred under hydrogen atmosphere at rt until completion. The crude mixture was filtered over celite®, solvents were removed under vacuum to give 122 as an orangeous oil (291 mg, quant.). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.97 (br s, 1H), 7.25 (s, 2H), 4.01 (s, 3H), 2.83 – 2.69 (m, 2H), 2.69 – 2.53 (m, 4H), 2.54 – 2.39 (m, 2H), 1.75 – 1.44 (m, 12H), 1.40 – 1.26 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.16, 157.18, 154.00, 129.18, 128.78, 126.63, 57.94, 55.25, 53.14, 37.56, 29.91, 27.15, 27.01, 26.72.

### I.86. 6-(5-(azepan-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde - 123

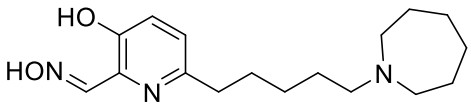



**123**

Chemical Formula: $C_{17}H_{26}N_2O_2$
Exact Mass: 290,20
Molecular Weight: 290,41

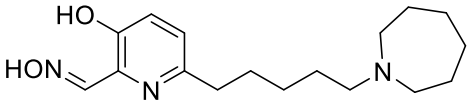
Unprotected 3-hydroxypyridine-2-methyl ester **122** (86 mg, 0.28 mmol, 1 equiv) was dissolved in dry dichloromethane (10 mL, 0.2 M), then triethylamine (118 µL, 0.84, 3 equiv) and TBSOTf (77 µL, 0.42 mmol, 1.5 equiv) were added dropwise at 0 °C. The mixture was stirred at rt overnight. Resulting mixture was diluted in dichloromethane, washed with water, brine and dried under sodium sulfate. dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyle ether that was dissolved in dry dichloromethane (0.1 M) and cooled down to -78 °C. DIBAL-H (685 µL, 685 µmol, 2.5 equiv) was added dropwised and the mixture was stirred at -78 °C during 15 min. Methanol was added and the crude mixture was heat up to rt. After dilution with dichloromethane, the organic layer was washed using aqueous NaOH (1M), water and brine. After dring under sodium sulfate or magnesium sulfate, dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyl ether aldehyde moety used without purification in the next step. Crude reduced silyl ether was dissolved in dry THF and cooled down to 0°C. TBAF (1.05- 1.1 equiv) was added dropwise and the mixture was stirred at 0°C during 30 min. THF was removed under vacuum and the crude was purified using silica gel flash chromatography (dichloromethane/MeOH, 95/5 to 90/10, v/v) to give the title compound as a brown oil (56 mg, 68% over 3 step, with trace of TBAF, 1 aldehyde for 0.4 TBAF). *Rf* = 0.5 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.04 (s, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.58 – 3.42 (br s, 2H), 3.06 – 2.83 (m, 4H), 2.69 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.25 – 2 (m, 2H), 1.96 – 1.59 (m, 12H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.68, 157.10, 154.29, 135.76, 130.01, 126.57, 57.48, 54.39, 36.64, 26.93, 26.30, 24.16, 23.84, 23.38. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C17H27N2O2 291.2079; found 291.2073.

## I.87. AB152 – 112 & 112a




**112 - AB-152**

Chemical Formula: $C_{17}H_{27}N_3O_2$
Exact Mass: 305,21
Molecular Weight: 305,42



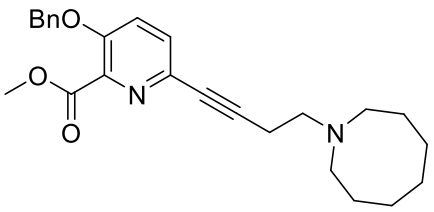

1.95 TFA

**112a AB-152. TFA**

Aldehyde **123** (60 mg, 0.21 mmol, 1 equiv) was dissolved in dry MeOH under argon. Hydroxylamine hydrochloride (15 mg, 1.1 equiv) and sodium acetate (21 mg, 1.2 equiv) were added and the mixture was stirred at rt during 4h. Methanol was removed under vacuum and the crude oxime was purified using normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v) to give **112** (38 mg, 60%) as a brown oil. *Rf* = 0.26 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.28 (s, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 2.92 – 2.78 (m, 4H), 2.72 (s, 2H), 2.68 – 2.59 (m, 2H), 1.75 – 1.61 (m, 12H), 1.49 – 1.35 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 154.36, 152.79, 136.40, 126.15, 125.33, 59.08, 56.37, 37.69, 30.98, 30.76, 27.98, 27.82, 26.97, 24.79. HPLC (Method A): tR = 17.9 min (purity: 97%). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C17H28N3O2 306.2177; found 306.2182.

Aldehyde **123** (295 mg, 1.017 mmol, 1 equiv) was dissolved in dry MeOH under argon. Hydroxylamine hydrochloride (87 mg, 1.2 equiv) and sodium acetate (120 mg, 1.4 equiv) were added and the mixture was stirred at rt during 4h. Methanol was removed under vacuum and the crude oxime was purified using reverse phase purification (Method D) to give **112** as a brown oil (98 mg, 18%). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 11.67 (s, 2H), 8.35 (s, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.58 – 3.42 (br s, 2H), 3.06 – 2.83 (m, 4H), 2.69 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.25 – 2 (m, 2H), 1.96 – 1.59 (m, 12H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 162.05 (q, J = 35 Hz), 153.18, 152.64, 152.52, 135.09, 124.67, 123.90, 57.48, 54.39, 36.64, 26.93, 26.30, 24.16, 23.84, 23.38. HPLC (Method B): $t_R$ = 17.57 min (96.5%)

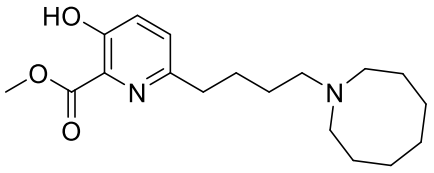
### I.88. Methyl 6-(4-(azocan-1-yl)but-1-yn-1-yl)-3-(benzyloxy)picolinate- 125




Chemical Formula: $C_{25}H_{30}N_2O_3$
Exact Mass: 406,23
Molecular Weight: 406,53

Mesylate **57a** (1.12 g, 2.90 mmol, 1.2 equiv) was dissolved in dry MeCN (30 mL, 0.1 M) under Argon atmosphere and the resulting mixture was cooled down to 0°C. Azocane (315 µL, 2.40 mmol, 1 equiv.) followed by potassium carbonate (666 mg, 4.80 mmol, 2 equiv.) were added in this order. The resulting heterogenous mixture was reflux overnight. Salt were removed by filtration and solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 95/5, v/v) to give the title compound as a brown oil (336 mg, 29 %, with trace of $PPh_3$). *Rf* = 0.31 (dichloromethane/MeOH, 96/4, v/v). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 407 [M+H]+, 429 [M+Na]+. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.50 – 7.12 (m, 8H), 5.07 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.69 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.50 (br s, 3H), 2.44 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.49 (t, *J* = 8.7 Hz, 11H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.78 (q, J = 36 Hz), 152.74, 139.92, 135.47, 135.42, 133.05, 132.00, 131.90, 131.87, 131.67, 129.81, 128.59, 128.50, 128.34, 128.08, 126.81, 121.72, 89.24, 79.69, 70.70, 57.12, 53.39, 52.50, 27.85, 27.25, 26.09, 18.59.

### I.89. Methyl 6-(4-(azocan-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinate -126



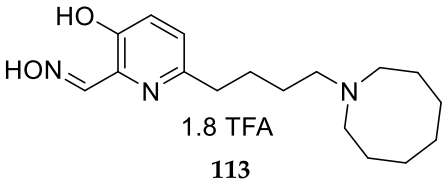

**126**

Chemical Formula: $C_{18}H_{28}N_2O_3$
Exact Mass: 320,21
Molecular Weight: 320,43

Compound **125** (336 mg, 0.827 mmol, 1 equiv) was dissolved in MeOH (83 mL, 0.01 M) and the homogenous solution was degased 20 min using argon. $Pd(OH)_2/C$ (150 mg, 40% w/w) was added. After 10 min of degasing using Argon, baloon of hydrogene gas was bubbled and the mixture was stirred under hydrogen atmosphere at rt overnight. The crude mixture was filtered over celite®®, solvents were removed under vacuum. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v) to afford the title product (39 mg, 15%). *Rf* = 0.50

(dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 321 [M+H]+, 344 [M+Na]+. $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.56 (s, 1H), 7.32 (s, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.22 (br s, 4H), 3.06 – 2.90 (m, 2H), 2.90 – 2.71 (m, 2H), 2.06 – 1.86 (m, 6H), 1.86 – 1.71 (m, 3H), 1.67 (br s, 5H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.46, 157.86, 153.10, 129.88, 129.35, 127.45, 55.63, 53.63, 50.80, 37.00, 27.50, 26.79, 24.87, 24.30, 22.85.

### I.90. 6-(4-(azocan-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinaldehyde -127




**113**

**AB-645**

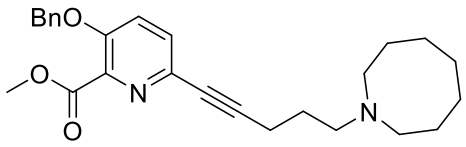
***2,4% from 57b - 6 steps***

Compound **126** (39 mg, 0.122 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry dichloromethane (10 mL, 0.1 M), then triethylamine (52 µL, 0.366 mmol, 3 equiv) and TBSOTf (43 µL, 0.188 mmol, 3 equiv) were added dropwise at 0°C. The mixture was stirred at rt overnight. Resulting mixture was diluted in dichloromethane, washed with water, brine and dried under sodium sulfate. dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyle ether that was dissolved in dry dichloromethane (10 mL, 0.1 M) and cooled down to -78°C. DIBAL-H (305 µL, 0.305 mmol, 2.5 equiv) was added dropwised and the mixture was stirred at -78°C during 15 min. Methanol (305 µL) was added and the crude mixture was heat up to rt. After dilution with dichloromethane, the organic layer was washed using aqueous NaOH (1M), water and brine. After dring under sodium sulfate, dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyl ether aldehyde moety used without purification in the next step. Crude reduced silyl ether was dissolved in dry THF (20 mL, 0.05 M) and cooled down to 0°C. TBAF (150 µL, 0.150 mmol, 1.2 equiv) was added dropwise and the mixture was stirred at 0°C during 30 min. THF was removed under vacuum and the crude was purified using silica gel flash chromatography (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v) to afford the aldehyde as a yellow oil (16.2 mg, 46 % over 3 steps – trace of TBAF). TLS-MS (ESI+) : *m/z* = 291 $[M+H]^+$, 313 $[M+Na]^+$; *Rf* = 0.18 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v).

The crude aldehyde was dissolved in MeOH (5 mL) under argon. Hydroxylamine hydrochloride (10 mg, 0.140 mmol, 2.5 equiv) and sodium acetate (14 mg, 0.168 mmol, 3 equiv) were added and the mixture was stirred at rt overnight. Methanol was removed under vacuum and the crude oxime was purified using reverse phase chromatography (Method D) to give the title compound as brown oil (4.98 mg, 8% over 4 steps). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.34 (s, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.55 – 3.40 (m, 2H), 3.27 – 3.09 (m, 4H), 2.95 – 2.80 (m, 2H), 2.10 – 1.93 (m, 2H), 1.90-1.70 (m, 10H), 1.70-1.50 (br s, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 152.75, 151.32, 148.49, 134.32, 126.67,

124.77, 55.89, 51.34, 34.45, 26.35, 25.16, 24.03, 23.53, 22.38. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C17H28N3O2 306.2182; found 306.2184. HPLC (Method A): $t_R$ = 17.90 min (purity = 95.1%).

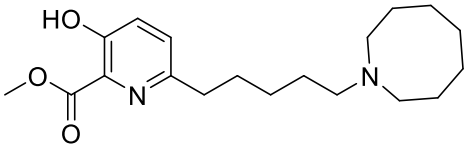
### I.91. Methyl 6-(5-(azocan-1-yl)pent-1-yn-1-yl)-3-(benzyloxy)picolinate - 128




**128**
Chemical Formula: $C_{26}H_{32}N_2O_3$
Exact Mass: 420,24
Molecular Weight: 420,55

Tosylate **59a** (1.02 g, 2.13 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry MeCN (0.1 M) under Argon atmosphere and the resulting mixture was cooled down to 0 °C. Azocane (305 µL, 2.35 mmol, 1.1 equiv.) followed by potassium carbonate (590 mg, 4.26 mmol, 2 equiv.) were added in this order. The resulting heterogenous mixture was reflux overnight. Salt were removed by filtration and solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified using Silica gel flash chromatography (dichloromethane/MeOH, 95/5 to 90/10, v/v) to give the title compound as a brown oil (780 mg, 85 %). *Rf* = 0.43 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.54 – 7.23 (m, 7H), 5.19 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 2.65 (t, *J* = 6.6 Hz, 5H), 2.50 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.93 – 1.73 (m, 2H), 1.61 (s, 9H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.66, 152.58, 139.77, 135.33, 135.19, 129.83, 128.43, 127.93, 126.68, 121.62, 89.86, 79.30, 70.52, 57.30, 53.41, 52.35, 26.89, 26.68, 26.25, 25.93, 16.96.

### I.92. Methyl 6-(5-(azocan-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate -129

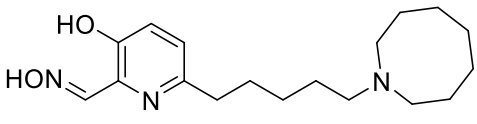



**129**
Chemical Formula: $C_{19}H_{30}N_2O_3$
Exact Mass: 334,23
Molecular Weight: 334,46

Compound **128** (780 mg, 1.86 mmol, 1 equiv) was dissolved in MeOH (186 mL, 0.01 M) and the homogenous solution was degased 20 min using argon. $Pd(OH)_2$/C (150 mg, 20% w/w) was added. After 10 min of degasing using Argon, baloon of hydrogene gas was bubbled and the mixture was stirred under hydrogen atmosphere at rt overnight. The crude mixture was filtered over celite®, solvents were removed under vacuum. The crude was purified by flash chromatography on silica gel

(dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v) to afford the title product (621 mg, 100%). *Rf* = 0.52 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v). TLC-MS (ESI+) *m/z* = 335 $[M+H]^+$, 357 $[M+Na]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.11 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.17 (br s, 2H), 3.03 (br s, 3H), 2.77 (br s, 2H), 2.56 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.72 (br s, 6H), 1.48 (d, *J* = 19.1 Hz, 7H), 1.18 (br s, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 169.79, 156.91, 153.18, 129.17, 128.59, 126.53, 55.58, 52.91, 50.55, 36.82, 29.06, 26.13, 25.85, 24.24, 24.03, 22.39.

## I.93. AB-436 - 114




1.81 TFA

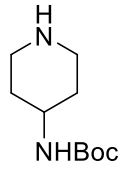
**114 - AB-436**

Chemical Formula: $C_{18}H_{29}N_3O_2$
Exact Mass: 319,23
Molecular Weight: 319,45

Compound **129** (621, 1.86 mmol, 1 equiv) was dissolved in dry dichloromethane (20 mL, 0.1 M), then triethylamine (783µL, 5.58, 3 equiv) and TBSOTf (510 µL, 2.79 mmol, 1.5 equiv) were added dropwise at 0°C. The mixture was stirred at rt until overnight. Resulting mixture was diluted in dichloromethane, washed with water, brine and dried under sodium sulfate. dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyle ether that was dissolved in dry dichloromethane (20 mL, 0.1 M) and cooled down to -78°C. DIBAL-H (3.29 mL, 3.29 mmol, 2.5 equiv) was added dropwised and the mixture was stirred at -78°C during 15 min. Methanol was added and the crude mixture was heat up to rt. After dilution with dichloromethane, the organic layer was washed using aqueous NaOH (1M), water and brine. After dring under sodium sulfate or magnesium sulfate, dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyl ether aldehyde moety used without purification in the next step. Crude reduced silyl ether was dissolved in dry THF (40 mL) and cooled down to 0 °C. TBAF (1.9 mL, 1.9 mmol, 1.02 equiv) was added dropwise and the mixture was stirred at 0 °C during 30 min. THF was removed under vacuum and the crude was purified filtred through a silica gel plug (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v) to give thecrude Aldehyde deprotected (105,4 mg, 0.347 mmol, 1 equiv) that was dissolved in dry MeOH under argon. Hydroxylamine hydrochloride (30 mg, 0.417 mmol, 1.1 equiv) and sodium acetate (36 mg,0.417 mmol, 1.2 equiv) were added and the mixture was stirred overnight at rt. Methanol was removed under vacuum and the crude oxime was purified using reverse phase chromatographyto afford the title compound as light orange oil (5.42 mg, 0.9 % over 4 steps). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 7.46 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.54 – 3.37 (m, 2H), 3.28 – 3.05 (m, 3H), 2.86 – 2.71 (m, 2H), 2.10 – 1.90 (m, 2H), 1.90 – 1.54 (m, 13H), 1.51 – 1.36 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 170.40 (q, 38 Hz), 158.07, 154.94, 130.81, 130.03, 128.50, 57.61, 53.36, 52.78, 37.20, 30.48, 27.07, 26.56,

25.47, 25.29, 23.83, 9.18. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C18H30N3O2 320.2338; found 320.2332. HPLC (Method B) : $t_R$ = 18.58 min (purity = 95.2%).

### I.94. *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*-(4-piperidyl)amine - 132

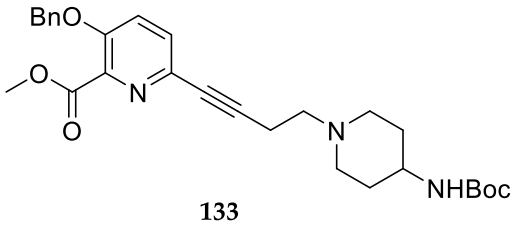



**132**

Chemical Formula: $C_{10}H_{20}N_2O_2$
Exact Mass: 200,15
Molecular Weight: 200,28

1-benzylpiperidin-4-amine (4 mL, 19.05 mmol, 1.0 equiv) and DIPEA (8.3 mL, 45.82 mmol, 2.4 equiv) were dissolved in dry THF (40 mL) at 0°C and Boc2O (4.97 g, 22.86 mmol, 1.2 equiv) in dry THF (23 mL) was added dropwise. The mixture was stirred overnight at rt. After concentration until dryness, a crude white powder was obtained and used whithout purification (5.33 g, 97 %). The product obtained 5.33 g, 18.40 mmol, 1 equiv) was dissolved in degazed methanol (100 mL). Pd/C (533 mg, 10% w/w) was poured into this solution. After 10 min of degasing using argon, baloon of hydrogene gas was bubbled and the mixture was stirred under hydrogen atmosphere (1 atm) at rt overnight. The crude mixture was filtered over celite®, solvents were removed under vacuum to give the title compound as a white solid (3.68 g, 97 % over 1 steps). Mp = 164 °C (dec). MS (ESI+): *m/z* = 201 $[M+H]^+$, 223 $[M+Na]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 4.88 (br s, 1H), 3.36 (br s, 1H), 2.94 (dt, *J* = 12.4, 3.0 Hz, 2H), 2.53 (td, *J* = 12.4, 2.3 Hz, 2H), 1.80 (d, *J* = 10.1 Hz, 2H), 1.63 – 1.44 (m, 1H), 1.28 (d, *J* = 30.7 Hz, 9H), 1.16 (ddd, *J* = 15.4, 11.7, 4.0 Hz, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 155.00, 78.72, 47.99, 45.25, 33.75, 28.22.

### I.95. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)piperidin-1-yl)but-1-yn-1-yl)picolinate - 133

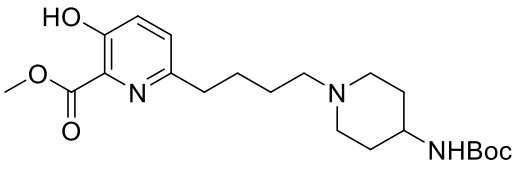



**133**

Chemical Formula: $C_{28}H_{35}N_3O_5$
Exact Mass: 493,26
Molecular Weight: 493,60

Mesylate **57b** (973 mg, 2.5 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry MeCN (30 mL, 0.08 M) under argon atmosphere and the resulting mixture was cooled down to 0 °C. Compound 132 (500 mg, 2.5 mmol, 1 equiv.) followed by potassium carbonate (700 g, 5 mmol, 2 equiv.) were added in this order. The resulting heterogenous mixture was reflux overnight. Salt were removed by filtration and solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (dichloromethane/MeOH, 94/6 to 90/10, v/v) to give the title compound 136 as an orange oil (389 g, 32 %). *Rf* = 0.25 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v). MS (ESI+): *m/z* = 494 $[M+H]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.43 – 7.04 (m, 7H), 5.10 (s, 2H), 4.56 (br s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.45 – 3.26 (m, 1H), 2.76 (d, *J* = 11.8 Hz, 2H), 2.63 – 2.52 (m, 2H), 2.52 – 2.43 (m, 2H), 2.06 (t, *J* = 10.5 Hz, 2H), 1.83 (d, *J* = 10.4 Hz, 2H), 1.35 (s, 10H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 172.81, 164.68, 155.13, 152.88, 139.81, 135.38, 135.06, 132.00, 131.93, 131.90, 131.87, 129.91, 128.62, 128.52, 128.36, 128.12, 126.80, 121.71, 88.28, 79.89, 79.06, 70.65, 56.59, 52.58, 51.94, 32.29, 28.32, 17.61.

### I.96. methyl 6-(4-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)piperidin-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinate

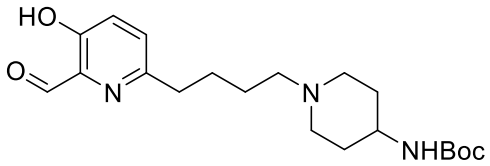



**134**

Compound **133** (388 mg, 0.788 mmol) was ether was dissolved in MeOH or EtOAc (0.05 M) and the homogenous solution was degased 20 min using argon. $Pd(OH)_2/C$ (77 mg, 20% w/w) was added. After 10 min of degasing using Argon, baloon of hydrogene gas was bubbled and the mixture was stirred under hydrogen atmosphere at rt until completion (4 days). The crude mixture was filtered over celite®, solvents were removed under vacuum to give the title compound as a brown solid (321 mg, quant.). MS (ESI+): *m/z* = 409 $[M+H]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.22 (s, 2H), 4.86 (br s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.41 (br s, 1H), 2.88 (d, *J* = 10.7 Hz, 2H), 2.71 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.49 – 2.30 (m, 2H), 2.12 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H),

1.88 (d, *J* = 13.8 Hz, 3H), 1.73 – 1.42 (m, 6H), 1.34 (s, 10H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 169.92, 157.05, 155.21, 153.45, 132.00, 131.95, 131.87, 129.14, 128.66, 128.55, 128.39, 126.62, 79.08, 57.91, 53.02, 52.15, 37.06, 31.58, 28.32, 27.67, 25.85.

### I.97. tert-butyl (1-(4-(6-formyl-5-hydroxypyridin-2-yl)butyl)piperidin-4-yl)carbamate -135

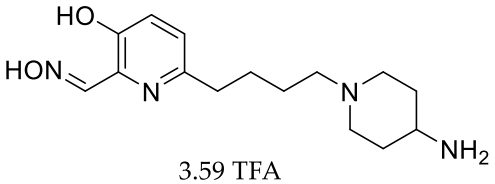



**135**

Chemical Formula: $C_{20}H_{31}N_3O_4$
Exact Mass: 377,23
Molecular Weight: 377,48

Compound **134** (321 mg, 0.788 mmol, 1 equiv) in dry dichloromethane (10, mL, 0.08 M), then triethylamine (280 µL, 1.97 mmol, 2.5 equiv) and TBSOTf (220 µL, 0.946 mmol, 1.2 equiv) were added dropwise at 0 °C. The mixture was stirred at rt overnight. Resulting mixture was diluted in dichloromethane, washed with water, brine and dried under sodium sulfate. dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyle ether that was dissolved in dry dichloromethane (10 mL, 0.08 M) and cooled down to -78 °C. DIBAL-H (2.36 mL, 2.36 mmol, 3.0 equiv) was added dropwised and the mixture was stirred at -78 °C during 15 min. Methanol was added and the crude mixture was heat up to rt. After dilution with dichloromethane, the organic layer was washed using aqueous NaOH (1M), water and brine. After dring under sodium sulfate or magnesium sulfate, dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyl ether aldehyde moety used without purification in the next step. Crude reduced silyl ether was dissolved in dry THF 20 mL and cooled down to 0 °C. TBAF (790 µL, 0.790 mmol, 1 equiv) was added dropwise and the mixture was stirred at 0°C during 30 min. THF was removed under vacuum and the crude was purified using silica gel flash chromatography (dichloromethane/MeOH,90/10, v/v) to give the title compound as a yellow oil (168 mg, 57% over 3 steps). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 378 $[M+H]^+$; *Rf* = 0.33 (DCM/MeOH, 95/5, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 9.95 (s, 1H), 7.24 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.42 (s, 1H), 3.39 (s, 1H), 2.87 – 2.66 (m, 4H), 2.40 – 2.23 (m, 2H), 2.00 (t, *J* = 10.8 Hz, 2H), 1.86 (d, *J* = 11.6 Hz, 2H), 1.77 – 1.58 (m, 2H), 1.52 (dt, *J* = 23.2, 13.0 Hz, 4H), 1.37 (s, 9H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.83, 157.08, 155.28, 154.75, 135.76, 129.86, 126.49, 77.16, 58.44, 52.55, 37.19, 32.48, 28.49, 27.69, 26.65.

## I.98. AB-740 – 115



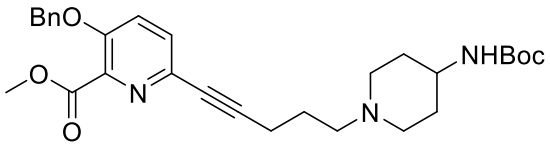

3.59 TFA

**115 - AB-740**

Chemical Formula: $C_{15}H_{24}N_4O_2$
Exact Mass: 292,19
Molecular Weight: 292,38

Aldehyde **135** (138 mg, 0.445 mmol, 1 equiv) was dissolved in dry MeOH (20 mL) under argon. Hydroxylamine hydrochloride (47 mg, 1.5 equiv) was added and the mixture was stirred at rt 10 min. Then TFA (5 mL) was added at 0 °C and the mixture was stirred during 10 min. Volatils were removed under vacuum and the crude oxime was purified using reverse phase chromatography to give the title compound as golden white off solid (177 mg, 57%). MS (ESI+): *m/z*: = 293 (100) $[M+H]^+$, 315 (15) $[M+Na]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.40 (s, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.19 (s, 11H), 3.68 (d, *J* = 9.9 Hz, 2H), 3.48 (s, 1H), 3.17 (s, 4H), 2.96 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.29 (d, *J* = 12.7 Hz, 2H), 2.02 (dd, *J* = 12.9, 9.8 Hz, 2H), 1.82 (t, *J* = 11.6 Hz, 4H). $^{19}$F NMR (282 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) -76.84. $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 162.95 (q, *J* = 35.0 Hz), 154.52, 151.06, 145.03, 134.10, 131.60, 127.45, 123.79, 119.92, 116.05, 112.17, 57.51, 51.78, 49.00, 46.75, 34.02, 28.46, 27.51, 24.43. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C15H25N4O2 293.1978; found 293.1974. HPLC (Method B) : $t_R$ = 9.70 min (purity = 95.35%).

## I.99. methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)piperidin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 136



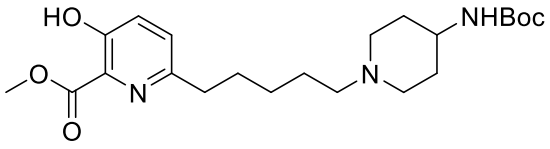

**136**

Chemical Formula: $C_{29}H_{37}N_3O_5$
Exact Mass: 507,27
Molecular Weight: 507,63

Tosylate **59a** (2.0 g, 4.2 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry MeCN (42 mL, 0.1 M) under Argon atmosphere and the resulting mixture was cooled down to 0 °C. Compound 132 (840 mg, 4.32 mmol, 1 equiv.) followed by potassium carbonate (1.7 g, 4.2 mmol, 3 equiv.) were added in this order. The resulting heterogenous mixture was reflux overnight. Salt were removed by filtration and solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified using Silica gel flash chromatography (dichloromethane/MeOH, 94/6 to 90/10, v/v) to give the title compound 136 as a yellow oil (2.1 g, 98 %). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.40 -7.15 (m, 7H), 5.11 (s, 2H), 4.42 (s, 1H), 3.87 (s,

3H), 3.37 (s, 1H), 2.76 (d, *J* = 11.5 Hz, 2H), 2.36 (dd, *J* = 13.4, 6.6 Hz, 4H), 2.00 (t, *J* = 11.0 Hz, 2H), 1.84 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H), 1.75 – 1.57 (m, 2H), 1.36 (s, 12H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.85, 155.23, 152.90, 135.56, 135.48, 129.97, 128.74, 128.24, 126.93, 121.83, 89.94, 79.55, 77.16, 70.85, 57.44, 52.67, 52.40, 32.51, 28.44, 25.83, 17.41. TLS-MS : *Rf* = 0.26 (dichloromethane/MeOH, 94/6, v/v) *m/z* = 508 [M+H]+.

### I.100. methyl 6-(5-(4-((tert-butoxycarbonyl)amino)piperidin-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate - 137

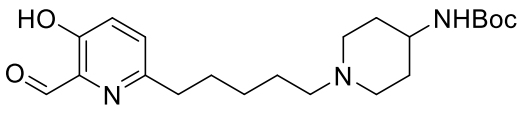



**137**

Chemical Formula: $C_{22}H_{35}N_3O_5$
Exact Mass: 421,26
Molecular Weight: 421,54

Compound **136** (2.1 g, 4.15 mmol, 1 equiv) was dissolved in MeOH (400 mL, 0.01 M) and the homogenous solution was degased 20 min using argon. $Pd(OH)_2/C$ (350 mg, 20%w/w) was added. After 10 min of degasing using Argon, baloon of hydrogene gas was bubbled and the mixture was stirred under hydrogen atmosphere at rt overnight. The crude mixture was filtered over celite®, solvents were removed under vacuum to give compound **137** as an orangeous oil (1.75 g, quant.). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.59 (s, 1H), 7.28 (s, 2H), 4.51 (s, 1H), 4.04 (s, 3H), 3.53 (s, 1H), 3.08 (s, 2H), 2.89 – 2.64 (m, 2H), 2.53 (s, 2H), 2.33 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 2.01 (d, *J* = 8.3 Hz, 3H), 1.88 – 1.55 (m, 6H), 1.53 – 1.17 (m, 13H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.10, 157.18, 155.21, 153.70, 129.17, 128.80, 126.66, 125.88, 79.46, 57.95, 53.13, 52.08, 46.95, 37.38, 31.15, 29.68, 28.38, 26.91, 25.68.

### I.101. tert-butyl (1-(5-(6-formyl-5-hydroxypyridin-2-yl)pentyl)piperidin-4-yl)carbamate - 138



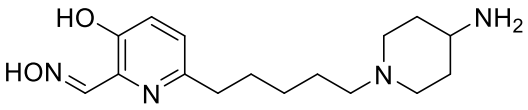

**138**

Chemical Formula: $C_{21}H_{33}N_3O_4$
Exact Mass: 391,25
Molecular Weight: 391,51

Compound **137** (1.75 g, 4.15 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry dichloromethane (40 mL, 0.1 M), then triethylamine (900 µL, 6.22 mmol, 1.5 equiv) and TBSOTf (1.10 mL, 4.98 mmol, 1.2 equiv) were added dropwise at 0°C. The mixture was stirred at rt during 3h. Resulting mixture was diluted in dichloromethane, washed with water, brine and dried over sodium sulfate. Dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyle ether that was dissolved in dry dichloromethane (40

mL, 0.1 M) and cooled down to -78°C. DIBAL-H (8.2 mL, 8.2 mmol, 2.0 equiv) was added dropwised and the mixture was stirred at -78°C during 15 min. Methanol (8.2 mL) was added and the crude mixture was heat up to rt. After dilution with dichloromethane, the organic layer was washed using aqueous NaOH (1M), water and brine. After dring under sodium sulfate or magnesium sulfate, dichloromethane was removed under vacuum giving the crude silyl ether aldehyde moety used without purification in the next step. Crude reduced silyl ether was dissolved in dry THF (100 mL) and cooled down to 0°C. TBAF (4.2 mL, 4.2 mmol, 1.01 equiv) was added dropwise and the mixture was stirred at 0°C during 30 min. THF was removed under vacuum and the crude was purified using silica gel flash chromatography (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v) to give the title producte as a white off foam (316 mg, 30% over 3 steps). *Rf* = 0.5 (dichloromethane/MeOH, 90/10). MS (ESI+): *m/z* (%) = 392 (100) $[M+H]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.46 (br s, *J* = 67.7 Hz, 1H), 10.05 (s, 1H), 7.32 (s, 2H), 4.63 (br s, 1H), 3.57 (br s, 1H), 3.10 (br s, 2H), 2.81 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.57 (br s, 2H), 2.35 (br s, 2H), 2.16 – 1.92 (m, 2H), 1.75 (dt, *J* = 25.1, 12.6 Hz, 5H), 1.60 – 1.05 (m, 11H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.85, 157.10, 155.30, 154.72, 135.82, 129.87, 126.50, 79.64, 58.12, 52.26, 47.11, 37.15, 31.31, 29.79, 29.40, 28.49, 26.98, 25.82.

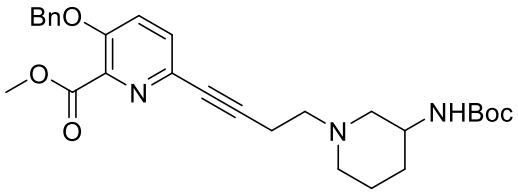
## I.102. AB-737 - 116




2.82 TFA
**116 - AB-737**
Chemical Formula: $C_{16}H_{26}N_4O_2$
Exact Mass: 306,21
Molecular Weight: 306,41

Same procedure as AB-740. Yellow solid (298 mg, 65%). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.42 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.48 (br s, 7H), 3.70 (d, *J* = 10.8 Hz, 2H), 3.49 (s, 1H), 3.12 (s, 4H), 3.01 – 2.82 (m, 2H), 2.31 (d, *J* = 12.9 Hz, 2H), 2.16 – 1.90 (m, 2H), 1.77 (t, *J* = 10.8 Hz, 4H), 1.59 – 1.29 (m, 2H). $^{19}$F NMR (282 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) -76.66. $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$ ) δ (ppm) 162.87 (q, *J* = 35.0 Hz), 154.52, 151.17, 143.34, 133.18, 132.92, 127.85, 123.76, 119.88, 116.01, 112.13, 57.73, 51.74, 46.81, 33.75, 29.96, 28.48, 26.79, 24.60. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C16H27N4O2 307.2134; found 307.2133. HPLC (Method B): $t_R$ = 14.51 min (97.37%).

### I.103. methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)piperidin-1-yl)but-1-yn-1-yl)picolinate - 140

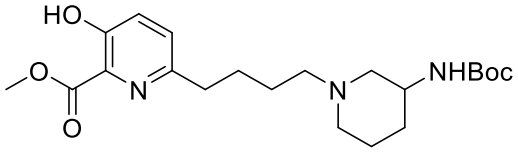



**140**

Chemical Formula: $C_{28}H_{35}N_3O_5$
Exact Mass: 493,26
Molecular Weight: 493,60

Same procedure as **115**. Yellow oil (461 mg, 38 %). *Rf* = 0.25 (dichloromethane/MeOH, 95/5). MS (ESI+): *m*/*z* = 494 $[M+H]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.47 – 7.05 (m, 7H), 5.10 (s, 2H), 4.55 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.36 (s, 1H), 2.76 (d, *J* = 11.8 Hz, 2H), 2.52 (qd, *J* = 6.6, 3.7 Hz, 4H), 2.06 (t, *J* = 10.5 Hz, 2H), 1.93 – 1.68 (m, 3H), 1.35 (s, 13H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 172.81, 164.68, 155.13, 152.88, 139.81, 135.38, 135.06, 132.00, 131.93, 131.90, 131.87, 129.91, 129.04, 128.62, 128.52, 128.36, 128.12, 126.80, 121.71, 88.28, 79.89, 79.06, 70.65, 56.59, 52.58, 51.94, 47.51, 32.29, 28.32, 17.61.

### I.104. methyl 6-(4-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)piperidin-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinate

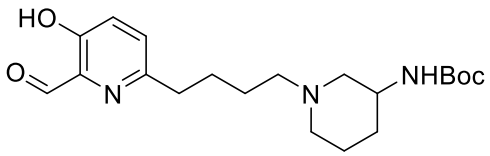



**141**

Chemical Formula: $C_{21}H_{33}N_3O_5$
Exact Mass: 407,24
Molecular Weight: 407,51

Same procedure as **137**. Light orange oil (374 mg, 98%). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.51 (br s, 1H), 7.23 (s, 2H), 5.05 (br s, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.68 (br s, 1H), 2.86 – 2.66 (m, 2H), 2.55 – 2.07 (m, 5H), 1.62 (dd, *J* = 15.7, 7.9 Hz, 3H), 1.56 – 1.41 (m, 4H), 1.36 (s, 10H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.16, 157.24, 155.22, 153.86, 129.21, 128.80, 126.72, 79.05, 58.54, 58.35, 53.75, 53.19, 46.22, 37.40, 29.68, 28.47, 27.87, 26.19, 22.12. MS (ESI+): *m*/*z* = 408 $[M+H]^+$.

### I.105. tert-butyl (1-(4-(6-formyl-5-hydroxypyridin-2-yl)butyl)piperidin-3-yl)carbamate - 142

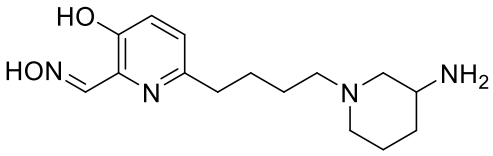



**142**

Chemical Formula: $C_{20}H_{31}N_3O_4$
Exact Mass: 377,23
Molecular Weight: 377,48

Same procedure as **138**. Yellow oil (189 mg, 55% over 3 steps). *Rf* = 0.5 (dichloromethane/MeOH, 90/10). MS (ESI+): m/z = 378 $[M+H]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 9.96 (s, 1H), 7.24 (s, 2H), 4.98 (s, 1H), 3.66 (s, 1H), 3.46 – 3.16 (m, 1H), 2.81 – 2.60 (m, 2H), 2.44 (s, 1H), 2.39 – 2.16 (m, 4H), 1.63 (dt, *J* = 15.6, 8.0 Hz, 4H), 1.53 – 1.41 (m, 4H), 1.36 (s, 10H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.64, 156.98, 155.16, 154.75, 135.70, 129.74, 126.41, 78.94, 58.98, 58.62, 58.29, 53.75, 46.30, 37.09, 29.67, 28.43, 27.49, 26.27, 24.12, 22.27, 19.76, 13.69.

### I.106. AB-738 - 117



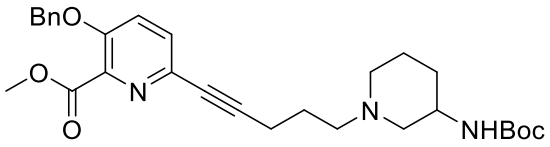

2.87 TFA

**117 - AB-738**

Chemical Formula: $C_{15}H_{24}N_4O_2$
Exact Mass: 292,19
Molecular Weight: 292,38

Same procedure as **136**, white off solid (199 mg, 65%). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.41 (s, 1H), 7.87 – 7.74 (m, 1H), 7.61 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 5.10 (br s, 9H), 3.78 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H), 3.70 – 3.41 (m, 2H), 3.20 (dd, *J* = 9.7, 6.5 Hz, 2H), 3.14 – 2.80 (m, 4H), 2.34 – 2.00 (m, 2H), 2.00 – 1.58 (m, 4H), 1.46 (dt, *J* = 15.0, 7.7 Hz, 2H). $^{19}$F NMR (282 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) -76.80. $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 162.93 (q, *J* = 35.0 Hz), 154.51, 151.31, 143.64, 133.46, 132.60, 129.07, 127.78, 123.76, 119.89, 116.01, 112.14, 58.25, 53.67, 52.96, 46.45, 33.95, 30.02, 27.30, 26.78, 24.53. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C15H25N4O2 293.1978; found 293.1972. HPLC (Method B): $t_R$ = 12.87 min (95%).

### I.107. methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)piperidin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate -143

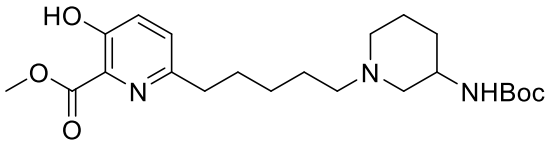



**143**

Chemical Formula: $C_{29}H_{37}N_3O_5$
Exact Mass: 507,27
Molecular Weight: 507,63

Same procedure as **137**. Yellow oil (873 mg, 83%). *Rf* = 0.36 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v). MS (ESI+): *m/z* = 508 [M+H]+. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.53 – 7.11 (m, 7H), 5.16 (s, 2H), 5.01 (br s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.70 (br s, 1H), 2.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 2.39 (dd, *J* = 14.7, 7.4 Hz, 5H), 2.25 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H), 1.81 – 1.59 (m, 3H), 1.42 (s, 12H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.74, 155.07, 152.73, 139.97, 135.46, 135.37, 129.87, 128.59, 128.36, 128.30, 128.08, 127.04, 126.81, 121.71, 89.96, 79.39, 78.81, 70.69, 58.67, 57.29, 53.59, 52.50, 46.28, 29.65, 28.36, 25.52, 22.25, 17.18.

### I.108. tert-butyl (1-(4-(6-formyl-5-hydroxypyridin-2-yl)butyl)piperidin-3-yl)carbamate - 144

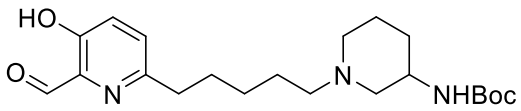



**144**

Chemical Formula: $C_{22}H_{35}N_3O_5$
Exact Mass: 421,26
Molecular Weight: 421,54

Same procedure as **138**. Yellow oil (666 mg, 92%). MS (ESI+): *m/z* = 422 $[M+H]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.14 (s, 1H), 7.18 (s, 2H), 5.08 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.61 (s, 1H), 3.31 (s, 1H), 2.84 – 2.53 (m, 2H), 2.42 (s, 1H), 2.33 – 2.05 (m, 4H), 1.57 (d, *J* = 7.4 Hz, 4H), 1.45 – 1.17 (m, 15H).$^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 169.86, 156.90, 155.00, 153.77, 128.94, 128.49, 126.40, 78.63, 58.41, 58.29, 53.49, 52.85, 49.85, 46.10, 37.30, 29.73, 29.59, 28.20, 26.95, 26.30, 22.12.

## I.109. tert-butyl (1-(5-(6-formyl-5-hydroxypyridin-2-yl)pentyl)piperidin-3-yl)carbamate - 145

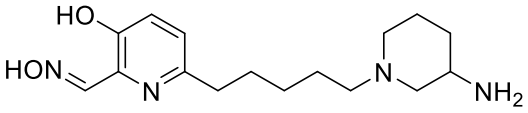



**145**

Chemical Formula: $C_{21}H_{33}N_3O_4$
Exact Mass: 391,25
Molecular Weight: 391,51

Same procedure as AB-737. Yellow oil (230 mg, 76%). *Rf* = 0.5 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v). MS (ESI+): *m/z* = 392 $[M+H]^+$; $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.25 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 7.21 (s, 2H), 4.95 (s, 1H), 3.64 (s, 1H), 2.79 – 2.63 (m, 2H), 2.42 (s, 1H), 2.23 (dd, *J* = 21.7, 14.6 Hz, 5H), 1.63 (dd, *J* = 15.3, 7.6 Hz, 4H), 1.50 – 1.21 (m, 16H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.66, 157.00, 155.18, 154.77, 135.72, 129.77, 126.43, 77.16, 59.00, 58.64, 58.31, 53.77, 46.32, 37.11, 28.45, 27.51, 26.29, 24.14, 19.78, 13.71.

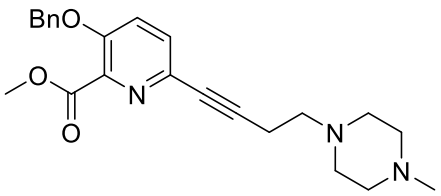
## I.110. AB739 - 118




2.38 TFA
**118 - AB-739**
Chemical Formula: $C_{16}H_{26}N_4O_2$
Exact Mass: 306,21
Molecular Weight: 306,41

Same procedure as **738**. Yellow solid (259 mg, 76%). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.31 (s, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.12 (br s, 7H), 3.68 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 3.53 (dd, *J* = 24.5, 12.3 Hz, 2H), 3.28 – 3.08 (m, 2H), 3.08 – 2.77 (m, 4H), 2.21 – 1.92 (m, 2H), 1.92 – 1.44 (m, 7H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 162.89 (q, *J* = 35.3 Hz), 154.55, 150.90, 144.62, 134.04, 131.85, 127.54, 123.74, 119.87, 116.00, 112.13, 57.99, 53.72, 53.00, 46.45, 33.89, 27.44, 27.29, 24.31. HPLC (Method B): $t_R$ = 14.97 (97.31%). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C16H27N4O2 307.2134; found 307.2129.

### I.111. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)but-1-yn-1-yl)picolinate - 160

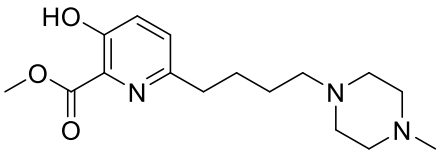



**160**

Chemical Formula: $C_{23}H_{27}N_3O_3$
Exact Mass: 393,21
Molecular Weight: 393,49

Mesylate **57b** (1.28 g, 3.28 mmol, 1.1 equiv) was dissolved in dry MeCN (33 mL, 0.1 M) under Argon atmosphere and the resulting mixture was cooled down to 0°C. *N*-methylpiperazine (340µL, 2.98 mmol , 1 equiv.) followed by potassium carbonate (820 mg, 5.96 mmol, 2 equiv.) were added in this order. The resulting heterogenous mixture was reflux overnight. Salt were removed by filtration and solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified using Silica gel flash chromatography (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v) to give the title compound as a brown oil (509 mg, 43%). *Rf* = 0.2 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v). MS (ESI+): *m/z* = 394 $[M+H]^+$, 416 [M+Na]+, 426 [M+K]+.. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.53 – 7.24 (m, 7H), 5.20 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 2.81 – 2.66 (m, 2H), 2.67 – 2.41 (m, 10H), 2.34 (s, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.57, 152.67, 139.86, 135.30, 134.97, 129.74, 128.46, 127.96, 126.68, 121.55, 88.05, 79.83, 70.53, 56.40, 54.69, 52.39, 52.29, 45.63, 17.37.

### I.112. methyl 3-hydroxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)picolinate - 161

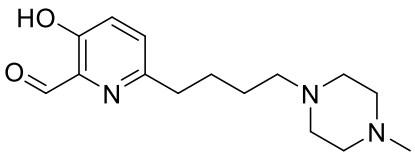



**161**

Chemical Formula: $C_{16}H_{25}N_3O_3$
Exact Mass: 307,19
Molecular Weight: 307,39

Procedure E (palladium hydroxide: 150 mg; MeOH : 200 mL; overnight; no purification). Brown oil (398 mg, quant.). *Rf* = 0.33 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v). MS (ESI+): *m/z* = 306 $[M+H]^+$, 328 $[M+Na]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.51 (s, 1H), 7.23 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.10 – 2.35 (br m, 10H), 1.66 (br s, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.08, 157.35, 129.29, 128.93, 126.89, 57.22, 53.23, 50.65, 50.24, 44.29, 36.99, 27.37.

## I.113. 3-hydroxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)picolinaldehyde -162

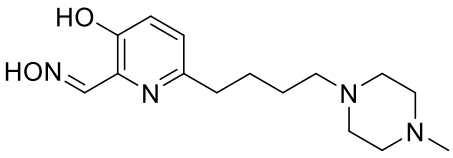


**162**

Chemical Formula: $C_{15}H_{23}N_3O_2$
Exact Mass: 277,18
Molecular Weight: 277,37

Procedure F (DIBAL-H: 3 equiv.). Brown oil (188 mg, 58% over 3 steps). *Rf* = 0.14 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v). MS (ESI+): *m/z* (%) = 278 (100) $[M+H]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.58 (br s, 1H), 9.96 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 2.82 – 2.64 (m, 2H), 2.43 (br s, 7H), 2.37 – 2.27 (m, 3H), 2.24 (s, 3H), 1.68 (dt, *J* = 8.7, 7.3 Hz, 2H), 1.49 (dt, *J* = 10.4, 4.9 Hz, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.31, 156.71, 154.37, 135.52, 129.47, 126.16, 58.03, 54.67, 52.72, 45.64, 36.84, 27.28, 26.08.

## I.114. 3-hydroxy-6-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)butyl)picolinaldehyde oxime – AB639

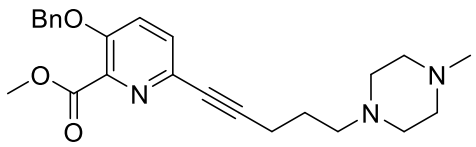


2.2 TFA
**146 - AB-639**

Chemical Formula: $C_{15}H_{24}N_4O_2$
Exact Mass: 292,19
Molecular Weight: 292,38

Procedure G. Reverse phase purification (Method F). White off powder (200.84 mg, 54 %). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.32 (s, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.50 (s, 8H), 3.12 (s, 2H), 2.88 (s, 5H), 1.73 (s, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 162.64 (d, *J* = 35.9 Hz), 154.47, 151.41, 145.67, 134.51, 131.04, 127.30, 119.69, 115.83, 57.42, 51.79, 50.03, 43.47, 34.37, 27.53, 24.58. HPLC (Method A) : $t_R$ = 8.70 (97.68%). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C15H25N4O2 293.1978; found 293.1975.

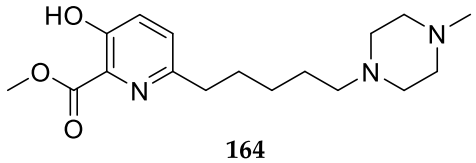
### I.115. methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(4-methylpiperazin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 163



**163**
Chemical Formula: $C_{24}H_{29}N_3O_3$
Exact Mass: 407,22
Molecular Weight: 407,51

Procedure C (mesylate **57a**). Purification: dichloromethane/MeOH + 2%triethylamine, 100/0/2 to 95/5/2, v/v/v. Orange Oil (1.73 g, 76%). *Rf* = 0.18 (dichloromethane/MeOH + 2%triethylamine, 95/5/2, v/v/v). MS (ESI+): *m/z* (%)= 408 (100). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.65 – 7.20 (m, 7H), 5.23 (s, 2H), 3.98 (s, 3H), 2.84 – 2.40 (m, 12H), 2.35 (s, 4H), 1.91 – 1.72 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.77, 152.84, 139.83, 135.43, 135.31, 129.97, 128.66, 128.16, 126.83, 121.71, 89.89, 79.39, 70.68, 57.26, 54.90, 53.47, 52.80, 52.64, 45.80, 25.50, 17.27.

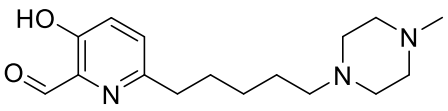
### I.116. methyl 3-hydroxy-6-(5-(4-methylpiperazin-1-yl)pentyl)picolinate - 164



**164**
Chemical Formula: $C_{17}H_{27}N_3O_3$
Exact Mass: 321,21
Molecular Weight: 321,42

Procedure D (Perlman catalyst in MeOH). Brown solid (1.19 g, 97 %). MS (ESI+): *m/z* = 322 $[M+H]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 7.44 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.03 (s, 3H), 2.86 – 2.70 (m, 3H), 2.52 (d, *J* = 24.6 Hz, 5H), 2.41 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 3H), 2.32 (s, 3H), 1.71 (dt, *J* = 15.4, 7.6 Hz, 2H), 1.63 – 1.45 (m, 2H), 1.45 – 1.26 (m, 2H).$^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 198.84, 186.25, 183.42, 158.87, 158.20, 156.30, 87.47, 83.47, 81.61, 81.47, 77.16, 73.95, 65.83, 59.19, 56.26, 55.28.

### I.117. 3-hydroxy-6-(5-(4-methylpiperazin-1-yl)pentyl)picolinaldehyde - 165

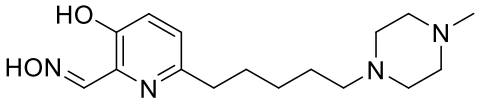


**165**

Chemical Formula: $C_{16}H_{25}N_3O_2$
Exact Mass: 291,19
Molecular Weight: 291,39

Procedure E: 2,6-lutidine as base, DIBAL-H = 3.0 equiv. Purification = silica gel, dichloromethane/MeOH/triethylamine, 92.5/2.5/2 (v/v/v). Brown redish oil (577 mg, 61% over 3 steps). *Rf* = 0.33 (dichloromethane/MeOH/triethylamine, 95/5/2, v/v/v). MS (ESI+): *m/z* = 295 $[M+H]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.34 (s, 1H), 10.01 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 2.85 – 2.66 (m, 2H), 2.49 (s, 8H), 2.41 – 2.31 (m, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.73 (dt, *J* = 15.4, 7.6 Hz, 2H), 1.63 – 1.44 (m, 2H), 1.35 (td, *J* = 14.8, 7.6 Hz, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.02, 156.51, 154.36, 135.41, 129.27, 125.98, 58.01, 54.52, 52.67, 52.57, 45.62, 45.51, 36.81, 29.16, 26.75, 26.19.

### I.118. 3-hydroxy-6-(5-(4-methylpiperazin-1-yl)pentyl)picolinaldehyde oxime - AB-069

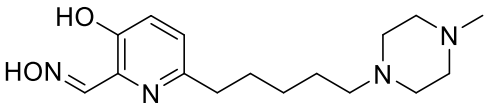


**147 - AB-069**

Chemical Formula: $C_{16}H_{26}N_4O_2$
Exact Mass: 306,21
Molecular Weight: 306,41

Compound **165** (422 mg, 1.09 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dried MeOH (11 mL). Then, sodium acetate (369 mg, 4.46 mmol, 4.1 equiv.) was introduced followed by hydroxylamine hydrochloride (304 mg, 4.36 mmol, 4.0 equiv.). The mixture was stirred at room temperature overnight. Concentration under reduced pressure and purification by flash chromatography on silicagel (DCM/MeOH/30% aq $NH_4OH$, 98:2:1 v/v/v) gave **AB-069** as a white-off solid (201 mg, 46%). *Rf* = 0.21 (dichloromethane/MeOH/triethylamine, 97.5/2.5/2, v/v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.28 (s, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H), 2.79 – 2.52 (br m, 8H), 2.46 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.79 – 1.64 (m, 2H), 1.64 – 1.47 (m, 2H), 1.46 – 1.26 (m, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 154.6, 153.8, 152.9, 136.2, 126.0, 125.3, 59.0, 55.0, 53.1, 45.5, 37.7, 30.9, 27.9, 26.9. MS (ESI+): *m/z* = 307 (100%) $[M+H]^+$. HPLC (Method A): $t_R$ = 19.32 min (purity: 96 %).

## I.119. 3-hydroxy-6-(5-(4-methylpiperazin-1-yl)pentyl)picolinaldehyde oxime hydrochloride - AB-069 HCl

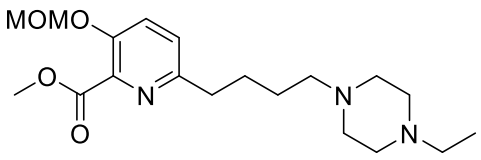



2HCl, 0.5$H_2O$

**147a (AB-069.HCl)**

AB-069 (57.1 mg, 0.186 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in methanol (2.2 mL). Aqueous HCl (650 µL, 0.650 mmol, 3.5 equiv, 1.01 N) was added at rt. After 2 h, concentration to dryness and storage in vaccum dessicator gave the title compound as white off solid (53 mg, 75%). Elemental analysis calculated: N% 15.92, C% 54.61, H% 8.02; found N% 17.03, C% 58.78 H% 6.85. HPLC (Method A): $t_R$ = 14.27 (purity : 96.68 %).

## I.120. methyl 6-(4-(4-ethylpiperazin-1-yl)butyl)-3-(methoxymethoxy)picolinate -166

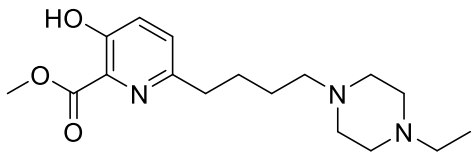



**166**

Chemical Formula: $C_{19}H_{31}N_3O_4$
Exact Mass: 365,23
Molecular Weight: 365,47

Primary alcohol 24b (1.2 g, 2.23 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dry dichloromethane (0.1 M) and the resulting mixture was cooled down to 0°C. triethylamine (675 µL, 4.69 mmol, 2.1 equiv.) followed by Mesyl chloride (190µL, 2.45 mmol, 1.1 equiv.) were added dropwise in this order. The resulting mixture was stired 3 h at rt. The crude mixture is dilluted in dichloromethane, washed with water and brine. Organic layer was dried over magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in dry MeCN (0.1M). N-ethylpiperazine (314 µL, 2.45 mmol, 1.1 equiv) and potassium carbonate (619 mg, 4.46 mmol, 2 equiv) were added in this order. The resulting heterogenous mixture was reflux overnight. Salt were removed by filtration and solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified (silicagel, dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v) to give the title compound as a brown oil (253 mg, 31%). *Rf* = 0.21 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v). MS (ESI+): *m/z* = 366 $[M+H]^+$, 388 $[M+Na]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.43 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.15 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.43 (s, 3H), 2.79 – 2.60 (m, 2H), 2.59 – 2.19 (m, 10H), 1.76 – 1.55 (m, 2H), 1.47 (dt, *J* = 15.1, 7.4 Hz, 2H), 1.01 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 165.81, 155.12, 150.74, 139.64, 125.73, 124.89, 95.23, 58.38, 56.41, 53.03, 52.64, 52.62, 52.26, 37.20, 27.90, 26.38, 11.83.

## I.121. Methyl 6-(4-(4-ethylpiperazin-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinate - 167

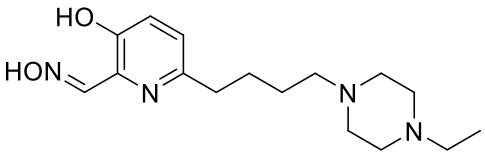


**167**

Chemical Formula: $C_{17}H_{27}N_3O_3$
Exact Mass: 321,21
Molecular Weight: 321,42

Compound 166 (252 mg, 0.69 mmol, 1 equiv) in dry dichloromethane (14 mL, 0.05M) and TFA (3.8 mL, 49 mmol, 72 equiv) was added at 0°Cand the reaction was stirred at this temperature during 2h. The crud was evaporate until dryness and purified on silica gel (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v) to give the title product as an orange oil (47 mg, 22 %). *Rf* = 0.5 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v). MS (ESI+): *m/z* = 322 $[M+H]^+$, 344 $[M+Na]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.50 (s, 1H), 7.22 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 2.93 – 2.60 (m, 2H), 2.60 – 2.08 (m, 12H), 1.73 – 1.57 (m, 2H), 1.57 – 1.40 (m, 2H), 1.04 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.18, 157.26, 153.82, 129.20, 128.86, 126.71, 58.36, 53.50, 53.19, 52.86, 52.53, 52.30, 37.46, 27.94, 26.36, 11.73.

## I.122. AB588 - 148



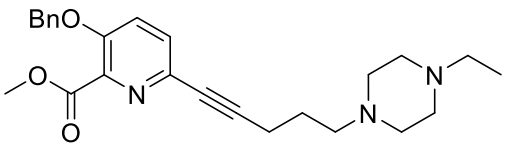
2 TFA

**148 - AB-588**

Chemical Formula: $C_{16}H_{26}N_4O_2$
Exact Mass: 306,21
Molecular Weight: 306,41

AB588 oxime was synthetise using procedure G and was purified using reverse phase purification (Method D) to afford the title compound as white off powder (45.4 mg, 75%). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.32 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.53 (br s, 8H), 3.24 – 3.10 (m, 4H), 2.86 (br s, 2H), 1.74 (br s, 4H), 1.30 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 162.86 (q, *J* = 35.3 Hz), 154.40, 151.71, 146.73, 134.74, 130.37, 127.04, 123.71, 119.84, 115.98, 112.11, 57.47, 53.10, 49.99, 49.62, 34.70, 27.56, 24.55, 9.49. HPLC (Method B): $t_R$ = 24.31 min (purity : 98.90%). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C16H27N4O2 307.2134; found 307.2132.

## I.123. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(4-ethylpiperazin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 168

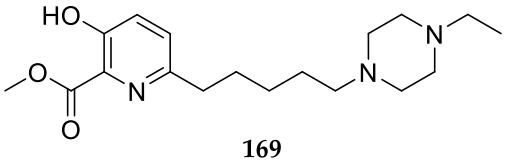



**168**

Chemical Formula: $C_{25}H_{31}N_3O_3$
Exact Mass: 421,24
Molecular Weight: 421,54

Procedure D was used on tosylate **59a** (purification: silica gel, dichloromethane/MeOH/triethylamine, 95/5/1, v/v/v) to give the title compound as a brown oil (1.12 g, 92%). *Rf* = 0.29 (dichloromethane/MeOH/triethylamine, 95/5/1, v/v/v). MS (ESI+): *m/z* = 422 $[M+H]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.55 – 7.25 (m, 7H), 5.23 (s, 2H), 3.98 (s, 3H), 2.68 – 2.39 (br m, 12H), 1.92 – 1.73 (m, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.15 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.93, 152.98, 140.19, 135.63, 135.58, 130.03, 128.82, 128.32, 127.01, 126.00, 121.90, 90.05, 79.59, 70.95, 57.46, 52.85, 52.75, 52.72, 52.39, 46.16, 25.67, 17.46, 11.75, 9.29.

## I.124. Methyl 6-(5-(4-ethylpiperazin-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate - 169

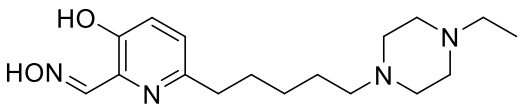



**169**

Chemical Formula: $C_{18}H_{29}N_3O_3$
Exact Mass: 335,22
Molecular Weight: 335,45

Procedure E (Pearlman catalyst, MeOH) was used and the crude product was purified using silica gel (dichloromethane/MeOH, 95/5 to 90/10 v/v) to give the title compound as an orange oil (446 mg, 49%). *Rf* = 0.38 (dichloromethane/MeOH, 90/10 v/v). MS (ESI+): *m/z* = 336 $[M+H]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.52 (s, 1H), 7.22 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 2.98 – 2.53 (m, 12H), 2.53 – 2.32 (m, 2H), 1.79 – 1.42 (m, 4H), 1.42 – 1.23 (m, 2H), 1.23 – 1.04 (m, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.65, 157.74, 154.30, 129.69, 129.34, 129.30, 127.22, 126.45, 58.28, 53.69, 52.59, 51.89, 37.98, 30.28, 27.42.

## I.125. AB-557 - 149



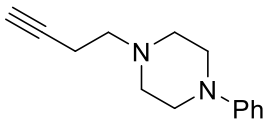

1.9 TFA

**149 - AB557**

Chemical Formula: $C_{17}H_{28}N_4O_2$
Exact Mass: 320,22
Molecular Weight: 320,44

Procedure F (DIBAL = 3 equiv.) and procedure G (Reverse phase purification, method D) were used on **169** to give the title compound as a brown solid (69.9 mg, 10 % over 4 steps). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.31 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.25 – 3.08 (m, 8H), 2.91 – 2.73 (m, 2H), 1.71 (s, 8H), 1.38 (s, 2H), 1.28 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 161.63 (q, *J* = 35.4 Hz), 154.31, 134.52, 130.51, 127.08, 119.91, 116.06, 57.68, 53.08, 35.08, 32.83, 30.22, 29.55, 26.90, 26.72, 24.84. HPLC (Method B): $t_R$ = 14.52 min (96.1%). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C17H29N4O2 321.2291; found 321.2287.

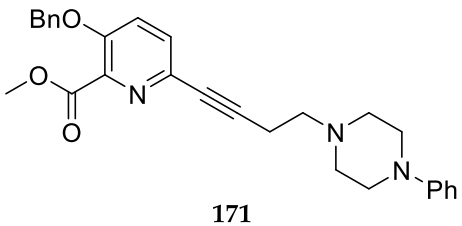
## I.126. 1-(but-3-yn-1-yl)-4-phenylpiperazine - 170




**170**
Chemical Formula: $C_{14}H_{18}N_2$
Exact Mass: 214,15
Molecular Weight: 214,31

Procedure D was used on **60b** (1 equiv) with N-phenylpiperazine (1 equiv) and potassium carbonate (1.1 equiv), normal phase purification (Petroleum ether/EtOAc, 100/0 to 1/1, v/v) gave the title compound as a yellow oil (829 mg, 78%). *Rf* = 0.28 (Petroleum ether/EtOAc, 80/40, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 7.23 (dd, *J* = 8.7, 7.3 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.82 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.24 – 3.08 (m, 4H), 2.70 – 2.58 (m, 6H), 2.41 (td, *J* = 7.4, 2.4 Hz, 2H), 2.01 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 152.06, 129.55, 119.91, 116.40, 83.40, 71.09, 69.25, 68.06, 57.50, 53.49, 49.58, 38.06, 20.26, 17.37.

## I.127. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(4-phenylpiperazin-1-yl)but-1-yn-1-yl)picolinate - 171

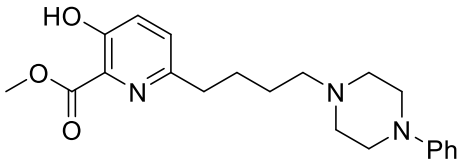


**171**

Chemical Formula: $C_{28}H_{29}N_3O_3$
Exact Mass: 455,22
Molecular Weight: 455,56

Procedure A was used with compounds 170 and 4a and purification on silica gel (Petroleum ether/EtOAc/triethylamine, 70/30/1 to 50/50/1, v/v/v) afforded the title product as an orange oil (505 mg, 54%, trace of PPh3). *Rf* = 0.28 (Petroleum ether/EtOAc/triethylamine, 50/50/1, v/v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 7.31 – 7.05 (m, 9H), 6.76 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.67 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.11 – 2.94 (m, 4H), 2.49 – 2.40 (m, 4H), 2.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.75 – 1.60 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 165.35, 153.25, 152.02, 140.62, 136.28, 135.69, 132.46, 132.38, 132.33, 130.31, 129.46, 129.10, 129.07, 128.91, 128.66, 127.59, 122.10, 119.68, 116.21, 90.23, 79.89, 71.19, 60.67, 57.68, 53.68, 52.82, 49.48, 26.33, 21.27, 17.56, 14.53.

## I.128. methyl 3-hydroxy-6-(4-(4-phenylpiperazin-1-yl)butyl)picolinate - 172

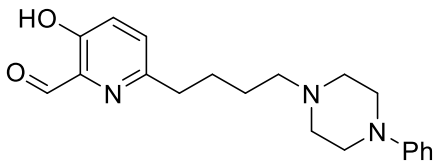


**172**

Chemical Formula: $C_{21}H_{27}N_3O_3$
Exact Mass: 369,21
Molecular Weight: 369,47

Procedure E (Perlmaan 0.4 equiv in methanol, 0.005M) was used on compound 172 to give the title compound without purification needed as a light orange oil (178 mg, 99%). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.53 (s, 1H), 7.19 (dd, *J* = 11.0, 4.9 Hz, 4H), 6.91 – 6.67 (m, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.23 – 3.05 (m, 4H), 2.79 – 2.69 (m, 2H), 2.66 – 2.53 (m, 4H), 2.50 – 2.36 (m, 2H), 1.76 – 1.59 (m, 2H), 1.60 – 1.41 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.15, 157.29, 153.67, 151.07, 129.26, 129.21, 128.87, 128.68, 128.52, 126.80, 120.07, 116.28, 58.26, 53.20, 53.06, 48.81, 37.32, 29.75, 27.83, 25.94.

## I.129. 3-hydroxy-6-(4-(4-phenylpiperazin-1-yl)butyl)picolinaldehyde – 173

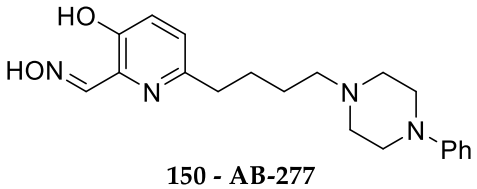



**173**

Chemical Formula: $C_{20}H_{25}N_3O_2$
Exact Mass: 339,19
Molecular Weight: 339,44

Procedure F (DIBAL = 3 equiv) was used on compound 172 that was isolated using normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 85/15, v/v) to give the title compound as an orange oil (67 mg, 38% over 3 steps). *Rf* = 0.62 (dichloromethane/MeOH, 90/10). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.08 (s, 1H), 7.42 – 7.19 (m, 4H), 6.97 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.89 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.37 – 3.14 (m, 4H), 2.87 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.77 – 2.57 (m, 4H), 2.57 – 2.42 (m, 2H), 1.96 – 1.72 (m, 2H), 1.72 – 1.55 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.81, 157.07, 154.78, 151.36, 135.78, 129.81, 129.16, 126.45, 119.75, 116.09, 58.49, 53.35, 49.15, 37.22, 27.65, 26.49.

## I.130. AB277 - 150

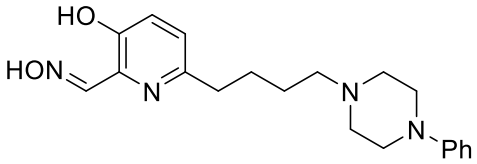



**150 - AB-277**

Chemical Formula: $C_{20}H_{26}N_4O_2$
Exact Mass: 354,21
Molecular Weight: 354,45

Procedure G was used on compound 173; prufication using silica gel (dichloromethane/MeOH, 95/5 to 90/10, v/v) gave the title product as light orange solid (59 mg, 92 %). *Rf* = 0.5 (dichloromethane/MeOH, 90/10). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 9.19 (br s, 2H), 8.27 (s, 1H), 7.25 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.96 – 6.82 (m, 3H), 3.43 – 3.24 (m, 4H), 3.04 – 2.83 (m, 3H), 2.75 (t, *J* = 6.1 Hz, 4H), 1.85 – 1.65 (m, 4H), 1.26 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 154.05, 153.09, 151.15, 135.61, 129.71, 125.43, 124.85, 124.49, 120.91, 116.97, 58.22, 52.94, 48.24, 36.77, 27.58, 24.86, 21.52. HPLC (Method A): $t_R$ = 18.85 (purity = 96.45 %). MS (ESI+): *m/z* = 355 $[M+H]^+$

## I.131. AB745 – 150a

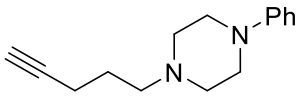



3.48 TFA

**150a - AB-745**

AB277 (58 mg, 0.164 mmol) was dissolved in dry methanol (1 mL), and TFA (1 mL) was added. Concentration until dryness and reverse phase purification gave the title compound as golden white off solid (57.25 mg, 46%). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.42 (s, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.35 – 7.23 (m, 2H), 7.01 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 6.93 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.98 – 3.48 (m, 4H), 3.29 – 2.86 (m, 8H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 162.48 (d, *J* = 35.9 Hz), 154.46, 151.30, 151.12, 145.60, 134.44, 131.11, 130.33, 127.32, 122.36, 119.80, 117.98, 115.94, 57.44, 53.06, 48.02, 34.32, 27.59, 24.36. HPLC (Method B): $t_R$ = 19.42 min (purity: 96.91 %). MS (ESI+): *m/z* = 355 $[M+H]^+$, 386 [M+K]+. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C20H27N4O2 355.2134; found 355.2148.

## I.132. 1-(pent-4-yn-1-yl)-4-phenylpiperazine -174

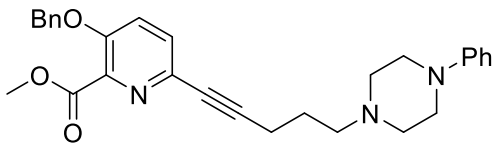



**174**

Chemical Formula: $C_{15}H_{20}N_2$
Exact Mass: 228,16
Molecular Weight: 228,34

Procedure D was used on **60b** (1 equiv) with N-phenylpiperazine (1 equiv) and potassium carbonate (1.1 equiv), normal phase purification (Petroleum ether/EtOAc, 100/0 to 1/1, v/v) gave the title compound as a yellow oil (989 mg, 87%). *Rf* = 0.25 (Petroleum ether/EtOAc, 80/40, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 7.23 (dd, *J* = 8.7, 7.3 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.81 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.22 – 3.07 (m, 4H), 2.62 – 2.51 (m, 4H), 2.46 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.26 (td, *J* = 7.1, 2.6 Hz, 2H), 1.98 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 1.72 (p, *J* = 7.1 Hz, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 152.15, 129.53, 119.79, 116.32, 84.89, 69.95, 69.11, 68.67, 57.61, 53.80, 49.63, 37.68, 28.44, 26.47, 16.75.

## I.133. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(4-phenylpiperazin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 175

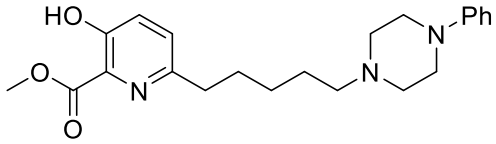



**175**

Chemical Formula: $C_{29}H_{31}N_3O_3$
Exact Mass: 469,24
Molecular Weight: 469,58

Procedure A was used with compounds 174 and 4a and purification on silica gel (Petroleum ether/EtOAc/triethylamine, 70/30/1 to 50/50/1, v/v/v) afforded the title product as an orange oil (283 mg, 32%, trace of PPh3). *Rf* = 0.28 (Petroleum ether/EtOAc/triethylamine, 50/50/1, v/v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 7.52 – 7.19 (m, 9H), 7.00 – 6.79 (m, 3H), 5.15 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.32 – 3.15 (m, 4H), 2.71 – 2.57 (m, 4H), 2.53 (t, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.85 (p, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.38 – 1.17 (m, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 165.35, 153.25, 152.02, 140.62, 136.28, 135.69, 132.46, 132.38, 132.33, 130.31, 129.46, 129.10, 129.07, 128.91, 128.66, 127.59, 122.10, 119.68, 116.21, 90.23, 79.89, 71.19, 57.68, 53.68, 52.82, 49.48, 26.33, 17.56.

## I.134. methyl 3-hydroxy-6-(5-(4-phenylpiperazin-1-yl)pentyl)picolinate -176

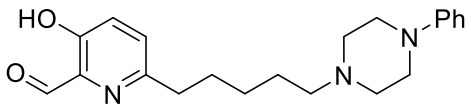



**176**

Chemical Formula: $C_{22}H_{29}N_3O_3$
Exact Mass: 383,22
Molecular Weight: 383,49

Procedure E (Perlmaan 0.4 equiv in methanol, 0.006M) was used on compound 175 to give the title compound without purification needed as a orange oil (173 mg, quant.).$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.17 (dd, *J* = 8.3, 7.6 Hz, 4H), 6.84 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.76 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.25 – 3.02 (m, 4H), 2.82 – 2.62 (m, 2H), 2.62 – 2.42 (m, 4H), 2.42 – 2.20 (m, 2H), 1.65 (dt, *J* = 15.5, 7.7 Hz, 2H), 1.49 (dt, *J* = 15.0, 7.4 Hz, 2H), 1.32 (dt, *J* = 14.6, 7.4 Hz, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.18, 157.45, 153.95, 151.41, 132.21, 132.08, 129.13, 128.63, 128.47, 126.79, 119.66, 116.04, 58.67, 53.35, 53.18, 49.18, 37.68, 30.10, 27.38, 26.84.

### I.135. 3-hydroxy-6-(5-(4-phenylpiperazin-1-yl)pentyl)picolinaldehyde - 177

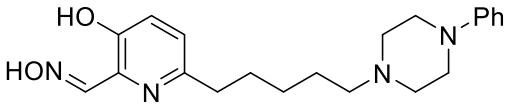



**177**

Chemical Formula: $C_{21}H_{27}N_3O_2$
Exact Mass: 353,21
Molecular Weight: 353,47

Procedure F (2,6-lutidine, DIBAL = 3 equiv) was used on compound 176 that was isolated using normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v) to give the title compound as a white off solid (40 mg, 50% over 3 steps). *Rf* = 0.55 (dichloromethane/MeOH, 90/10). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.38 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 7.31 – 7.15 (m, 4H), 6.93 – 6.86 (m, 2H), 6.82 (dd, *J* = 11.4, 4.1 Hz, 1H), 3.33 – 3.08 (m, 4H), 2.85 – 2.67 (m, 2H), 2.67 – 2.46 (m, 4H), 2.37 (dd, *J* = 8.7, 6.6 Hz, 2H), 1.73 (dt, *J* = 15.5, 7.6 Hz, 2H), 1.57 (dt, *J* = 15.2, 7.3 Hz, 2H), 1.46 – 1.30 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.89, 157.09, 155.04, 151.44, 135.82, 132.28, 132.15, 129.84, 129.20, 128.69, 128.53, 126.47, 119.77, 116.12, 58.71, 53.40, 49.21, 37.41, 29.77, 27.35, 26.83.

### I.136. AB269- 151

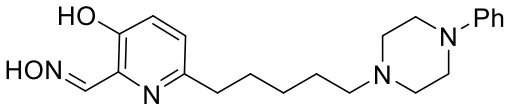



**151 - AB-269**

Chemical Formula: $C_{21}H_{28}N_4O_2$
Exact Mass: 368,22
Molecular Weight: 368,48

Procedure G was used for compound **177** and the title product was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v) as a a white off solid (29 mg, 70%). *Rf* = 0.2 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 10.60 (s, 2H), 8.24 (s, 1H), 7.15 (dd, *J* = 8.5, 7.4 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.75 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.28 – 3.07 (m, 4H), 2.80 – 2.55 (m, 6H), 2.53 – 2.36 (m, 2H), 1.72 – 1.43 (m, 4H), 1.37 – 1.24 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 153.79, 153.73, 153.04, 151.54, 135.78, 129.63, 124.86, 124.26, 120.48, 116.73, 58.70, 53.32, 48.81, 37.40, 30.24, 27.42, 26.14. HPLC (Method A): $t_R$ = 19.63 (98.60%)

## I.137. AB-744 – 151a




2.93 TFA

**151a - AB-744**

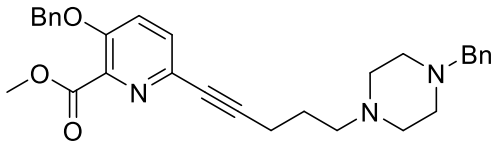
Chemical Formula: $C_{21}H_{28}N_4O_2$

Exact Mass: 368,22

Molecular Weight: 368,48

Same procedure used for AB-745, white off solid (57.4 mg, 49%). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.29 (s, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.13 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.77 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.66 (d, *J* = 12.1 Hz, 2H), 3.51 (d, *J* = 9.7 Hz, 2H), 3.13 – 2.73 (m, 8H), 1.78 – 1.54 (m, 4H), 1.45 – 1.22 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 160.5 (q, J = 36 Hz), 153.17, 149.84, 149.75, 141.68, 132.15, 131.51, 128.95, 126.59, 121.01, 116.62, 56.27, 51.67, 46.68, 32.48, 28.75, 25.55, 23.24. HPLC (Method B): $t_R$ = 20.00 (95.30%). MS (ESI+): *m*/*z* = 369 (100) [M+H], 401 (5) [M+K]+. HRMS (ESI+): *m*/*z* calcd. for C21H29N4O2 369.2291; found 369.2291.

## I.138. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(4-benzylpiperazin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 173




**178**

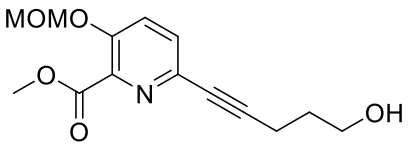
Chemical Formula: $C_{30}H_{33}N_3O_3$

Exact Mass: 483,25

Molecular Weight: 483,61

Procedure D was used for mesylate **57a** and *N*-benzylpiperazine, purification by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH/triethylamine, 100/0/1 to 95/5/1, v/v/v) to give the title compound as an orange oil (870 mg, 68%). *Rf* = 0.68 (dichloromethane/MeOH/triethylamine, 90/10/1, v/v/v).$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.53 – 7.10 (m, 13H), 5.13 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.49 (s, 2H), 2.53 – 2.31 (m, 12H), 1.91 – 1.67 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.46, 152.44, 139.59, 137.83, 135.19, 135.01, 129.63, 128.78, 128.32, 127.82, 126.62, 126.51, 121.36, 89.69, 79.13, 70.28, 62.69, 57.11, 52.84, 52.75, 52.25, 25.36, 17.00. MS (ESI+): *m*/*z* = 484 (100) $[M+H]^+$.

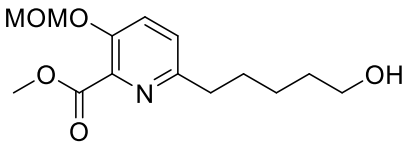
### I.139. Methyl 6-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)-3-(methoxymethoxy)picolinate – 23a




**23a**
Chemical Formula: $C_{14}H_{17}NO_5$
Exact Mass: 279,11
Molecular Weight: 279,29

Procedure A was used for 4-pentyn-1-ol and 4b. Purification by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 75/25 to 20/80, v/v) gave the title compound as a yellow solid (1.13 mg, 80%). *Rf* = 0.15 (Petroleum ether/EtOAc, 60/40, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.52 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.26 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.80 (dd, *J* = 11.6, 6.0 Hz, 2H), 3.50 (s, 3H), 2.55 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.98 – 1.77 (m, 2H), 1.56 (s, 1H), 1.43 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 1.27 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 0.84 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.91, 151.89, 140.51, 136.11, 130.22, 124.20, 95.13, 87.10, 81.07, 77.36, 60.95, 56.76, 52.90, 23.96. MS (ESI+) : *m/z* = 280 $[M+H]^+$.

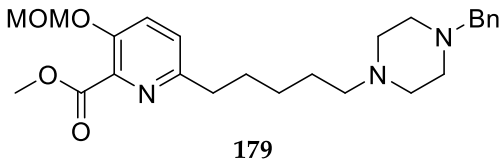
### I.140. Methyl 6-(5-hydroxypentyl)-3-(methoxymethoxy)picolinate – 24a




**24a**
Chemical Formula: $C_{14}H_{21}NO_5$
Exact Mass: 283,14
Molecular Weight: 283,32

Same procedure used for **24b** was applied to **23a**.The title product was obtained after purification on silica gel (Petroleum ether/EtOAc,40/60, v/v) as a light yellow oil (342 mg, 60% over 3 steps). *Rf* = 0.25 (Petroleum ether/EtOAc,40/60, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.20 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.58 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.47 (s, 3H), 2.87 – 2.69 (m, 2H), 1.81 – 1.61 (m, 2H), 1.61 – 1.49 (m, 2H), 1.49 – 1.32 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 165.47, 154.89, 150.21, 139.17, 125.42, 124.52, 94.77, 61.76, 55.95, 52.16, 36.81, 32.06, 29.39, 25.11. MS (ESI+): *m/z* = 284 [M+H]+.

### I.141. Methyl 6-(5-(4-benzylpiperazin-1-yl)pentyl)-3-(methoxymethoxy)picolinate - 179

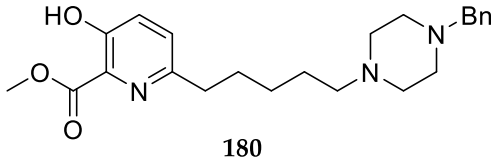



**179**

Chemical Formula: $C_{25}H_{35}N_3O_4$
Exact Mass: 441,26
Molecular Weight: 441,57

Procedure B was used for **24a** to generate the mesylate that was used without purification on the next steps (procedure D) with *N*-benzyl morpholine (1.2 equiv) to give the title compound after purification by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH/triethylamine, 100/0/2 to 90/10/2, v/v/v) as an orangeous oil (446 mg, 86%). *Rf* = 0.55 (dichloromethane/MeOH/triethylamine, 90/10/2, v/v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.36 – 7.23 (m, 6H), 5.25 (s, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.53 (s, 3H), 2.86 – 2.73 (m, 3H), 2.53 (br s, 10H), 2.44 – 2.31 (m, 2H), 1.86 – 1.66 (m, 2H), 1.63 – 1.52 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 166.29, 155.50, 150.57, 140.52, 138.56, 132.31, 129.46, 128.99, 128.54, 127.40, 125.82, 125.16, 95.71, 62.96, 58.37, 56.59, 53.22, 52.63, 46.23, 37.45, 30.00, 27.30, 26.28. MS (ESI+) : *m/z* = 442 (100%) $[M+H]^+$.

### I.142. Methyl 6-(5-(4-benzylpiperazin-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate - 180

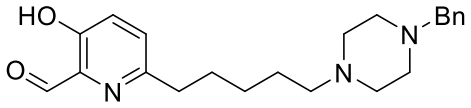



**180**

Chemical Formula: $C_{23}H_{31}N_3O_3$
Exact Mass: 397,24
Molecular Weight: 397,52

Compound **179** (404 mg, 0.915 mmol, 1 equiv) was dissolved in dry dichloromethane and TFA was added at 0 °C. The mixture was stirred at rt during 2 h, then excess of TFA was remode under vacuum. The residue was dissolved in dichloromethane and washed with saturated aqueous $Na_2CO_3$. The organic phase was dried with magnesium sulfate and removing of volatile gave the desired product as an orange oil (233 mg, 64%). *Rf* = 0.57 (dichloromethane/MeOH/triethylamine, 95/5/2, v/v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.47 – 7.20 (m, 7H), 4.07 (s, 2H), 3.56 (s, 3H), 2.96 – 2.71 (m, 2H), 2.71 – 2.26 (m, 10H), 1.92 – 1.69 (m, 2H), 1.69 – 1.51 (m, 2H), 1.51 – 1.34 (m, 2H), 1.06 – 0.81 (m, 1H). MS (ESI+) : 398 $[M+H]^+$.

### I.143. 6-(5-(4-benzylpiperazin-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde - 181

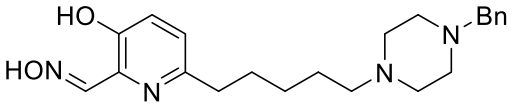



**181**

Chemical Formula: $C_{22}H_{29}N_3O_2$
Exact Mass: 367,23
Molecular Weight: 367,49

Procedure F was used for compound **180** (2,6-lutidine as base; DIBAL-H = 3 equiv) and after a normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 95/5, v/v/v) the title compound was obtained as yellow oil (94 mg, 43% over 3 steps). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 9.85 (s, 1H), 7.13 (dd, *J* = 7.0, 3.0 Hz, 7H), 3.39 (s, 2H), 2.71 – 2.22 (m, 12H), 1.62 – 1.42 (m, 4H), 1.26 – 1.15 (m, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.74, 157.00, 154.71, 137.36, 135.71, 129.83, 129.28, 128.35, 127.35, 126.42, 62.64, 58.11, 52.76, 51.78, 37.09, 29.36, 26.90, 25.63. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C22H30N3O2 368.2338; found 368.2338.

### I.144. AB-153 – 153

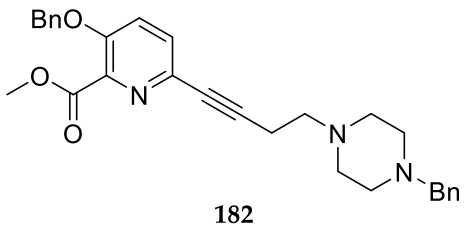



**153 - AB153**

Chemical Formula: $C_{22}H_{30}N_4O_2$
Exact Mass: 382,24
Molecular Weight: 382,51

Procedure G was used for compound **181** to give after normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v) the title product as a yellow oil that crystalize upon standing (78.2 mg, 82%). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.08 (s, 1H), 7.16 – 7.03 (m, 6H), 6.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.45 (s, 2H), 2.94 (s, 4H), 2.74 (dd, *J* = 9.5, 6.8 Hz, 2H), 2.64 – 2.48 (m, 6H), 1.75 (s, 4H), 1.60 – 1.45 (m, 4H), 1.26 – 1.13 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 154.28, 153.77, 152.75, 137.43, 136.27, 130.49, 129.53, 128.83, 126.04, 125.37, 62.73, 57.91, 52.90, 51.11, 37.43, 30.56, 27.22, 25.15, 22.38. MS (ESI+): *m/z* (%) = 383 (100) $[M+H]^+$. HPLC (method A): $t_R$ = 17.87 min (98.4%).

### I.145. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(4-benzylpiperazin-1-yl)but-1-yn-1-yl)picolinate -152

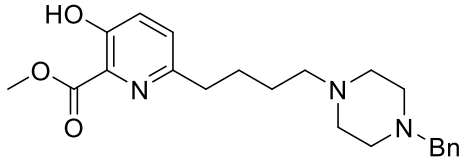


**182**

Chemical Formula: $C_{29}H_{31}N_3O_3$
Exact Mass: 469,24
Molecular Weight: 469,58

Procedure D was used on mesylate **57b** (1.1 equiv), potassium carbonate (2.2 equiv) and N-benzylpiperazine (1 equiv), purification by chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 95/5, v/v) gave the title product as an orange oil (714 mg, 46 %). *Rf* = 0.28 (dichloromethane/MeOH, 96/4, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.45 – 7.19 (m, 12H), 5.20 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.51 (s, 2H), 2.74 – 2.64 (m, 2H), 2.64 – 2.27 (m, 10H).$^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.67, 152.80, 139.97, 137.98, 135.41, 135.14, 132.00, 131.87, 131.82, 129.83, 129.05, 128.59, 128.48, 128.32, 128.09, 126.91, 126.78, 121.66, 88.31, 79.92, 70.66, 62.89, 56.65, 52.85, 52.69, 52.52, 17.46. MS (ESI+): *m/z* = 470 $[M+H]^+$, 492 $[M+Na]^+$, 502 $[M+K]^+$.

### I.146. Methyl 6-(4-(4-benzylpiperazin-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinate -183

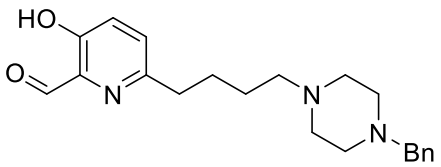


**183**

Chemical Formula: $C_{22}H_{29}N_3O_3$
Exact Mass: 383,22
Molecular Weight: 383,49

Procedure E was used on compound **182**. After normal phase purification, the title compound was obtained as a brown oil (335 mg, 58%, trace of toluene). *Rf* = 0.5 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.32 – 7.20 (m, 7H), 4.00 (s, 3H), 3.49 (s, 3H), 2.88 – 2.67 (m, 2H), 2.62 – 2.23 (m, 10H), 1.79 – 1.63 (m, 2H), 1.60 – 1.45 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.17, 157.26, 153.80, 137.94, 132.21, 129.28, 128.84, 128.64, 128.27, 127.15, 63.00, 58.37, 53.18, 53.13, 52.75, 37.42, 27.94, 26.23. MS (ESI+): *m/z* = 384 $[M+H]^+$.

### I.147. 6-(4-(4-benzylpiperazin-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinaldehyde -184




**184**

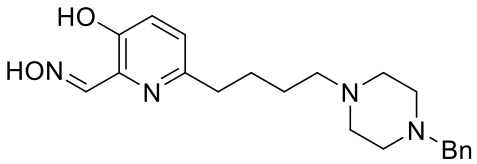
Chemical Formula: $C_{21}H_{27}N_3O_2$

Exact Mass: 353,21

Molecular Weight: 353,47

Procedure F (triethylamine as base, DIBAL-H = 3 equiv) was used on compound **183** and the title compound was isolated after normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v) as a brown oil (216 mg, 70% over 3 steps. TLC-MS (ESI+) : *m/z* = 354 $[M+H]^+$, 376 $[M+Na]^+$; *Rf* = 0.33; . $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.49 (br s, 1H), 9.95 (s, 1H), 7.37 – 7.03 (m, 7H), 3.44 (s, 2H), 2.86 – 2.62 (m, 2H), 2.60 – 2.18 (m, 8H), 1.78 – 1.57 (m, 2H), 1.57 – 1.36 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.53, 156.86, 154.53, 137.82, 135.61, 129.62, 129.11, 128.10, 126.96, 126.26, 62.87, 58.21, 53.02, 52.70, 36.97, 27.44, 26.14.

### I.148. AB641 – 152




3.2 TFA

**152 - AB-641**

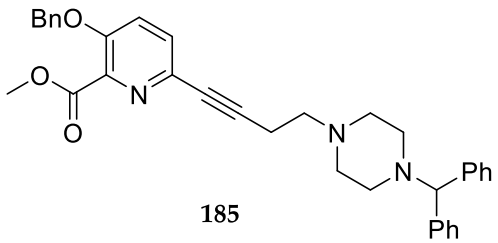
Chemical Formula: $C_{21}H_{28}N_4O_2$

Exact Mass: 368,22

Molecular Weight: 368,48

Procedure G was used for compound **184**, reverse phase purification (method D) gave the title compound as white off powder (189.84 mg, 42%). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.29 (s, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.41 – 7.25 (m, 5H), 4.17 (s, 2H), 3.44 (s, 4H), 3.35 (d, *J* = 4.1 Hz, 4H), 3.10 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.85 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.81 – 1.56 (m, 4H).$^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 162.33 (q, *J* = 36.5 Hz), 154.59, 150.88, 144.19, 134.08, 131.99, 131.25, 130.96, 130.28, 127.67, 61.55, 57.33, 50.47, 49.71, 33.81, 27.42, 24.37. HPLC (method B): $t_R$ = 17.28 min (purity: 97 %). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C21H19N4O3 369.2291; found 329.2287.

### I.149. Methyl 6-(4-(4-benzhydrylpiperazin-1-yl)but-1-yn-1-yl)-3-(benzyloxy)picolinate - 185

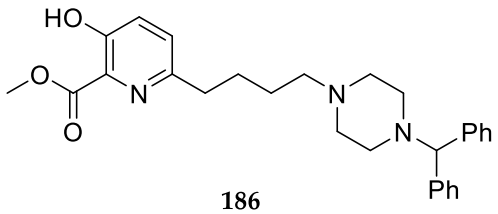



**185**

Chemical Formula: $C_{35}H_{35}N_3O_3$
Exact Mass: 545,27
Molecular Weight: 545,68

Procedure D was used on mesylate **57b** (1.1 equiv), potassium carbonate (2 equiv) and N-benzhydrylpiperazine (1 equiv), purification by chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 95/5, v/v) gave the title product as brown foaming solid (767 mg, 43%). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 546 $[M+H]^+$;*Rf* = 0.4 (dichloromethane/MeOH, 96/4, v/v); . $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.44 – 7.13 (m, 17H), 5.19 (s, 2H), 4.21 (s, 1H), 3.95 (s, 3H), 2.75 – 2.63 (br m, 2H), 2.63 – 2.22 (m, 10H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.60, 152.70, 142.53, 139.88, 135.35, 135.02, 133.04, 131.91, 131.78, 131.75, 131.66, 129.76, 128.50, 128.41, 128.29, 128.25, 127.99, 127.71, 126.73, 126.70, 121.56, 88.26, 79.87, 75.99, 70.52, 56.55, 52.89, 52.42, 51.61, 17.41.

### I.150. methyl 6-(4-(4-benzhydrylpiperazin-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinate - 186

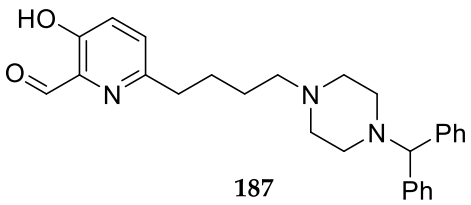



**186**

Chemical Formula: $C_{28}H_{33}N_3O_3$
Exact Mass: 459,25
Molecular Weight: 459,59

Procedure E (Pearlman, MeOH) was used on compound **185** to giva after normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10) the title compound as a brown oil (574 mg, 89%). *Rf* = 0.52 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.36 – 7.03 (m, 12H), 4.12 (s, 1H), 3.90 (s, 3H), 2.76 – 2.58 (m, 2H), 2.58 – 2.06 (m, 10H), 1.72 – 1.52 (m, 2H), 1.52 – 1.31 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.07, 157.14, 153.77, 142.73, 132.11, 131.98, 131.92, 131.89, 129.12, 128.74, 128.60, 128.55, 128.41, 127.88, 126.91, 126.85, 126.58, 76.22, 70.96, 58.37, 53.45, 53.07, 51.78, 37.38, 37.08, 27.94, 26.33.

### I.151. 6-(4-(4-benzhydrylpiperazin-1-yl)butyl)-3-hydroxypicolinaldehyde - 187

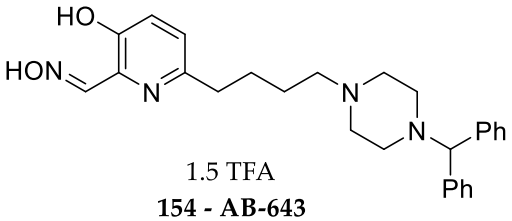



**187**

Chemical Formula: $C_{27}H_{31}N_3O_2$
Exact Mass: 429,24
Molecular Weight: 429,56

Procedure F (triethylamine as base, DIBAL-H = 3 equiv) was usedon compound **186**, normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v, gave the title compound as an orange oil (499.7 mg, 93% over 3 steps). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 430 $[M+H]^+$; *Rf* = 0.5 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v); .$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.52 (s, 1H), 9.92 (s, 1H), 7.35 – 7.02 (m, 12H), 4.12 (s, 1H), 2.77 – 2.58 (m, 2H), 2.51 – 1.89 (m, 10H), 1.73 – 1.53 (m, 2H), 1.53 – 1.35 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.43, 156.80, 154.47, 142.57, 131.97, 131.84, 131.79, 129.56, 128.61, 128.44, 128.31, 128.28, 127.75, 126.90, 126.76, 126.18, 76.04, 58.17, 53.35, 53.30, 51.56, 36.91, 27.40, 26.12.

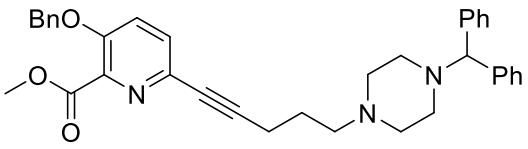
### I.152. AB643 - 154




1.5 TFA
**154 - AB-643**
Chemical Formula: $C_{27}H_{32}N_4O_2$
Exact Mass: 444,25
Molecular Weight: 444,58

Procedure G was used on compound **187**, reverse phase purification (method A) gave the title compound as a white off powder (444.1 mg, 62%). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$,) δ (ppm) 8.42 (s, 1H), 7.78 (t, *J* = 10.6 Hz, 1H), 7.58 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.53 – 7.39 (m, 5H), 7.33 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H), 7.24 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.52 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.51 – 3.25 br (m, 6H), 3.19 (br s, 3H), 2.98 (br s, 3H), 2.78 (br s, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 161.65 (q, *J* = 38.1 Hz), 154.59, 150.88, 144.21, 142.20, 134.07, 132.04, 129.93, 128.89, 128.77, 127.65, 119.37, 115.52, 76.37, 57.26, 53.08, 49.87, 33.87, 27.52, 24.38. HPLC (Method B): $t_R$ = 24.55 min (purity : 97.99 %). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C27H33N4O2 445.2604; found 445.2611.

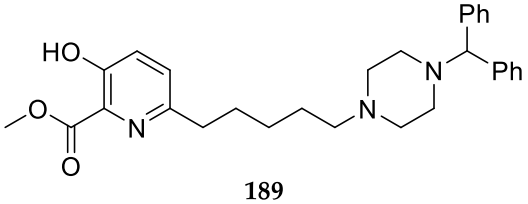
### I.153. Methyl 6-(5-(4-benzhydrylpiperazin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)-3-(benzyloxy)picolinate - 188




**188**
Chemical Formula: $C_{36}H_{37}N_3O_3$
Exact Mass: 559,28
Molecular Weight: 559,71

Procedure D was used on mesylate **57a** (1.1 equiv), potassium carbonate (2 equiv) and *N*-benzhydrylpiperazine (1 equiv), purification on silica gel (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 95/5, v/v) gave the title product as yellow foaming solid (2.21g, 60%). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 560 $[M+H]^+$, 582 $[M+Na]^+$.*Rf* = 0.30 (dichloromethane/MeOH, 98/2, v/v); . $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.73 – 7.16 (m, 17H), 5.24 (s, 2H), 4.36 (s, 1H), 4.04 (s, 3H), 2.77 – 2.43 (m, 12H), 1.98 – 1.83 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.66, 152.63, 142.67, 139.92, 135.41, 135.27, 131.94, 131.80, 131.75, 129.76, 128.52, 128.42, 128.29, 128.01, 127.74, 126.73, 121.58, 89.90, 79.34, 76.08, 70.57, 57.32, 53.37, 53.30, 52.42, 51.76, 25.55, 17.24.

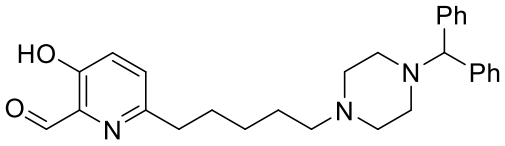
### I.154. methyl 6-(5-(4-benzhydrylpiperazin-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate - 189




**189**
Chemical Formula: $C_{29}H_{35}N_3O_3$
Exact Mass: 473,27
Molecular Weight: 473,62

Procedure E (Pearlman, MeOH) was used for compound **188** to give the title compound as a yellowish oil (1.69 g, quant.). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.34, 7.34, 7.32, 7.22, 7.21, 7.19, 7.19, 7.17, 7.14, 7.13, 7.12, 7.12, 7.10, 4.19, 3.96, 2.73, 2.71, 2.68, 2.60, 2.48, 2.46, 2.43, 2.40, 1.69, 1.66, 1.64, 1.61, 1.59, 1.56, 1.54, 1.51, 1.48, 1.46, 1.34, 1.32, 1.29, 1.27, 1.24, 1.18. $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.21, 157.28, 153.90, 142.50, 141.18, 132.23, 132.10, 129.26, 129.00, 128.87, 128.64, 128.52, 127.91, 127.14, 126.74, 126.13, 76.03, 58.21, 53.21, 50.96, 42.01, 37.52, 29.85, 27.11, 25.83.

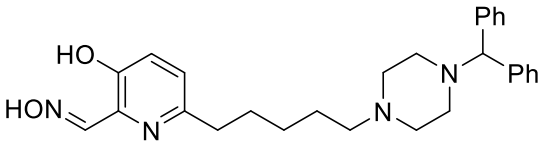
### I.155. 6-(5-(4-benzhydrylpiperazin-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde - 190




**190**
Chemical Formula: $C_{28}H_{33}N_3O_2$
Exact Mass: 443,26
Molecular Weight: 443,59

Procedure F (triethylamine as base, DIBAL-H = 3.0 equiv) was used on compound **189** to give after normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v) the desired product as brown oil (763 mg, 66% over 3 steps). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 444 $[M+H]^+$. *Rf* = 0.55 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v); $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 9.94 (s, 1H), 7.95 (br s, 1H), 7.41 – 7.27 (m, 5H), 7.22 – 6.99 (m, 7H), 4.16 (s, 1H), 2.74 – 2.59 (m, 2H), 2.59 – 2.12 (br m, 10H), 1.73 – 1.56 (m, 2H), 1.56 – 1.36 (m, 3H), 1.36 – 1.16 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.31, 156.68, 154.50, 142.48, 135.48, 131.89, 131.76, 129.41, 128.35, 128.22, 127.66, 126.66, 126.09, 75.97, 58.23, 53.17, 51.41, 36.91, 29.30, 26.96, 26.19, 25.65.

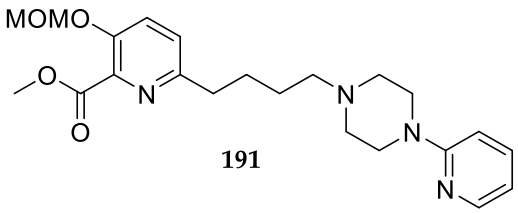
### I.156. AB555 -155




1.46 TFA
**155 - AB-555**
Chemical Formula: $C_{28}H_{34}N_4O_2$
Exact Mass: 458,27
Molecular Weight: 458,61

Procedure G was used on compound **190**, reverse phase purification (method A) gave the title compound as a yellow solid (416 mg, 39%). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.36 (s, 1H), 7.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J* = 5.2, 3.4 Hz, 4H), 7.32 – 7.22 (m, 4H), 7.22 – 7.12 (m, 2H), 4.41 (s, 1H), 3.44 – 3.22 (m, 8H), 3.13 – 3.04 (m, 2H), 2.92 – 2.85 (m, 2H), 1.80 – 1.62 (m, 4H), 1.51 – 1.31 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 161.92 (q, *J* = 37.3 Hz), 154.45, 151.74, 144.70, 142.54, 134.04, 131.75, 129.88, 128.88, 128.67, 127.53, 123.40, 119.54, 115.70, 76.34, 57.56, 53.24, 49.89, 49.00, 34.45, 30.16, 26.95, 24.67. HPLC (method B) : $t_R$ 24.75 (98.08%). HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C28H35N4O4 459.2760; found 459.2774.

### I.157. Methyl 3-(methoxymethoxy)-6-(4-(4-(pyridin-2-yl)piperazin-1-yl)butyl)picolinate - 191

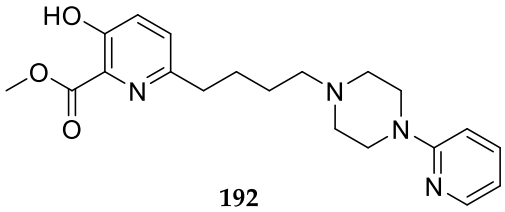



**191**

Chemical Formula: $C_{22}H_{30}N_4O_4$
Exact Mass: 414,23
Molecular Weight: 414,51

Procedure B was applied to compound **24b** to generate the activated mesylate quantitatively that was used without purification. Then, procedure D was used on the mesylate (1 equiv) and the 1-(pyridin-2-yl)piperazine (1.1 equiv) with potassium carbonate (2 equiv). Normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v) gave the title product as brown oil (428 mg, 46% over 2 steps). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 415 $[M+H]^+$, 437 $[M+Na]^+$. *Rf* = 0.37 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v), . $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.12 (dd, *J* = 4.9, 1.1 Hz, 1H), 7.47 – 7.35 (m, 2H), 7.18 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.63 – 6.51 (m, 2H), 5.17 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.49 (dd, *J* = 10.2, 5.3 Hz, 4H), 3.45 (s, 2H), 2.81 – 2.70 (m, 2H), 2.48 (dd, *J* = 9.3, 4.3 Hz, 4H), 2.42 – 2.30 (m, 2H), 1.78 – 1.60 (m, 2H), 1.60 – 1.43 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 165.82, 159.53, 155.08, 150.70, 147.90, 139.70, 137.42, 128.43, 125.69, 124.87, 113.22, 95.21, 58.48, 56.40, 54.83, 53.47, 53.03, 52.63, 45.12, 37.20, 27.89, 26.38.

### I.158. Methyl 3-hydroxy-6-(4-(4-(pyridin-2-yl)piperazin-1-yl)butyl)picolinate -192



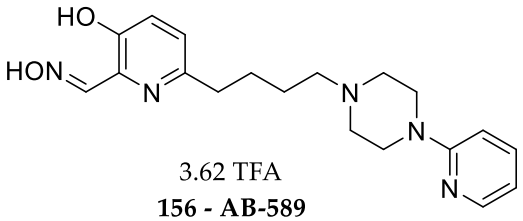

**192**

Chemical Formula: $C_{20}H_{26}N_4O_3$
Exact Mass: 370,20
Molecular Weight: 370,45

Compound **191** (428 mg, 1.03 mmol, 1 equiv) was dissolved in dry dichloromethane (20 mL). TFA (5 mL) was added dropwise at 0 °C and the mixture was stirred for 2 hours at rt. Concentration to dryness and subsequent normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v) gave the title compound asa brown oil (116 mg, 31%). TLC-MS (ESI+) : *m/z* = 371 $[M+H]^+$, 393$[M+Na]^+$. *Rf* =0.59 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v); . $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.46 (br s, 1H), 8.10 (dd, *J* = 4.8, 1.2 Hz, 1H), 7.49 – 7.30 (m, 1H), 7.22 (s, 2H), 6.63 – 6.41 (m, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.53 – 3.40 (m, 4H), 2.83 – 2.66 (m, 2H), 2.56 – 2.42 (m, 4H), 2.42 – 2.22 (m, 2H), 1.77 – 1.60 (m, 2H), 1.60 – 1.42 (m, 2H). $^{13}$C

NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.14, 159.51, 157.23, 153.80, 147.96, 137.46, 129.19, 128.83, 126.69, 113.32, 107.07, 58.47, 53.16, 53.03, 45.09, 37.43, 27.93, 26.33.

### I.159. AB589 - 156




3.62 TFA

**156 - AB-589**

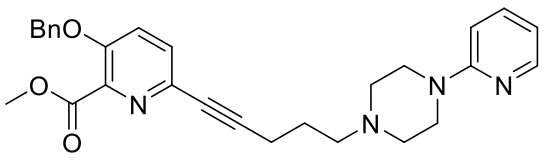
Chemical Formula: $C_{19}H_{25}N_5O_2$

Exact Mass: 355,20

Molecular Weight: 355,44

Procedure F (triethylamine, DIBAL-H = 4 equiv) was applied to compound **192** to generate the 3-hydroxy-6-(4-(4-(pyridin-2-yl)piperazin-1-yl)butyl)picolinaldehyde that was isolated with impurities using normal phase purification. TLC-MS(ESI+): *m/z* = 341 $[M+H]^+$, 363 $[M+Na]^+$. *Rf* = 0.33 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v); . The crude aldehyde was used without further purification in the oxime generation (procedure G). Subsequent reverse phase purification (method A) gave the title product as a tan solid (71.21 mg, 27% over 4 steps). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.42 (s, 1H), 8.13 (dd, *J* = 5.9, 1.2 Hz, 1H), 8.02 (ddd, *J* = 9.0, 7.2, 1.8 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.07 (dd, *J* = 9.6, 3.4 Hz, 1H), 4.01 (s, 4H), 3.52 (s, 4H), 3.32 – 3.24 (m, 2H), 2.99 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.98 – 1.73 (m, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 161.13 (q, *J* = 37.6 Hz), 154.10, 153.12, 149.87, 144.15, 142.94, 140.03, 133.03, 129.87, 125.98, 114.50, 111.55, 56.20, 50.63, 43.00, 32.87, 26.13, 22.90. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C19H26N5O2 356.2087; found 356.2088. HPLC (Method B) : $t_R$ = 15.58 min (purity : 97.09 %).

### I.160. methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(4-(pyridin-2-yl)piperazin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 193




**193**

Chemical Formula: $C_{28}H_{30}N_4O_3$

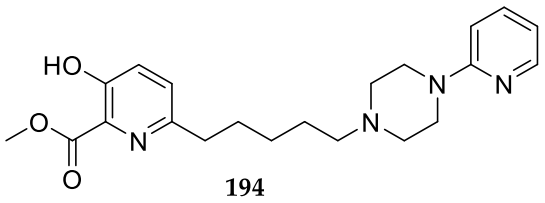
Exact Mass: 470,23

Molecular Weight: 470,57

Procedure D was used on tosylate 59a (1 equiv) and the 1-(pyridin-2-yl)piperazine (1.1 equiv) with potassium carbonate (2 equiv). Normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 99/1 to 85/15, v/v) gave the title compound as a brown oil (1.04g, 72%). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 471 [M+H]+, 493 [M+Na]+; *Rf*

= 0.29 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.25 – 8.13 (m, 1H), 7.54 – 7.19 (m, 8H), 6.71 – 6.51 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.59 – 3.48 (m, 4H), 2.63 – 2.52 (m, 4H), 2.52 – 2.44 (m, 4H), 1.97 – 1.71 (m, 2H).

### I.161. methyl 3-hydroxy-6-(5-(4-(pyridin-2-yl)piperazin-1-yl)pentyl)picolinate -194

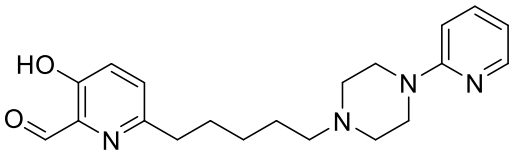



**194**

Chemical Formula: $C_{21}H_{28}N_4O_3$
Exact Mass: 384,22
Molecular Weight: 384,48

Procedure E (Pearlman, MeOH) was used on compound **193** to give the title compound without purification as a brown oil (796 mg, 95%). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.36 (br s, 1H), 8.18 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.31 (s, 2H), 6.82 – 6.53 (m, 2H), 4.04 (s, 3H), 3.91 (br s, 4H), 3.06 (br s, 2H), 2.92 – 2.69 (m, 4H), 2.62 (br s, 2H), 1.87 (br s, 2H), 1.83 – 1.71 (m, 2H), 1.48 – 1.33 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 169.85, 160.30, 158.13, 156.96, 153.24, 147.74, 137.67, 129.06, 126.48, 114.18, 107.24, 57.42, 52.92, 51.56, 43.00, 36.98, 29.20, 26.32, 24.06, 20.22, 18.78.

### I.162. 3-hydroxy-6-(5-(4-(pyridin-2-yl)piperazin-1-yl)pentyl)picolinaldehyde - 195

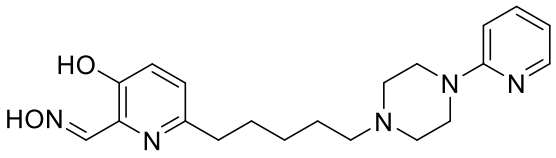



**195**

Chemical Formula: $C_{20}H_{26}N_4O_2$
Exact Mass: 354,21
Molecular Weight: 354,45

Procedure F (triethylamine as base and DIBAL = 4 equiv) was applied to compound **194** to give after normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v) the title compound as a brown oil (311 mg, 44% over 3 steps, traces of TBAF remaining). *Rf* = 0.56 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 9.96 (s, 1H), 8.08 (dd, *J* = 4.9, 1.3 Hz, 1H), 7.37 (ddd, *J* = 7.2, 5.7, 2.0 Hz, 1H), 7.31 – 7.12 (m, 2H), 6.66 – 6.41 (m, 2H), 3.57 – 3.36 (m, 4H), 2.81 – 2.62 (m, 2H), 2.60 – 2.40 (m, 4H), 2.40 – 2.23 (m, 2H), 1.65 – 1.52 (m, 2H + TBAF), 1.37 (dt, *J* = 14.7, 7.4 Hz, 2H + TBAF). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 197.72, 159.13, 156.69, 154.40, 147.54, 137.16, 135.58, 129.39, 126.20, 112.99, 106.80, 58.22, 52.63, 44.69, 36.92, 29.28, 26.84, 26.16, 19.43.

## I.163. AB451- 157



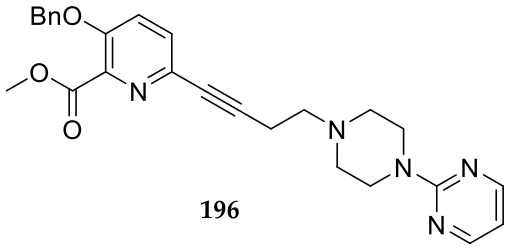
3.5 TFA

**157 - AB-451**

Chemical Formula: $C_{20}H_{27}N_5O_2$
Exact Mass: 369,22
Molecular Weight: 369,47

Procedure G was used on compound **195** and reverse phase purification gave the title compound as a brown oil (6.51 mg, 1%). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.38 (s, 1H), 8.14 (dd, *J* = 5.5, 1.1 Hz, 1H), 8.00 – 7.82 (m, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.06 – 6.85 (m, 1H), 3.46 (s, 4H), 3.22 – 3.15 (m, 2H), 2.97 – 2.80 (m, 2H), 1.89 – 1.74 (m, 4H), 1.57 – 1.39 (m, 2H), 1.39 – 1.21 (m, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 161.13 (q, *J* = 37.8 Hz), 157.00, 154.34, 152.29, 146.40, 144.10, 142.66, 134.56, 130.60, 127.12, 116.04, 111.71, 57.88, 52.28, 49.00, 44.26, 35.08, 30.25, 26.95, 24.67. HRMS (ESI+): *m*/*z* calcd. for C20H28N5O2 370.2235; found 370.2243. HPLC (Method B) : $t_R$ = 16.15 min (purity = 95.5%).

## I.164. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)but-1-yn-1-yl)picolinate - 196

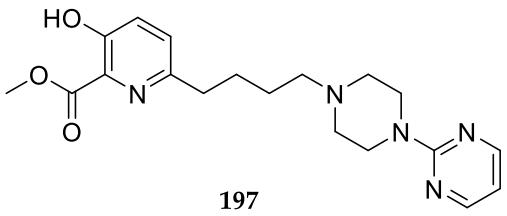


**196**

Chemical Formula: $C_{26}H_{27}N_5O_3$
Exact Mass: 457,21
Molecular Weight: 457,53

Procedure D was used with mesylate **57b** (1.2 equiv) and 2-(piperazin-1-yl)pyrimidine (1 equiv) with potassium carbonate (2 equiv). Normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v) gave the title compound as a brown oil (658 mg, 48%). TLC-MS (ESI+): *m*/*z* = 458 $[M+H]^+$, 480 $[M+Na]^+$. *Rf* = 0.5 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v), . $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.34 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H), 7.52 – 7.23 (m, 8H), 6.51 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.92 – 3.80 (m, 4H), 2.80 – 2.72 (m, 2H), 2.72 – 2.64 (m, 2H), 2.64 – 2.50 (m, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 164.62, 161.43, 157.51, 152.77, 139.91, 135.35, 135.02, 131.79, 129.81, 128.53, 128.44, 128.28, 128.04, 126.74, 121.62, 109.70, 88.12, 79.96, 70.60, 56.65, 52.52, 52.46, 43.42, 17.48.

### I.165. Methyl 3-hydroxy-6-(4-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)butyl)picolinate - 197

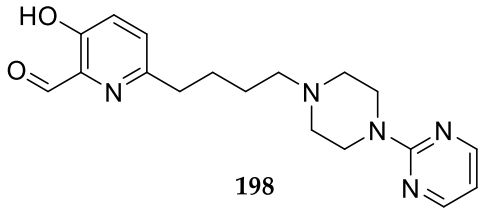


**197**

Chemical Formula: $C_{19}H_{25}N_5O_3$
Exact Mass: 371,20
Molecular Weight: 371,44

Procedure E (pearlman catalyst, MeOH) was applied to compound **196** that was isolated using normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v) to obtain the title compound as a brown oil (104 mg, 19%). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 372 $[M+H]^+$, 394 $[M+Na]^+$ *Rf* = 0.5 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v); . $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.32 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H), 7.33 (s, 2H), 6.49 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 4.06 (s, 3H), 3.93 – 3.76 (m, 4H), 2.91 – 2.78 (m, 2H), 2.56 – 2.49 (m, 4H), 2.49 – 2.36 (m, 2H), 1.87 – 1.69 (m, 2H), 1.69 – 1.51 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.10, 161.64, 157.68, 157.19, 153.77, 129.13, 126.65, 109.79, 58.46, 53.13, 53.06, 43.57, 37.41, 27.91, 26.34.

### I.166. 3-Hydroxy-6-(4-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)butyl)picolinaldehyde - 198

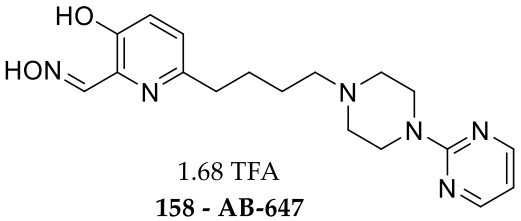


**198**

Chemical Formula: $C_{18}H_{23}N_5O_2$
Exact Mass: 341,19
Molecular Weight: 341,41

Procedure F (triethylamine as base, DIBAL-H = 3 equiv) was used on compound **197**. Purification by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v) gave the title compound as light yellow solid (93 mg, 98 % over 3 steps). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 342 $[M+H]^+$, 364 $[M+Na]^+$; *Rf* = 0.5 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v); . $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.33 (s, 1H), 9.96 (s, 1H), 8.22 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.40 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 3.90 – 3.65 (m, 4H), 2.75 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.56 – 2.41 (m, 4H), 2.41 – 2.27 (m, 2H), 1.81 – 1.63 (m, 2H), 1.54 (dt, *J* = 9.7, 6.9 Hz, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.80, 161.71, 157.78, 157.08, 154.74, 135.80, 129.82, 126.48, 109.95, 58.55, 53.17, 43.61, 37.19, 27.61, 26.37.

## I.167. AB647 - 158



1.68 TFA

**158 - AB-647**

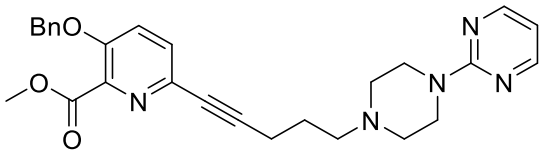
Chemical Formula: $C_{18}H_{24}N_6O_2$

Exact Mass: 356,20

Molecular Weight: 356,43

Procedure G was applied to compound **198**, reverse phase purification (method A) gave the title product as a white off solid (67.31 mg, 45%). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.16 (s, 1H), 8.12 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.44 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.61 (br s, 2H), 3.34 (br s, 4H), 3.00 – 2.85 (m, 3H), 2.83 – 2.64 (m, 3H), 1.73 – 1.42 (m, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 162.12, 159.24, 154.59, 150.89, 144.36, 133.98, 132.01, 127.66, 112.71, 57.56, 52.70, 42.02, 33.84, 27.51, 24.29. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C18H25N6O2 357.2039; found 357.2040. HPLC (Method B) : $t_R$ = 17.23 min (purity = 95.6%).

## I.168. Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate - 199



**199**

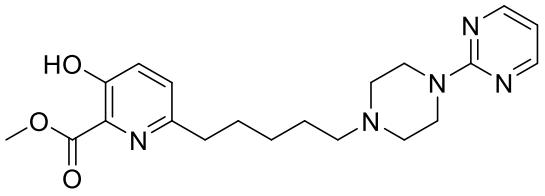
Chemical Formula: $C_{27}H_{29}N_5O_3$

Exact Mass: 471,23

Molecular Weight: 471,56

Procedure D was used with mesylate **57a** (1.0 equiv) and 2-(piperazin-1-yl)pyrimidine (1 equiv) with potassium carbonate (2 equiv). Normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v) gave the title compound as a brown oil (4.15 g, 78%). *Rf* = 0.4 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 8.28 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H), 7.53 – 7.22 (m, 7H), 6.46 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.86 – 3.68 (m, 4H), 2.56 – 2.42 (m, 8H), 1.92 – 1.73 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 165.39, 162.36, 158.14, 153.33, 140.68, 136.32, 135.79, 130.34, 129.17, 128.74, 127.67, 122.17, 110.22, 90.25, 79.86, 71.34, 57.82, 53.60, 52.89, 44.23, 26.32, 17.59.

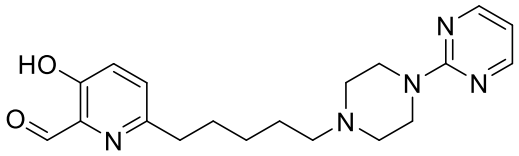
### I.169. Methyl 3-hydroxy-6-(5-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)pentyl)picolinate - 200



**200**
Chemical Formula: $C_{20}H_{27}N_5O_3$
Exact Mass: 385,21
Molecular Weight: 385,47

Procedure E was applied on compound **199** to give without purification the title compound as a brown oil (3.4 g, quant.). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 8.30 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.49 (br s), 6.49 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H), 4.03 (s, 3H), 3.87 – 3.73 (m, 4H), 2.84 – 2.72 (m, 2H), 2.49 – 2.44 (m, 4H), 2.40 – 2.33 (m, 2H), 1.80 – 1.62 (m, 3H), 1.62 – 1.48 (m, 2H), 1.48 – 1.23 (m, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 170.80, 162.39, 158.16, 157.71, 154.35, 129.57, 129.51, 126.91, 110.20, 59.07, 53.68, 53.37, 44.26, 37.98, 30.49, 27.72, 27.24.

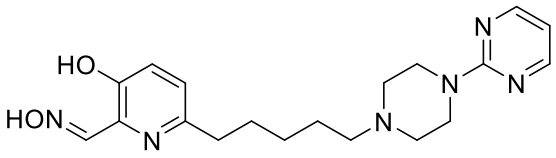
### I.170. 3-Hydroxy-6-(5-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)pentyl)picolinaldehyde - 201



**201**
Chemical Formula: $C_{19}H_{25}N_5O_2$
Exact Mass: 355,20
Molecular Weight: 355,44

Procedure F (triethylamine as base, DIBAL-H = 4 equiv) was applied to compound **200**. Normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v) gave the desired product as a yellow solid (1.46 g, 40 % over 3 steps). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.04 (s, 1H), 9.73 (s, 1H), 8.30 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.47 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 3.94 – 3.76 (m, 4H), 2.90 – 2.72 (m, 2H), 2.63 – 2.44 (m, 4H), 2.44 – 2.31 (m, 2H), 1.87 – 1.69 (m, 2H), 1.69 – 1.50 (m, 2H), 1.50 – 1.31 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.47, 161.42, 157.46, 156.68, 154.62, 135.51, 129.46, 126.12, 109.58, 58.44, 52.92, 43.40, 37.02, 29.38, 26.98, 26.43.

## I.171. AB508 - 159

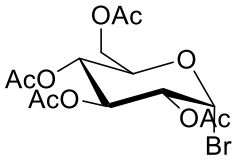



**159 - AB-508**

Chemical Formula: $C_{19}H_{26}N_6O_2$
Exact Mass: 370,21
Molecular Weight: 370,46

Procedure G was applied to compound **201**. Normal phase purification (dichloromethane/MeOH,100/0 to 90/10, v/v) gave the title product as a white off powder (1.01 g, 66%). *Rf* = 0.5 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 9.82 (s, 2H), 8.42 (s, 1H), 8.34 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 7.29 (s, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.53 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.02 – 3.79 (m, 4H), 2.83 – 2.69 (m, 2H), 2.69 – 2.53 (m, 4H), 2.53 – 2.36 (m, 2H), 1.85 – 1.53 (m, 4H), 1.53 – 1.29 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 161.67, 157.89, 153.89, 153.44, 152.68, 135.20, 124.61, 123.98, 110.17, 58.73, 53.05, 43.34, 37.22, 30.03, 27.19, 26.30. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C19H27N6O2 371.2195; found 371.2191. HPLC (Method B): $t_R$ = 17.88 min (purity = 97.25%).

## I.172. 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-α-D-glucopyranosyl bromide - 205

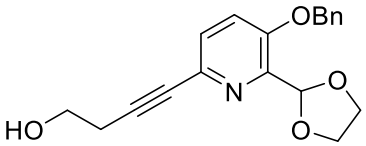



**205**

Chemical Formula: $C_{14}H_{19}BrO_9$
Exact Mass: 410,02
Molecular Weight: 411,20

The title compound was obtained using a reported procedure.[574] β-D-glucose pentaaacetate (1.5 g, 3.84 mmol, 1 equiv) was dissolved in dichloromethane (7.5 mL) and cooled down to 0°C. HBr/AcOH (33% w/w) (2.5 mL) was slowly added and the mixture was stirred 30 min at 0°C and 3h at rt. The reaction was quenched with $NaHCO_3$ sat. and extracted twice with dichloromethane, dried over Magnesium sulfate and evaporated to give the title compound as a white solid (1.6 g, quant.). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 6.60 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H1), 5.55 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, H3), 5.13 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, H4), 4.83 (dd, *J* = 10.0, 4.0 Hz, 1H, H2), 4.38 – 4.24 (m, 2H, H6'), 4.12 (dd, *J* = 13.2, 2.7 Hz, 1H, H6), 2.09 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.4, 169.73, 169.67, 169.3, 86.5 (C1), 72.0 (C5), 70.5 (C2), 70.00 (C3), 67.0 (C4), 60.8 (C6), 20.54, 20.51, 20.45.

### I.173. 4-(5-(benzyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin-2-yl)but-3-yn-1-ol - 215

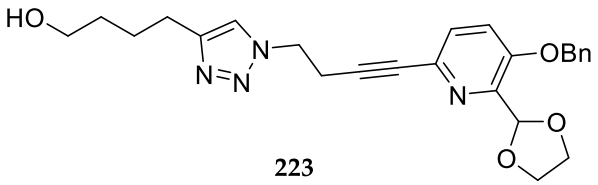



**215**

Chemical Formula: $C_{19}H_{19}NO_4$
Exact Mass: 325,13
Molecular Weight: 325,36

Procedure A was used for compound **4b** and 3-butyn-1-ol and the crude was purified on silica gel (dichloromethane/MeOH, 100/1 to 90/10, v/v) to give the title compound as an orange oil (952 mg, 98%). *Rf* = 0.3 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 7.38 – 7.11 (m, 7H), 6.19 (s, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.17 – 4.08 (m, 2H), 3.99 – 3.91 (m, 2H), 3.75 (q, J = 6.1 Hz, 2H), 2.61 (t, J = 6.1 Hz, 2H).

### I.174. 4-(1-(4-(5-(benzyloxy)-6-(1,3-dioxolan-2-yl)pyridin-2-yl)but-3-yn-1-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butan-1-ol - 223




**223**

Chemical Formula: $C_{25}H_{28}N_4O_4$
Exact Mass: 448,21
Molecular Weight: 448,52

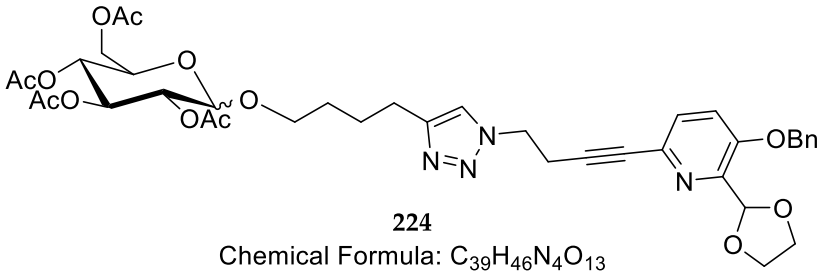
Procedure B was used to generate the mesylate of compound **215** that was used without further purification (orange oil, 1.14 g, 95%). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.50 – 7.27 (m, 6H), 7.22 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 5.15 (s, 2H), 4.41 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 4.24 – 4.17 (m, 2H), 4.07 – 4.00 (m, 2H), 3.10 (s, 3H), 2.90 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H).

The crude mesylate was dissolved in dry DMF (15 mL) and $NaN_3$ (660 mg, 3.5 equiv) was added. The mixture was heated at 60 °C overnight. The crude was diluted with EtOAc, washed with water, brine, dried over magnesium sulfate and evaporated to give the azide **222** as an orange oil that was used in the next step without purification (913 mg, 90%). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.48 – 7.30 (m, 6H), 7.17 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.26 (s, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.26 – 4.14 (m, 2H), 4.10 – 3.97 (m, 2H), 3.48 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.70 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H).

The crude azide (834 mg, 2.36 mmol, 1 equiv) and 5-hexyn-1-ol (535 µL, 4.72 mmol, 2 eq.) were dissolved in dry argon degazed mixture of DMF/triethylamine (7/40 ml, v/v, 0.05 mL) triethylamine (5 mL) and

DMF (30 mL). After 15 min of degazing, CuI (452 mg, 2.72 mmol, 1 equiv) was added. The mixture was stirred at rt overnight. The crude mixture was diluted in EtOAc, washed with water and brine. The organic layer was dried over magnesium sulfate and evaporated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH, 98/2 to 95/5, v/v) to give the title compound **223** as a brown oil (752 mg, 93%). *Rf* = 0.33 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.64 (s, 1H), 7.55 – 7.42 (m, 6H), 7.40 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.22 (s, 2H), 4.64 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 4.35 – 4.19 (m, 2H), 4.19 – 4.00 (m, 2H), 3.08 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.02 (br s, 1H), 2.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.92 – 1.79 (m, 2H), 1.76 – 1.63 (m, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 152.90, 147.92, 146.53, 135.54, 133.85, 128.62, 128.47, 128.29, 127.39, 121.44, 120.04, 100.89, 84.05, 82.52, 70.49, 65.74, 48.45, 32.00, 31.66, 25.50, 25.16, 24.63, 21.49. MS (ESI+): *m/z* = 449 $[M+H]^+$.

## I.175. Molecule 224

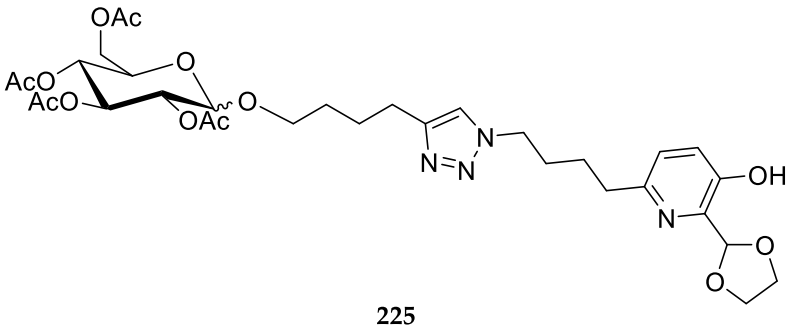



**224**
Chemical Formula: $C_{39}H_{46}N_4O_{13}$
Exact Mass: 778,31
Molecular Weight: 778,81

Compound **223** (752 mg, 1.67 mmol, 1.0 equiv) and 205 (1.1 g, 2.67 mmol, 1.6 equiv) were dissolved in dry toluene (40 mL, 0.05 M). $Ag_2CO_3$ (918 mg, 3.34 mmol, 2 eq.) was added and the mixture was stirred at 90°C for 4 h. Salts were filtered over celite®, washed with acetone, the filtrate was evaporated. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 98/2, v/v) to give the title compound (α/β, 1/1) as a yellow oil (795 mg, 61%). *Rf* = 0.4 (dichloromethane/MeOH, 98/2, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.50 – 7.26 (m, 7H), 7.18 (dd, *J* = 8.6, 3.2 Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 5.69 (d, *J* = 5.4 Hz, 0.5H, Hα), 5.60 – 5.41 (m, 0.5H), 5.23 – 5.14 (m, 1H), 5.12 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 5.10 – 5.01 (m, 1H), 4.92 (ddd, *J* = 14.9, 11.4, 5.4 Hz, 1.5H), 4.55 (dd, *J* = 7.4, 6.3 Hz, 2H), 4.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 0.5H, Hβ), 4.36 – 4.22 (m, 2H), 4.22 – 4.04 (m, 4H), 4.04 – 3.98 (m, 2H), 3.91 (ddd, *J* = 12.4, 9.5, 4.9 Hz, 1H), 3.79 – 3.60 (m, 1H), 2.98 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.71 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.17- 1.98 (m, 12H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.85, 170.41, 170.26, 170.22, 169.80, 169.76, 169.51, 169.37, 153.09, 147.92, 146.94, 135.75, 134.14, 128.86, 128.55, 128.52, 127.59, 121.46, 121.33, 120.12, 101.12, 100.96 (Cβ), 97.04 (Cα), 90.30, 84.04, 82.72, 73.24, 72.99, 71.90, 71.46, 71.23, 70.72, 70.29, 70.04, 69.93, 68.64, 68.36, 67.36, 67.11, 65.96, 63.37, 63.24, 62.09, 53.56, 48.66, 29.24, 28.86, 26.13, 25.78, 25.39, 25.24, 21.74, 20.96, 20.93, 20.89, 20.82, 20.73. MS

(ESI+): *m/z* = 779 $[M+H]^+$. N.B.: complexity and overlaping of NMR signals made assignation difficult, only anomeric signals were precised.

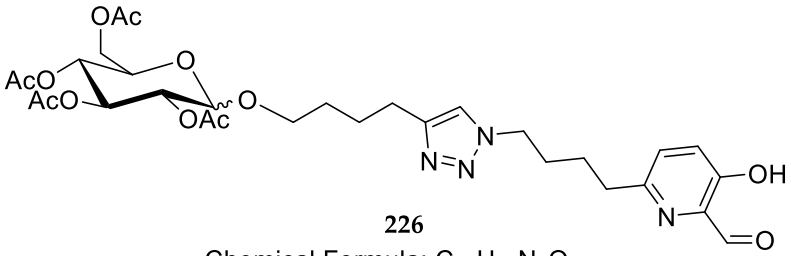
## I.176. Molecule 225




**225**
Chemical Formula: $C_{32}H_{44}N_4O_{13}$
Exact Mass: 692,29
Molecular Weight: 692,72

Compound **224** (795 mg, 1.02 mmol, 1.0 equiv) was drissolved in dry methanol (100 mL). After 15 min of Argon degazing, palladium on charcoal (318 mg, 20% w/w) was added and a balloon of hydrogene gas was bubled in the mixture. The reaction mixture was stirred during 2 h under hydrogene gas atmosphere (1 atm) at rt. Filtration on celite® pad, eveaporation, normal phase purification (silica gel, dichloromethane/MeOH, 100/0 to 95/5, v/v) followed by SFC purification (method F) gave the title compound as a brown oil (428 mg, 61%, $\alpha/\beta$, 57/43). *Rf* = 0.35 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v). MS (ESI+): *m/z* = 693 $[M+H]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.24 (s, 1H), 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.86 (s, 1H), 5.69 (d, *J* = 5.2 Hz, 0.4H, H$\alpha$), 5.32 – 4.82 (m, 3H), 4.48 (d, *J* = 7.9 Hz, 0.6H, H$\beta$), 4.41 – 4.00 (m, 9H), 4.00 – 3.76 (m, 1H), 3.76 – 3.57 (m, 1H), 3.57 – 3.40 (m, 2H), 2.81 – 2.59 (m, 4H), 2.12 – 1.97 (m, 12H), 1.95 – 1.81 (m, 2H), 1.81 – 1.50 (m, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.40, 169.98, 169.39, 169.14, 169.08, 168.95, 152.01, 150.50, 147.44, 137.54, 125.43, 124.16, 121.04, 120.30, 105.52, 100.55 (C$\beta$), 96.61 (C$\alpha$), 72.81, 72.56, 71.48, 71.04, 69.86, 69.54, 68.19, 67.93, 66.69, 64.84, 62.96, 62.81, 61.70, 49.64, 36.09, 29.49, 28.86, 28.52, 26.49, 25.72, 25.39, 25.00, 24.88, 20.51, 20.47, 20.45, 20.36, 20.32. N.B.: complexity and overlaping of NMR signals made assignation difficult, only anomeric signals were precised. HPLC (Method C) = 21.27 min (purity: 96%).

## I.177. Molecule 226

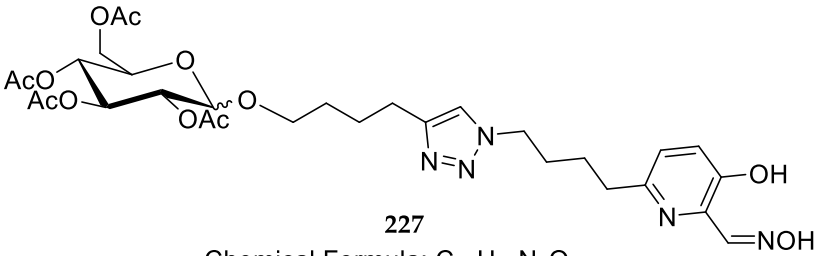


**226**

Chemical Formula: $C_{30}H_{40}N_4O_{12}$
Exact Mass: 648,26
Molecular Weight: 648,67

Compound **225** (360 mg, 0.52 mmol, 1 equiv) was dissolved at 0 °C in water (2.6 mL) and formic acid was added (2.6 mL). The reaction was stirred 15 h at rt. The reaction was quenched by saturated aqueous solution of NaHCO3 and the mixture was extracted by dichloromethane. The organic layer was dried on magnesium sulfate concentrated and purified using flash chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 93/7) to give the desired compound as a yellow oil (217 mg, 64 %, α/β : 51/49). *Rf* = 0.44 (dichloromethane/MeOH, 95/5). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.51 (s, 1H), 9.89 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.19 (s, 2H), 5.38 (d, *J* = 3.5 Hz, 0.5H, Hα), 5.18 – 5.03 (m, 1H), 5.03 – 4.70 (m, 2H), 4.41 (d, *J* = 7.9 Hz, 0.5H, Hβ), 4.33 – 4.21 (m, 3H), 4.21 – 4.10 (m, 3H), 4.10 – 3.88 (m, 2H), 3.87 – 3.71 (m, 1H), 3.70 – 3.55 (m, 1H), 3.48 – 3.33 (m, 1H), 2.72 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.61 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.05 – 1.76 (m, 14H), 1.76 – 1.44 (m, 6H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 198.47, 198.44, 171.06, 170.82, 170.65, 170.57, 170.53, 170.09, 170.07, 170.01, 169.91, 169.57, 169.46, 169.38, 169.34, 169.26, 169.14, 161.05, 156.90, 153.69, 153.66, 147.60, 147.46, 147.34, 135.57, 129.71, 126.48, 120.68, 120.64, 100.66 (Cβ), 95.13 (Cα), 91.31, 89.75, 72.86, 72.82, 72.69, 72.61, 71.68, 71.59, 71.22, 70.03, 69.65, 69.45, 69.11, 68.58, 68.42, 68.35, 67.72, 66.67, 63.98, 63.43, 61.96, 61.86, 61.62, 53.45, 49.78, 36.11, 29.56, 29.51, 28.61, 27.99, 27.86, 26.13, 25.68, 25.57, 25.51, 24.99, 24.90, 20.82, 20.67, 20.58, 20.50, 20.44. MS (ESI+): *m/z* = 649 $[M+H]^+$. N.B.: complexity and overlaping of NMR signals made assignation difficult, only anomeric signals were precised.

## I.178. Molecule 227



**227**

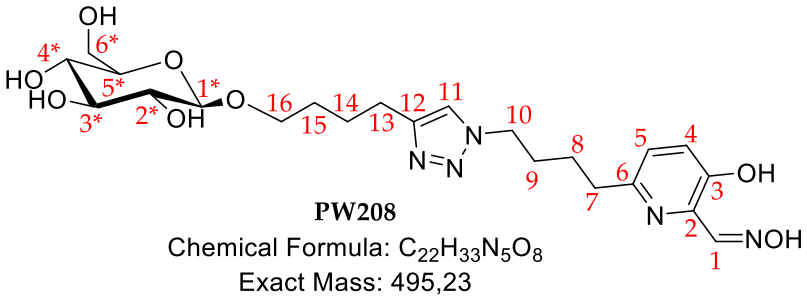
Chemical Formula: $C_{30}H_{41}N_5O_{12}$

Exact Mass: 663,28

Molecular Weight: 663,68

Procedure G was used on compound **226** (217.2 mg, 0.335 mmol, 1 equiv). Normal phase purification (dichloromethane/MeOH, 98/2 to 95/5, v/v) gave the title compound as a yellow oil (103 mg, 47%, $\alpha/\beta$ : 51/49). *Rf* = 0.30 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v) $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.17 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.60 (d, *J* = 2.5 Hz, 0.5H, Hα), 5.54 -5.49 (m, 1H), 5.02 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H), 4.92 (dd, *J* = 9.5, 8.0 Hz, 1H), 4.45 (d, *J* = 7.9 Hz, 0.5H, Hβ), 4.30 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.21 (dd, *J* = 12.3, 4.7 Hz, 1H), 4.15 – 3.96 (m, 2H), 3.91 – 3.76 (m, 1H), 3.76 – 3.56 (m, 1H), 3.46 (dt, *J* = 9.3, 6.2 Hz, 1H), 2.82 – 2.58 (m, 4H), 2.11 – 1.49 (m, 20H).

## I.179. PW208



**PW208**

Chemical Formula: $C_{22}H_{33}N_5O_8$

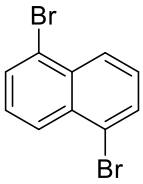
Exact Mass: 495,23

Molecular Weight: 495,53

Compound **227** (100 mg, 0.152 mmol, 1 equiv) was dissolved in dry methanol (2 mL) and NaOMe (10 mg, 0.152, 1 equiv) was added. The reaction was stirred 10 h at rt, then Amberlist 120 H+ (100 mg) was added. After 30 min, the mixture was filtrated and evaporated. The crude was purified using preparative reverse phase chromatography (method E) to give the title compound as a yellow oil (26 mg, 35%, $\alpha/\beta$ : 0/100). $[\alpha]^{20}{}_D$ = - 11.12° (*c* = 8.45 mg/mL) MeOH MS (ESI+): *m/z* (%) = 496 (100) $[M+H]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 8.28 (s, 1H, H1), 7.73 (s, 1H, H11), 7.28 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H4), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H3), 4.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H10), 4.26 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H1*), 4.00 – 3.84 (m, 2H, H16+H6*), 3.72 – 3.53 (m, 2H, H16 + H6*), 3.40 – 3.26 (m, 6H, H3* + H4*+ H5* + MeOD ), 3.26 – 3.13 (m, 1H, H2*), 2.88 – 2.58 (m, 4H, H7+H13), 1.93 (dt, *J* = 14.8, 7.4 Hz, 2H, H9), 1.86 – 1.53 (m, 6H, H8 + H14 + H15). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 153.95 (C3 or C6), 153.85 (C3 or C6), 152.88 (C1), 149.09 (C12 or C2), 136.39 (C2 or C2), 126.04 (C13), 125.35 (C5), 123.20 (C11), 104.37 (C1*), 78.11 (C3* or C5*), 77.91

(C3* or C5*), 75.13(C2*), 71.66(C4*), 70.30 (C6* or C16), 62.76 (C6* or C16), 50.97 (C10), 36.95 (C7), 30.71 (C9), 30.07(C14 or C8 or C15), 27.88(C14 or C8 or C15), 27.00 (C14 or C8 or C15), 25.90 (C13). HRMS: on going.

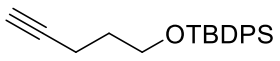
### I.180. 1,5-dibromonaphthalene - 232




**232**
Chemical Formula: $C_{10}H_6Br_2$
Exact Mass: 283,88
Molecular Weight: 285,97

The compound **232** was prepared by following a procedure reported in the literature.[537] 1,5-diaminonaphthalene (20 g, 12.6 mmol, 1 equiv) was suspended in distilled water (500 mL) and concentrated sulfuric acid (33 mL) was added dropwise to the suspension at 0 °C. Then, sodium nitrate(III) (21.8 g, 31.6 mmol, 2.5 equiv.) in distillated water (300 mL) was added drowise (temperature must not rise above 5 °C). The mixture was stired during 1.5 h. Then, solution of CuBr (50 g, 34.9 mmol, 2.8 equiv) in hydrobromic acid (40 mL) was added dropwise (5 min) at 0°C. The mixture was stirred 30 min at 0 °C, 30 min at rt and 1 h at 70 °C. Dark precipitate was filtered off, washed with distilled water, dried and purified by flash chromatography on silica gel (cyclohexane, 100%) to give the title compound as a white solid (2.89 g, 80%). Mp = 129 °C. *Rf* = 0.4 (cyclohexane). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 8.25 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.45 (dd, *J* = 8.3, 7.5 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_2Cl_2$) δ (ppm) 133.56, 131.53, 128.06, 127.79, 123.45.

### I.181. tert-butyl(pent-4-yn-1-yloxy)diphenylsilane - 233

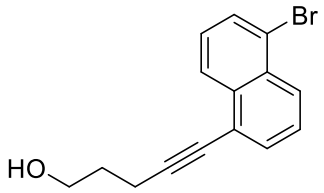



**233**
Chemical Formula: $C_{21}H_{26}OSi$
Exact Mass: 322,18
Molecular Weight: 322,52

4-pentyn-1-ol ( 3 mL, 31 mmol, 1 equiv) and imidazole (3.16 g, 46.5 mmol, 1.5 equiv) were dissolved in dry THF. TBDPSCl (10.3 mL, 39 mmol, 1.25 equiv) was added and the reaction mixture was stirred overnight. Concentration until dryness and purification on silica gel (Petroleum ether/$Et_2O$, 100/0 to 95/5) gave the title compound as a colorless oil (10 g, quant.). *Rf* = 0.67 (Petroleum ether/$Et_2O$, 95/5, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.67 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 4H), 7.50 – 7.30 (m, 6H), 3.75 (t, *J* = 6.0 Hz,

2H), 2.35 (td, *J* = 7.2, 2.6 Hz, 2H), 1.92 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.85 – 1.67 (m, 2H), 1.05 (s, 9H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 135.5, 133.8, 129.6, 127.6, 84.2, 68.3, 62.2, 31.4, 26.8, 19.2, 14.9.

### I.182. 5-(5-bromonaphthalen-1-yl)pent-4-yn-1-ol - 234

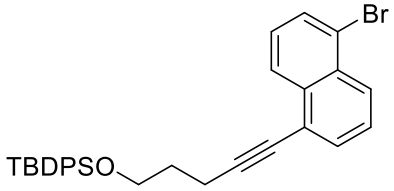



**234**

Chemical Formula: $C_{15}H_{13}BrO$
Exact Mass: 288,01
Molecular Weight: 289,17

Procedure A was applied to compound **232** and 4-pentyn-1-ol. Purification by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 50/50 to 20/80, v/v) gave the title compound as a yellow oil (1.08 g, 98%). *Rf* = 0.2 (Petroleum ether/EtOAc, 60/40, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.31 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.78 (dd, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H), 7.65 (dd, *J* = 7.2, 0.9 Hz, 1H), 7.47 (dd, *J* = 8.5, 7.2 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 8.4, 7.5 Hz, 1H), 3.87 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.68 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.27 (s, 1H), 2.02 – 1.85 (m, 2H).

### I.183. ((5-(5-bromonaphthalen-1-yl)pent-4-yn-1-yl)oxy)(tert-butyl)diphenylsilane - 235




**235**

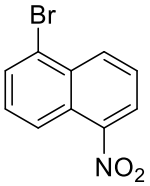
Chemical Formula: $C_{31}H_{31}BrOSi$
Exact Mass: 526,13
Molecular Weight: 527,58

From compound **234** : same procedure as for compound **223** (1.98 g, quant.)

From compound **233** and **232** : same procedure as for compound **234** (2.5 g, 95%).

*Rf* = 0.6 (Petroleum ether/EtOAc, 60/40, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.42 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.06 – 7.92 (m, 6H), 7.84 (dd, *J* = 7.2, 0.9 Hz, 1H), 7.62 – 7.56 (m, 6H), 7.47 (dd, *J* = 8.4, 7.5 Hz, 1H), 4.17 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.00 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.31 – 2.14 (m, 2H), 1.39 (s, *J* = 6.5 Hz, 9H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 135.66, 133.89, 131.88, 130.97, 130.45, 129.73, 127.80, 127.11, 126.74, 126.67, 126.51, 125.90, 123.23, 122.44, 95.70, 78.65, 62.55, 31.79, 27.03, 19.40, 16.40.

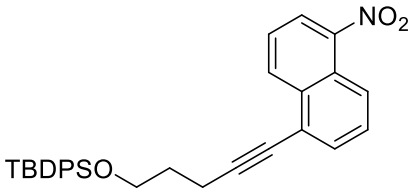
### I.184. 1-bromo-5-nitronaphthalene - 238




**238**
Chemical Formula: $C_{10}H_6BrNO_2$
Exact Mass: 250,96
Molecular Weight: 252,07

1-nitronaphtalene (1.78 g, 10 mmol, 1 equiv) and iron powder (20 mg, 0.6 mmol, 0.06 equiv) were heat up to 90°C and bromine (500 µL, 9.5 mmol, 0.95 equiv) was added over a 30 min period (100 µL dropwise every 6 min). After 2 h at 90 °C (gas evolution ceased), ethanol was added the mixture was cooled down to rt. Filtration of the crude crystal and subsequent recrystallysation in acetone gave the title compound as yellow needles (1.89 g, 75%) mp = 122 °C. *Rf* = 0.5 (Petroleum ether/Et2O, 95/5, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.61 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.47 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.23 (dd, *J* = 7.6, 1.0 Hz, 1H), 7.94 (dd, *J* = 7.5, 0.7 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 8.5, 7.7 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 8.7, 7.6 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 133.66, 132.84, 131.81, 129.55, 126.52, 125.65, 124.49, 123.66, 123.01.

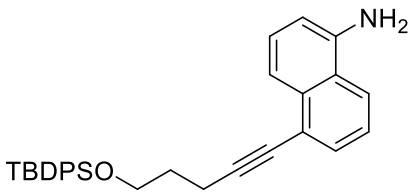
### I.185. tert-butyl((5-(5-nitronaphthalen-1-yl)pent-4-yn-1-yl)oxy)diphenylsilane - 239




**239**
Chemical Formula: $C_{31}H_{31}NO_3Si$
Exact Mass: 493,21
Molecular Weight: 493,68

Procedure A was applied to compound **238** and **233**. Purification by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/$Et_2O$, 100/0 to 95/5, v/v) gave the title compound as a yellow solid (558 mg, 95%). *Rf* = 0.63 (Petroleum ether/EtOAc, 80/20, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.62 (dt, *J* = 8.6, 1.0 Hz, 1H), 8.48 (dt, *J* = 8.8, 0.9 Hz, 1H), 8.24 (dd, *J* = 7.6, 1.1 Hz, 1H), 7.94 (dd, *J* = 7.5, 0.9 Hz, 1H), 7.80 – 7.61 (m, 5H), 7.55 (dd, *J* = 8.8, 7.5 Hz, 1H), 7.47 – 7.32 (m, 6H), 3.73 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.42 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.83 – 1.70 (m, 2H), 1.22 (d, *J* = 21.3 Hz, 9H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 135.63, 133.80, 133.39, 132.60, 131.63, 129.69, 129.37, 127.76, 127.72, 126.30, 125.49, 124.33, 123.49, 122.85, 65.75, 62.28, 31.39, 26.93, 19.30, 15.87.

### I.186. 5-(5-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)pent-1-yn-1-yl)naphthalen-1-amine - 240

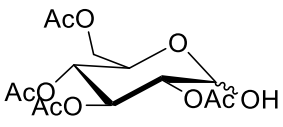



**240**

Chemical Formula: $C_{31}H_{33}NOSi$
Exact Mass: 463,23
Molecular Weight: 463,70

Iron powder (224 mg, 4 mmol, 5 equiv) was suspended in EtOH (32 mL) and HCl (37%, 34 µL, 0.4 mmol, 0.5 equiv) and heated at 65 °C during 30 min. The mixture was cooled down to 55 °C during 10 min and NH4Cl (25%w/w, 3.0 mmol, 3.8 equiv) and compound **239** (396 mg, 0.8 mmol, 1 equiv) were added dropwise while maintaining the internal temperature to 60 °C. The mixture was stired at this temperature during 90 min. Then, the mixture was cooled down to 40 °C and celite® was added. The crude mixture was filtrate on a pad of celite® and washed with dichloromethane. The filtrate was extracted with dichloromethane, dried on sodium sulfate and evaporate to give the title product as a light-yellow solid that was used without further purification (282 mg, 76%). *Rf* =0.29 (Petroleum ether/EtOAc, 80/20, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.97 – 7.87 (m, 4H), 7.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.58 – 7.41 (m, 8H), 6.87 (dd, *J* = 7.4, 0.7 Hz, 1H), 4.19 (s, 2H), 4.09 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.92 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.14 (p, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.30 (s, 9H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 162.07, 142.73, 135.05, 134.00, 133.33, 129.59, 129.17, 127.26, 126.67, 123.29, 122.95, 121.40, 120.86, 116.01, 109.47, 94.10, 78.97, 62.01, 35.93, 31.32, 30.85, 26.42, 18.82, 15.77. MS (ESI+): *m*/*z* = 464 $[M+H]^+$.

### I.187. Compound 243

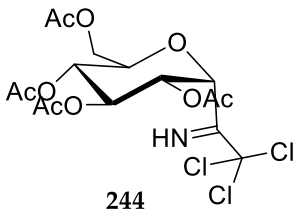



**243**

Compound **243** was prepared by following a procedure reported in literature.[538] A solution of β-D-glucose pentaaacetate (5 g, 12.81 mmol) and DMAPA (8.1 mL, 64.05 mmol, 5 equiv) in non-anhydrous THF (50 mL) was stirred at room temperature during 30 min. The reaction mixture was diluted in DCM and washed with aqueous HCl solution (1 M) and with brine. The organic layer was dried with sodium sulfate, filtered and evaporated to dryness giving the title product as a colorless oil (4 g, 90%, α/β 2.2:1). *Rf*: 0.43 (Petroleum ether/EtOAc, 1/1, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 5.44 (t, J = 9.9 Hz, 1H),

5.35 (t, J = 3.5 Hz, 1H, Hα), 5.14 (t, J = 9.8 Hz, 1H), 4.99 (t, J = 9.9 Hz, 2H), 4.93 (d, J = 8.2 Hz, 1H) 4.79 (dd, J = 10.1, 3.5 Hz, 2H), 4.20-4.14 (m, 2H), 4.07 (m, 2H), 3.66 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.00, 2.00, 1.95, 1.93 (s, 24H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δC 171.0, 170.9, 170.3, 170.3, 170.3, 169.8, 169.6, 95.2 (Cβ), 89.9 (Cα), 71.2, 72.9, 72.5, 71.8, 69.9, 68.5, 68.4, 67.9, 66.9, 62.0, 25.49, 20.7, 20.6, 20.6, 20.6, 20.5.

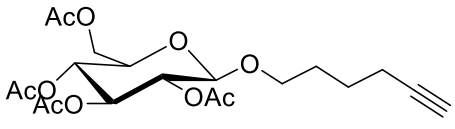
## I.188. Compound 244




**244**

Compound **244** was prepared by following a procedure reported in literature.[538] A solution of compound **243** (4 g, 11.53 mmol, 1 equiv) was dissolved in dichloromethane. Trichloroacetonitrile (12 mL, 115 mmol, 10 equiv.) and DBU (1.8 mL, 11.53 mmol, 1 equiv) were added and the reaction was stirred under an argon atmosphere for 45 min. The reaction mixture was diluted in dichloromethane and the organic phase was washed with aqueous hydrochloric acid (1 M), then with a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate. The combined organic phases were dried over sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (Petroleum ether/EtOAc 1:1) to give the title compound as a yellow oil. (5.1 g, 90%). *Rf* = 0.50 (EtOAc/EtOAc 1:1). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δH 8.68 (s, 1H, NH), 6.51 (d, J = 3.7 Hz, 1H, Hα), 5.51 (t, J = 9.9 Hz, 1H), 5.13 (t, J = 9.9 Hz, 1H), 5.09 (dd, J = 10.3, 3.7 Hz, 1H), 4.24 (dd, J = 12.0, 3.8 Hz, Hα), 4.19-4.15 (m, 1H) 4.09 (dd, J = 12.0, 1.8 Hz, 1H), 2.02, 2.00, 1.98, 1.97 (s, 12H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δC 170.5, 170.0, 169.8, 169.5, 160.7, 92.9 (Cα), 90.7, 70.0, 69.8, 69.7, 67.7, 61.4, 20.7, 20.6, 20.5.

## I.189. Compound 245

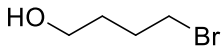



**245**

Already published procedure was used for this compound.[575] Compound **244** (1.66 g, 3.37 mmol, 1.0 equiv) and 5-hexyn-1-ol (420 µL, 3.70 mmol, 1.1 equiv) were dissolved in dry dichloromethane (22 mL) containing activated molecular sieve (4 Å). $BF_3.OEt_2$ (43 µL, 0.337 mmol, 0.1 equiv) was added at 0 °C and the reaction mixture was stirred 2.5 h at rt. The reaction was quenched by water (5 mL) and extracted with dichloromethane. Organic layers were combined, washed with aqueous $NaHCO_3$, water

and brine. After drying on sodium sulfate, the crude was concentrated to dryness. Purification by flash chromatography on silice gel (Petroleum ether/EtOAc, 70/30, v/v) gave the title compound as a colorless oil (791 mg, 57%). *Rf* = 0.18 (Petroleum ether/EtOAc, 7/3, v/v). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 5.20 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.07 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H), 4.97 (dd, *J* = 9.5, 8.0 Hz, 1H), 4.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Hβ), 4.27 (dd, *J* = 12.3, 4.7 Hz, 1H), 4.22 – 4.06 (m, 1H), 3.90 (dt, *J* = 9.8, 5.9 Hz, 1H), 3.71 (ddd, *J* = 9.9, 4.7, 2.5 Hz, 1H), 3.65 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 3.52 (dt, *J* = 9.8, 6.3 Hz, 1H), 2.31 – 2.12 (m, 2H), 2.12 – 2.06 (m, 2H), 2.04 (s, *J* = 2.1 Hz, 4H), 2.02 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.98 – 1.94 (m, 2H), 1.75 – 1.50 (m, 2H). NMR data are in accordance with those reported in literature.[575]

### I.190. 4-bromobutan-1-ol - 257

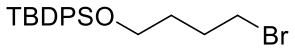



**257**

Chemical Formula: $C_4H_9BrO$
Exact Mass: 151,98
Molecular Weight: 153,02

The product was prepared following literature procedure[550] (yield: 22%, litt.: 30 %). $^{1}$H NMR (300 MHz, CDCl3) δ (ppm) 3.72 (t, J = 6.4 Hz, 2H, $H_5$), 3.45 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.03 – 1.91 (m, 2H), 1.81 – 1.67 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 61.8, 33.6, 30.9, 29.1. NMR data are in accordance with those reported in literature.[576]

### I.191. (4-bromobutoxy)(tert-butyl)diphenylsilane

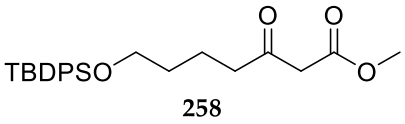



**258**

Chemical Formula: $C_{20}H_{27}BrOSi$
Exact Mass: 390,10
Molecular Weight: 391,42

4-bromobutanol (2 g, 13 mmol, 1 equiv.) is added in dry DMF (2 g/mL). TBDPS-Cl (4.1 mL, 15.6 mmol, 1.2 equiv.) was added dropwise in the mixture then imidazole (2.21 mg, 32.5 mmol, 2.5equiv.) was added. The reaction was stirred at room temperature overnight. Water was added, and aqueous phase was extracted with $Et_2O$. HCl (10%) was added is the organic phase and then was neutralized with $NaHCO_3$, dried over magnesium sulfate and concentrated to obtain a colorless oil (yield = 57%). $^{1}$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.72 – 7.59 (m, 4H), 7.50 – 7.32 (m, 6H), 3.69 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.42 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.04 – 1.92 (m, 2H), 1.70 (dt, *J* = 12.9, 6.3 Hz), 1.05 (s, 9H). NMR data are in accordance with those reported in literature.[577]

### I.192. Methyl 7-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)-3-oxoheptanoate - 258

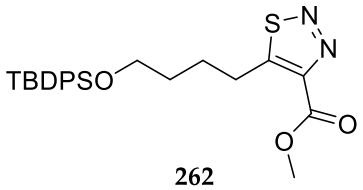



**258**

Chemical Formula: $C_{24}H_{32}O_4Si$
Exact Mass: 412,21
Molecular Weight: 412,60

The product was prepared following a reported procedure (yield = 45%).[551] ***Rf*** (Petroleum ether/EtOAc 9/1 v/v): 0.36. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.65 (dd, *J* = 7.7, 1.8 Hz, 4H), 7.46 – 7.33 (m, 6H), 3.73 (s, 3H, $H_7$), 3.65 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.43 (s, 2H), 2.51 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.64 – 1.47 (m, 9H), 1.45 – 1.17 (m, 6H), 1.04 (s, 9H). $^{13}$C NMR (75 MHz, CDCl3) δ (ppm) 207.09, 202.80, 167.81, 135.70-134.18-129.68-127.74, 77.16, 63.76, 52.46, 49.15, 43.18, 32.39, 31.06, 27.01, 25.39, 23.35, 19.35.

### I.193. Methyl 5-(4-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)butyl)-1,2,3-thiadiazole-4-carboxylate - 262

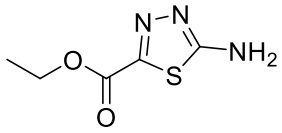



**262**

Chemical Formula: $C_{24}H_{30}N_2O_3SSi$
Exact Mass: 454,17
Molecular Weight: 454,66

Compound **258** (50 mg, 0.117 mmol, 1 equiv.) was dissolved in methanol (2.6 M) and added rapidly to a solution of semicarbazide hydrochloride (87.8 mg, 1.17 mmol, 10 equiv.) in water (2 M). Pyridine (18.9 µL, 0.234 mmol, 2 equiv.) was added and the reaction mixture was heated to reflux for 5 minutes, the reaction mixture is cooled to -20 °C overnight. After concentration, then extraction with dichloromethane, organic phase was washed with water and brine and concentrated under reduced pressure to obtain the intermediate product as a semicarbazone. A solution of this semicarbazone (35 g, 7,2.10$^{-2}$ mmol, 1 equiv.) in neat thionyl chloride (36 µL, 0.5 mmol; 7 equiv.) was stirred at 0 °C for 1 h. Dichloromethane was then added, the excess of thionyl chloride was quenched slowly with $NaHCO_3$ sat., the aqueous phase was extracted with dichloromethane. Combined organic extracts were dried over magnesium sulfate dry, filtered and concentrated under reduced pressure. Flash chromatography on silica gel (EP/Et2O 8/2, v/v) afforded the desired product as a brownish oil. 1H NMR (300 MHz, CDCl3) δ (ppm) 7.69 (ddd, J = 18.3, 7.4, 1.8 Hz, 4H), 7.46 – 7.32 (m, 6H), 3.73 (s, 3H, H9), 3.65 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 2.51 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 1.65 – 1.47 (m, 1H), 1.44 – 1.16 (m, 1H), 1.10 – 0.99 (m, 1H). 13C NMR (75 MHz, CDCl3) δ (ppm) 202.82, 167.82, 135.71, 134.94, 134.19, 129.68, 127.87, 127.75, 77.16, 63.78, 52.47, 49.16, 43.19, 32.39, 29.85, 27.02, 26.70, 25.40, 23.36, 19.36, 1.16.

### I.194. Ethyl 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-carboxylate - 266

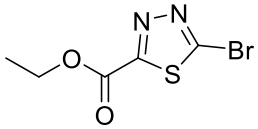


**266**

Chemical Formula: $C_5H_7N_3O_2S$
Exact Mass: 173,03
Molecular Weight: 173,19

of the compound **266** was prepared by following a reported procedure.[578] To a solution of hydrazinecarbothiamide (10g, 54.8 mmol, 1 equiv) in $POCl_3$ (25 mL) was added ethyl 2-chloro-2-oxoacetate (6.1 mL, 54.8 mmol, 1 equiv.) The reaction mixture was heated at 70 °C overnight. Volatils were removed under vaccum and the residue was diluted with ice cooled water and basified to pH = 8 with aqueous saturated $Na_2CO_3$. The mixture was extracted with EtOAc, and the combined organic layers were dried over magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure. Filtration over a pad of silica gel (dichloromethane/MeOH, 98/2, v/v) gave the title compound as an ocher solid (4.9 g, 52%). $^1$H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) 7.99 (s, 2H), 4.32 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, DMSO) δ (ppm) 172.32, 158.88, 120.87, 61.79, 39.52, 14.04. Elemental analysis: calculated, %N 24.26, %C 34.68; %H 4.07; %S 18.51; found %N 24.97, %C 33.06, %H 4.04, %S 19.22. MS (ESI+): *m*/*z* = 174 $[M+H]^+$.

### I.195. Ethyl 5-bromo-1,3,4-thiadiazole-2-carboxylate - 267

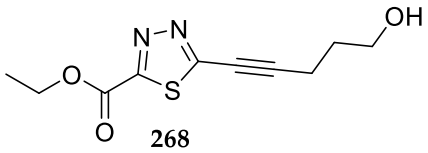


**267**

Chemical Formula: $C_5H_5BrN_2O_2S$
Exact Mass: 235,93
Molecular Weight: 237,07

Compound **266** (600 mg, 3.5 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in dry MeCN (10 mL). $CuBr_2$ (1.6 g, 7 mmol, 2.0 equiv was added and the mixture was stirred at rt during 30 min. Then, tBuONO (850 µL, 7 mmol, 2 equiv) was added and the reaction was heated at 70 °C. Volatils were removed and the residu was dissolved in water. The aqueous phase was extracted with dichloromethane. Organic phase was dried over sodium sulfate and concentrate. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 70/30, v/v) to give the title compound as an yellow solid (755 mg, 91%). $^1$H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm) 4.44 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). Elemental analysis: calculated, %N 11.82, %C 25.33; %H 2.13; %S 13.50; found %N 11.76, %C 24.90, %H 2.15, %S 13.22.

### I.196. Ethyl 5-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)-1,3,4-thiadiazole-2-carboxylate - 268

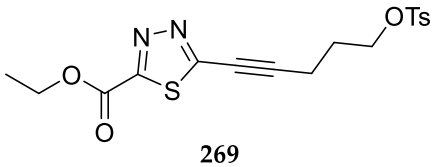


**268**

Chemical Formula: $C_{10}H_{12}N_2O_3S$
Exact Mass: 240,06
Molecular Weight: 240,28

Modified procedure A was applied to compound **267**: 4 h, 0.1 equiv of $Pd(PPh_3)_4$, 0.2 equiv of CuI and 0.8 equiv of 4-pentyn-1-ol. Purification on silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 80/20 to 0/100, v/v) gave the title product as a yellow oil (82 mg, 98%). *Rf* = 0.2 (Petroleum ether/EtOAc, 60/40, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 4.49 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.78 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.66 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.14 (br s, 1H), 1.97 – 1.82 (m, 2H), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 159.57, 158.27, 154.53, 103.91, 89.94, 63.61, 61.06, 30.44, 16.43, 14.21. MS (ESI+): *m/z* = 241 $[M+H]^+$.

### I.197. Ethyl 5-(5-(tosyloxy)pent-1-yn-1-yl)-1,3,4-thiadiazole-2-carboxylate - 269

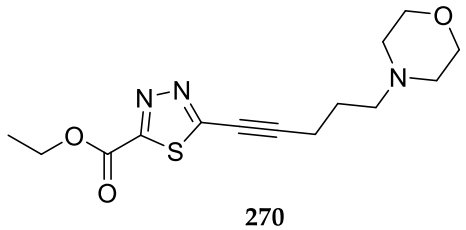


**269**

Chemical Formula: $C_{17}H_{18}N_2O_5S_2$
Exact Mass: 394,07
Molecular Weight: 394,46

Procedure C was applied to compound **268**. Purification by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/EtOAc, 60/40, v/v) gave the title compound as a yellow solid (63 mg, 36%). *Rf* = 0.29 (Petroleum ether/EtOAc, 60/40, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.77 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.30 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.49 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.15 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.61 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.11 – 1.85 (m, 2H), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 159.72, 158.18, 154.00, 145.14, 132.72, 130.05, 129.99, 127.97, 101.56, 70.90, 68.40, 63.63, 27.08, 21.70, 16.23, 14.20.

### I.198. Ethyl 5-(5-morpholinopent-1-yn-1-yl)-1,3,4-thiadiazole-2-carboxylate - 270



**270**

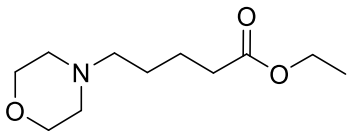
Chemical Formula: $C_{14}H_{19}N_3O_3S$
Exact Mass: 309,11
Molecular Weight: 309,38

Procedure D was followed using compound **269** and morpholine. Purification by flash chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 95/5, v/v) gave the compound **270** as a brown oil (13 mg, 20 %). *Rf* = 0.28 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 4.45 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.86 – 3.71 (m, 2H), 3.71 – 3.57 (m, 2H), 3.34 – 3.09 (m, 2H), 2.58 – 2.22 (m, 8H), 1.72 (dt, *J* = 15.2, 7.6 Hz, 2H), 1.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 172.12, 159.71, 154.91, 89.89, 66.92, 66.52, 62.77, 58.33, 53.85, 47.14, 29.76, 27.56, 24.82, 14.32. MS (ESI+): *m/z* = 310 $[M+H]^+$.

### I.199. Nucleophilic substitution on Ethyl bromovalerate

In a dry scelled flask, amine (1.0 equiv), ethyl bromovalerate (1.1 equiv) and potassium carbonate (1.1 equiv) were poored together and heated during 1 to 2h at 90°C. Salt were removed by filtration, evaporation a filtration on a pad of silica (dichloromethane, 100%) gave the desired substitution product.

#### I.199.1. Ethyl 5-morpholinopentanoate - 278

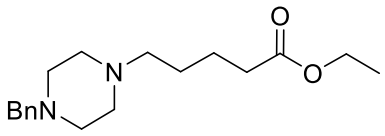


**278**

Chemical Formula: $C_{11}H_{21}NO_3$
Exact Mass: 215,15
Molecular Weight: 215,29

Orange oil (1.02 g, quant.). TLC- MS (ESI+): *m/z* = 216 $[M+H]^+$. *Rf* = 0.33 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v),. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 4.00 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.65 – 3.38 (m, 4H), 2.39 – 2.25 (m, 4H), 2.25 – 2.10 (m, 4H), 1.65 – 1.47 (m, 2H), 1.47 – 1.30 (m, 2H), 1.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 172.11, 66.04, 59.07, 57.69, 53.02, 33.10, 25.15, 21.98, 13.45.

### I.199.2. ethyl 5-(4-benzylpiperazin-1-yl)pentanoate - 279

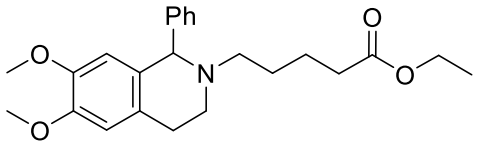


**279**

Chemical Formula: $C_{18}H_{28}N_2O_2$
Exact Mass: 304,22
Molecular Weight: 304,43

Orange oil (3.04 g, quant.). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 305 $[M+H]^+$. *Rf* = 0.35 (dichloromethane/MeOH, 95/5); . $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.47 – 7.21 (m, 5H), 4.15 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.54 (s, 2H), 2.72 – 2.21 (m, 12H), 1.78 – 1.42 (m, 4H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 173.71, 138.25, 129.35, 128.32, 127.15, 63.20, 60.36, 58.33, 53.34, 34.33, 26.46, 23.12, 14.39.

### I.199.3. ethyl 5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentanoate - 280



**280**

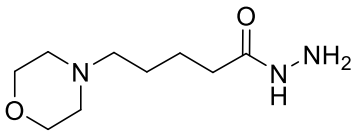
Chemical Formula: $C_{24}H_{31}NO_4$
Exact Mass: 397,23
Molecular Weight: 397,51

Orange oil (3.95 g, quant.). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 398 $[M+H]^+$. *Rf* = 0.34 (Petroleum ether/EtOAc, 70/30, v/v); $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.29 – 7.06 (m, 5H), 6.52 (s, 1H), 6.09 (s, 1H), 4.39 (s, 1H), 4.02 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.14 – 3.00 (m, 1H), 3.00 – 2.82 (m, 1H), 2.76 – 2.60 (m, 1H), 2.54 – 2.33 (m, 2H), 2.24 (dd, *J* = 12.2, 5.0 Hz, 1H), 2.11 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.57 – 1.33 (m, 4H), 1.15 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 173.76, 147.43, 147.07, 144.30, 130.29, 129.61, 128.15, 127.12, 126.99, 111.80, 110.88, 68.18, 60.18, 55.84, 55.82, 53.64, 46.89, 34.10, 28.33, 26.27, 22.69, 14.31.

## I.200. Acyl hydrazine generation

Ethyl-5-amine pentanoate was dissolved in methanol (3M) and hydrazine monohydrate (10 equiv.) was added. The mixture was heated at reflux for 1 hour. Concentration until dryness gave the acyl hydrazine without purification needed.

### I.200.1. 5-morpholinopentanehydrazide - 281

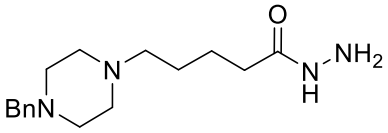


**281**

Chemical Formula: $C_9H_{19}N_3O_2$
Exact Mass: 201,15
Molecular Weight: 201,27

White sticky solid (905 mg, quant.). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 202 $[M+H]^+$. *Rf* = 0.29 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v); $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 3.54 (br s, 4H), 3.28 – 3.15 (m, 4H), 2.06 – 1.92 (m, 4H), 1.92 – 1.82 (m, 2H), 1.73 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.27 – 1.11 (m, 2H), 1.11 – 0.91 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 172.51, 65.73, 57.40, 52.61, 32.96, 24.92, 22.37.

### I.200.2. 5-(4-benzylpiperazin-1-yl)pentanehydrazide - 282

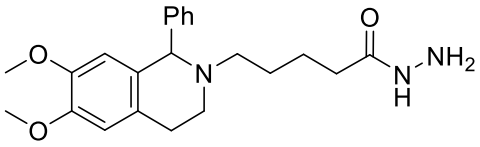


**282**

Chemical Formula: $C_{16}H_{26}N_4O$
Exact Mass: 290,21
Molecular Weight: 290,41

Colorless oil that solidified as a sticky white solid (2.09 g, quant.). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 291 $[M+H]^+$; *Rf* = 0.32 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v); $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.08 (s, 1H), 7.39 – 7.08 (m, 5H), 3.47 (br s, 5H), 2.44 (br s, 7H), 2.35 – 2.21 (m, 3H), 2.21 – 2.05 (m, 2H), 1.76 – 1.53 (m, 2H), 1.53 – 1.34 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 173.63, 137.93, 129.08, 128.07, 126.90, 62.92, 57.88, 53.09, 52.91, 34.07, 26.18, 23.34.

### I.200.3. 5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentanehydrazide - 283

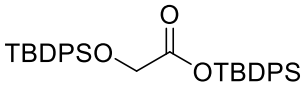



**283**

Chemical Formula: $C_{22}H_{29}N_3O_3$
Exact Mass: 383,22
Molecular Weight: 383,49

Sticky yellow oil (3.1 g, quant.). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 384 $[M+H]^+$; *Rf* = 0.18 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v); $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.40 – 7.19 (m, 5H), 6.70 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.17 (s, 1H), 4.46 (s, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.27 – 3.14 (m, 1H), 3.14 – 2.97 (m, 1H), 2.86 – 2.71 (m, 1H), 2.63 – 2.44 (m, 2H), 2.30 (dd, *J* = 16.2, 10.5 Hz, 1H), 1.99 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H), 1.67 – 1.39 (m, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 173.48, 147.03, 146.67, 143.96, 129.89, 129.28, 127.76, 126.78, 126.63, 111.47, 110.58, 67.92, 55.46, 55.44, 53.22, 46.57, 33.57, 27.97, 25.92, 22.84.

## I.201. tert-butyldiphenylsilyl 2-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)acetate - 286

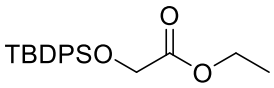



**286**

Chemical Formula: $C_{34}H_{40}O_3Si_2$
Exact Mass: 552,25
Molecular Weight: 552,86

Glycoic acid monohydrate (550 mg, 5.97 mmol, 1 equiv) and TBDPSCl (7.7 mL, 29.6 mmol, 5 equiv) were dissolved in pyridine (20mL). The mixture was stirred during 4 h and brine was added. The mixture was extracted with dichloromethane and the organic layers were washed with aqueous HCl (1 N) and brine. After drying over magnesium sulfate, volatils were removed under vaccum and the crude was purified by flash chromatography on silica gel ( Petroleum ether/EtOAc, 90/10, v/v) to give the title compound as a white solid (3.3 g, quant.). *Rf* = 0.33 (Petroleum ether/EtOAc, 90/10, v/v).$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.76 – 7.67 (m, 8H), 7.52 – 7.31 (m, 12H), 2.09 (s, 2H), 1.07 (s, 18H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 169.9, 135.4, 135.1, 132.7, 131.5, 129.9, 129.7, 127.7, 127.6, 62.8, 26.7, 26.5, 19.0.

### I.202. Ethyl 2-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)acetate - 287

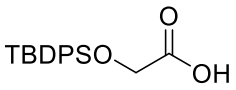



**287**

Chemical Formula: $C_{20}H_{26}O_3Si$
Exact Mass: 342,17
Molecular Weight: 342,51

Ethyl glycoate (5 mL, 50 mmol, 1 equiv), $Et_3N$ (22.1 mL, 150 mmol, 3 equiv), DMAP (640 mg, 5 mmol, 0.1 equiv) and TBDPSCl (14.3 mL, 55 mmol, 1.1 equiv) were dissolved in dry dichloromethane and the reaction was stirred overnight. The reaction mixture was washed with HCl (1N), water, saturated Na2CO3 solution and brine. Organic layer was dried over Sodium sulfate and concentrated. The crude mixture was purified by flash chromatography on silica gel (Petroleum ether/$Et_2O$, 97.5/2.5 to 90/10, v/v) to give the title compound as a sticky oil that crystillized upon standing (17.1 g, quant.). *Rf* = 0.38 (Petroleum ether/ $Et_2O$, 90/10, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.79 – 7.64 (m, 4H), 7.53 – 7.32 (m, 6H), 4.25 (s, 2H), 4.16 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.11 (s, 9H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 171.35, 135.74, 133.03, 130.00, 127.90, 62.43, 60.77, 26.81, 14.27.

### I.203. 2-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)acetic acid - 273




**273**

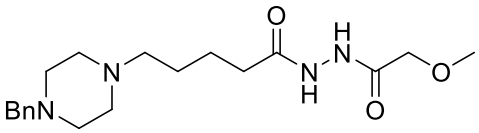
Chemical Formula: $C_{18}H_{22}O_3Si$
Exact Mass: 314,13
Molecular Weight: 314,46

Compound **286** (4.28 g, 7.8 mmol, 1 equiv) was dissolved in a mixture of methanol/THF (2/1, v/v, 7M) and potassium carbonate (3.3 g, 24 mmol, 3 equiv) in water (2.3 mL) was added. The reaction was stirred at rt for 2 h. The mixture was acidifiified at pH = 3 using aqueous HCL (1N) and was extracted with $Et_2O$. Organic layer was washed with brine and dried over magnesium sulfate. Concentration until dryness and subsequent filtration on silica gel pad (Petroleum ether/EtOAc/AcOH, 80/20/1, v/v/v) gave the title compound as a colorless oil (2.5 g, quant.). Caution = instable product, must be used immediately, crystallization is a signs of degradation. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 9.87 (s, 1H), 8.00 – 7.73 (m, 4H), 7.68 – 7.42 (m, 6H), 4.42 (s, 2H), 1.26 (s, 9H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 176.07, 135.57, 132.37, 130.18, 128.01, 61.90, 26.75, 19.28.

## I.204. Acyl hydrazine peptide coupling

Acyl hydrazine (1 equiv) and appropriated carboxylic acid (1.1 equiv) were dissolved in dry THF. EEDQ (1.3 equiv) was added and the reaction mixture was stirred at rt overnight. Quick basic work up (NaHCO3 sat.) to remove excess of acid and concentration of the organic phase until dryness followed by normal or reverse phase purification afforded the desired coupling product.

### I.204.1. 5-(4-benzylpiperazin-1-yl)-N'-(2-methoxyacetyl)pentanehydrazide - 288

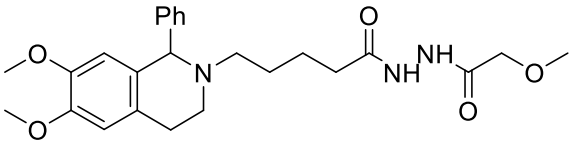


**288**

Chemical Formula: $C_{19}H_{30}N_4O_3$
Exact Mass: 362,23
Molecular Weight: 362,47

Purification: flash chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 85/15) gave a white solid (272 mg, 75%). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 363 $[M+H]^+$. *Rf* =0.25 (dichloromethane/MeOH, 90/10, v/v); .$^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.59 (br s, 2H), 7.46 – 7.15 (m, 5H), 4.06 (s, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.49 (s, 3H), 2.95 – 2.44 (m, 10H), 2.35 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.87 – 1.54 (m, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 171.20, 167.33, 137.50, 129.15, 128.16, 127.09, 71.12, 62.70, 59.35, 57.49, 52.71, 52.20, 49.95, 33.32, 25.30, 23.08.

### I.204.2. 5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)-N'-(2-methoxyacetyl)pentane hydrazide - 289

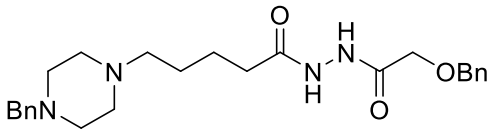


**289**

Chemical Formula: $C_{25}H_{33}N_3O_5$
Exact Mass: 455,24
Molecular Weight: 455,56

Purification: reverse phase (Method D). White solid (175 mg, 77%). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$ ,) δ (ppm) 7.60 – 7.44 (m, 4H), 7.44 – 7.28 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.37 (s, 1H), 5.78 (s, 1H), 4.04 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.62 (s, 4H), 3.45 (s, 4H), 3.36 (s, 2H), 3.24 (s, 4H), 2.35 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.95 (s, 1H), 1.81 – 1.61 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$) δ (ppm) 174.31, 171.63, 151.15, 150.11, 131.61, 131.33, 130.44, 112.63, 112.37, 72.11, 59.74, 56.48, 56.39, 33.54, 24.41, 23.13.. MS (ESI+): *m/z* = 456 $[M+H]^+$. HPLC (Method B): $t_R$ = 21.2 min.

### I.204.3. N'-(2-(benzyloxy)acetyl)-5-(4-benzylpiperazin-1-yl)pentanehydrazide - 294

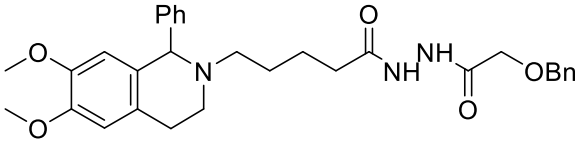


**294**

Chemical Formula: $C_{25}H_{34}N_4O_3$
Exact Mass: 438,26
Molecular Weight: 438,57

Purification: flash chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10). White solid (1.2 g, 83%). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 439 $[M+H]^+$. *Rf* = 0.25 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v); . $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.59 (br s, 2H), 7.46 – 7.15 (m, 10H), 4.06 (s, 4H), 3.55 (s, 2H), 3.49 (s, 3H), 2.95 – 2.44 (m, 10H), 2.35 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.87 – 1.54 (m, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 171.20, 167.33, 137.50, 129.15, 128.16, 127.09, 71.12, 62.70, 59.35, 57.49, 52.71, 52.20, 49.95, 33.32, 26.30.

### I.204.4. N'-(2-(benzyloxy)acetyl)-5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentane hydrazide - 295



**295**

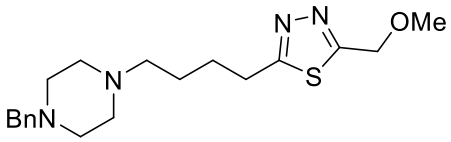
Chemical Formula: $C_{31}H_{37}N_3O_5$
Exact Mass: 531,27
Molecular Weight: 531,65

Purification: flash chromatography on silica gel (dichloromethane/MeOH, 100/0 to 90/10, v/v). Light yellow solid (475 mg, quant.). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 532 $[M+H]^+$, 555 $[M+Na]^+$. *Rf* = 0.44 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v); $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.90 (s, 2H), 7.46 – 7.14 (m, 9H), 6.61 (s, 1H), 6.17 (s, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.49 (s, 1H), 4.06 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.45 (s, 2H), 3.23 – 3.06 (m, 1H), 3.06 – 2.90 (m, 1H), 2.87 – 2.69 (m, 1H), 2.65 – 2.43 (m, 2H), 2.41 – 2.22 (m, 1H), 2.14 (dd, *J* = 14.2, 8.1 Hz, 2H), 1.70 – 1.43 (m, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.68, 166.64, 147.48, 147.10, 144.03, 136.50, 130.12, 129.78, 128.70, 128.37, 128.19, 128.12, 127.25, 126.91, 111.77, 110.85, 77.16, 73.80, 68.68, 68.21, 55.85, 55.83, 53.44, 46.82, 33.48, 28.27, 25.95, 23.08.

## I.205. Thiadiazole cyclization

In a scelled flask, acyl hydazide (1.0 equiv) and Lawesson reagent (2 equiv.) were dissolved in dry THF and the reaction mixture was heated at reflux overnight. The crude product was filtrated on celite® pad and the volatils were removed. Filtration on neutral alumina pad (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v) gave the desired 1,3,4- thiadiazole.

### I.205.1. 2-(4-(4-benzylpiperazin-1-yl)butyl)-5-(methoxymethyl)-1,3,4-thiadiazole – 290

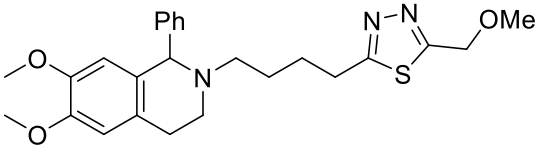



**290**

Chemical Formula: $C_{19}H_{28}N_4OS$
Exact Mass: 360,20
Molecular Weight: 360,52

Smelling yellow oil (96 mg, 35%). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 361 $[M+H]^+$, 383 $[M+Na]^+$. *Rf* = 0.92 (neutral alumina, dichloromethane/MeOH, 96/4, v/v); . $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.41 – 7.12 (m, 6H), 4.81 (s, 2H), 3.91 – 3.69 (m, 2H), 3.58 (s, 2H), 3.46 (s, 3H), 3.10 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.68 (s, 8H), 1.90 – 1.70 (m, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.67, 167.98, 136.51, 129.14, 128.17, 127.29, 68.63, 62.08, 58.74, 56.97, 52.14, 51.10, 29.40, 27.07, 24.53.

### I.205.2. 2-(4-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)butyl)-5-(methoxymethyl)-1,3,4-thiadiazole - 291

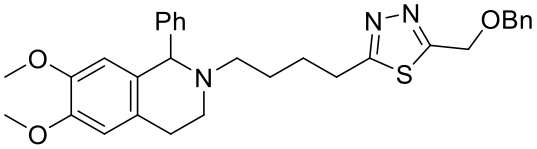



**291**

Chemical Formula: $C_{25}H_{31}N_3O_3S$
Exact Mass: 453,21
Molecular Weight: 453,60

Smelly orange oil (107 mg, 93%). MS (ESI+) *m/z* = 454 $[M+H]^+$, 476 $[M+Na]^+$. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.28 – 7.07 (m, 5H), 6.53 (s, 1H), 6.09 (s, 1H), 4.73 (s, 2H), 4.51 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 3.17 – 3.03 (m, 1H), 2.91 (dd, *J* = 14.6, 8.1 Hz, 2H), 2.75 (dd, *J* = 25.9, 9.8 Hz, 1H), 2.56 (dd, *J* = 22.0, 16.8 Hz, 2H), 2.42 – 2.25 (m, 1H), 1.75 – 1.43 (m, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 171.61, 168.07, 147.63, 147.21, 129.80, 128.28, 127.51, 126.50, 111.67, 110.82, 68.95, 68.03, 58.94, 55.84, 55.82, 53.21, 46.63, 29.72, 27.92, 27.46, 25.73.

### I.205.3. 2-((benzyloxy)methyl)-5-(4-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)butyl)-1,3,4-thiadiazole - 296

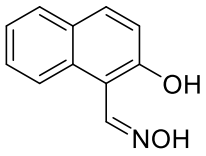



**296**

Chemical Formula: $C_{31}H_{35}N_3O_3S$
Exact Mass: 529,24
Molecular Weight: 529,70

Smelly brown oil (77 mg, 76%). TLC-MS (ESI+): *m/z* = 530 [M+H]+; *Rf* = 0.44 (dichloromethane/MeOH, 95/5, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 8.80 (s, 2H), 7.46 – 6.99 (m, 10H), 6.51 (s, 1H), 6.08 (s, 1H), 4.50 (s, 2H), 4.39 (s, 1H), 3.97 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 3.35 (s, 2H), 3.11 – 2.99 (m, 1H), 2.99 – 2.76 (m, 1H), 2.76 – 2.60 (m, 1H), 2.55 – 2.34 (m, 2H), 2.34 – 2.13 (m, 1H), 2.13 – 1.93 (m, 3H), 1.67 – 1.32 (m, 4H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 170.68, 166.64, 147.48, 147.10, 144.03, 136.50, 130.12, 129.78, 128.70, 128.37, 128.19, 128.12, 127.25, 126.91, 111.77, 110.85, 73.80, 68.68, 68.21, 55.85, 55.83, 53.44, 46.82, 33.48, 28.27, 25.95, 23.08.

## I.206. AB359 - 302




**302 - AB-359**

Chemical Formula: $C_{11}H_9NO_2$
Exact Mass: 187,06
Molecular Weight: 187,20

**AB359** was prepared following a reported procedure.[449] 2-hydroxynaphtaldehyde (500 mg, 2.91 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dry ethanol (10mL, 3 M). hydroxyl amine hydrochloride (250 mg, 3.5 mmol, 1.2 equiv.) was added and the mixture was heated at 70°C overnight. Concentration to dryness and purification by flash chromatography on silica gel gave the desired product as white needles (496 mg, 91%, litt. 82%). *Rf* = 0.28 (dichloromethane/MeOH, 99/1, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 10.82 (s, 1H), 9.15 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.84 – 7.74 (m, 2H), 7.53 (ddd, *J* = 8.5, 6.9, 1.4 Hz, 1H), 7.37 (ddd, *J* = 8.0, 6.9, 1.1 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 157.58, 150.06, 132.72, 132.0, 129.16, 18.49, 127.67, 123.71, 120.36, 118.96, 106.93. HRMS (ESI+): *m/z* calcd. for C11H9NO2 188.0712; found 188.0713. HPLC (Method B): $t_R$ = 18.85 min (purity: 97.2).

## II. Biochemistry

As our collaborators are using their own methodology for in vivo or in vitro evaluation, the procedures are presented for each collaborator.

### II.1. In vitro evaluations

#### II.1.1. PAMPA-BBB (Dr Pérez)

A parallel artificial membrane permeation assay for the BBB was used, following the method described by Di et al.[500] The in vitro permeability (Pe) of fourteen commercial drugs through a lipid extract of the porcine brain membrane together with the test compounds was determined. Commercial drugs and assayed compounds were tested using a mixture of PBS/EtOH (70:30). Assay validation was pe*Rf*ormed by comparing the experimental permeability with reported values of the commercial drugs, and linear correlation between the experimental and reported permeability of the fourteen commercial drugs using the parallel artificial membrane permeation assay was evaluated ($y = ax-b$; $R_2 = c$). From this equation and considering the limits for BBB permeation reported by Di et al., the ranges of permeability were established.

#### II.1.2. Reversible inhibition and reactivation measurements (Dr Kovarik)

A stock solution of oximes was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO; Kemika, Zagreb, Croatia), methanol (Kemika, Zagreb, Croatia) or water. Further dilutions were prepared in water or 0.1 M sodium phosphate pH 7.4. HI-6 dichloride monohydrate was a gift from Dr. Kamil Kuča and Dr. Daniel Jun (Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Kralove, Czech Republic). Tabun, VX, sarin and cyclosarin were purchased from NC Laboratory (Spiez, Switzerland), while paraoxon-ethyl was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). OP stock solutions (5000 μg/mL) were made in isopropyl alcohol, and further dilutions were made in water just before use, except for paraoxon-ethyl whose stock (2750 μg/mL) and further dilutions were prepared in ethanol. Acetylthiocholine iodide (ATCh), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Reversible inhibition of enzymes by oximes was measured in the presence of ATCh (0.05–1.0 mM) in order to determine the enzyme-oxime dissociation constant (Ki). The oxime was added to the mixture containing the enzyme and DTNB (final 0.3 mM), and upon addition of the ATCh, enzyme activity was measured. The activity was corrected for non-enzymatic substrate degradation by an oxime (oximolysis), and DMSO was kept below 0.15% to attenuate its inhibitory effect on AChE activity. The

Ki was evaluated from the experimental data according to the Hunter-Downs equation and the procedure described previously. [579]

For reactivation experiments, the enzyme was incubated with a 10-fold excess of the OP for 30-60 min, achieving 90−100% inhibition. The incubation mixture was filtrated using a filtration column Strata® C18-E tubes (Phenomenex, Torrance, CA, USA) to remove the excess of unconjugated OP. The inhibited enzyme was then added to the reactivation mixture containing the oxime in 0.01% BSA/0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 to initiate reactivation. At a designated time, point, an aliquot was diluted in phosphate buffer containing DTNB, and upon addition of ATCh, enzyme activity was measured. The final concentrations of ATCh and DTNB were 1.0 and 0.3 mM, respectively. An equivalent sample of an uninhibited enzyme was passed through a parallel column, diluted to the same extent as the reactivation mixture, and control activity was measured in the presence of an oxime at the same concentrations used for reactivation. Both the activities of the control and the reactivation mixture were corrected for oximolysis. No significant spontaneous reactivation of the phosphylated enzyme occurred.

One oxime concentration (0.2 mM; or 0.1 mM) or a wide range of oxime concentrations were used to determine the first-order reactivation rate constant at a given oxime concentration (kobs), maximal percentage of reactivation (Reactmax) and kinetic constants (maximal first-order reactivation rate constant k+2, overall second-order reactivation rate constant kr and phosphylated enzyme-oxime dissociation constant KOX) as described previously.[580]

Reversible inhibition and reactivation measurements were pe*R*formed at 25 °C using the Ellman spectrophotometric method[581] at 412 nm on a Tecan Infinite M200PRO microplate reader (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austria) or a CARY 300 spectrophotometer (Varian Inc., Mulgrave, Australia), respectively.

### II.1.3. In vitro inhibition and reactivation (Dr Dias)

#### II.1.3.1. Inhibition of hAChE and hBChE by OPNAs

Inhibition of hAChE and hBChE by OPNAs Recombinant hAChE and hBChE were produced and purified as previously described.[154,582] VX and tabun were from DGA maîtrise NRBC (Vert le Petit, France). Paraoxon-ethyl was purchased from Sigma-Aldrich. Isopropyl p-nitrophenyl methyl-phosphonate (INMP) was used as surrogate of sarin.[56] HI-6 was from Pharmacie Centrale des Armées (Orléans, France). All other chemicals including paraoxon were from Sigma. Stock solution of VX and tabun were 5 mM in isopropanol. The inhibition of 120 mM hAChE or 100 mM of hBChE is realized with a 5-fold excess of OPNAs and was performed in tris buffer (20 mM, pH 7.4, 0.1% BSA) at 25°C.

After 20 minutes incubation, inhibited hAChE or hBChE was desalted on PD-10 column (GE Healthcare).

### II.1.3.2. IC50 measurements

Compounds were dissolved in MeOH to make 5 mM stock solutions. Recombinant hAChE activity was measured spectro- photometrically (absorbance at 412 nm) in the presence of various concentrations of oximes in 1 mL Ellman's buffer (sodium phosphate 0.1 M, pH 7.4, 0.1% BSA, 5% MeOH, 0.1 mg/mL DTNB, 25 °C) and 1 mM acetylthiocholine. The concentration of compound producing 50% of enzyme inhibition was determined by non-linear fitting using ProFit 7.0 (Quantumsoft) using the standard IC50 equation: % activity = 100 x IC50/(IC50 + [Ox]).

### II.1.3.3. Reactivation of hAChE and hBChE inhibited by OPNAs

OPNA-inhibited hAChE was incubated at 37 °C with different concentrations of oxime in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.1% BSA, 5% methanol. Methanol was used for complete dissolution of the oximes. 10 mL aliquots of mix was transferred to 1 mL cuvettes (100-fold dilution) at time intervals ranging from 1 to 10 minutes depending on the reactivation rate, for measurement of hAChE activity (1 mM acetylthiocholine) or hBChE activity (1 mM butyrylthiocholine), in Ellman's buffer (phosphate 0.1 M, pH 7.4, 0.1% BSA, 0.5 mM DTNB, 25 °C).[581] The increase in absorbance at 412 nm was followed on a Uvikon 943 spectrophotometer. The enzyme activity in the control (non-inhibited enzyme) remained constant during the experiment. The percentage of reactivated enzyme (% Ereact) was calculated as the ratio of the recovered enzyme activity and activity in the control. The apparent reactivation rate kobs for each oxime concentration, the dissociation constant KD of inhibited enzyme–oxime complex (E–POx) and the maximal reactivation rate constant kr, were calculated by non-linear fitting using ProFit 7.0 (Quantumsoft) and the standard oxime concentration-dependent reactivation equation derived from the following scheme:

$$\mathrm{E-P+Ox} \overset{K_D}{\rightleftarrows} \mathrm{E-POx} \overset{k_r}{\rightarrow} \mathrm{E+POx}$$

$$\%\ E_{react} = 100\left(1 - e^{k_{obs}t}\right) \text{ and } k_{obs} = \frac{k_r[\mathrm{Ox}]}{K_D + [\mathrm{Ox}]}$$

### II.1.4. RnAChE -α-7 (Dr Araoz)

#### II.1.4.1. Voltage-Clamp Recording on Ovocytes.

ACh-evoked currents were recorded with a standard two-microelectrode voltage-clamp amplifier (OC-725B, Warner Instrument Corp., Hamden, CT) at a holding potential of -60 mV. Voltage and current microelectrodes were pulled from borosilicate glass to reach 0.5-1.5MΩ tip resistance when filled with 3M KCl. Data were acquired with a pCLAMP-9/Digidata-1322A system (Molecular Devices, Union City, CA). The recording chamber (capacity 300 μL) was supe*Rf*used (8 - 12mL/min; 20 °C) with amodified Ringer's solution containing (in millimolar units) NaCl 100,KCl 2.8, BaCl2 0.3, and HEPES 5 (pH 7.4), where $BaCl_2$ substitution for CaCl2 prevents secondary activation of a $Ca^{2+}$-dependent $Cl^-$-current.66 Ovocytes were initially incubated for 3 min with the respective compound and then ACh was applied, for 3 s in ovocytes expressing the human R7nAChR/ Between successive ACh applications, 4-min perfusion intervals with modified Ringer's were maintained to ensure receptor recovery from desensitization.

#### II.1.4.2. Concentration - Inhibition Analysis of ACh Currents.

Dose - response curves for agonist activation were analyzed by using the equation I = Imax[L]n/(EC50 +[L])nH, where I is the measured agonist-evoked current, [L] is the agonist concentration, EC50 is the agonist concentration that evoked half the maximal current (Imax), and nH is the Hill coefficient. I values were normalized to the Imax value recorded from the same oocyte, to yield fractional (percent) response data. The IC50 was determined from dose-response curves by fitting to the equation: I = 1/[1 + ([X]/IC50)nH ] where F is the fractional response obtained in the presence of the inhibitor at concentration [X] and IC50 is the inhibitor concentration that reduced the ACh-evoked amplitude by half.

### II.1.5. Crystallization and structure determination

Torpedo californica AChE (TcAChE) was purified as described previously. [41] Trigonal crystals were obtained in hanging drops with the vapor diffusion method by mixing an equal volume of protein solution (13 mg/mL) and precipitant solution (28–36% PEG 200, MES 100 mM pH 5.4) at 21 °C. Before carrying out soaking experiments, the DMSO solvent was evaporated from RM048. To achieve evaporation, 2 μL of reactivator solutions (at 2-20 mM) in 100 % DMSO were added onto the surface of crystallization supports from EasyXtal crystallization trays (Qiagen) and stored in a fume hood during 24 h. After complete DMSO evaporation, 2 μl of the precipitant solution were added and pipetted exhaustively to dissolve the maximum amount of reactivator remaining on the surface of the

crystallization supports. TcAChE crystals were then transferred into the resulting drop and incubated during 24 h before flash-cooling in liquid nitrogen. Data collection was performed at 100 K on BM30A-FIP beamline at the European Synchrotron Radiation Facility, with $\lambda = 0.98$ Å and an ADSC Q315r CCD detector. Diffraction patterns were indexed, integrated and scaled using XDS and XSCALE.[583] Phase determination was performed by molecular replacement in Phaser,[584]and refinement was carried out with Phenix.[585] Reactivator's geometry descriptions and restraints were obtained from Avogadro[586] and Phenix.elbow,[585] respectively. Real space refinement and model analysis were performed using Coot.[587] Coordinates and structure factors were deposited in the PDB with the assigned code 6EWK.

## II.2. Ex vivo scavenging assay (Dr Kovarik)

Ex vivo degradation of OPs with oximes was performed in whole human blood (hWB) incubated with 10-fold and 50-fold concentrations (0.7 μM and 3.4 μM, respectively) of VX, sarin, cyclosarin and paraoxon relative to the concentration of the AChE in hWB, which accounts for 80% of total blood cholinesterase activity (20% BChE). After 1 h of incubation (achieving 95–100% inhibition), oxime (1.0 mM) was added to the mixture. At specified time intervals, an aliquot was taken for enzyme activity measurements and results were expressed as percentage reactivation, as described previously.[185] Enzyme activity measurements were performed as described for the reactivation assay at 436 nm on a CARY 300 spectrophotometer (Varian Inc., Mulgrave, Australia) at 25 °C. hWB was collected from a healthy female donor at the Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Croatia following approval by the Ethics Committee of the Institute.

## II.3. In vivo (Dr Guilhem Calas)

### II.3.1. Inhibition of hAChE by VX

Stock solution of VX was 5 mM in isopropanol. The inhibition of 120 μM purified hAChE is realized with a five-fold excess of VX (ten-fold for standard reactivation curves) and was performed in sodium phosphate buffer (100 mM, pH 7.4, 0.1% BSA) at 25°C. Complete inhibition of hAChE was monitored by measuring the residual activity as previously described.[581] After a 20-min incubation, the excess of VX was removed by desalting the inhibited hAChE on a PD-10 column (GE Healthcare).

### II.3.2. Plasma test protocol

#### II.3.2.1. Standard reactivation curves

Plasma was isolated from erythrocytes by centrifugation at 3000 g for 10 minutes. Endogenous cholinesterases from plasma were then heat-inactivated at 56°C for 30 minutes. VX-inhibited hAChE was incubated for 30 minutes at 37°C in presence of different concentrations of oximes diluted in plasma (0, 1, 5, 10, 50, 100, 150 and 250 µM). A volume of 7 µL of heated plasma containing oxime was mixed with the same volume of VX-inhibited hAChE solution in sodium-phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4, 0.1% BSA) and incubated 30 minutes at 37°C to reactivate hAChE. An incubation of 30 min was empirically chosen to obtain full reactivation at the highest oxime concentration tested. 10-µL aliquots of each sample were transferred to cuvettes containing 1 mM acetylthiocholine in 1 mL Ellman's buffer (sodium-phosphate 0.1 M, pH 7.4, 0.1% BSA, 0.5 mM DTNB, 25°C) for measurement of resulting hAChE activity at 412 nm. The enzyme activity in the control (uninhibited enzyme + oxime) remained constant during the experiment. The percentage of reactivated enzyme ($\%E_{react}$) was calculated as the ratio of the recovered VX-inhibited hAChE activity and HI-6 reactivated hAChE activity, knowing that maximal reactivation (i.e. $\%E_{react}$ = 100%) was achieved by incubating VX-inhibited hAChE with 200 µM HI-6 diluted in heated plasma. Three independent experiments were carried out for each oxime and results are presented as mean values ± SEM.

Standard curves were fitted with ProFit (Quantumsoft) using a standard asymptotical/exponential time-dependent reactivation equation giving $\%E_{react}$ in function of the oxime concentration ([Ox]):

$$\%E_{react} = 100.\left(1 - e^{k.[Ox].t}\right)$$

where k is an apparent bimolecular rate constant ($\mu M^{-1}min^{-1}$) and t = 30 min for these series of experiment.

#### II.3.2.2. Blood samples

Mice were anesthetized by isoflurane gas and kept anesthetized during shaving. Mice hind limbs were shaved with a 3 minute-long application of a commercial depilatory cream.

The day of the experiment, mice received intraperitoneal injection of oxime (50 mg/kg). At various times (0, 2, 5, 10, 15, 30, 60 and 180 minutes after oxime injection and 0, 5, 15, 30, 60 and 180 minutes for HI-6), the saphenous vein was drilled with a needle, about 15 µl of blood was collected with an heparinized capillary tube and put in a collection tube containing 2µL of heparine. Blood collection was carried out and the exact volume of collected blood of each sample was determined in order to calculate the dilution factor due to the heparine. Plasma was next isolated from erythrocytes by centrifugation at 3000 g for 10 minutes. Plasma samples were then treated as previously described to obtain the percentage of

reactivated enzyme (%$E_{react}$). $T_{max}$ corresponds to the time when the curve reachs %$E_{react}$. The areas under the percentage of reactivation curve (AUC) and the first moment curve (AUMC) were calculated using the trapezoidal rule. Mean residence time (MRT) was calculated as the ratio of AUMC to AUC.[588]

### II.3.3. LD50 estimation using the up-and-down method

$LD_{50}$ was estimated using the improved method of Dixon's up-and-down procedure described by Rispin.[589] This method uses an iterative dose-selection algorithm. It consists of a single ordered dose progression in which mice are dosed, one at a time, at a minimum of 24-hour intervals. The first animal receives a dose a step below the level of the best estimate of the $LD_{50}$ of the organophosphorous compound (either Paraoxon, NIMP or NEMP). If the mouse survives, the dose for the next animal is increased by 1.1 times the original dose; if it dies, the dose for the next animal is decreased by the same factor. In our particular conditions the testing stops when one of the following criteria is met: (1) Three consecutive animals survive at the highest dose (which is normally 2000 mg/kg); (2) five reversals occur in any six consecutive animals tested; (3) at least four animals have followed the first reversal and the specified likelihood-ratios which compares the maximum likelihood estimate for $LD_{50}$ with $LD_{50}$ values above and below exceed the critical value of 2.5. Profile likelihood methods are used to estimate confidence intervals. In practice the stopping criteria, the resulting $LD_{50}$ and the corresponding confidence interval are determined using the AOT 425 Pgm software as recommended by OECD. Simulations have shown that the average animal use is expected to be of seven to nine animals per test and in any case the test is terminated with 15 animals. The protective index (PI) corresponds to the ratio of $LD_{50}$ of organophosphorous compound (Paraoxon, NIMP or NEMP) combined with oxime treatment on $LD_{50}$ of organophosphorous compound alone.

# Bibliographie

(1) Petroianu, G. A. History of Organophosphate Synthesis: The Very Early Days. *Pharmazie* **2010**, *65* (4), 306–311.

(2) Petroianu, G. History of Organophosphorus Cholinesterase Inhibitors & Reactivators. *Military Medical Science Letter* **2015**, *84* (4), 182–185.

(3) Soltaninejad, K.; Shadnia, S. History of the Use and Epidemiology of Organophosphorus Poisoning. In *Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds*; Springer London: London, 2014; pp 25–43.

(4) Everts, B. S. The Nazi Origins of Deadly Nerve Gases. *Chemical & Engineering News*. 2016, pp 26–28.

(5) Marrs, T. C. Toxicology of Organophosphate Nerve Agents. In *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment, Second Edition*; Marrs, T. C., Maynard, R. L., Sidell, F. R., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2007; pp 191–221.

(6) Holmstedt, B. *Pharmacology of Organophosphorus Cholinesterase Inhibitors*; American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1959; Vol. 11.

(7) Reimann, J. Giftgas – der unsichtbare Tod. (Gaz toxique - la mort invisible.) https://diefreiheitsliebe.de/politik/giftgas-der-unsichtbare-tod-im-gespraech-mit-jakob-reimann/ (accessed Jan 12, 2018).

(8) Holmstedt, B. The Third Symposium on the Prophylaxis and Treatment of Chemical Poisons. *Fundamental and Applied Toxicology* **1985**, *5* (6), S1–S9.

(9) Popov, I. G.; Popov, G. I. Structure, Chemical Reactivity and Toxicity of Organophosphorus Compounds. In *Medical management of chemical and biological casualties*; Tonev S, Kanev K, D. C., Ed.; Publishing House IRITA: Sofia, 2009; pp 85–93.

(10) Backlund, G. R.; Divine, R. D.; Martino, J. F. Malathion Manufacture. US3463841A, 1966.

(11) Balali-Mood, M.; Shariat, M. Treatment of Organophosphate Poisoning. Experience of Nerve Agents and Acute Pesticide Poisoning on the Effects of Oximes. *Journal of Physiology Paris* **1998**, *92* (5–6), 375–378.

(12) Mahan, C. M.; Page, W. F.; Bullman, T. A.; Kang, H. K. Health Effects in Army Gulf War Veterans Possibly Exposed to Chemical Munitions Destruction at Khamisiyah, Iraq: Part I. Morbidity Associated with Potential Exposure. *Military medicine* **2005**, *170* (11), 935–944.

(13) An Iranian soldier wearing a gas mask during the Iran-Iraq War https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chemical_weapon1.jpg (accessed Jan 11, 2018).

(14) Organisation Pour L'Interdiction Des Armes Chimiques. Convention Sur L'Interdiction De La Mise Au Point, De La Fabrication, Du Stockage Et De L'Emploi Des Armes Chimiques Et Sur Leur Destruction https://www.opcw.org/fileadmin/OPCW/CWC/CWC_fr.pdf (accessed Jan 11, 2018).

(15) Tokuda, Y.; Kikuchi, M.; Takahashi, O.; Stein, G. H. Prehospital Management of Sarin Nerve Gas Terrorism in Urban Settings: 10 Years of Progress after the Tokyo Subway Sarin Attack. *Resuscitation* **2006**, *68* (2), 193–202.

(16) Tu, A. T. Overview of Sarin Terrorist Attacks in Japan. In *Natural and Selected Synthetic Toxins*; ACS Symposium Series, 1999; Vol. 745, pp 304–317.

(17) AFP. Tokyo subway attacks: Japan still baffled 20 years on | Daily Mail Online http://www.dailymail.co.uk/wires/afp/article-3002043/Tokyo-subway-attacks-Japan-baffled-20-years-on.html (accessed Jan 10, 2018).

(18) Alfred, C. 20 Years Ago, A Shadowy Cult Poisoned The Tokyo Subway | HuffPost https://www.huffingtonpost.com/2015/03/20/tokyo-subway-sarin-attack_n_6896754.html (accessed Jan 10, 2018).

(19) Sellström, Å.; Cairns, S.; Barbeschi, M. *Report on the Alleged Use of Chemical Weapons in the Ghouta Area of Damascus on 21 August 2013*; 2013.

(20) Human Rights Council. *Report of the Independent International Commission of Inquiry on the Syrian Arab Republic*; 2017.

(21) Rescue workers hose down children hit by the gas attack. http://www.abc.net.au/news/2017-04-07/workers-hose-down-children-in-syria/8426358 (accessed Jan 11, 2018).

(22) Qu'est-ce que le VX, le poison qui a tué Kim Jong-nam ? http://www.lemonde.fr/asie-pacifique/article/2017/02/24/qu-est-ce-que-le-vx-le-poison-qui-a-tue-kim-jong-nam_5085016_3216.html (accessed Jan 11, 2018).

(23) Pommiers, E. Que sait-on sur l'empoisonnement de l'ex-agent double russe au Royaume-Uni ? http://www.lemonde.fr/international/article/2018/03/19/que-sait-on-sur-l-empoisonnement-de-serguei-skripal-l-ex-agent-double-russe-au-royaume-uni_5273209_3210.html (accessed Mar 20, 2018).

(24) Joseph, A.; Shears, R.; Boyle, D.; Mclaughlin, K. Seconds from death: Kim Jong-Un's brother is seen on security camera footage telling airport staff he has just been poisoned moments before collapsing and dying http://www.dailymail.co.uk/news/article-4242126/Kim-Jong-nam-told-airport-staff-just-poisoned.html (accessed Jan 11, 2018).

(25) Okoli, U. A.; Nubila, N. I.; Okafor, M. T. Review Article Organophosphorous Pesticide : An Environmental Pollutant Perspective. **2017**, *9* (9), 126–130.

(26) Eddleston, M. Are Oximes Still Indicated for Acute Organophosphorus Insecticide Self-Poisoning? *Journal of Medical Toxicology* **2018**, 1–2.

(27) Mew, E. J.; Padmanathan, P.; Konradsen, F.; Eddleston, M.; Chang, S. Sen; Phillips, M. R.; Gunnell, D. The Global Burden of Fatal Self-Poisoning with Pesticides 2006-15: Systematic Review. *Journal of Affective Disorders* **2017**, *219* (May), 93–104.

(28) Srivastava, N.; Kumari, S.; Nair, K.; Alam, S.; Raza, S. K. Determination of Organophosphorous Pesticides in Environmental Water Samples Using Surface-Engineered C18 Functionalized Silica-Coated Core-Shell Magnetic Nanoparticles–Based Extraction Coupled with GC-MS/MS Analysis. *Journal of AOAC International* **2017**, *100* (6), 804–809.

(29) Phytosanitaires organophosphorés autorisées en France https://ephy.anses.fr/resultats_recherche/substance?f%5B0%5D=field_famille_chimique%253Afield_libelle%3AOrgano-phosphoré (accessed Jan 11, 2018).

(30) Zilker, T. Medical Management of Incidents with Chemical Warfare Agents. *Toxicology* **2005**, *214* (3), 221–231.

(31) Irwin, B. W.; Ginsburg, S.; Nachmansohn, D. Alkyl Pyridinium Salt, 2-Carboxaldehyde Oximes and Process of Preparation. US2816113A, 1956.

(32) Oldiges, H.; Schoene, K. Pyridinium and Imidazoliumsalze. *Archives of Toxicology* **1970**, *26*, 293–305.

(33) Mercey, G.; Verdelet, T.; Renou, J.; Kliachyna, M.; Baati, R.; Nachon, F.; Jean, L.; Renard, P. Y. Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Nerve Agents. *Accounts of Chemical Research* **2012**, *45* (5), 756–766.

(34) Saint-André, G.; Kliachyna, M.; Kodepelly, S.; Louise-Leriche, L.; Gillon, E.; Renard, P.-Y.; Nachon, F.; Baati, R.; Wagner, A. Design, Synthesis and Evaluation of New $\alpha$-Nucleophiles for the Hydrolysis of Organophosphorus Nerve Agents: Application to the Reactivation of Phosphorylated Acetylcholinesterase. *Tetrahedron* **2011**, *67* (34), 6352–6361.

(35) Mercey, G.; Verdelet, T.; Saint-André, G.; Gillon, E.; Wagner, A.; Baati, R.; Jean, L.; Nachon, F.; Renard, P.-Y. First Efficient Uncharged Reactivators for the Dephosphylation of Poisoned Human Acetylcholinesterase. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2011**, *47* (18), 5295–5297.

(36) Mercey, G.; Renou, J.; Verdelet, T.; Kliachyna, M.; Baati, R.; Gillon, E.; Arboléas, M.; Loiodice, M.; Nachon, F.; Jean, L.; Renard, P. Y. Phenyltetrahydroisoquinoline-Pyridinaldoxime Conjugates as Efficient Uncharged Reactivators for the Dephosphylation of Inhibited Human Acetylcholinesterase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55* (23), 10791–10795.

(37) Renou, J.; Mercey, G.; Verdelet, T.; Păunescu, E.; Gillon, E.; Arboléas, M.; Loiodice, M.; Kliachyna, M.; Baati, R.; Nachon, F.; Jean, L.; Renard, P. Y. Syntheses and in Vitro Evaluations of Uncharged Reactivators for Human Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Nerve Agents. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, *203* (1), 81–84.

(38) Renou, J.; Loiodice, M.; Arboléas, M.; Baati, R.; Jean, L.; Nachon, F.; Renard, P.-Y. Tryptoline-3-Hydroxypyridinaldoxime Conjugates as Efficient Reactivators of Phosphylated Human Acetyl and Butyrylcholinesterases. *Chemical communications* **2014**, *50* (30), 3947–3950.

(39) Kliachyna, M.; Santoni, G.; Nussbaum, V.; Renou, J.; Sanson, B.; Colletier, J.-P.; Arboléas, M.; Loiodice, M.; Weik, M.; Jean, L.; Renard, P.-Y.; Nachon, F.; Baati, R. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Tetrahydroacridine Pyridine- Aldoxime and -Amidoxime Hybrids as Efficient Uncharged Reactivators of Nerve Agent-Inhibited Human Acetylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *78*, 455–467.

(40) Renou, J.; Dias, J.; Mercey, G.; Verdelet, T.; Rousseau, C.; Gastellier, A.-J.; Arboléas, M.; Touvrey-Loiodice, M.; Baati, R.; Jean, L.; Nachon, F.; Renard, P.-Y. Synthesis and in Vitro Evaluation of Donepezil-Based Reactivators and Analogues for Nerve Agent-Inhibited Human Acetylcholinesterase. *RSC Advances* **2016**, *6* (22), 17929–17940.

(41) Gupta, R. C. Classification and Uses of Organophosphates and Carbamates. In *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*; Gupta, R. C., Ed.; Elsevier: USA, 2006; pp 5–24.

(42) Hyde, E. G.; Carmichael, W. W. Anatoxin-a(s), a Naturally Occurring Organophosphate, Is an Irreversible Active Site-Directed Inhibitor of Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7). *Journal of biochemical toxicology* **1991**, *6* (3), 195–201.

(43) Wei, G. L.; Li, D. Q.; Zhuo, M. N.; Liao, Y. S.; Xie, Z. Y.; Guo, T. L.; Li, J. J.; Zhang, S. Y.; Liang, Z. Q. Organophosphorus Flame Retardants and Plasticizers: Sources, Occurrence, Toxicity and Human Exposure. *Environmental Pollution* **2015**, *196*, 29–46.

(44) Organisation mondiale de la Santé. Métrifonate http://apps.who.int/medicinedocs/fr/p/printable.html (accessed Jan 12, 2018).

(45) Bate, R. The Rise, Fall, Rise, and Imminent Fall of DDT. *American Enterprise Institute*. November 2014.

(46) Bajgar, J.; Fusek, J.; Kassa, J.; Kuca, K.; Jun, D. *Global Impact of Chemical Warfare Agents Used Before and After 1945*; Elsevier Inc., 2015.

(47) Soltaninejad, K.; Shadnia, S. History of the Use and Epidemiology of Organophosphorus Poisoning. In *Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds*; Balali-Mood, M., Abdollahi, M., Eds.; Springer London: London, 2014; pp 25–43.

(48) Johnson, N. H.; Larsen, J. C.; Meek, E. *Historical Perspective of Chemical Warfare Agents*; Elsevier Inc., 2015.

(49) Greaves, I.; Hunt, P. Chemical Agents. *Responding to Terrorism: A Medical Handbook* **2010**, 233–344.

(50) Mandraud, I. En Russie, des témoignages accablants sur le programme « Novitchok » http://www.lemonde.fr/international/article/2018/03/20/un-scientifique-russe-confirme-l-existence-de-l-agent-innervant-novitchok_5273552_3210.html (accessed Mar 23, 2018).

(51) Hoenig, S. *Nerve Agents*; Springer New York: New York, NY, 2006.

(52) Gupta, R. C. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, Academic P.; Gupta, R. C., Ed.; Elsivier, 2015.

(53) Calas, A. G.; Dias, J.; Rousseau, C.; Arboléas, M.; Touvrey-Loiodice, M.; Mercey, G.; Jean, L.; Renard, P. Y.; Nachon, F. An Easy Method for the Determination of Active Concentrations of Cholinesterase Reactivators in Blood Samples: Application to the Efficacy Assessment of Non Quaternary Reactivators Compared to HI-6 and Pralidoxime in VX-Poisoned Mice. *Chemico-Biological Interactions* **2017**, *267*, 11–16.

(54) Niijima, H.; Nagao, M.; Nakajima, M.; Takatori, T.; Matsuda, Y.; Iwase, H.; Kobayashi, M. Sarin-like and Soman-like Organophosphorous Agents Activate PLCγ, in Rat Brains. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1999**, *156* (1), 64–69.

(55) Nagao, M.; Takatori, T.; Matsuda, Y.; Nakajima, M.; Niijima, H.; Iwase, H.; Iwadate, K.; Amano, T. Detection of Sarin Hydrolysis Products from Sarin-like Organophosphorus Agent-Exposed Human Erythrocytes. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* **1997**, *701* (1), 9–17.

(56) Ohta, H.; Ohmori, T.; Suzuki, S.; Ikegaya, H.; Sakurada, K.; Takatori, T. New Safe Method for Preparation of Sarin-Exposed Human Erythrocytes Acetylcholinesterase Using Non-Toxic and Stable Sarin Analogue Isopropyl p-Nitrophenyl Methylphosphonate and Its Application to Evaluation of Nerve Agent Antidotes. *Pharmaceutical Research* **2006**, *23* (12), 2827–2833.

(57) Vayron, P.; Renard, P. Y.; Taran, F.; Créminon, C.; Frobert, Y.; Grassi, J.; Mioskowski, C. Toward Antibody-Catalyzed Hydrolysis of Organophosphorus Poisons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97* (13), 7058–7063.

(58) Vayron, P.; Renard, P. Y.; Valleix, a; Mioskowski, C. Design and Synthesis of an Alpha,Alpha-Difluorophosphinate Hapten for Antibody-Catalyzed Hydrolysis of Organophosphorus Nerve Agents. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2000**, *6* (6), 1050–1063.

(59) Meek, E. C.; Chambers, H. W.; Coban, A.; Funck, K. E.; Pringle, R. B.; Ross, M. K.; Chambers, J. E. Synthesis and in Vitro and in Vivo Inhibition Potencies of Highly Relevant Nerve Agent Surrogates. *Toxicological Sciences* **2012**, *126* (2), 525–533.

(60) Coban, A.; Carr, R. L.; Chambers, H. W.; Willeford, K. O.; Chambers, J. E. Comparison of Inhibition Kinetics of Several Organophosphates, Including Some Nerve Agent Surrogates, Using Human Erythrocyte and Rat and Mouse Brain Acetylcholinesterase. *Toxicology Letters*. 2016, pp 39–45.

(61) Worek, F.; Thiermann, H.; Szinicz, L.; Eyer, P. Kinetic Analysis of Interactions between Human Acetylcholinesterase, Structurally Different Organophosphorus Compounds and Oximes. *Biochemical Pharmacology* **2004**, *68* (11), 2237–2248.

(62) Easson, L.; Stedman, E. The Specificity of Choline-Esterase. *Biochemical Journal* **1937**, *31* (10), 1723–1729.

(63) Carr, P. D.; Ollis, D. L. Alpha/Beta Hydrolase Fold: An Update. *Protein and Peptide Letters* **2009**, *16* (10), 1137–1148.

(64) Augustinsson, K.; Nachmansohn, D. Distinction between Acetylcholine-Esterase and Other Choline Ester-Splitting Enzymes. *Science* **1949**, *110* (2847), 98–99.

(65) Nicolet, Y.; Lockridge, O.; Masson, P.; Fontecilla-Camps, J. C.; Nachon, F. Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (42), 41141–41147.

(66) Lockridge, O. Review of Human Butyrylcholinesterase Structure, Function, Genetic Variants, History of Use in the Clinic, and Potential Therapeutic Uses. *Pharmacology and Therapeutics* **2015**, *148*, 34–46.

(67) Quinn, D. M. Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States. *Chemical Reviews* **1987**, *87* (5), 955–979.

(68) Grisaru, D.; Sternfeld, M.; Eldor, A.; Glick, D.; Soreq, H. Structural Roles of Acetylcholinesterase Variants in Biology and Pathology. *European Journal of Biochemistry* **1999**, *264* (3), 672–686.

(69) Van der Kloot, W.; Molgó, J.; Cameron, R.; Colasante, C. Vesicle Size and Transmitter Release at the Frog Neuromuscular Junction When Quantal Acetylcholine Content Is Increased or Decreased. *The Journal of physiology* **2002**, *541* (Pt 2), 385–393.

(70) Jones, C. K.; Byun, N.; Bubser, M. Muscarinic and Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists and Allosteric Modulators for the Treatment of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **2012**, *37* (1), 16–42.

(71) Hasin, Y.; Avidan, N.; Bercovich, D.; Korczyn, A.; Silman, I.; Beckmann, J. S.; Sussman, J. L. A Paradigm for Single Nucleotide Polymorphism Analysis: The Case of the Acetylcholinesterase Gene. *Human Mutation* **2004**, *24* (5), 408–416.

(72) Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldmant, A.; Toker, L.; Silman, I. Acetyicholinesterase from Torpedo Calfornica : A Prototypic Acetyicholine-Binding Protein. *Science* **1991**, *253* (May 1988), 872–879.

(73) Bourne, Y.; Grassi, J.; Bougis, P. E.; Marchot, P. Conformational Flexibility of the Acetylcholinesterase Tetramer Suggested by X-Ray Crystallography. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274* (43), 30370–30376.

(74) Harel, M.; Kryger, G.; Rosenberry, T. L.; Mallender, W. D.; Lewis, T.; Fletcher, R. J.; Guss, J. M.; Silman, I.; Sussman, J. L. Three-Dimensional Structures of Drosophila Melanogaster Acetylcholinesterase and of Its Complexes with Two Potent Inhibitors. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2000**, *9* (6), 1063–1072.

(75) Marchot, P.; Ravelli, R. B.; Raves, M. L.; Bourne, Y.; Vellom, D. C.; Kanter, J.; Camp, S.; Sussman, J. L.; Taylor, P. Soluble Monomeric Acetylcholinesterase from Mouse: Expression, Purification, and Crystallization in Complex with Fasciculin. *Protein science : a publication of the Protein Society* **1996**, *5* (4), 672–679.

(76) Kryger, G.; Harel, M.; Giles, K.; Toker, L.; Velan, B.; Lazar, A.; Kronman, C.; Barak, D.; Ariel, N.; Shafferman, A.; Silman, I.; Sussman, J. L. Structures of Recombinant Native and E202Q Mutant Human Acetylcholinesterase Complexed with the Snake-Venom Toxin Fasciculin-II. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **2000**, *56* (11), 1385–1394.

(77) Taylor, P.; Radic, Z. The Cholinesterases: From Genes to Proteins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **1994**, *34* (1), 281–320.

(78) Froede, H. C.; Wilson, I. B. Direct Determination of Acetyl-Enzyme Intermediate in the Acetylcholinesterase-Catalyzed Hydrolysis of Acetylcholine and Acetylthiocholine. *Journal of Biological Chemistry* **1984**, *259* (17), 11010–11013.

(79) Bourne, Y.; Radić, Z.; Sulzenbacher, G.; Kim, E.; Taylor, P.; Marchot, P. Substrate and Product Trafficking through the Active Center Gorge of Acetylcholinesterase Analyzed by Crystallography and Equilibrium Binding. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281* (39), 29256–29267.

(80) Pezzementi, L.; Johnson, K.; Tsigelny, I.; Cotney, J.; Manning, E.; Barker, A.; Merritt, S. Amino Acids Defining the Acyl Pocket of an Invertebrate Cholinesterase. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* **2003**, *136* (4), 813–832.

(81) Dougherty, D. A. The Cation-π Interaction. *Accounts of Chemical Research* **2013**, *46* (4), 885–893.

(82) Axelsen, P. H.; Harel, M.; Silman, I.; Sussman, J. L. Structure and Dynamics of the Active Site Gorge of Acetylcholinesterase: Synergistic Use of Molecular Dynamics Simulation and X-Ray Crystallography. *Protein Science* **1994**, *3* (2), 188–197.

(83) Barak, D.; Kronman, C.; Ordentlich, A.; Ariel, N.; Bromberg, A.; Marcus, D.; Lazar, A.; Velan, B.; Shafferman, A. Acetylcholinesterase Peripheral Anionic Site Degeneracy Conferred by Amino Acid Arrays Sharing a Common Core. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269* (9), 6296–6305.

(84) Taylor, P.; Lappi, S. Interaction of Fluorescence Probes with Acetylcholinesterase. Site and Specificity of Propidium Binding. *Biochemistry* **1975**, *14* (9), 1989–1997.

(85) Barak, D.; Ordentlich, A.; Bromberg, A.; Kronman, C.; Marcus, D.; Lazar, A.; Ariel, N.; Velan, B.; Shafferman, A. Allosteric Modulation of Acetylcholinesterase Activity by Peripheral Ligands Involves a Conformational Transition of the Anionic Subsite. *Biochemistry* **1995**, *34* (47), 15444–15452.

(86) Van Belle, D.; De Maria, L.; Iurcu, G.; Wodak, S. J. Pathways of Ligand Clearance in Acetylcholinesterase by Multiple Copy Sampling. *Journal of Molecular Biology* **2000**, *298* (4), 705–726.

(87) Doenicke, A.; Gürtner, T.; Kreutzberg, G.; Remes, I.; Spiess, W.; Steinbereithner, K. Serum Cholinesterase Anzemia - Report of a Case Confirmed by Enzyme -Histochemical Examination of Liver -Biopsy Specimen. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **1963**, *7* (2), 59–68.

(88) Masson, P.; Froment, M. T.; Fortier, P. L.; Visicchio, J. E.; Bartels, C. F.; Lockridge, O. Butyrylcholinesterase-Catalysed Hydrolysis of Aspirin, a Negatively Charged Ester, and Aspirin-Related Neutral Esters. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1998**, *1387* (1–2), 41–52.

(89) Stewart, D. J.; Inaba, T.; Tang, B. K.; Kalow, W. Hydrolysis of Cocaine in Human Plasma by Cholinesterase. *Life Sciences* **1977**, *20* (9), 1557–1563.

(90) Lockridge, O.; Mottershaw-Jackson, N.; Eckerson, H. W.; La Du, B. N. Hydrolysis of Diacetylmorphine (Heroin) by Human Serum Cholinesterase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1980**, *215* (1), 1 LP-8.

(91) Barricklow, J.; Blatnik, M. 2-Arachidonoylglycerol Is a Substrate for Butyrylcholinesterase: A Potential Mechanism for Extracellular Endocannabinoid Regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2013**, *536* (1), 1–5.

(92) Allderdice, P. W.; Gardner, H. A. R.; Galutira, D.; Lockridge, O.; Ladu, B. N.; McAlpine, P. J. The Cloned Butyrylcholinesterase (BChE) Gene Maps to a Single Chromosome Site, 3q26. *Genomics* **1991**, *11* (2), 452–454.

(93) Duysen, E. G.; Li, B.; Darvesh, S.; Lockridge, O. Sensitivity of Butyrylcholinesterase Knockout Mice to (-)-Huperzine A and Donepezil Suggests Humans with Butyrylcholinesterase Deficiency May Not Tolerate These Alzheimer's Disease Drugs and Indicates Butyrylcholinesterase Function in Neurotransmission. *Toxicology* **2007**, *233* (1–3 SPEC. ISS.), 60–69.

(94) Giacobini, E. Cholinesterase Inhibitors: New Roles and Therapeutic Alternatives. *Pharmacological Research* **2004**, *50* (4), 433–440.

(95) De Vriese, C.; Gregoire, F.; Lema-Kisoka, R.; Waelbroeck, M.; Robberecht, P.; Delporte, C. Ghrelin Degradation by Serum and Tissue Homogenates: Identification of the Cleavage Sites. *Endocrinology* **2004**, *145* (11), 4997–5005.

(96) Chen, P.; Gao, Y.; Geng, L.; Ping, V.; Gao, Y.; Geng, L.; Parks, R. J.; Pang, Y.; Brimijoin, S. Plasma Butyrylcholinesterase Regulates Ghrelin to Control Aggression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, *112* (12), 2251–2256.

(97) Müller, T. D.; Nogueiras, R.; Andermann, M. L.; Andrews, Z. B.; Anker, S. D.; Argente, J.; Batterham, R. L.; Benoit, S. C.; Bowers, C. Y.; Broglio, F.; Casanueva, F. F.; D'Alessio, D.; Depoortere, I.; Geliebter, A.; Ghigo, E.; Cole, P. A.; Cowley, M.; Cummings, D. E.; Dagher, A.; et al. Ghrelin. *Molecular Metabolism* **2015**, *4* (6), 437–460.

(98) Adzhubei, A. A.; Sternberg, M. J. E.; Makarov, A. A. Polyproline-II Helix in Proteins: Structure and Function. *Journal of Molecular Biology* **2013**, *425* (12), 2100–2132.

(99) Biberoglu, K.; Schopfer, L. M.; Saxena, A.; Tacal, O.; Lockridge, O. Polyproline Tetramer Organizing Peptides in Fetal Bovine Serum Acetylcholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **2013**, *1834* (4), 745–753.

(100) Biberoglu, K.; Schopfer, L. M.; Tacal, O.; Lockridge, O. The Proline-Rich Tetramerization Peptides in Equine Serum Butyrylcholinesterase. *FEBS Journal* **2012**, *279* (20), 3844–3858.

(101) Adresi, Y. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turkish Journal of Biochemistry -Turk J Biochem]* **2003**, *28* (2), 54–61.

(102) Chatonnet, A.; Lockridgetl, O. Comparison of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase. *Biochemical Journal* **1989**, *260*, 625–634.

(103) Rosenberry, T. L.; Brazzolotto, X.; MacDonald, I. R.; Wandhammer, M.; Trovaslet-Leroy, M.; Darvesh, S.; Nachon, F. Comparison of the Binding of Reversible Inhibitors to Human Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: A Crystallographic, Kinetic and Calorimetric Study. *Molecules* **2017**, *22* (12), 1–21.

(104) Kovarik, Z.; Radic, Z.; Berman, H. A.; Simeon-Rudolf, V.; Reiner, E.; Taylor, P. Acetylcholinesterase Active Centre and Gorge Conformations Analysed by Combinatorial Mutations and Enantiomeric Phosphonates. *Biochemical Journal* **2003**, *373*, 33–40.

(105) Saxena, A.; Redman, A. M. G.; Jiang, X.; Lockridge, O.; Doctor, B. P. Differences in Active Site Gorge Dimensions of Cholinesterase Revealed by Binding of Inhibitors to Human Butyrylcholinesterase. *Biochemistry* **1997**, *36* (97), 14642–14651.

(106) Weingand-Ziadé, A.; Ribes, F.; Renault, F.; Masson, P. Pressure- and Heat-Induced Inactivation of Butyrylcholinesterase: Evidence for Multiple Intermediates and the Remnant Inactivation Process. *The Biochemical journal* **2001**, *356* (Pt 2), 487–493.

(107) MacDonald, I. R.; Martin, E.; Rosenberry, T. L.; Darvesh, S. Probing the Peripheral Site of Human Butyrylcholinesterase. *Biochemistry* **2012**, *51* (36), 7046–7053.

(108) Maxwell, D. M.; Brecht, K. M.; Koplovitz, I.; Sweeney, R. E. Acetylcholinesterase Inhibition: Does It Explain the Toxicity of Organophosphorus Compounds? *Archives of Toxicology* **2006**, *80* (11), 756–760.

(109) Jokanović, M.; Prostran, M. Pyridinium Oximes as Cholinesterase Reactivators. Structure-Activity Relationship and Efficacy in the Treatment of Poisoning with Organophosphorus Compounds. *Current medicinal chemistry* **2009**, *16* (17), 2177–2188.

(110) Sanson, B.; Nachon, F.; Colletier, J. P.; Froment, M. T.; Toker, L.; Greenblatt, H. M.; Sussman, J. L.; Ashani, Y.; Masson, P.; Silman, I.; Weik, M. Crystallographic Snapshots of Nonaged and Aged Conjugates of Soman with Acetylcholinesterase, and of a Ternary Complex of the Aged Conjugate with Pralidoxime. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52* (23), 7593–7603.

(111) Millard, C. B.; Koellner, G.; Ordentlich, A.; Shafferman, A.; Silman, I.; Sussman, J. L. Reaction Products of Acetylcholinesterase and VX Reveal a Mobile Histidine in the Catalytic Triad. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (42), 9883–9884.

(112) Carletti, E.; Colletier, J. P.; Dupeux, F.; Trovaslet, M.; Masson, P.; Nachon, F. Structural Evidence That Human Acetylcholinesterase Inhibited by Tabun Ages through O-Dealkylation. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53* (10), 4002–4008.

(113) Worek, F.; Thiermann, H. The Value of Novel Oximes for Treatment of Poisoning by Organophosphorus Compounds. *Pharmacology & therapeutics* **2013**, *139* (2), 249–259.

(114) Mason, H. J.; Waine, E.; Stevenson, A.; Wilson, H. K. Aging and Spontaneous Reactivation of Human Plasma Cholinesterase Activity after Inhibition by Organophosphorus Pesticides. *Human and Experimental Toxicology* **1993**, *12* (6), 497–503.

(115) Trovaslet-Leroy, M.; Musilova, L.; Renault, F.; Brazzolotto, X.; Misik, J.; Novotny, L.; Froment, M. T.; Gillon, E.; Loiodice, M.; Verdier, L.; Masson, P.; Rochu, D.; Jun, D.; Nachon, F. Organophosphate Hydrolases as Catalytic Bioscavengers of Organophosphorus Nerve Agents. *Toxicology Letters* **2011**, *206* (1), 14–23.

(116) Mason, H. J.; Sams, C.; Stevenson, A. J.; Rawbone, R. Rates of Spontaneous Reactivation and Aging of Acetylcholinesterase in Human Erythrocytes after Inhibition by Organophosphorus Pesticides. *Human and Experimental Toxicology* **2000**, *19* (9), 511–516.

(117) Coult, B. D. B.; Marsh, D. J.; Read, G. Inhibited Acetylcholinesterase R /' - l-E. *Biochemical Journal* **1966**, *98*, 869–873.

(118) Sirin, G. S.; Zhou, Y.; Lior-Hoffmann, L.; Wang, S.; Zhang, Y. Aging Mechanism of Soman Inhibited Acetylcholinesterase. *Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116* (40), 12199–12207.

(119) Viragh, C.; Kovach, I. M.; Pannell, L. Small Molecular Products of Dealkylation in Soman-Inhibited Electric Eel Acetylcholinesterase. *Biochemistry* **1999**, *38* (30), 9557–9561.

(120) Zhuang, Q.; Young, A.; Callam, C. S.; McElroy, C. A.; Ekici, Ö. D.; Yoder, R. J.; Hadad, C. M. Efforts toward Treatments against Aging of Organophosphorus-Inhibited Acetylcholinesterase. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2016**, *1374* (1), 94–104.

(121) An, Y.; Zhu, Y.; Yao, Y.; Liu, J. Is It Possible to Reverse Aged Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Compounds? Insight from the Theoretical Study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (14), 9838–9846.

(122) Rice, H.; Mann, T. M.; Armstrong, S. J.; Price, M. E.; Green, A. C.; Tattersall, J. E. H. The Potential Role of Bioscavenger in the Medical Management of Nerve-Agent Poisoned Casualties. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *259*, 175–181.

(123) Karalliedde, L.; Baker, D.; Marrs, T. C. Organophosphate-Induced Intermediate Syndrome: Aetiology and Relationships with Myopathy. *Toxicological Reviews* **2006**, *25* (1), 1–14.

(124) Lotti, M.; Moretto, A. Organophosphate-Induced Delayed Polyneuropathy. *Toxicological Reviews* **2005**, *24* (1), 37–49.

(125) Testud, F.; Grillet, J.-P. Insecticides Organophosphorés, Carbamates, Pyréthrinoïdes de Synthèse et Divers. *EMC - Pathologie professionnelle et de l 'environnement* **2007**, *2* (2), 1–24.

(126) Jokanovic, M.; Kosanovic, M.; Stukalov, P. Organophosphate Induced Delayed Polyneuropathy. *Medicinal Chemistry Reviews - Online* **2004**, *1* (2), 123–131.

(127) Zaccheo, O.; Dinsdale, D.; Meacock, P. A.; Glynn, P. Neuropathy Target Esterase and Its Yeast Homologue Degrade Phosphatidylcholine to Glycerophosphocholine in Living Cells. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (23), 24024–24033.

(128) Nachon, F.; Brazzolotto, X.; Trovaslet, M.; Masson, P. Progress in the Development of Enzyme-Based Nerve Agent Bioscavengers. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, *206* (3), 536–544.

(129) Keeler, J. R.; Hurst, C. G.; Dunn, M. A. Pyridostigmine Used as a Nerve Agent Pretreatment Under Wartime Conditions. *Journal of the American Medical Association* **1991**, *266* (5), 693–695.

(130) Piratox, F. Fiche Piratox n ° 4 : « Organophosphorés : Neurotoxiques de Guerre et Pesticides ». **2010**, *33* (0), 1–18.

(131) Albuquerque, E. X.; Pereira, E. F. R.; Aracava, Y.; Fawcett, W. P.; Oliveira, M.; Randall, W. R.; Hamilton, T. A.; Kan, R. K.; Romano, J. A.; Adler, M. Effective Countermeasure against Poisoning by Organophosphorus Insecticides and Nerve Agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103* (35), 13220–13225.

(132) Eckert, S.; Eyer, P.; Worek, F. Reversible Inhibition of Acetylcholinesterase by Carbamates or Huperzine A Increases Residual Activity of the Enzyme upon Soman Challenge. *Toxicology* **2007**, *233* (1–3), 180–186.

(133) Amourette, C.; Lamproglou, I.; Barbier, L.; Fauquette, W.; Zoppe, A.; Viret, R.; Diserbo, M. Gulf War Illness: Effects of Repeated Stress and Pyridostigmine Treatment on Blood-Brain Barrier Permeability and Cholinesterase Activity in Rat Brain. *Behavioural Brain Research* **2009**, *203* (2), 207–214.

(134) Masson, P. Evolution of and Perspectives on Therapeutic Approaches to Nerve Agent Poisoning. *Toxicology letters* **2011**, *206* (1), 5–13.

(135) Kassa, J. Therapeutic and Neuroprotective Efficacy of Pharmacological Pretreatment and Antidotal Treatment of Acute Tabun or Soman Poisoning with the Emphasis on Pretreatment Drug PANPAL. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **2006**, *57* (4), 427–434.

(136) Leader, H.; Wolfe, A. D.; Chiang, P. K.; Gordon, R. K. Pyridophens : Binary Pyridostigmine - Aprophen Prodrugs with Differential Inhibition of Acetylcholinesterase , Butyrylcholinesterase , and Muscarinic Receptors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *10* (4), 902–910.

(137) Myers, T. M.; Sun, W.; Saxena, A.; Doctor, B. P.; Bonvillain, A. J.; Clark, M. G. Systemic Administration of the Potential Countermeasure Huperzine Reversibly Inhibits Central and Peripheral Acetylcholinesterase Activity without Adverse Cognitive-Behavioral Effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **2010**, *94* (3), 477–481.

(138) Coleman, B. R.; Ratcliffe, R. H.; Oguntayo, S. A.; Shi, X.; Doctor, B. P.; Gordon, R. K.; Nambiar, M. P. [+]-Huperzine A Treatment Protects against N-Methyl-d-Aspartate-Induced Seizure/Status Epilepticus in Rats. *Chemico-Biological Interactions* **2008**, *175* (1–3), 387–395.

(139) Lallement, G.; Demoncheaux, J. P.; Foquin, A.; Baubichon, D.; Galonnier, M.; Clarençon, D.; Dorandeu, F. Subchronic Administration of Pyridostigmine or Huperzine to Primates: Compared Efficacy against Soman Toxicity. *Drug and Chemical Toxicology* **2002**, *25* (3), 309–320.

(140) Wang, Y.; Wei, Y.; Oguntayo, S.; Doctor, B. P.; Nambiar, M. P. A Combination of [+] and [-]-Huperzine A Improves Protection against Soman Toxicity Compared to [+]-Huperzine A in Guinea Pigs. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, *203* (1), 120–124.

(141) Pereira, E. F. R.; Aracava, Y.; Alkondon, M.; Akkerman, M.; Merchenthaler, I.; Albuquerque, E. X. Molecular and Cellular Actions of Galantamine: Clinical Implications for Treatment of Organophosphorus Poisoning. *Journal of Molecular Neuroscience* **2010**, *40* (1–2), 196–203.

(142) Aracava, Y.; Pereira, E. F. R.; Akkerman, M.; Adler, M.; Albuquerque, E. X. Effectiveness of Donepezil, Rivastigmine, and ( )Huperzine A in Counteracting the Acute Toxicity of Organophosphorus Nerve Agents: Comparison with Galantamine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2009**, *331* (3), 1014–1024.

(143) Jokanović, M. Current Understanding of the Mechanisms Involved in Metabolic Detoxification of Warfare Nerve Agents. *Toxicology Letters* **2009**, *188* (1), 1–10.

(144) Lockridge, O.; Norgren, R. B.; Johnson, R. C.; Blake, T. A. Naturally Occurring Genetic Variants of Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase and Their Potential Impact on the Risk of Toxicity from Cholinesterase Inhibitors. *Chemical Research in Toxicology* **2016**, *29* (9), 1381–1392.

(145) Hatfield, M. J.; Umans, R. A.; Hyatt, J. L.; Edwards, C. C.; Wierdl, M.; Tsurkan, L.; Taylor, M. R.; Potter, P. M. Carboxylesterases: General Detoxifying Enzymes. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *259* (6068), 327–331.

(146) Li, B.; Sedlacek, M.; Manoharan, I.; Boopathy, R.; Duysen, E. G.; Masson, P.; Lockridge, O. Butyrylcholinesterase, Paraoxonase, and Albumin Esterase, but Not Carboxylesterase, Are Present in Human Plasma. *Biochemical Pharmacology* **2005**, *70* (11), 1673–1684.

(147) Sogorb, M. A.; Vilanova, E. Serum Albumins and Detoxication of Anti-Cholinesterase Agents. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, *187* (1–3), 325–329.

(148) Yeung, D. T.; Lenz, D. E.; Cerasoli, D. M. Human Paraoxonase I: A Potential Bioscavenger of Organophosphorus Nerve Agents BT - The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism; Mackness, B., Mackness, M., Aviram, M., Paragh, G., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2008; pp 151–170.

(149) Masson, P.; Nachon, F. Cholinesterase Reactivators and Bioscavengers for Pre- and Post-Exposure Treatments of Organophosphorus Poisoning. *Journal of Neurochemistry* **2017**, *142*, 26–40.

(150) Reed, B. A.; Sabourin, C. L.; Lenz, D. E. Human Butyrylcholinesterase Efficacy against Nerve Agent Exposure. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **2017**, *31* (5).

(151) Mumford, H.; Price, M. E.; Lenz, D. E.; Cerasoli, D. M. Post-Exposure Therapy with Human Butyrylcholinesterase Following Percutaneous VX Challenge in Guinea Pigs. *Clinical Toxicology* **2011**, *49* (4), 287–297.

(152) Lenz, D. E.; Maxwell, D. M.; Koplovitz, I.; Clark, C. R.; Capacio, B. R.; Cerasoli, D. M.; Federko, J. M.; Luo, C.; Saxena, A.; Doctor, B. P.; Olson, C. Protection against Soman or VX Poisoning by Human Butyrylcholinesterase in Guinea Pigs and Cynomolgus Monkeys. *Chemico-Biological Interactions* **2005**, *157–158*, 205–210.

(153) Saxena, A.; Sun, W.; Fedorko, J. M.; Koplovitz, I.; Doctor, B. P. Prophylaxis with Human Serum Butyrylcholinesterase Protects Guinea Pigs Exposed to Multiple Lethal Doses of Soman or VX. *Biochemical Pharmacology* **2011**, *81* (1), 164–169.

(154) Brazzolotto, X.; Wandhammer, M.; Ronco, C.; Trovaslet, M.; Jean, L.; Lockridge, O.; Renard, P. Y.; Nachon, F. Human Butyrylcholinesterase Produced in Insect Cells: Huprine-Based Affinity Purification and Crystal Structure. *FEBS Journal* **2012**, *279* (16), 2905–2916.

(155) Ilyushin, D. G.; Haertley, O. M.; Bobik, T. V.; Shamborant, O. G.; Surina, E. A.; Knorre, V. D.; Masson, P.; Smirnov, I. V.; Gabibov, A. G.; Ponomarenko, N. A. Recombinant Human Butyrylcholinesterase as a New-Age Bioscavenger Drug: Development of the Expression System. *Acta Naturae* **2013**, *5* (16), 73–84.

(156) Huang, Y.-J.; Huang, Y.; Baldassarre, H.; Wang, B.; Lazaris, A.; Leduc, M.; Bilodeau, A. S.; Bellemare, A.; Cote, M.; Herskovits, P.; Touati, M.; Turcotte, C.; Valeanu, L.; Lemee, N.; Wilgus, H.; Begin, I.; Bhatia, B.; Rao, K.; Neveu, N.; et al. Recombinant Human Butyrylcholinesterase from Milk of Transgenic Animals to Protect against Organophosphate Poisoning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104* (34), 13603–13608.

(157) Terekhov, S.; Smirnov, I.; Bobik, T.; Shamborant, O.; Zenkova, M.; Chernolovskaya, E.; Gladkikh, D.; Murashev, A.; Dyachenko, I.; Palikov, V.; Palikova, Y.; Knorre, V.; Belogurov, A.; Ponomarenko, N.; Blackburn, G. M.; Masson, P.; Gabibov, A. A Novel Expression Cassette Delivers Efficient Production of Exclusively Tetrameric Human Butyrylcholinesterase with Improved Pharmacokinetics for Protection against Organophosphate Poisoning. *Biochimie* **2015**, *118*, 51–59.

(158) Corbin, J. M.; Hashimoto, B. I.; Karuppanan, K.; Kyser, Z. R.; Wu, L.; Roberts, B. A.; Noe, A. R.; Rodriguez, R. L.; McDonald, K. A.; Nandi, S. Semicontinuous Bioreactor Production of Recombinant

Butyrylcholinesterase in Transgenic Rice Cell Suspension Cultures. *Frontiers in Plant Science* **2016**, *7* (March), 1–9.

(159) Grunwald, J.; Marcus, D.; Papier, Y.; Raveh, L.; Pittel, Z.; Ashani, Y. Large-Scale Purification and Long-Term Stability of Human Butyrylcholinesterase: A Potential Bioscavenger Drug. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1997**, *34* (2), 123–135.

(160) Wei, W.-L.; Qin, J.-C.; Sun, M.-J. High-Level Expression of Human Butyrylcholinesterase Gene in Bombyx Mori and Biochemical-Pharmacological Characteristic Study of Its Product. *Biochemical Pharmacology* **2000**, *60* (1), 121–126.

(161) Lockridge, O.; Larson, M. A.; Schopfer, L. M.; Hinrichs, S. H.; Nachon, F.; Brazzolotto, X.; Ronco, C.; Jean, L.; David, E. Compositions and Methods for the Purification and Production of Butyrylcholinesterase. WO2015077317, 2015.

(162) Ronco, C.; Renard, P. Y.; Jean, L.; Nachon, F.; Romieu, A. 7,11-Methanocycloocta[b]Quinoline Derivative as Highly Functionalizable Acetylcholinesterase Inhibitors. WO2011124712, 2011.

(163) CHEMFORASE. Hupresin https://www.chemforase.com/en/products/hupresin (accessed Jan 24, 2018).

(164) Larson, M. A.; Lockridge, O.; Hinrichs, S. H. Polyproline Promotes Tetramerization of Recombinant Human Butyrylcholinesterase. *Biochemical Journal* **2014**, *462* (2), 329–335.

(165) Terekhov, S. S.; Smirnov, I. V.; Shamborant, O. G.; Bobik, T. V.; Ilyushin, D. G.; Murashev, A. N.; Dyachenko, I. A.; Palikov, V. A.; Knorre, V. D.; Belogurov, A. A.; Ponomarenko, N. A.; Kuzina, E. S.; Genkin, D. D.; Masson, P.; Gabibov, A. G. Chemical Polysialylation and in Vivo Tetramerization Improve Pharmacokinetic Characteristics of Recombinant Human Butyrylcholinesterase-Based Bioscavengers. *Acta Naturae* **2015**, *7* (4), 136–141.

(166) Rosenberg, Y. J.; Saxena, A.; Sun, W.; Jiang, X.; Chilukuri, N.; Luo, C.; Doctor, B. P.; Lee, K. D. Demonstration of in Vivo Stability and Lack of Immunogenicity of a Polyethyleneglycol-Conjugated Recombinant CHO-Derived Butyrylcholinesterase Bioscavenger Using a Homologous Macaque Model. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, *187* (1–3), 279–286.

(167) Huang, Y. J.; Lundy, P. M.; Lazaris, A.; Huang, Y.; Baldassarre, H.; Wang, B.; Turcotte, C.; Côté, M.; Bellemare, A.; Bilodeau, A. S.; Brouillard, S.; Touati, M.; Herskovits, P.; Bégin, I.; Neveu, N.; Brochu, E.; Pierson, J.; Hockley, D. K.; Cerasoli, D. M.; et al. Substantially Improved Pharmacokinetics of Recombinant Human Butyrylcholinesterase by Fusion to Human Serum Albumin. *BMC Biotechnology* **2008**, *8*, 1–11.

(168) Pope, C.; Uchea, C.; Flynn, N.; Poindexter, K.; Geng, L.; Brimijoin, W. S.; Hartson, S.; Ranjan, A.; Ramsey, J. D.; Liu, J. In Vitro Characterization of Cationic Copolymer-Complexed Recombinant Human Butyrylcholinesterase. *Biochemical Pharmacology* **2015**, *98* (3), 531–539.

(169) Murthy, V.; Gao, Y.; Geng, L.; LeBrasseur, N. K.; White, T. A.; Parks, R. J.; Brimijoin, S. Physiologic and Metabolic Safety of Butyrylcholinesterase Gene Therapy in Mice. *Vaccine* **2014**, *32* (33), 4155–4162.

(170) Parikh, K.; Duysen, E. G.; Snow, B.; Jensen, N. S.; Manne, V.; Lockridge, O.; Chilukuri, N. Gene-Delivered Butyrylcholinesterase Is Prophylactic against the Toxicity of Chemical Warfare Nerve Agents and Organophosphorus Compounds. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2011**, *337* (1), 92–101.

(171) Gao, Y.; Geng, L.; Chen, V. P.; Brimijoin, S. Therapeutic Delivery of Butyrylcholinesterase by Brain-Wide Viral Gene Transfer to Mice. *Molecules* **2017**, *22* (7), 1145.

(172) Valdmanis, P. N.; Lisowski, L.; Kay, M. A. RAAV-Mediated Tumorigenesis: Still Unresolved after an AAV Assault. *Molecular Therapy* **2012**, *20* (11), 2014–2017.

(173) Pearson, S.; Jia, H.; Kandachi, K. China Approves First Gene Therapy. *Nature biotechnology* **2004**, *22* (1), 3–4.

(174) Ordentlich, A.; Barak, D.; Kronman, C.; Benschop, H. P.; De Jong, L. P. A.; Ariel, N.; Barak, R.; Segall, Y.; Velan, B.; Shafferman, A. Exploring the Active Center of Human Acetylcholinesterase with Stereomers of an Organophosphorus Inhibitor with Two Chiral Centers. *Biochemistry* **1999**, *38* (10), 3055–3066.

(175) Wandhammer, M.; Carletti, E.; Van Der Schans, M.; Gillon, E.; Nicolet, Y.; Masson, P.; Goeldner, M.; Noort, D.; Nachon, F. Structural Study of the Complex Stereoselectivity of Human Butyrylcholinesterase for the Neurotoxic V-Agents. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286* (19), 16783–16789.

(176) Cohen, O.; Kronman, C.; Raveh, L.; Mazor, O.; Ordentlich, A.; Shafferman, A. Comparison of Polyethylene Glycol-Conjugated Recombinant Human Acetylcholinesterase and Serum Human Butyrylcholinesterase as Bioscavengers of Organophosphate Compounds. *Molecular pharmacology* **2006**, *70* (3), 1121–1131.

(177) Pascual, L.; Sayed, S. El; Martínez-Máñez, R.; Costero, A. M.; Gil, S.; Gaviña, P.; Sancenón, F. Acetylcholinesterase-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles That Open in the Presence of Diisopropylfluorophosphate (a Sarin or Soman Simulant). *Organic Letters* **2016**, *18* (21), 5548–5551.

(178) Pang, Z.; Hu, C.-M. J.; Fang, R. H.; Luk, B. T.; Gao, W.; Wang, F.; Chuluun, E.; Angsantikul, P.; Thamphiwatana, S.; Lu, W.; Jiang, X.; Zhang, L. Detoxification of Organophosphate Poisoning Using Nanoparticle Bioscavengers. *ACS Nano* **2015**, *9* (6), 6450–6458.

(179) Kovarik, Z.; Katalinić, M.; Šinko, G.; Binder, J.; Holas, O.; Jung, Y. S.; Musilova, L.; Jun, D.; Kuča, K. Pseudo-Catalytic Scavenging: Searching for a Suitable Reactivator of Phosphorylated Butyrylcholinesterase. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, *187* (1–3), 167–171.

(180) Horn, G.; Wille, T.; Musilek, K.; Kuca, K.; Thiermann, H.; Worek, F. Reactivation Kinetics of 31 Structurally Different Bispyridinium Oximes with Organophosphate-Inhibited Human Butyrylcholinesterase. *Archives of Toxicology* **2015**, *89* (3), 405–414.

(181) Wiesner, J.; Kříž, Z.; Kuča, K.; Jun, D.; Koča, J. Why Acetylcholinesterase Reactivators Do Not Work in Butyrylcholinesterase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2010**, *25* (3), 318–322.

(182) Maček Hrvat, N.; Žunec, S.; Taylor, P.; Radić, Z.; Kovarik, Z. HI-6 Assisted Catalytic Scavenging of VX by Acetylcholinesterase Choline Binding Site Mutants. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *259* (6188), 148–153.

(183) Katalinić, M.; Maček Hrvat, N.; Baumann, K.; Morasi Piperčić, S.; Makarić, S.; Tomić, S.; Jović, O.; Hrenar, T.; Miličević, A.; Jelić, D.; Žunec, S.; Primožič, I.; Kovarik, Z. A Comprehensive Evaluation of Novel Oximes in Creation of Butyrylcholinesterase-Based Nerve Agent Bioscavengers. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2016**, *310*, 195–204.

(184) Sit, R. K.; Fokin, V. V.; Amitai, G.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Radi??, Z. Imidazole Aldoximes Effective in Assisting Butyrylcholinesterase Catalysis of Organophosphate Detoxification. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57* (4), 1378–1389.

(185) Radić, Z.; Dale, T.; Kovarik, Z.; Berend, S.; Garcia, E.; Zhang, L.; Amitai, G.; Green, C.; Radić, B.; Duggan, B. M.; Ajami, D.; Rebek, J.; Taylor, P. Catalytic Detoxification of Nerve Agent and Pesticide Organophosphates by Butyrylcholinesterase Assisted with Non-Pyridinium Oximes. *Biochemical Journal* **2013**, *450* (1), 231–242.

(186) Tsai, P.-C.; Fox, N.; Bigley, A. N.; Harvey, S. P.; Barondeau, D. P.; Raushel, F. M. Enzymes for the Homeland Defense: Optimizing Phosphotriesterase for the Hydrolysis of Organophosphate Nerve Agents. *Biochemistry* **2012**, *51* (32), 6463–6475.

(187) Bigley, A. N.; Xu, C.; Henderson, T. J.; Harvey, S. P.; Raushel, F. M. Enzymatic Neutralization of the Chemical Warfare Agent VX: Evolution of Phosphotriesterase for Phosphorothiolate Hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (28), 10426–10432.

(188) Tsai, P.-C.; Fox, N.; Bigley, A. N.; Harvey, S. P.; Barondeau, D. P.; Raushel, F. M. Enzymes for the Homeland Defense: Optimizing Phosphotriesterase for the Hydrolysis of Organophosphate Nerve Agents. *Biochemistry* **2012**, *51* (32), 6463–6475.

(189) Bigley, A. N.; Mabanglo, M. F.; Harvey, S. P.; Raushel, F. M. Variants of Phosphotriesterase for the Enhanced Detoxification of the Chemical Warfare Agent VR. *Biochemistry* **2015**, *54* (35), 5502–5512.

(190) Goldsmith, M.; Eckstein, S.; Ashani, Y.; Greisen, P.; Leader, H.; Sussman, J. L.; Aggarwal, N.; Ovchinnikov, S.; Tawfik, D. S.; Baker, D.; Thiermann, H.; Worek, F. Catalytic Efficiencies of Directly Evolved Phosphotriesterase Variants with Structurally Different Organophosphorus Compounds in Vitro. *Archives of Toxicology* **2016**, *90* (11), 2711–2724.

(191) Worek, F.; Seeger, T.; Reiter, G.; Goldsmith, M.; Ashani, Y.; Leader, H.; Sussman, J. L.; Aggarwal, N.; Thiermann, H.; Tawfik, D. S. Post-Exposure Treatment of VX Poisoned Guinea Pigs with the Engineered Phosphotriesterase Mutant C23: A Proof-of-Concept Study. *Toxicology Letters* **2014**, *231* (1), 45–54.

(192) Furlong, C. E.; Marsillach, J.; Jarvik, G. P.; Costa, L. G. Paraoxonases-1, -2 and -3: What Are Their Functions? *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *259*, 51–62.

(193) Wille, T.; Neumaier, K.; Koller, M.; Ehinger, C.; Aggarwal, N.; Ashani, Y.; Goldsmith, M.; Sussman, J. L.; Tawfik, D. S.; Thiermann, H.; Worek, F. Single Treatment of VX Poisoned Guinea Pigs with the Phosphotriesterase Mutant C23AL: Intraosseous versus Intravenous Injection. *Toxicology Letters* **2016**, *258*, 198–206.

(194) Szilasi, M.; Budai, M.; Budai, L.; Petrikovics, I. Nanoencapsulated and Microencapsulated Enzymes in Drug Antidotal Therapy. *Toxicology and Industrial Health* **2012**, *28* (6), 522–531.

(195) Nachon, F.; Carletti, E.; Wandhammer, M.; Nicolet, Y.; Schopfer, L. M.; Masson, P.; Lockridge, O. X-Ray Crystallographic Snapshots of Reaction Intermediates in the G117H Mutant of Human Butyrylcholinesterase, a Nerve Agent Target Engineered into a Catalytic Bioscavenger. *The Biochemical journal* **2011**, *434* (1), 73–82.

(196) Masson, P.; Nachon, F.; Broomfield, C. A.; Lenz, D. E.; Verdier, L.; Schopfer, L. M.; Lockridge, O. A Collaborative Endeavor to Design Cholinesterase-Based Catalytic Scavengers against Toxic Organophosphorus Esters. *Chemico-Biological Interactions* **2008**, *175* (1–3), 273–280.

(197) Masson, P.; Lushchekina, S. V. Emergence of Catalytic Bioscavengers against Organophosphorus Agents. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *259*, 319–326.

(198) Furlong, C. E.; Marsillach, J.; Jarvik, G. P.; Costa, L. G. Paraoxonases-1, -2 and -3: What Are Their Functions? *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *259*, 51–62.

(199) Rochu, D.; Chabrière, E.; Masson, P. Human Paraoxonase: A Promising Approach for Pre-Treatment and Therapy of Organophosphorus Poisoning. *Toxicology* **2007**, *233* (1–3 SPEC. ISS.), 47–59.

(200) Ashani, Y.; Leader, H.; Aggarwal, N.; Silman, I.; Worek, F.; Sussman, J. L.; Goldsmith, M. In Vitro Evaluation of the Catalytic Activity of Paraoxonases and Phosphotriesterases Predicts the Enzyme Circulatory Levels Required for in Vivo Protection against Organophosphate Intoxications. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *259*, 252–256.

(201) Worek, F.; Seeger, T.; Goldsmith, M.; Ashani, Y.; Leader, H.; Sussman, J. S.; Tawfik, D.; Thiermann, H.; Wille, T. Efficacy of the RePON1 Mutant IIG1 to Prevent Cyclosarin Toxicity in Vivo and to Detoxify Structurally Different Nerve Agents in Vitro. *Archives of Toxicology* **2014**, *88* (6), 1257–1266.

(202) Renault, F.; Carus, T.; Cléry-Barraud, C.; Elias, M.; Chabrière, E.; Masson, P.; Rochu, D. Integrative Analytical Approach by Capillary Electrophoresis and Kinetics under High Pressure Optimized for Deciphering Intrinsic and Extrinsic Cofactors That Modulate Activity and Stability of Human Paraoxonase (PON1). *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2010**, *878* (17–18), 1346–1355.

(203) Bajaj, P.; Tripathy, R. K.; Aggarwal, G.; Datusalia, A. K.; Sharma, S. S.; Pande, A. H. Refolded Recombinant Human Paraoxonase 1 Variant Exhibits Prophylactic Activity Against Organophosphate Poisoning. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2016**, *180* (1), 165–176.

(204) Otto, T. C.; Kasten, S. A.; Kovaleva, E.; Liu, Z.; Buchman, G.; Tolosa, M.; Davis, D.; Smith, J. R.; Balcerzak, R.; Lenz, D. E.; Cerasoli, D. M. Purification and Characterization of Functional Human Paraoxonase-1 Expressed in Trichoplusia Ni Larvae. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, *187* (1–3), 388–392.

(205) Boado, R. J.; Hui, E. K. W.; Lu, J. Z.; Pardridge, W. M. CHO Cell Expression, Long-Term Stability, and Primate Pharmacokinetics and Brain Uptake of an IgG-Paroxonase-1 Fusion Protein. *Biotechnology and Bioengineering* **2011**, *108* (1), 186–196.

(206) Duysen, E. G.; Parikh, K.; Aleti, V.; Manne, V.; Lockridge, O.; Chilukuri, N. Adenovirus-Mediated Human Paraoxonase1 Gene Transfer to Provide Protection against the Toxicity of the Organophosphorus Pesticide Toxicant Diazoxon. *Gene Therapy* **2011**, *18* (3), 250–257.

(207) Smirnov, I.; Belogurov, A.; Friboulet, A.; Masson, P.; Gabibov, A.; Renard, P. Y. Strategies for the Selection of Catalytic Antibodies against Organophosphorus Nerve Agents. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, *203* (1), 196–201.

(208) Legifrance.gouv.fr. Arrêté du 14 novembre 2015 autorisant l'utilisation de sulfate d'atropine, solution injectable 40 mg/20 mL PCA antidote des neurotoxiques organophosphorés https://www.legifrance.gouv.fr (accessed Jan 21, 2018).

(209) Rousseau, J. M.; Besse Bardot, I.; Franck, L.; Libert, N.; Lallement, G.; Clair, P. Intérêt de La Seringue Ineurope® Devant Une Intoxication Par Neurotoxique de Guerre. *Annales Francaises d'Anesthesie et de Reanimation* **2009**, *28* (5), 482–488.

(210) Grob, D. The Manifestations and Treatment of Poisoning Due to Nerve Gas and Other Organic Phosphate Anticholinesterase Compounds. *A.M.A Archives of Internal Medicine* **1956**, *98* (2), 221–239.

(211) Zwart, R.; Vijverberg, H. P. Potentiation and Inhibition of Neuronal Nicotinic Receptors by Atropine: Competitive and Noncompetitive Effects. *Molecular pharmacology* **1997**, *52* (5), 886–895.

(212) Geyer, B. C. *Nerve-Agent Mass Casualty Incidents*, 2nd ed.; Elsevier Inc., 2015.

(213) Delacour, H.; Dorandeu, F. Intoxications Aiguës Par Les Agents Neurotoxiques Organophosphorés: Modalités de Prise En Charge Médicale. *Reanimation* **2014**, *23*, 458–465.

(214) Rossetti, A. O.; Santoli, F. Traitement Pharmacologique de l'état de Mal Réfractaire. *Revue Neurologique* **2009**, *165* (4), 373–379.

(215) Dorandeu, F.; Dhote, F.; Barbier, L.; Baccus, B.; Testylier, G. Treatment of Status Epilepticus with Ketamine, Are We There Yet? *CNS Neuroscience & Therapeutics* **2013**, *19* (6), 411–427.

(216) McDonough, J. H.; Zoeffel, L. D.; McMonagle, J.; Copeland, T. L.; Smith, C. D.; Shih, T. M. Anticonvulsant Treatment of Nerve Agent Seizures: Anticholinergics versus Diazepam in Soman-Intoxicated Guinea Pigs. *Epilepsy Research* **1999**, *38* (1), 1–14.

(217) Dorandeu, F.; Barbier, L.; Dhote, F.; Testylier, G.; Carpentier, P. Ketamine Combinations for the Field Treatment of Soman-Induced Self-Sustaining Status Epilepticus. Review of Current Data and Perspectives. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, *203* (1), 154–159.

(218) Fang, Y.; Wang, X. Ketamine for the Treatment of Refractory Status Epilepticus. *Seizure* **2015**, *30*, 14–20.

(219) Newmark, J. Nerve Agents. In *Clinical Neurotoxicology*; Elsevier, 2009; pp 646–659.

(220) Vonesch, M.; Nachon, F.; Burnat, P. Actions et Efficacités Des Différentes Oximes Dans Le Traitement de l ' Intoxication Par Les Neurotoxiques Organophosphorés . *Médecine et armées* **2011**, *39* (5), 445–452.

(221) Jokanović, M.; Stojiljković, M. P. Current Understanding of the Application of Pyridinium Oximes as Cholinesterase Reactivators in Treatment of Organophosphate Poisoning. *European Journal of Pharmacology* **2006**, *553* (1–3), 10–17.

(222) Worek, F.; Aurbek, N.; Koller, M.; Becker, C.; Eyer, P.; Thiermann, H. Kinetic Analysis of Reactivation and Aging of Human Acetylcholinesterase Inhibited by Different Phosphoramidates. *Biochemical pharmacology* **2007**, *73* (11), 1807–1817.

(223) Worek, F.; Thiermann, H.; Wille, T. Oximes in Organophosphate Poisoning: 60 Years of Hope and Despair. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *259*, 93–98.

(224) Petroianu, G. A. The History of Cholinesterase Reactivation: Hydroxylamine and Pyridinium Aldoximes. *Pharmazie* **2012**, *67* (10), 874–879.

(225) Augustinsson, K.-B.; Grahn, M. On the Reversible Enzyme Inhibition by Tetraethyl Pyrophosphate (TEPP). *Acta Chemica Scandinavica* **1952**, *6*, 1477–1484.

(226) Wilson, I. B.; Ginsburg, S. A Powerful Reactivator of Alkylphosphate-Inhibited Acetylcholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1955**, *18*, 168–170.

(227) Petroianu, G. A. The History of Pyridinium Oximes as Nerve Gas Antidotes: The British Contribution. *Pharmazie* **2013**, *68* (11), 916–918.

(228) Wilson, I. B.; Ginsburg, S.; Nachmansohn, D. Alkyl Pyridinium Salt, 2-Carboxaldehyde Oximes and Process of Preparation. US2816113A, 1956.

(229) Hobbiger, F. Effect of the Nicotinhydroxamic Acid Methiodide on Human Plasma Choliensterase Inhibited by Organophosphates Containing a Dialkylphosphato Group. *British Journal of Pharmacology* **1955**, *10* (3), 356–362.

(230) Davies, D. R.; Green, A. L. The Kinetics of Reactivation, by Oximes, of Cholinesterase Inhibited by Organophosphorus Compounds. *Biochemical Journal* **1956**, *63* (4), 529–535.

(231) Childs, A. F.; Davies, D. R.; Green, A. L.; Rutland, J. P. The Reactivation by Oximes and Hydroxamic Acids of Cholinesterase Inhibited by Organo-Phosphorus Compounds. *British journal of pharmacology and chemotherapy* **1955**, *10* (4), 462–465.

(232) Green, A. L.; Smith, H. J. The Reactivation of Cholinesterase Inhibited with Organophosphorus Compounds. I. Reactivation by 2-Oxoaldoximes. *The Biochemical journal* **1958**, *68* (1), 28–31.

(233) Edwards, J. O.; Pearson, R. G. The Factors Determining Nucleophilic Reactivities. *Journal of the American Chemical Society* **1962**, *84* (1), 16–24.

(234) Namba, T.; Hiraki, K. Pam (Pyridine-2-Aldoxime Methiodide) Therapy for Alkylphosphate Poisoning. *Journal of the American Medical Association* **1958**, *166* (15), 1834–1839.

(235) Poziomek, E. J.; Hackley, B. E.; Steinberg, G. M. Pyridinium Aldoximes 1. *The Journal of Organic Chemistry* **1958**, *23* (5), 714–717.

(236) Hobbiger, F.; O'sullivan, D. G.; Sadler, P. W. New Potent Reactivators of Acetocholinesterase Inhibited by Tetraethyl Pyrophosphate. *Nature* **1958**, *182* (4648), 1498–1499.

(237) Hobbiger, F.; Sadler, P. W. Protection by Oximes of Bis-Pyridinium Ions against Lethal Diisopropyl Phosphonofluoridate Poisoning. *Nature* **1958**, *182* (4650), 1672–1673.

(238) Luettringhaus, A.; Hagedorn, I. [Quaternary Hydroxyiminomethylpyridinium Salts. The Dischloride Of Bis-(4-Hydroxyiminomethyl-1-Pyridinium-Methyl)-Ether (Lueh6), A New Reactivator Of Acetylcholinesterase Inhibited By Organic Phosphoric Acid Esters]. *Arzneimittel-Forschung* **1964**, *14*, 1–5.

(239) Eyer, E.; Hagedorn, I.; Klimmek, R.; Lippstreu, P.; Oidiges, H.; Steidl, I.; Sziniczs, L.; Worek, F. HLo 7 Dimethanesulfonate, a Potent Bispyridinium-Dioxime against Anticholinesterases. *Archives of Toxicology* **1992**, *66*, 603–621.

(240) Hagedorn, I.; Gündel, W. H.; Schoene, K. [Reactivation of Phosphorylated Acetylcholine Esterase with Oximes: Contribution to the Study of the Reaction Course]. *Arzneimittel-Forschung* **1969**, *19* (4), 603–606.

(241) Kenley, R. A.; Howd, R. A.; Mosher, C. W.; Winterle, J. S. Nonquaternary Cholinesterase Reactivators. Dialkylaminoalkyl Thioesters of Alpha-Ketothiohydroximic Acids as Reactivators of Diisopropyl Phosphorofluoridate-Inhibited Acetylcholinesterase. *Journal of Medicinal Chemistry* **1981**, *24* (10), 1124–1133.

(242) Kenley, R. A.; Bedford, C. D.; Howd, R. A.; Jackson, S. E. Reactivation of Ethyl Methylphosphonylated Eel Acetylcholinesterase in Vitro by 2PAM, H16, and a Series of Nonquaternary $\alpha$-Ketothiohydroximates. *Biochemical Pharmacology* **1985**, *34* (19), 3606–3608.

(243) Beznosko, B. K.; Voronov, I. B.; Feĭgman, E. E.; Krivenchuk, V. E. [Central Action of a New Cholinesterase Reactivator, Diethyxime]. *Farmakologiia i toksikologiia 40* (5), 531–535.

(244) Kenley, R. A.; Bedford, C. D.; Dailey, O. D.; Howd, R. A.; Miller, A. Nonquaternary Cholinesterase Reactivators. 2. Alpha-Heteroaromatic Aldoximes and Thiohydroximates as Reactivators of Ethyl Methylphosphonyl-Acetylcholinesterase in Vitro. *Journal of Medicinal Chemistry* **1984**, *27* (9), 1201–1211.

(245) Bedford, C. D.; Miura, M.; Bottaro, J. C.; Howd, R. A.; Nolen, H. W. Nonquaternary Cholinesterase Reactivators. 4. Dialkylaminoalkyl Thioesters of Alpha-Keto Thiohydroximic Acids as Reactivators of Ethyl Methylphosphonyl- and 1,2,2-Trimethylpropyl Methylphosphonyl-Acetylcholinesterase in Vitro. *Journal of Medicinal Chemistry* **1986**, *29* (9), 1689–1696.

(246) Benschop, H. P.; Van Oosten, A. M.; Platenburg, D. H. J. M.; Van Hooidonk, C. Isothiazolecarboxaldoximes and Methylated Derivatives as Therapeutic Agents in Poisoning by Organophosphorus Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* **1970**, *13* (6), 1208–1212.

(247) Benschop, H. P.; Hooidonk, C. Van; Jong, L. P. A. De; Kientz, C. E.; Berends, F.; Kepner, L. A.; Meeter, E.; Visser, R. P. L. S. Organophosphate Poisoning. 2.′ Thiadiazole-5-Carboxaldoximes. *Journal of Medicinal Chemistry* **1979**, *22* (1978), 1306–1313.

(248) Bedford, C. D.; Howd, R. A.; Dailey, O. D.; Miller, A.; Nolen, H. W.; Kenley, R. A.; Kern, J. R.; Winterle, J. S. Nonquaternary Cholinesterase Reactivators. 3. 3(5)-Substituted 1,2,4-Oxadiazol-5(3)-Aldoximes and 1,2,4-Oxadiazole-5(3)-Thiocarbohydroximates as Reactivators of Organophosphonate-Inhibited Eel and Human Acetylcholinesterase in Vitro. *Journal of Medicinal Chemistry* **1986**, *29* (11), 2174–2183.

(249) Degorre, F.; Kiffer, D.; Terrier, F. Sulfur Derivatives of 2-Oxopropanal Oxime as Reactivators of Organophosphate-Inhibited Acetylcholinesterase in Vitro: Synthesis and Structure-Reactivity Relationships. *Journal of Medicinal Chemistry* **1988**, *31* (4), 757–763.

(250) Worek, F.; Eyer, P.; Aurbek, N.; Szinicz, L.; Thiermann, H. Recent Advances in Evaluation of Oxime Efficacy in Nerve Agent Poisoning by in Vitro Analysis. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2007**, *219* (2–3), 226–234.

(251) Worek, F.; Wille, T.; Koller, M.; Thiermann, H. Reactivation Kinetics of a Series of Related Bispyridinium Oximes with Organophosphate-Inhibited Human Acetylcholinesterase—Structure–activity Relationships. *Biochemical Pharmacology* **2012**, *83* (12), 1700–1706.

(252) Terrier, F.; Rodriguez-Dafonte, P.; Le Guével, E.; Moutiers, G. Revisiting the Reactivity of Oximate $\alpha$-Nucleophiles with Electrophilic Phosphorus Centers. Relevance to Detoxification of Sarin, Soman and DFP under Mild Conditions. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (23), 4352–4363.

(253) Hörnberg, A.; Artursson, E.; Wärme, R.; Pang, Y.-P.; Ekström, F. Crystal Structures of Oxime-Bound Fenamiphos-Acetylcholinesterases: Reactivation Involving Flipping of the His447 Ring to Form a Reactive Glu334–His447–oxime Triad. *Biochemical Pharmacology* **2010**, *79* (3), 507–515.

(254) Ekström, F.; Hörnberg, A.; Artursson, E.; Hammarström, L.-G.; Schneider, G.; Pang, Y.-P. Structure of HI-6*sarin-Acetylcholinesterase Determined by X-Ray Crystallography and Molecular Dynamics Simulation: Reactivator Mechanism and Design. *PloS one* **2009**, *4* (6), e5957.

(255) Hörnberg, A.; Tunemalm, A. K.; Ekström, F. Crystal Structures of Acetylcholinesterase in Complex with Organophosphorus Compounds Suggest That the Acyl Pocket Modulates the Aging Reaction by Precluding the Formation of the Trigonal Bipyramidal Transition State. *Biochemistry* **2007**, *46* (16), 4815–4825.

(256) Allgardsson, A.; Berg, L.; Akfur, C.; Hörnberg, A.; Worek, F.; Linusson, A.; Ekström, F. J. Structure of a Prereaction Complex between the Nerve Agent Sarin, Its Biological Target Acetylcholinesterase, and the Antidote HI-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, *113* (20), 5514–5519.

(257) Chandar, N. B.; Lo, R.; Ganguly, B. Quantum Chemical and Steered Molecular Dynamics Studies for One Pot Solution to Reactivate Aged Acetylcholinesterase with Alkylator Oxime. *Chemico-Biological Interactions* **2014**, *223*, 58–68.

(258) Driant, T.; Nachon, F.; Ollivier, C.; Renard, P.-Y.; Derat, E. On the Influence of the Protonation States of Active Site Residues on AChE Reactivation: A QM/MM Approach. *ChemBioChem* **2017**, *18* (7), 666–675.

(259) Artursson, E.; Andersson, P. O.; Akfur, C.; Linusson, A.; Börjegren, S.; Ekström, F. Catalytic-Site Conformational Equilibrium in Nerve-Agent Adducts of Acetylcholinesterase: Possible Implications for the HI-6 Antidote Substrate Specificity. *Biochemical pharmacology* **2013**, *85* (9), 1389–1397.

(260) Wilhelm, C. M.; Snider, T. H.; Babin, M. C.; Jett, D. A.; Platoff, G. E.; Yeung, D. T. A Comprehensive Evaluation of the Efficacy of Leading Oxime Therapies in Guinea Pigs Exposed to Organophosphorus Chemical Warfare Agents or Pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2014**, *281* (3), 254–265.

(261) Schoene, K.; Steinhanses, J.; Oldiges, H. Protective Activity of Pyridinium Salts against Soman Poisoning in Vivo and in Vitro. *Biochemical Pharmacology* **1976**, *25* (17), 1955–1958.

(262) Clement, J. Toxicology and Pharmacology of Bispyridinium Oximes Insight into the Mechanism of Action vs Soman Poisoning in Vivo. *Fundamental and Applied Toxicology* **1981**, *1* (2), 193–202.

(263) Van Helden, H. P. M.; Wiel, H. J.; Wolthuis, O. L. Therapy of Organophosphate Poisoning: The Marmoset as a Model for Man. *British Journal of Pharmacology* **1983**, *78* (3), 579–589.

(264) Van Helden, H. P. M.; Van Der Wiel, H. J.; De Lange, J.; Busker, R. W.; Melchers, B. P. C.; Wolthuis, O. L. Therapeutic Efficacy of HI-6 in Soman-Poisoned Marmoset Monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1992**, *115* (1), 50–56.

(265) Hamilton, M. G.; Lundy, P. M. HI-6 Therapy of Soman and Tabun Poisoning in Primates and Rodents. *Archives of Toxicology* **1989**, *63* (2), 144–149.

(266) Melchers, B. P. C.; van der Laaken, A. L.; Busker, R. W.; Bruijnzeel, P. L. B.; Van Helden, H. P. M. Non-Reactivating Effects of HI-6 on Hippocampal Neurotransmission. *Archives of Toxicology* **1994**, *69* (2), 118–126.

(267) Clement, J. G. Pharmacological Actions of HS-6, an Oxime, on the Neuromuscular Junction. *European Journal of Pharmacology* **1979**, *53* (2), 135–141.

(268) Van Helden, H. P. M.; Busker, R. W.; Melchers, B. P. C.; Bruijnzeel, P. L. B. Pharmacological Effects of Oximes: How Relevant Are They? *Archives of Toxicology* **1996**, *70* (12), 779–786.

(269) Kirsch, D.; Hauser, W.; Weger, N. Effect of the Bispyridinium Oximes Hgg12 and Hgg42 and Ganglion Blocking Agents on Synaptic Transmission and Nad(p)Hfluorescence in the Superior Cervical Ganglion of the Rat after Soman Poisoning in Vitro. *Toxicological Sciences* **1981**, *1* (2), 169–176.

(270) Kloog, Y.; Galron, R.; Sokolovsky, M. Bisquaternary Pyridinium Oximes as Presynaptic Agonists and Postsynaptic Antagonists of Muscarinic Receptors. *Journal of Neurochemistry* **1986**, *46* (3), 767–772.

(271) Kuhnen-Clausen, D.; Hagedorn, I.; Gross, G.; Bayer, H.; Hucho, F. Interactions of Bisquaternary Pyridine Salts (H-Oximes) with Cholinergic Receptors. *Archives of Toxicology* **1983**, *54* (3), 171–179.

(272) Lundy, P. M.; Tremblay, K. P. Ganglion Blocking Properties of Some Bispyridinium Soman Antagonists. *European Journal of Pharmacology* **1979**, *60* (1), 47–53.

(273) SU, C.; TANG, C.; MA, C.; SHIH, Y.; LIU, C.; WU, M. Quantitative Structure-Activity Relationships and Possible Mechanisms of Action of Bispyridinium Oximes as Antidotes against Pinacolyl Methylphosphonofluoridate. *Fundamental and Applied Toxicology* **1983**, *3* (4), 271–277.

(274) Reithmann, C.; Berger, H.-J.; Hilf, G.; Werdan, K. The Oxime HGG-12 as a Muscarinic Acetylcholine Receptor Antagonist without Intrinsic Activity in Cardiac Membranes. *Archives of Toxicology* **1991**, *65* (6), 518–523.

(275) Tuček, S.; Proška, J. Allosteric Modulation of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **1995**, *16* (6), 205–212.

(276) Valdes, J. J.; Tsung-Ming Shih; Whalley, C. Competitive Binding of the Oximes HI-6 and 2-PAM with Regional Brain Muscarinic Receptors. *Biochemical Pharmacology* **1985**, *34* (15), 2815–2818.

(277) Melchers, B. P. C.; Van der Laaken, A. L.; Van Helden, H. P. M. On the Mechanism Whereby HI-6 Improves Neuromuscular Function after Oxime-Resistant Acetylcholinesterase Inhibition and Subsequent Impairment of Neuromuscular Transmission. *European Journal of Pharmacology* **1991**, *200* (2–3), 331–337.

(278) Øydvin, O. K.; Tansø, R.; Aas, P. Pre-Junctional Effects of Oximes on [3H]-Acetylcholine Release in Rat Hippocampal Slices during Soman Intoxication. *European Journal of Pharmacology* **2005**, *516* (3), 227–234.

(279) Aas, P. In Vitro Effects of Toxogonin, HI-6 and HLö-7 on the Release of [3H]Acetylcholine from Peripheral Cholinergic Nerves in Rat Airway Smooth Muscle. *European Journal of Pharmacology* **1996**, *301* (1–3), 59–66.

(280) Alkondon, M.; Rao, K. S.; Albuquerque, E. X. Acetylcholinesterase Reactivators Modify the Functional Properties of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Ion Channel. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1988**, *245* (2), 543–556.

(281) Amitai, G.; Kloog, Y.; Balderman, D.; Sokolovsky, M. The Interaction of Bis-Pyridinium Oximes with Mouse Brain Muscarinic Receptor. *Biochemical Pharmacology* **1980**, *29* (4), 483–488.

(282) Henis, Y. I.; Kloog, Y.; Sokolovsky, M. Allosteric Interactions of Muscarinic Receptors and Their Regulation by Other Membrane Proteins. In *The Muscarinic Receptors*; Brown, J. H., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 1989; pp 377–418.

(283) Kloog, Y.; Sokolovsky, M. Allosteric Interactions between Muscarinic Agonist Binding Sites and Effector Sites Demonstrated by the Use of Bisquaternary Pyridinium Oximes. *Life sciences* **1985**, *36* (22), 2127–2136.

(284) Ellis, J.; Seidenberg, M. Two Allosteric Modulators Interact at a Common Site on Cardiac Muscarinic Receptors. *Molecular pharmacology* **1992**, *42* (4), 638–641.

(285) Kusic, R.; Jovanovic, D.; Randjelovic, S.; Joksovic, D.; Todorovic, V.; Boskovic, B.; Jokanovic, M.; Vojvodic, V. HI-6 in Man: Efficacy of the Oxime in Poisoning by Organophosphorus Insecticides. *Human and Experimental Toxicology* **1991**, *10* (2), 113–118.

(286) Jovanovic, D. Pharmacokinetics of Pralidoxime Chloride. *Archives of Toxicology* **1989**, 416–418.

(287) Zanetti, M. E.; Tennent, D. M.; Soc, P.; Exp, B.; Sidell, F. R.; Groff, W. A. Toxogonin : Blood Levels and Side Effects after Intramuscular Administration in Man. **1970**, *59* (6), 1–5.

(288) Eyer, P. The Role of Oximes in the Management of Organophosphorus Pesticide Poisoning. *Toxicological Reviews* **2003**, *22* (3), 165–190.

(289) Clement, J. G.; Bailey, D. G.; Madill, H. D.; Tran, L. T.; Spence, J. D. The Acetylcholinesterase Oxime Reactivator HI-6 in Man: Pharmacokinetics and Tolerability in Combination with Atropine. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* **1995**, *16* (5), 415–425.

(290) Eyer, P. A.; Worek, F. Oximes. In *Chemical Warfare Agents*; John Wiley & Sons, Ltd, 2007; pp 305–329.

(291) Stemler, F. W.; Tezak-reid, T. M.; Mccluskey, M. P.; Kaminskis, A.; Corcoran, K. D.; Shih, M. L.; Stewart, J. R.; Wade, J. V.; Hayward, I. J. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Oximes in Unanesthetized Pigs. *Toxicological Sciences* **1991**, *16* (3), 548–558.

(292) Ellin, R. I.; Groff, W. A.; Sidell, F. R. Passage of Pyridinium Oximes into Human Red Cells. *Biochemical Pharmacology* **1974**, *23* (19), 2663–2670.

(293) Garrigue, H.; Maurizis, J. C.; Madelmont, J. C.; Nicolas, C.; Meyniel, J. M.; Louvel, A.; Demerseman, P.; Sentenac-Roumanou, H.; Veyre, A. Disposition and Metabolism of Acetylcholinesterase Reactivators 2PAM-I, TMB4 and R665 in Rats Submitted to Organophosphate Poisoning. *Xenobiotica* **1991**, *21* (5), 583–595.

(294) Garrigue, H.; Maurizis, J. C.; Nicolas, C.; Madelmont, J. C.; Godeneche, D.; Hulot, T.; Morge, X.; Demerseman, P.; Sentenac-Roumanou, H.; Veyre, A. Disposition and Metabolism of Two Acetylcholinesterase Reactivators, Pyrimidoxime and HI6, in Rats Submitted to Organophosphate Poisoning. *Xenobiotica* **1990**, *20* (7), 699–709.

(295) Maurizis, J. C.; Ollier, M.; Nicolas, C.; Madelmont, J. C.; Garrigue, H.; Veyre, A. In Vitro Binding of Oxime Acetylcholinesterase Reactivators to Proteoglycans Synthesized by Cultured Chondrocytes and Fibroblasts. *Biochemical Pharmacology* **1992**, *44* (10), 1927–1933.

(296) Sidell, F. R.; Groff, W. A.; Kaminskis, A. Toxogonin and Pralidoxime: Kinetic Comparison after Intravenous Administration to Man. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1972**, *61* (11), 1765–1769.

(297) Josselson, J.; Sidell, F. R. Effect of Intravenous Thiamine on Pralidoxime Kinetics. *Clinical pharmacology and therapeutics* **1978**, *24* (1), 95–100.

(298) Willems, J. L.; Langenberg, J. P.; Verstraete, A. G.; De Loose, M.; Vanhaesebroeck, B.; Goethals, G.; Belpaire, F. M.; Buylaert, W. A.; Vogelaers, D.; Colardyn, F. Plasma Concentrations of Pralidoxime Methylsulphate in Organophosphorus Poisoned Patients. *Archives of Toxicology* **1992**, *66* (4), 260–266.

(299) Bentur, Y.; Nutenko, I.; Tsipiniuk, A.; Raikhlin-Eisenkraft, B.; Taitelman, U. Pharmacokinetics of Obidoxime in Organophosphate Poisoning Associated with Renal Failure. *Journal of toxicology. Clinical toxicology* **1993**, *31* (2), 315–322.

(300) Voicu, V. A.; Bajgar, J.; Medvedovici, A.; Radulescu, F. S.; Miron, D. S. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Some Oximes and Associated Therapeutic Consequences: A Critical Review. *Journal of Applied Toxicology* **2010**, *30* (8), 719–729.

(301) Antonijevic, B.; Stojiljkovic, M. P. Unequal Efficacy of Pyridinium Oximes in Acute Organophosphate Poisoning. *Clinical Medicine and Research* **2007**, *5* (1), 71–82.

(302) Voicu, V.; Rădulescu, F. Ş.; Medvedovici, A. Relationships between the Antidotal Efficacy and Structure, PK/PD Parameters and Bio-Relevant Molecular Descriptors of AChE Reactivating Oximes: Inclusion and Integration to Biopharmaceutical Classification Systems. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **2014**, 1–15.

(303) Eyer, P.; Ladstetter, B.; Schäfer, W.; Sonnenbichler, J. Studies on the Stability and Decomposition of the Hagedorn-Oxime HLö-7 in Aqueous Solution. *Archives of Toxicology* **1989**, *63* (1), 59–67.

(304) Dixon, H.; Clark, A. P. Z.; Cabell, L. A.; Mcdonough, J. A. MMB4 DMS Nanoparticle Suspension Formulation With Enhanced Stability for the Treatment of Nerve Agent Intoxication. *International Journal of Toxicology* **2013**, *32*, 18S–29S.

(305) Clark, A. P.; Cabell, L. A.; Mcdonough, J. A. Non-Newtonian Suspension Formulations For Improved Stability And Delivery of Autoinjectable CBRN Countermeasures. *Military Medical Science Letters* **2014**, *83* (1), 18–27.

(306) Eyer, P.; Hagedorn, I.; Ladstetter, B. Study on the Stability of the Oxime HI 6 in Aqueous Solution. *Archives of Toxicology* **1988**, *62* (2–3), 224–226.

(307) Ellin, R. I. Stability of Concentrated Aqueous Solutions of Pralidoxime Chloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1982**, *71* (9), 1057–1059.

(308) Rubnov, S.; Amisar, S.; Levy, D.; Muchtar, S.; Schneider, H. Stability of Trimedoxime in Concentrated Acidic Injectable Solutions. *Military medicine* **1999**, *164* (1), 55–58.

(309) Rubnov, S.; Shats, I.; Levy, D.; Amisar, S.; Schneider, H. Autocatalytic Degradation and Stability of Obidoxime. **1999**, 9–14.

(310) Schroeder, A.; Digiovanni, J. H.; Heiffer, H. Pralidoxime Chloride Stability-Indicating Assay and Analysis of Solution Samples Stored at Room Temperature for Ten Years. **1989**, 132–136.

(311) Lin, A. J.; Klayman, D. L. Stability Studies of Bis(Pyridiniumaldoxime) Reactivators of Organophosphate-Inhibited Acetylcholinesterase. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1986**, *75* (8), 797–799.

(312) Enander, I.; Sundwall, A.; Sörbo, B. Metabolic Studies on N-Methylpyridinium-2-Aldoxime—III. Experiments with the 14C-Labelled Compound. *Biochemical Pharmacology* **1962**, *11* (4–5), 377–382.

(313) Lusiak, B. D.; Kobs, D. J.; Hong, S. P.; Burback, B. L.; Johnson, J. D. Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of 14C-MMB4 DMS Administered Intramuscularly to Sprague-Dawley Rats and New Zealand White Rabbits. *International journal of toxicology* **2013**, *32* (4 Suppl), 88S–98S.

(314) Ligtenstein, D. A.; Wils, E. R. J.; Kossen, S. P.; Hulst, A. G. Identification of Two Metabolites of the Cholinesterase Reactivator HI-6 Isolated from Rat Urine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1987**, *39* (1), 17–23.

(315) Spohrer, U.; Thiermann, H.; Klimmek, R.; Eyer, P. Pharmacokinetics of the Oximes HI 6 and HLo 7 in Dogs after i.m. Injection with Newly Developed Dry/Wet Autoinjectors. *Archives of toxicology* **1994**, *68* (8), 480–489.

(316) Worek, F.; Aurbek, N.; Thiermann, H. Reactivation of Organophosphate-Inhibited Human AChE by Combinations of Obidoxime and HI 6 in Vitro. *Journal of Applied Toxicology* **2007**, *27*, 582–588.

(317) Worek, F.; Koller, M.; Thiermann, H.; Wille, T. Reactivation of Nerve Agent-Inhibited Human Acetylcholinesterase by Obidoxime, HI-6 and Obidoxime+HI-6: Kinetic in Vitro Study with Simulated Nerve Agent Toxicokinetics and Oxime Pharmacokinetics. *Toxicology* **2016**, *350–352*, 25–30.

(318) Kassa, J.; Karasova, J. Z.; Sepsova, V.; Caisberger, F. The Benefit of Combinations of Oximes for the Reactivating and Therapeutic Efficacy of Antidotal Treatment of Sarin Poisoning in Rats and Mice. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* **2011**, *109* (1), 30–34.

(319) Bajgar, J.; Karasova, J. Z.; Kassa, J.; Cabal, J.; Fusek, J.; Blaha, V.; Tesarova, S. Tabun-Inhibited Rat Tissue and Blood Cholinesterases and Their Reactivation with the Combination of Trimedoxime and HI-6 in Vivo. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, *187* (1–3), 287–290.

(320) Kassa, J.; Karasova, J. Z.; Pavlikova, R.; Misik, J.; Caisberger, F.; Bajgar, J. The Influence of Combinations of Oximes on the Reactivating and Therapeutic Efficacy of Antidotal Treatment of Tabun Poisoning in Rats and Mice. *Journal of Applied Toxicology* **2010**, *30* (2), 120–124.

(321) Voicu, V. A.; Thiermann, H.; Rădulescu, F. Ş.; Mircioiu, C.; Miron, D. S. The Toxicokinetics and Toxicodynamics of Organophosphonates versus the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Oxime Antidotes: Biological Consequences. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* **2010**, *106* (2), 73–85.

(322) Bartosova, L.; Kuca, K.; Kunesova, G.; Jun, D. The Acute Toxicity of Acetylcholinesterase Reactivators in Mice in Relation to Their Structure. *Neurotoxicity Research* **2006**, *9* (4), 291–296.

(323) Musilek, K.; Holas, O.; Misik, J.; Pohanka, M.; Novotny, L.; Dohnal, V.; Opletalova, V.; Kuca, K. Monooxime-Monocarbamoyl Bispyridinium Xylene-Linked Reactivators of Acetylcholinesterase-Synthesis, In Vitro and Toxicity Evaluation, and Docking Studies. *ChemMedChem* **2010**, *5* (2), 247–254.

(324) Voicu, V.; Rădulescu, F. Ş.; Medvedovici, A. Toxicological Considerations of Acetylcholinesterase Reactivators. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **2013**, *9* (1), 31–50.

(325) Snider, T. H.; Babin, M. C.; Jett, D. A.; Platoff Jr., G. E.; Yeung, D. T. Toxicity and Median Effective Doses of Oxime Therapies against Percutaneous Organophosphorus Pesticide and Nerve Agent Challenges in the Hartley Guinea Pig. *The Journal of Toxicological Sciences* **2016**, *41* (4), 511–521.

(326) Ashani, Y.; Gentry, M. K.; Doctor, B. P. Differences in Conformational Stability between Native and Phosphorylated Acetylcholinesterase As Evidenced by a Monoclonal Antibody. *Biochemistry* **1990**, *29* (10), 2456–2463.

(327) Wille, T.; Ekström, F.; Lee, J. C.; Pang, Y. P.; Thiermann, H.; Worek, F. Kinetic Analysis of Interactions between Alkylene-Linked Bis-Pyridiniumaldoximes and Human Acetylcholinesterases Inhibited by Various Organophosphorus Compounds. *Biochemical Pharmacology* **2010**, *80* (6), 941–946.

(328) Becker, C.; Worek, F.; John, H. Chromatographic Analysis of Toxic Phosphylated Oximes (POX): A Brief Overview. *Drug Testing and Analysis* **2010**, *2* (10), 460–468.

(329) Ashani, Y.; Bhattacharjee, A. K.; Leader, H.; Saxena, A.; Doctor, B. P. Inhibition of Cholinesterases with Cationic Phosphonyl Oximes Highlights Distinctive Properties of the Charged Pyridine Groups of Quaternary Oxime Reactivators. *Biochemical Pharmacology* **2003**, *66* (2), 191–202.

(330) Herkenhoff, S.; Szinicz, L.; Rastogi, V. K.; Cheng, T.-C.; DeFrank, J. J.; Worek, F. Effect of Organophosphorus Hydrolysing Enzymes on Obidoxime-Induced Reactivation of Organophosphate-Inhibited Human Acetylcholinesterase. *Archives of toxicology* **2004**, *78* (6), 338–343.

(331) Stenzel, J.; Worek, F.; Eyer, P. Preparation and Characterization of Dialkylphosphoryl-Obidoxime Conjugates, Potent Anticholinesterase Derivatives That Are Quickly Hydrolyzed by Human Paraoxonase (PON1192Q). *Biochemical Pharmacology* **2007**, *74* (9), 1390–1400.

(332) Kiderlen, D.; Eyer, P.; Worek, F. Formation and Disposition of Diethylphosphoryl-Obidoxime, a Potent Anticholinesterase That Is Hydrolyzed by Human Paraoxonase (PON1). *Biochemical pharmacology* **2005**, *69* (12), 1853–1867.

(333) Kiderlen, D.; Worek, F.; Klimmek, R.; Eyer, P. The Phosphoryl Oxime-Destroying Activity of Human Plasma. *Archives of toxicology* **2000**, *74* (1), 27–32.

(334) Duffy, F. H.; Burchfiel, J. L.; Bartels, P. H.; Gaon, M.; Sim, V. M. Long-Term Effects of an Organophosphate upon the Human Electroencephalogram. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1979**, *47* (1), 161–176.

(335) Burchfiel, J. L.; Duffy, F. H. Organophosphate Neurotoxicity: Chronic Effects of Sarin on the Electroencephalogram of Monkey and Man. *Neurobehavioral Toxicology & Teratology* **1982**, *4* (6), 767–778.

(336) Rosenstock, L.; Keifer, M.; Daniell, W. E.; McConnell, R.; Claypoole, K. Chronic Central Nervous System Effects of Acute Organophosphate Pesticide Intoxication. *The Lancet* **1991**, *338* (8761), 223–227.

(337) Abou-Donia, M. B.; Siracuse, B.; Gupta, N.; Sobel Sokol, A. Sarin (GB, O-Isopropyl Methylphosphonofluoridate) Neurotoxicity: Critical Review. *Critical Reviews in Toxicology* **2016**, *46* (10), 845–875.

(338) Kamel, F.; Hoppin, J. A. Association of Pesticide Exposure with Neurologic Dysfunction and Disease. *Environmental Health Perspectives* **2004**, *112* (9), 950–958.

(339) Deshpande, L. S.; Phillips, K.; Huang, B.; DeLorenzo, R. J. Chronic Behavioral and Cognitive Deficits in a Rat Survival Model of Paraoxon Toxicity. *NeuroToxicology* **2014**, *44* (9), 352–357.

(340) Flannery, B. M.; Bruun, D. A.; Rowland, D. J.; Banks, C. N.; Austin, A. T.; Kukis, D. L.; Li, Y.; Ford, B. D.; Tancredi, D. J.; Silverman, J. L.; Cherry, S. R.; Lein, P. J. Persistent Neuroinflammation and Cognitive Impairment in a Rat Model of Acute Diisopropylfluorophosphate Intoxication. *Journal of Neuroinflammation* **2016**, *13* (1), 1–16.

(341) Pessah, I. N.; Rogawski, M. A.; Tancredi, D. J.; Wulff, H.; Zolkowska, D.; Bruun, D. A.; Hammock, B. D.; Lein, P. J. Models to Identify Treatments for the Acute and Persistent Effects of Seizure-Inducing Chemical Threat Agents. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2016**, *1378* (1), 124–136.

(342) Chao, L. L.; Reeb, R.; Esparza, I. L.; Abadjian, L. R. Associations between the Self-Reported Frequency of Hearing Chemical Alarms in Theater and Regional Brain Volume in Gulf War Veterans. *Neurotoxicology* **2016**, *53* (1), 246–256.

(343) Nishiwaki, Y.; Maekawa, K.; Ogawa, Y.; Asukai, N.; Minami, M.; Omae, K.; Yamaguchi, T.; Hirata, M.; Takahashi, M.; Katsumata, M.; Sano, Y.; Imai, A.; Chin, R. R.; Saito, T. Effects of Sarin on the Nervous System in Rescue Team Staff Members and Police Officers 3 Years after the Tokyo Subway Sarin Attack. *Environmental Health Perspectives* **2001**, *109* (11), 1169–1173.

(344) Murata, K.; Araki, S.; Yokoyama, K.; Okumura, T.; Ishimatsu, S.; Takasu, N.; White, R. F. Asymptomatic Sequelae to Acute Sarin Poisoning in the Central and Autonomic Nervous System 6 Months after the Tokyo Subway Attack. *Journal of Neurology* **1997**, *244* (10), 601–606.

(345) Yanagisawa, N.; Morita, H.; Nakajima, T. Sarin Experiences in Japan: Acute Toxicity and Long-Term Effects. *Journal of the Neurological Sciences* **2006**, *249* (1), 76–85.

(346) Yokoyama, K.; Araki, S.; Murata, K.; Nishikitani, M.; Okumura, T.; Ishimatsu, S.; Takasu, N. Chronic Neurobehavioral and Central and Autonomic Nervous System Effects of Tokyo Subway Sarin Poisoning. *Journal of Physiology Paris* **1998**, *92* (3–4), 317–323.

(347) Miyaki, K.; Nishiwaki, Y.; Maekawa, K.; Ogawa, Y.; Asukai, N.; Yoshimura, K.; Etoh, N.; Matsumoto, Y.; Kikuchi, Y.; Kumagai, N.; Omae, K. Effects of Sarin on the Nervous System of Subway Workers Seven Years after the Tokyo Subway Sarin Attack. *Journal of Occupational Health* **2005**, *47* (4), 299–304.

(348) Sakurada, K.; Matsubara, K.; Shimizu, K.; Shiono, H.; Seto, Y.; Tsuge, K.; Yoshino, M.; Sakai, I.; Mukoyama, H.; Takatori, T. Pralidoxime Iodide (2-PAM) Penetrates across the Blood-Brain Barrier. *Neurochemical Research* **2003**, *28* (9), 1401–1407.

(349) Nagao, M.; Takatori, T.; Matsuda, Y.; Nakajima, M.; Iwase, H.; Iwadate, K. Definitive Evidence for the Acute Sarin Poisoning Diagnosis in the Tokyo Subway. *Toxicology and applied pharmacology* **1997**, *144* (1), 198–203.

(350) Lorke, D. E.; Kalasz, H.; Petroianu, G. a; Tekes, K. Entry of Oximes into the Brain: A Review. *Current medicinal chemistry* **2008**, *15* (8), 743–753.

(351) Firemark, H.; Barlow, C. F.; Roth, L. J. The Penetration Of 2-Pam-C14 Into Brain And The Effect Of Cholinesterase Inhibitors On Its Transport. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **1964**, *145*, 252–265.

(352) Falb, A.; Erdmann, W. D. [Penetration of 14C-Obidoxime through the so-Called Blood-Brain Barrier of Mice and Rats]. *Archiv fur Toxikologie* **1969**, *24* (2), 123–132.

(353) Cassel, G.; Karlsson, L.; Waara, L.; Ang, K. W.; Göransson-Nyberg, A. Pharmacokinetics and Effects of HI 6 in Blood and Brain of Soman-Intoxicated Rats: A Microdialysis Study. *European Journal of Pharmacology* **1997**, *332* (1), 43–52.

(354) Bajgar, J. Organophosphates/Nerve Agent Poisoning: Mechanism of Action, Diagnosis, Prophylaxis, and Treatment. *Advances in clinical chemistry* **2004**, *38*, 151–216.

(355) Yang, J.; Fan, L.; Wang, F.; Luo, Y.; Sui, X.; Li, W.; Zhang, X.; Wang, Y. Rapid-Releasing of HI-6 via Brain-Targeted Mesoporous Silica Nanoparticles for Nerve Agent Detoxification. *Nanoscale* **2016**, *8* (18), 9537–9547.

(356) Pashirova, T. N.; Zueva, I. V.; Petrov, K. A.; Babaev, V. M.; Lukashenko, S. S.; Rizvanov, I. K.; Souto, E. B.; Nikolsky, E. E.; Zakharova, L. Y.; Masson, P.; Sinyashin, O. G. Nanoparticle-Delivered 2-PAM for Rat Brain Protection against Paraoxon Central Toxicity. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, *9* (20), 16922–16932.

(357) Hoskovcova, M.; Halamek, E.; Kobliha, Z. Efficacy of Structural Homoloques and Isomers of Pralidoxime in Reactivation of Immobilised Acetylcholinesterase Inhibited with Sarin, Cyclosarin and Soman. *Neuro Endocrinology Letters* **2009**, *30*, 152–155.

(358) Hoskovcová, M.; Halámek, E.; Kobliha, Z.; Tušarová, I. Reactivation of Immobilized Acetylcholinesterasetabun Complex by Pralidoxime, Its Isomers, and Homologs. *Toxicology Mechanisms and Methods* **2010**, *20* (5), 223–226.

(359) Singh, N.; Ghosh, K. K.; Marek, J.; Kuca, K. Hydrolysis of Carboxylate and Phosphate Esters Using Monopyridinium Oximes in Cationic Micellar Media. *International Journal of Chemical Kinetics* **2011**, *31* (5), n/a-n/a.

(360) Luettringhaus, A.; Hagedorn, I. Quaternary Hydroxyiminomethyl-Pyridinium Salts. The Dichloride of Bis(4-Hydroxyiminomethylpyridiniomethyl) Ether; a New Reactivator of Acetylcholinesterase When Inhibited by Phosphoric Acid Esters. *Arzneimittel-Forschung* **1964**, *14*, 1–5.

(361) Hagedorn, I.; Guendel, W. H.; Schoene, K. Reactivation of Phosphorylated Acetylcholinesterase by Oximes. Mechanism of the Reaction. *Arzneimittel-Forschung* **1969**, *19* (4), 603–606.

(362) Hagedorn, I.; Stark, I.; Lorenz, H. P. Reactivation of Phosphorylated Acetylcholinesterase - Dependence upon Activator Acidity. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1972**, *11* (4), 307–309.

(363) Acharya, J.; Rana, H.; Aditya Kapil, V.; Kaushik, M. P. In Vitro Reactivation of Organophosphorus (OP)-Inhibited Electric Eel Acetylcholinesterase by Novel Monoquaternary Pyridinium Oximes. *Medicinal Chemistry Research* **2013**, *22* (3), 1277–1286.

(364) de Koning, M. C.; Joosen, M. J. A.; Noort, D.; van Zuylen, A.; Tromp, M. C. Peripheral Site Ligand–oxime Conjugates: A Novel Concept towards Reactivation of Nerve Agent-Inhibited Human Acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19* (1), 588–594.

(365) Chambers, J. E.; Chambers, H. W.; Meek, E. C.; Pringle, R. B. Testing of Novel Brain-Penetrating Oxime Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Nerve Agent Surrogates. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, *203* (1), 135–138.

(366) Chambers, J. E.; Chambers, H. W.; Funck, K. E.; Meek, E. C.; Pringle, R. B.; Ross, M. K. Efficacy of Novel Phenoxyalkyl Pyridinium Oximes as Brain-Penetrating Reactivators of Cholinesterase Inhibited by Surrogates of Sarin and VX. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *259*, 154–159.

(367) Chambers, J. E.; Meek, E. C.; Chambers, H. W. Novel Brain-Penetrating Oximes for Reactivation of Cholinesterase Inhibited by Sarin and VX Surrogates. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2016**, *1374* (1), 52–58.

(368) Chambers, J. E.; Chambers, H. W.; Meek, E. C. Phenoxyalkyl Pyridinium Oxime Therapeutics for Treatment of Organophosphate Poisoning. US 20130172393 A1, 2013.

(369) Chambers, J. E.; Chambers, H. W.; Meek, E. C. Oximes for Reactivating Butyrylcholinesterase. US 20170258774, September 14, 2017.

(370) Odzak, R.; Calić, M.; Hrenar, T.; Primozic, I.; Kovarik, Z. Evaluation of Monoquaternary Pyridinium Oximes Potency to Reactivate Tabun-Inhibited Human Acetylcholinesterase. *Toxicology* **2007**, *233* (1–3), 85–96.

(371) Pooja, P.; Aggarwal, S.; Tiwari, A. K.; Kumar, V.; Pratap, R.; Singh, G.; Mishra, A. K. Novel Pyridinium Oximes: Synthesis, Molecular Docking and in Vitro Reactivation Studies. *RSC Advances* **2015**, *5* (30), 23471–23480.

(372) Valiveti, A. K.; Bhalerao, U. M.; Acharya, J.; Karade, H. N.; Acharya, B. N.; Raviraju, G.; Halve, A. K.; Kaushik, M. P. Synthesis and in Vitro Kinetic Evaluation of N-Thiazolylacetamido Monoquaternary Pyridinium Oximes as Reactivators of Sarin, O-Ethylsarin and VX Inhibited Human Acetylcholinesterase (HAChE). *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2015, pp 4899–4910.

(373) Valiveti, A. K.; Acharya, J.; Pratap, A.; Halve, A. K.; Kaushik, M. P. Synthesis and in Vitro Screening of N-Phenacylpyridinium Oximes as Reactivators of Organophosphorus (OP)-Inhibited Electric Eel Acetylcholinesterase (AChE). *Medicinal Chemistry Research* **2015**, *24* (9), 3353–3371.

(374) Ginsburg, S.; Wilson, I. B. Oximes of the Pyridine Series. *Journal of the American Chemical Society* **1957**, *79* (2), 481–485.

(375) Timperley, C. M.; Banks, R. E.; Young, I. M.; Haszeldine, R. N. Synthesis of Some Fluorine-Containing Pyridinealdoximes of Potential Use for the Treatment of Organophosphorus Nerve-Agent Poisoning. *Journal of Fluorine Chemistry* **2011**, *132* (8), 541–547.

(376) Jeong, H. C.; Park, N. J.; Chae, C. H.; Musilek, K.; Kassa, J.; Kuca, K.; Jung, Y. S. Fluorinated Pyridinium Oximes as Potential Reactivators for Acetylcholinesterases Inhibited by Paraoxon Organophosphorus Agent. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2009**, *17* (17), 6213–6217.

(377) Kuča, K.; Pícha, J.; Cabal, J.; Liška, F. Synthesis of the Three Monopyridinium Oximes and Evaluation of Their Potency to Reactivate Acetylcholinesterase Inhibited by Nerve Agents. *Journal Of Applied Biomedicine* **2004**, *2*, 51–56.

(378) Salvador, R. L.; Saucier, M.; Simon, D.; Goyer, R. Acetylcholinesterase Reactivators. Pyridyl and Anilyl Trifluoromethyl Ketoximes. *Journal of Medicinal Chemistry* **1972**, *15* (6), 646–650.

(379) Picha, J.; Kuca, K.; Kivala, M.; Kohout, M.; Cabal, J.; Liska, F. A New Group of Monoquaternary Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Nerve Agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2005**, *20* (3), 233–237.

(380) Prokai, L.; Prokai-Tatrai, K.; Bodor, N. Targeting Drugs to the Brain by Redox Chemical Delivery Systems. *Medicinal Research Reviews* **2000**, *20* (5), 367–416.

(381) Bodor, N.; Shek, E.; Higuchi, T. Improved Delivery through Biological Membranes. 1. Synthesis and Properties of 1-Methyl-1,6-Dihydropyridine-2-Carbaldoxime, a pro-Drug of N-Methylpyridinium-2-Carbaldoxime Chloride. *Journal of Medicinal Chemistry* **1976**, *19* (1), 102–107.

(382) DeMar, J. C.; Clarkson, E. D.; Ratcliffe, R. H.; Campbell, A. J.; Thangavelu, S. G.; Herdman, C. A.; Leader, H.; Schulz, S. M.; Marek, E.; Medynets, M. A.; Ku, T. C.; Evans, S. A.; Khan, F. A.; Owens, R. R.; Nambiar, M. P.; Gordon, R. K. Pro-2-PAM Therapy for Central and Peripheral Cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, *187* (1–3), 191–198.

(383) Bedford, C. D.; Harris, R. N. 3rd; Howd, R. A.; Miller, A.; Nolen, H. W. 3rd; Kenley, R. A. Structure-Activity Relationships for Reactivators of Organophosphorus-Inhibited Acetylcholinesterase: Quaternary Salts of 2-[(Hydroxyimino)Methyl]Imidazole. *Journal of Medicinal Chemistry* **1984**, *27* (11), 1431–1438.

(384) Grifantini, M.; Martelli, S.; Stein, M. L. Structure-Activity Relationships in Reactivators of Organophosphorus-Inhibited Acetylcholinesterase. 6. 2-Hydroxyiminomethylimidazolium Iodides. *Journal of Medicinal Chemistry* **1973**, *16* (8), 937–939.

(385) Goff, D. A.; Koolpe, G. A.; Kelson, A. B.; Vu, H. M.; Taylor, D. L.; Bedford, C. D.; Musallam, H. A.; Koplovitz, I.; Harris, R. N. 3rd. Quaternary Salts of 2-[(Hydroxyimino)Methyl]Imidazole. 4. Effect of Various Side-Chain Substituents on Therapeutic Activity against Anticholinesterase Intoxication. *Journal of Medicinal Chemistry* **1991**, *34* (4), 1363–1368.

(386) Koolpe, G. A.; Lovejoy, S. M.; Goff, D. A.; Lin, K. Y.; Leung, D. S.; Bedford, C. D.; Musallam, H. A.; Koplovitz, I.; Harris, R. N. 3rd. Quaternary Salts of 2-[(Hydroxyimino)Methyl]Imidazole. 5. Structure-Activity Relationships for Side-Chain Nitro-, Sulfone-, Amino-, and Aminosulfonyl-Substituted Analogues for Therapy against Anticholinesterase Intoxication. *Journal of Medicinal Chemistry* **1991**, *34* (4), 1368–1376.

(387) Grifantini, M.; Martelli, S.; Stein, M. L. Structure-Activity Relationships in Reactivators of Organophosphorus-Inhibited Acetylcholinesterase. V. Quaternary Salts of Hydroxyiminomethylimidazoles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1972**, *61* (4), 631–633.

(388) Simeon-Rudolf, V.; Reiner, E.; Škrinjarić-Š, M.; Radić, B.; Lucić, A.; Primožič, I.; Tomić, S. Quinuclidinium-Imidazolium Compounds: Synthesis, Mode of Interaction with Acetylcholinesterase and Effect upon Soman Intoxicated Mice. *Archives of Toxicology* **1998**, *72* (5), 289–295.

(389) SIMEON-RUDOLF, V.; REINER, E. Pyridinium, Imidazolium and Quinuclidinium Compounds: Toxicity and Antidotal Effects against the Nerve Agents Tabun and Soman. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju* **2006**, No. 2, 171–179.

(390) De Koning, M. C.; Joosen, M. J. A.; Worek, F.; Nachon, F.; Van Grol, M.; Klaassen, S. D.; Alkema, D. P. W.; Wille, T.; De Bruijn, H. M. Application of the Ugi Multicomponent Reaction in the Synthesis of Reactivators of Nerve Agent Inhibited Acetylcholinesterase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60* (22), 9376–9392.

(391) Liubin, F. A.; Hosseini, S. A.; Moghimi, A.; Iman, M.; Ebrahimi, F. Docking Studies, Synthesis, and In-Vitro Evaluation of Novel Oximes Based on Nitrones as Reactivators of Inhibited Acetylcholinesterase. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR* **2017**, *16* (3), 880–892.

(392) Amitai, G.; Gez, R.; Raveh, L.; Bar-Ner, N.; Grauer, E.; Chapman, S. Novel Bifunctional Hybrid Small Molecule Scavengers for Mitigating Nerve Agents Toxicity. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *259*, 187–204.

(393) Oh, K. A.; Park, N. J.; Park, N. S.; Kuca, K.; Jun, D.; Jung, Y. S. Reactivation of DFP- and Paraoxon-Inhibited Acetylcholinesterases by Pyridinium Oximes. *Chemico-Biological Interactions* **2008**, *175* (1–3), 365–367.

(394) Pang, Y.-P.; Kollmeyer, T. M.; Hong, F.; Lee, J.-C.; Hammond, P. I.; Haugabouk, S. P.; Brimijoin, S. Rational Design of Alkylene-Linked Bis-Pyridiniumaldoximes as Improved Acetylcholinesterase Reactivators. *Chemistry & Biology* **2003**, *10* (6), 491–502.

(395) Kuca, K.; Bielavsky, J.; Cabal, J.; Bielavska, M. Synthesis of a Potential Reactivator of Acetylcholinesterase—1-(4-Hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(Carbamoylpyridinium)Propane Dibromide. *Tetrahedron Letters* **2003**, *44* (15), 3123–3125.

(396) Kuca, K.; Bielavský, J.; Cabal, J.; Kassa, J. Synthesis of a New Reactivator of Tabun-Inhibited Acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13* (20), 3545–3547.

(397) Srinivas Rao, C.; Venkateswarlu, V.; Achaiah, G. Quaternary Salts of 4,3′ and 4,4′ Bis-Pyridinium Monooximes. Part 2: Synthesis and Biological Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16* (8), 2134–2138.

(398) Kuca, K.; Cabal, J.; Patocka, J.; Kassa, J. Synthesis of Bisquaternary Symmetric - χ,δ--Bis(2-Hydroxyiminomethylpyridinium) Alkane Dibromides and Their Reactivation of Cyclosarin-Inhibited Acetylcholinesterase. *Letters in Organic Chemistry* **2004**, *1* (1), 84–86.

(399) Musílek, K.; Lipka, L.; Račáková, V.; Kuča, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Doležal, M. New Methods in Synthesis of Acetylcholinesterase Reactivators and Evaluation of Their Potency to Reactivate Cyclosarin-Inhibited AChE. *Chemical Papers* **2006**, *60* (1), 1–4.

(400) Musilek, K.; Holas, O.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Dolezal, M. Synthesis of Asymmetrical Bispyridinium Compounds Bearing Cyano-Moiety and Evaluation of Their Reactivation Activity against Tabun and Paraoxon-Inhibited Acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16* (21), 5673–5676.

(401) Musilek, K.; Komloova, M.; Holas, O.; Horova, A.; Pohanka, M.; Gunn-Moore, F.; Dohnal, V.; Dolezal, M.; Kuca, K. Mono-Oxime Bisquaternary Acetylcholinesterase Reactivators with Prop-1,3-Diyl

Linkage-Preparation, in Vitro Screening and Molecular Docking. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19* (2), 754–762.

(402) Kuca, K.; Cabal, J.; Musilek, K.; Jun, D.; Bajgar, J. Effective Bisquaternary Reactivators of Tabun-Inhibited AChE. *Journal of Applied Toxicology* **2005**, *25* (6), 491–495.

(403) Srinivas Rao, C.; Venkateswarlu, V.; Achaiah, G. Quaternary Salts of 4,3′ and 4,4′ Bis-Pyridinium Monooximes. Part 2: Synthesis and Biological Activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16* (8), 2134–2138.

(404) Cabal, J.; Kuca, K.; Kassa, J. Specification of the Structure of Oximes Able to Reactivate Tabun-Inhibited Acetylcholinesterase. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* **2004**, *95* (2), 81–86.

(405) Gupta, B.; Sharma, R.; Singh, N.; Kuca, K.; Acharya, J. R.; Ghosh, K. K. In Vitro Reactivation Kinetics of Paraoxon- and DFP-Inhibited Electric Eel AChE Using Mono- and Bis-Pyridinium Oximes. *Archives of Toxicology* **2014**, *88* (2), 381–390.

(406) Calić, M.; Vrdoljak, A. L.; Radić, B.; Jelić, D.; Jun, D.; Kuca, K.; Kovarik, Z. In Vitro and in Vivo Evaluation of Pyridinium Oximes: Mode of Interaction with Acetylcholinesterase, Effect on Tabun- and Soman-Poisoned Mice and Their Cytotoxicity. *Toxicology* **2006**, *219* (1–3), 85–96.

(407) Hammond, P. I. Cholinesterase Reactivation in Vivo with a Novel Bis-Oxime Optimized by Computer-Aided Design. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2003**, *307* (1), 190–196.

(408) Žunec, S.; Radić, B.; Kuča, K.; Musilek, K.; Vrdoljak, A. L. Comparative Determination of the Efficacy of Bispyridinium Oximes in Paraoxon Poisoning. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* **2015**, *66* (2), 129–134.

(409) Antonijevic, E.; Kotur-Stevuljevic, J.; Musilek, K.; Kosvancova, A.; Kuca, K.; Djukic-Cosic, D.; Spasojevic-Kalimanovska, V.; Antonijevic, B. Effect of Six Oximes on Acutely Anticholinesterase Inhibitor-Induced Oxidative Stress in Rat Plasma and Brain. *Archives of Toxicology* **2018**, *92* (2), 745–757.

(410) Kassa, J.; Kuca, K.; Cabal, J.; Paar, M. A Comparison of the Efficacy of New Asymmetric Bispyridinium Oximes (K027, K048) with Currently Available Oximes against Tabun by in Vivo Methods. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* **2006**, *69* (20), 1875–1882.

(411) Karasova, J. Z.; Kvetina, J.; Tacheci, I.; Radochova, V.; Musilek, K.; Kuca, K.; Bures, J. Pharmacokinetic Profile of Promising Acetylcholinesterase Reactivators K027 and K203 in Experimental Pigs. *Toxicology Letters* **2017**, *273*, 20–25.

(412) Soukup, O.; Krůšek, J.; Kaniaková, M.; Kumar, U. K.; Oz, M.; Jun, D.; Fusek, J.; Kuča, K.; Tobin, G. Oxime Reactivators and Their in Vivo and in Vitro Effects on Nicotinic Receptors. *Physiological Research* **2011**, *60* (4), 679–686.

(413) Jeong, H. C.; Kang, N. S.; Park, N.-J.; Yum, E. K.; Jung, Y.-S. Reactivation Potency of Fluorinated Pyridinium Oximes for Acetylcholinesterases Inhibited by Paraoxon Organophosphorus Agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19* (4), 1214–1217.

(414) Kim, T. H.; Oh, K. A.; Park, N. J.; Park, N. S.; Kim, Y. J.; Yum, E. K.; Jung, Y. S. Reactivation Study of Pyridinium Oximes for Acetylcholinesterases Inhibited by Paraoxon or DFP. *Journal of Applied Biomedicine* **2006**, *4* (2), 67–72.

(415) Acharya, J.; Gupta, A. K.; Mazumder, A.; Dubey, D. K. In Vitro Reactivation of Sarin Inhibited Electric Eel Acetylcholinesterase by Bis-Pyridinium Oximes Bearing Methoxy Ether Linkages. *Toxicology in Vitro* **2008**, *22* (2), 525–530.

(416) Oh, K.-A.; Yang, G. Y.; Jun, D.; Kuca, K.; Jung, Y.-S. Bis-Pyridiumaldoxime Reactivators Connected with CH2O(CH2)n OCH2 Linkers between Pyridinium Rings and Their Reactivity against VX. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16* (18), 4852–4855.

(417) Yang, G. Y.; Oh, K. A.; Park, N. J.; Jung, Y. S. New Oxime Reactivators Connected with CH2O(CH2)NOCH2 Linker and Their Reactivation Potency for Organophosphorus Agents-Inhibited Acetylcholinesterase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2007**, *15* (24), 7704–7710.

(418) Acharya, J.; Gupta, A. K.; Mazumder, A.; Dubey, D. K. In-Vitro Regeneration of Sarin Inhibited Electric Eel Acetylcholinesterase by Bis-Pyridinium Oximes Bearing Xylene Linker. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *44* (3), 1326–1330.

(419) Worek, F.; Bierwisch, A.; Wille, T.; Koller, M.; Thiermann, H. Kinetic Interactions of a Homologous Series of Bispyridinium Monooximes (HGG Oximes) with Native and Phosphonylated Human Acetylcholinesterase. *Toxicology Letters* **2012**, *212* (1), 29–32.

(420) Kuca, K.; Jun, D.; Kim, T. H.; Cabal, J.; Jung, Y. S. In Vitro Evaluation of New Acetylcholinesterase Reactivators as Casual Antidotes against Tabun and Cyclosarin. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2006**, *27* (3), 395–398.

(421) Kassa, J.; Karasova, J.; Musilek, K.; Kuca, K.; Jung, Y.-S. A Comparison of the Therapeutic and Reactivating Efficacy of Newly Developed Oximes (K117, K127) and Currently Available Oximes (Obidoxime, Trimedoxime, HI-6) in Tabun-Poisoned Rats and Mice. *Drug and Chemical Toxicology* **2008**, *31* (3), 371–381.

(422) Musilek, K.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Dolezal, M. Synthesis of a Novel Series of Bispyridinium Compounds Bearing a Xylene Linker and Evaluation of Their Reactivation Activity against Chlorpyrifos-Inhibited Acetylcholinesterase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2005**, *20* (5), 409–415.

(423) Musilek, K.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Dolezal, M. Synthesis of the Novel Series of Bispyridinium Compounds Bearing (E)-but-2-Ene Linker and Evaluation of Their Reactivation Activity against Chlorpyrifos-Inhibited Acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16* (3), 622–627.

(424) Musilek, K.; Holas, O.; Jun, D.; Dohnal, V.; Gunn-Moore, F.; Opletalova, V.; Dolezal, M.; Kuca, K. Monooxime Reactivators of Acetylcholinesterase with (E)-but-2-Ene Linker: Preparation and Reactivation of Tabun- and Paraoxon-Inhibited Acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15* (21), 6733–6741.

(425) Musilek, K.; Jun, D.; Cabal, J.; Kassa, J.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. Design of a Potent Reactivator of Tabun-Inhibited Acetylcholinesterase--Synthesis and Evaluation of (E)-1-(4-Carbamoylpyridinium)-4-(4-Hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-Ene Dibromide (K203). *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50* (22), 5514–5518.

(426) Musilek, K.; Holas, O.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Opletalova, V.; Dolezal, M. Novel Series of Bispyridinium Compounds Bearing a (Z)-but-2-Ene Linker--Synthesis and Evaluation of Their Reactivation Activity against Tabun and Paraoxon-Inhibited Acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17* (11), 3172–3176.

(427) Musilek, K.; Hambalek, J.; Holas, O.; Dohnal, V.; Kuca, K. Monooxime Bispyridinium Reactivators Bearing Xylene Linker Synthesis and in Vitro Evaluation on Model of Organophosphate-Inhibited Acetylcholinesterase. *Medicinal Chemistry* **2016**, *12* (4), 362–370.

(428) Musílek, K.; Kuča, K.; Jun, D.; Doležal, M. In Vitro Reactivation Potency of Bispyridinium ( E ) -but-2-Ene Linked Acetylcholinesterase Reactivators against Tabun-Inhibited Acetylcholinesterase. *Journal Of Applied Biomedicine* **2007**, *5*, 25–30.

(429) Musilek, K.; Holas, O.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Dolezal, M. Synthesis of a Novel Series of Non-Symmetrical Bispyridinium Compounds Bearing a Xylene Linker and Evaluation of Their Reactivation Activity against Tabun and Paraoxon-Inhibited Acetylcholinesterase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2007**, *22* (4), 425–432.

(430) Musilek, K.; Holas, O.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Opletalova, V.; Dolezal, M. Synthesis of Monooxime-Monocarbamoyl Bispyridinium Compounds Bearing (E)-but-2-Ene Linker and Evaluation of Their Reactivation Activity against Tabun- and Paraoxon-Inhibited Acetylcholinesterase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2008**, *23* (1), 70–76.

(431) Kuca, K.; Musilek, K.; Jun, D.; Zdarova-Karasova, J.; Nepovimova, E.; Soukup, O.; Hrabinova, M.; Mikler, J.; Franca, T. C. C.; Da Cunha, E. F. F.; De Castro, A. A.; Valis, M.; Ramalho, T. C. A Newly

Developed Oxime K203 Is the Most Effective Reactivator of Tabun-Inhibited Acetylcholinesterase. *BMC Pharmacology and Toxicology* **2018**, *19* (1), 8.

(432) Kovarik, Z.; Vrdoljak, A.; Berend, S.; Katalinić, M.; Kuča, K.; Musilek, K.; Radić, B. Evaluation of Oxime K203 as Antidote in Tabun Poisoning. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **2009**, *60* (1), 19–26.

(433) Karade, H. N.; Valiveti, A. K.; Acharya, J.; Kaushik, M. P. Synthesis and in Vitro Evaluation of Bis-Quaternary 2-(Hydroxyimino)-N-(Pyridin-3-Yl)Acetamide Derivatives as Reactivators against Sarin and VX Inhibited Human Acetylcholinesterase (HAChE). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22* (9), 2684–2691.

(434) Karade, H. N.; Raviraju, G.; Acharya, B. N.; Valiveti, A. K.; Bhalerao, U.; Acharya, J. Synthesis and in Vitro Reactivation Study of Isonicotinamide Derivatives of 2-(Hydroxyimino)-N-(Pyridin-3-Yl)Acetamide as Reactivators of Sarin and VX Inhibited Human Acetylcholinesterase (HAChE). *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2016**, *24* (18), 4171–4176.

(435) Kumar, P.; Swami, D.; Nagar, D. P.; Singh, K. P.; Acharya, J.; Karade, H. N.; Yadav, R. In Vivo Protection Studies of Bis-Quaternary 2-(Hydroxyimino)-N-(Pyridin-3-Yl) Acetamide Derivatives (HNK Oximes) against Tabun and Soman Poisoning in Swiss Albino Mice. *Human and Experimental Toxicology* **2017**, *36* (12), 1270–1285.

(436) Swami, D.; Saxena, N.; Karade, H. N.; Kumar, P. Comparative Toxicity of Bis-Pyridinium Acetamide Derivatives in Human Cell Lines and Their Acute Toxicity in Swiss Albino Mice. *Defence Life Science Journal* **2016**, *1* (2), 149.

(437) Simeon-Rudolf, V.; Reiner, E.; Škrinjarić-Š, M.; Radić, B.; Lucić, A.; Primožič, I.; Tomić, S. Quinuclidinium-Imidazolium Compounds: Synthesis, Mode of Interaction with Acetylcholinesterase and Effect upon Soman Intoxicated Mice. *Archives of Toxicology* **1998**, *72* (5), 289–295.

(438) Simeon-Rudolf, V.; Reiner, E.; Skrinjaric-Spoljar, M.; Radić, B.; Lucic, A.; Primozic, I.; Tomic, S. Quinuclidinium-Imidazolium.Pdf. *Archives of Toxicology* **1998**, *72*, 289–295.

(439) Lucić, A.; Radić, B.; Peraica, M.; Mesić, M.; Primožič, I.; Binenfeld, Z. Antidotal Efficacy of Quinuclidinium Oximes against Soman Poisoning. *Archives of Toxicology* **1997**, *71* (7), 467–470.

(440) Sharma, R.; Gupta, B.; Sahu, A. K.; Acharya, J.; Satnami, M. L.; Ghosh, K. K. Synthesis and In-Vitro Reactivation Screening of Imidazolium Aldoximes as Reactivators of Sarin and VX-Inhibited Human Acetylcholinesterase (HAChE). *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *259*, 85–92.

(441) Konidaris, K. F.; Dalkas, G. A.; Katsoulakou, E.; Pairas, G.; Raptopoulou, C. P.; Lamari, F. N.; Spyroulias, G. A.; Manessi-Zoupa, E. ZnII/Pyridyloxime Complexes as Potential Reactivators of OP-

Inhibited Acetylcholinesterase: In Vitro and Docking Simulation Studies. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2014**, *134*, 12–19.

(442) Nedzhib, A.; Stoykova, S.; Atanasov, V.; Pantcheva, I.; Antonov, L. Pd(II) Complexes of Acetylcholinesterase Reactivator Obidoxime. *Interdisciplinary Toxicology* **2014**, *7* (3), 139–145.

(443) Wagner, S.; Kufleitner, J.; Zensi, A.; Dadparvar, M.; Wien, S.; Bungert, J.; Vogel, T.; Worek, F.; Kreuter, J.; von Briesen, H. Nanoparticulate Transport of Oximes over an in Vitro Blood-Brain Barrier Model. *PloS one* **2010**, *5* (12), e14213.

(444) Dadparvar, M.; Wagner, S.; Wien, S.; Kufleitner, J.; Worek, F.; von Briesen, H.; Kreuter, J. HI 6 Human Serum Albumin Nanoparticles-Development and Transport over an in Vitro Blood-Brain Barrier Model. *Toxicology Letters* **2011**, *206* (1), 60–66.

(445) Garcia, G. E.; Campbell, A. J.; Olson, J.; Moorad-Doctor, D.; Morthole, V. I. Novel Oximes as Blood–brain Barrier Penetrating Cholinesterase Reactivators. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, *187* (1–3), 199–206.

(446) Bhonsle, J. B.; Causey, R.; Oyler, B. L.; Bartolucci, C.; Lamba, D.; Pesaresi, A.; Bhamare, N. K.; Soojhawon, I.; Garcia, G. E. Evaluation and Computational Characterization of the Facilitated Transport of Glc Carbon C-1 Oxime Reactivators across a Blood Brain Barrier Model. *Chemico-Biological Interactions* **2012**, No. October, 1–6.

(447) Louise-Leriche, L.; Paunescu, E.; Saint-André, G.; Baati, R.; Romieu, A.; Wagner, A.; Renard, P.-Y. A HTS Assay for the Detection of Organophosphorus Nerve Agent Scavengers. *Chemistry – A European Journal* **2010**, *16* (11), 3510–3523.

(448) Dale, T. J.; Rebek, J. Hydroxy Oximes as Organophosphorus Nerve Agent Sensors. *Angewandte Chemie - International Edition* **2009**, *48* (42), 7850–7852.

(449) Dale, T. J.; Sather, A. C.; Rebek, J. Synthesis of Novel Aryl-1,2-Oxazoles from Ortho-Hydroxyaryloximes. *Tetrahedron Letters* **2009**, *50* (45), 6173–6175.

(450) Timperley, C. M.; Banks, R. E.; Young, I. M.; Haszeldine, R. N. Synthesis of Some Fluorine-Containing Pyridinealdoximes of Potential Use for the Treatment of Organophosphorus Nerve-Agent Poisoning. *Journal of Fluorine Chemistry* **2011**, *132* (8), 541–547.

(451) Wei, Z.; Liu, Y. qin; Wang, Y. an; Li, W. hua; Zhou, X. bo; Zhao, J.; Huang, C. qian; Li, X. zhou; Liu, J.; Zheng, Z. bing; Li, S. Novel Nonquaternary Reactivators Showing Reactivation Efficiency for Soman-Inhibited Human Acetylcholinesterase. *Toxicology Letters* **2016**, *246*, 1–6.

(452) Wei, Z.; Liu, Y.; Wang, S.; Yao, L.; Nie, H.; Wang, Y.; Liu, X.-Y.; Zheng, Z.; Li, S. Conjugates of Salicylaldoximes and Peripheral Site Ligands: Novel Efficient Nonquaternary Reactivators for Nerve Agent-Inhibited Acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**, *25* (16), 4497–4505.

(453) Worek, F.; Thiermann, H. Reactivation of Organophosphate-Inhibited Human Acetylcholinesterase by Isonitrosoacetone (MINA): A Kinetic Analysis. *Chemico-Biological Interactions* **2011**, *194* (2–3), 91–96.

(454) Shih, T.; Skovira, J. W.; Donnell, J. C. O.; Mcdonough, J. H. Central Acetylcholinesterase Reactivation by Oximes Improves Survival and Terminates Seizures Following Nerve Agent Intoxication. *Advanced Studies in Biology* **2009**, *1* (3), 155–196.

(455) Skovira, J. W.; O'Donnell, J. C.; Koplovitz, I.; Kan, R. K.; McDonough, J. H.; Shih, T.-M. Reactivation of Brain Acetylcholinesterase by Monoisonitrosoacetone Increases the Therapeutic Efficacy against Nerve Agents in Guinea Pigs. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, *187* (1–3), 318–324.

(456) Degorre, F.; Kiffer, D.; Terrier, F. Sulfur Derivatives of 2-Oxopropanal Oxime as Reactivators of Organophosphate-Inhibited Acetylcholinesterase in Vitro: Synthesis and Structure-Reactivity Relationships. *Journal of Medicinal Chemistry* **1988**, *31* (4), 757–763.

(457) Sit, R. K.; Radić, Z.; Gerardi, V.; Zhang, L.; Garcia, E.; Katalinić, M.; Amitai, G.; Kovarik, Z.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Katalinic, M.; Amitai, G.; Kovarik, Z.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Taylor, P. New Structural Scaffolds for Centrally Acting Oxime Reactivators of Phosphylated Cholinesterases. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286* (22), 19422–19430.

(458) Radić, Z.; Sit, R. K.; Garcia, E.; Zhang, L.; Berend, S.; Kovarik, Z.; Amitai, G.; Fokin, V. V; Barry Sharpless, K.; Taylor, P. Mechanism of Interaction of Novel Uncharged, Centrally Active Reactivators with OP-HAChE Conjugates. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, *203* (1), 67–71.

(459) Radić, Z.; Sit, R. K.; Kovarik, Z.; Berend, S.; Garcia, E.; Zhang, L.; Amitai, G.; Green, C.; Radić, B.; Fokin, V. V; Sharpless, K. B.; Taylor, P. Refinement of Structural Leads for Centrally Acting Oxime Reactivators of Phosphylated Cholinesterases. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287* (15), 11798–11809.

(460) Malfatti, M. A.; Enright, H. A.; Be, N. A.; Kuhn, E. A.; Hok, S.; McNerney, M. W.; Lao, V.; Nguyen, T. H.; Lightstone, F. C.; Carpenter, T. S.; Bennion, B. J.; Valdez, C. A. The Biodistribution and Pharmacokinetics of the Oxime Acetylcholinesterase Reactivator RS194B in Guinea Pigs. *Chemico-Biological Interactions* **2017**, *277* (1), 159–167.

(461) Rosenberg, Y. J.; Mao, L.; Jiang, X.; Lees, J.; Zhang, L.; Radic, Z.; Taylor, P. Post-Exposure Treatment with the Oxime RS194B Rapidly Reverses Early and Advanced Symptoms in Macaques Exposed to Sarin Vapor. *Chemico-Biological Interactions* **2017**, *274*, 50–57.

(462) de Koning, M. C.; van Grol, M.; Noort, D. Peripheral Site Ligand Conjugation to a Non-Quaternary Oxime Enhances Reactivation of Nerve Agent-Inhibited Human Acetylcholinesterase. *Toxicology Letters* **2011**, *206* (1), 54–59.

(463) de Almeida, J. S. F. D.; Cuya Guizado, T. R.; Guimarães, A. P.; Ramalho, T. C.; Gonçalves, A. S.; de Koning, M. C.; França, T. C. C. Docking and Molecular Dynamics Studies of Peripheral Site Ligand–oximes as Reactivators of Sarin-Inhibited Human Acetylcholinesterase. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2016**, *34* (12), 1–11.

(464) McHardy, S. F.; Bohmann, J. a; Corbett, M. R.; Campos, B.; Tidwell, M. W.; Thompson, P. M.; Bemben, C. J.; Menchaca, T. a; Reeves, T. E.; Cantrell, W. R.; Bauta, W. E.; Lopez, A.; Maxwell, D. M.; Brecht, K. M.; Sweeney, R. E.; McDonough, J. Design, Synthesis, and Characterization of Novel, Nonquaternary Reactivators of GF-Inhibited Human Acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24* (7), 1711–1714.

(465) Maraković, N.; Knežević, A.; Vinković, V.; Kovarik, Z.; Šinko, G. Design and Synthesis of N-Substituted-2-Hydroxyiminoacetamides and Interactions with Cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *259*, 122–132.

(466) Kalisiak, J.; Ralph, E. C.; Zhang, J.; Cashman, J. R. Amidine-Oximes: Reactivators for Organophosphate Exposure. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54* (9), 3319–3330.

(467) Kalisiak, J.; Ralph, E. C.; Cashman, J. R. Nonquaternary Reactivators for Organophosphate-Inhibited Cholinesterases. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55* (1), 465–474.

(468) Okolotowicz, K. J.; Dwyer, M.; Smith, E.; Cashman, J. R. Preclinical Studies of Noncharged Oxime Reactivators for Organophosphate Exposure. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **2014**, *28* (1), 23–31.

(469) Kovarik, Z.; MačEk, N.; Sit, R. K.; Radić, Z.; Fokin, V. V.; Barry Sharpless, K.; Taylor, P. Centrally Acting Oximes in Reactivation of Tabun-Phosphoramidated AChE. *Chemico-Biological Interactions* **2013**, *203* (1), 77–80.

(470) Wei, Z.; Liu, Y. Q.; Zhou, X. B.; Luo, Y.; Huang, C. Q.; Wang, Y. A.; Zheng, Z. B.; Li, S. New Efficient Imidazolium Aldoxime Reactivators for Nerve Agent-Inhibited Acetylcholinesterase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24* (24), 5743–5748.

(471) Kovarik, Z.; Maček Hrvat, N.; Katalinić, M.; Sit, R. K.; Paradyse, A.; Žunec, S.; Musilek, K.; Fokin, V. V.; Taylor, P.; Radić, Z. Catalytic Soman Scavenging by the Y337A/F338A Acetylcholinesterase Mutant Assisted with Novel Site-Directed Aldoximes. *Chemical Research in Toxicology* **2015**, *28* (5), 1036–1044.

(472) Da Cunha Xavier Soares, S. F.; Vieira, A. A.; Delfino, R. T.; Figueroa-Villar, J. D. NMR Determination of Electrophorus Electricus Acetylcholinesterase Inhibition and Reactivation by Neutral Oximes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2013**, *21* (18), 5923–5930.

(473) Ribeiro, T. S.; Prates, A.; Alves, S. R.; Oliveira-Silva, J. J.; Riehl, C. A. S.; Figueroa-Villar, J. D. The Effect of Neutral Oximes on the Reactivation of Human Acetylcholinesterase Inhibited with Paraoxon. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2012**, *23* (7), 1216–1225.

(474) Lo, R.; Ganguly, B. Can Hydroxylamine Be a More Potent Nucleophile for the Reactivation of Tabun-Inhibited AChE than Prototype Oxime Drugs? An Answer Derived from Quantum Chemical and Steered Molecular Dynamics Studies. *Molecular BioSystems* **2014**, *10* (9), 2368.

(475) Petronilho, E. da C.; Rennó, M. do N.; Castro, N. G.; da Silva, F. M. R.; Pinto, A. da C.; Figueroa-Villar, J. D. Design, Synthesis, and Evaluation of Guanylhydrazones as Potential Inhibitors or Reactivators of Acetylcholinesterase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2016**, *31* (6), 1069–1078.

(476) Delfino, R. T.; Figueroa-Villar, J. D. Nucleophilic Reactivation of Sarin-Inhibited Acetylcholinesterase: A Molecular Modeling Study. *Journal of Physical Chemistry* **2009**, *113* (24), 8402–8411.

(477) Katz, F. S.; Pecic, S.; Tran, T. H.; Trakht, I.; Schneider, L.; Zhu, Z.; Ton-That, L.; Luzac, M.; Zlatanic, V.; Damera, S.; Macdonald, J.; Landry, D. W.; Tong, L.; Stojanovic, M. N. Discovery of New Classes of Compounds That Reactivate Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphates. *ChemBioChem* **2015**, *16* (15), 2205–2215.

(478) Olliaro, P. L.; Mussano, P. Amodiaquine for Treating Malaria. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2003**, No. 4.

(479) Gnonlonfin, G. J. B.; Sanni, A.; Brimer, L. Review Scopoletin – A Coumarin Phytoalexin with Medicinal Properties. *Critical Reviews in Plant Sciences* **2012**, *31* (1), 47–56.

(480) Bierwisch, A.; Wille, T.; Thiermann, H.; Worek, F. Kinetic Analysis of Interactions of Amodiaquine with Human Cholinesterases and Organophosphorus Compounds. *Toxicology Letters* **2016**, *246*, 49–56.

(481) Cadieux, C. L.; Wang, H.; Zhang, Y.; Koenig, J. A.; Shih, T. M.; McDonough, J.; Koh, J.; Cerasoli, D. Probing the Activity of a Non-Oxime Reactivator for Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Nerve Agents. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, *259*, 133–141.

(482) Bhattacharjee, A. K.; Marek, E.; Le, H. T.; Gordon, R. K. Discovery of Non-Oxime Reactivators Using an in Silico Pharmacophore Model of Oxime Reactivators of OP-Inhibited Acetylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *49*, 229–238.

(483) Bhattacharjee, A. K.; Marek, E.; Le, H. T.; Ratcliffe, R.; DeMar, J. C.; Pervitsky, D.; Gordon, R. K. Discovery of Non-Oxime Reactivators Using an in Silico Pharmacophore Model of Reactivators for DFP-Inhibited Acetylcholinesterase. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *90*, 209–220.

(484) Bhattacharjee, A. K.; Kuca, K.; Musilek, K.; Gordon, R. K. In Silico Pharmacophore Model for Tabun-Inhibited Acetylcholinesterase Reactivators: A Study of Their Stereoelectronic Properties. *Chemical research in toxicology* **2010**, *23* (1), 26–36.

(485) Weinback, E. C.; Hartung, W. H. Synthesis of Tetrahydroisoquinoline Derivatives. *The Journal of Organic Chemistry* **1950**, *15* (3), 676–679.

(486) Lewis, W. G.; Green, L. G.; Grynszpan, F.; Radić, Z.; Carlier, P. R.; Taylor, P.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry in Situ: Acetylcholinesterase as a Reaction Vessel for the Selective Assembly of a Femtomolar Inhibitor from an Array of Building Blocks. *Angewandte Chemie - International Edition* **2002**, *41* (6), 1053–1057.

(487) Manetsch, R.; Krasiński, A.; Radić, Z.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. In Situ Click Chemistry: Enzyme Inhibitors Made to Their Own Specifications. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (40), 12809–12818.

(488) Mercey, G.; Verdelet, T.; Saint-André, G.; Gillon, E.; Wagner, A.; Baati, R.; Jean, L.; Nachon, F.; Renard, P.-Y. First Efficient Uncharged Reactivators for the Dephosphylation of Poisoned Human Acetylcholinesterase. *Chemical Communications* **2011**, *47* (18), 5295.

(489) Calas, A.-G.; Dias, J.; Rousseau, C.; Arboléas, M.; Touvrey-Loiodice, M.; Mercey, G.; Jean, L.; Renard, P.-Y.; Nachon, F. An Easy Method for the Determination of Active Concentrations of Cholinesterase Reactivators in Blood Samples: Application to the Efficacy Assessment of Non Quaternary Reactivators Compared to HI-6 and Pralidoxime in VX-Poisoned Mice. *Chemico-Biological Interactions* **2016**, 4–9.

(490) Pal'chikov, V. A. Morpholines. Synthesis and Biological Activity. *Russian Journal of Organic Chemistry* **2013**, *49* (6), 787–814.

(491) Zorbaz, T.; Braïki, A.; Marakovic, N.; Renou, J.; de la Mora, E.; Marek Hrvat, N.; Katalinic, M.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Mercey, G.; Gomez, C.; Mougeot, R.; Perez, B.; Baati, R.; Nachon, F.; Weik, M.; Jean, L.; Zrinka, K.; Renard, P.-Y. Potent 3-Hydroxy-2-Pyridine Aldoxime Reactivators of Organophosphate-Inhibited Cholinesterases with Predicted Blood-Brain Barrier Penetration. *Chemistry - A European Journal* **2018**.

(492) Vastag, M.; Keseru, G. M. Current in Vitro and in Silico Models of Blood-Brain Barrier Penetration: A Practical View. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* **2009**, *12* (1), 115–124.

(493) Jeffrey, P.; Summerfield, S. Assessment of the Blood-Brain Barrier in CNS Drug Discovery. *Neurobiology of Disease* **2010**, *37* (1), 33–37.

(494) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Develop Ment Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *23*, 3–25.

(495) Lipinski, C. A. Lead- and Drug-like Compounds: The Rule-of-Five Revolution. *Drug Discovery Today: Technologies* **2004**, *1* (4), 337–341.

(496) Pajouhesh, H.; Lenz, G. R. Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs. *NeuroRX* **2005**, *2* (4), 541–553.

(497) Wager, T. T.; Hou, X.; Verhoest, P. R.; Villalobos, A. Central Nervous System Multiparameter Optimization Desirability: Application in Drug Discovery. *ACS Chemical Neuroscience* **2016**, *7* (6), 767–775.

(498) Wager, T. T.; Hou, X.; Verhoest, P. R.; Villalobos, A. Moving beyond Rules: The Development of a Central Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO) Approach to Enable Alignment of Druglike Properties. *ACS Chemical Neuroscience* **2010**, *1* (6), 435–449.

(499) Wager, T. T.; Chandrasekaran, R. Y.; Hou, X.; Troutman, M. D.; Verhoest, P. R.; Villalobos, A.; Will, Y. Defining Desirable Central Nervous System Drug Space through the Alignment of Molecular Properties, in Vitro ADME, and Safety Attributes. *ACS Chemical Neuroscience* **2010**, *1* (6), 420–434.

(500) Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. High Throughput Artificial Membrane Permeability Assay for Blood-Brain Barrier. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *38* (3), 223–232.

(501) Bennion, B. J.; Be, N. A.; McNerney, M. W.; Lao, V.; Carlson, E. M.; Valdez, C. A.; Malfatti, M. A.; Enright, H. A.; Nguyen, T. H.; Lightstone, F. C.; Carpenter, T. S. Predicting a Drug's Membrane Permeability: A Computational Model Validated with in Vitro Permeability Assay Data. *Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121* (20), 5228–5237.

(502) Franklin, M. C.; Rudolph, M. J.; Ginter, C.; Cassidy, M. S.; Cheung, J. Structures of Paraoxon-Inhibited Human Acetylcholinesterase Reveal Perturbations of the Acyl Loop and the Dimer Interface. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **2016**, *84* (9), 1246–1256.

(503) Legler, P. M.; Soojhawon, I.; Millard, C. B. A Conformational Change in the Peripheral Anionic Site of Torpedo Californica Acetylcholinesterase Induced by a Bis-Imidazolium Oxime. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **2015**, *71*, 1788–1798.

(504) Bourne, Y.; Kolb, H. C.; Radic, Z.; Sharpless, K. B.; Taylor, P.; Marchot, P. Freeze-Frame Inhibitor Captures Acetylcholinesterase in a Unique Conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101* (6), 1449–1454.

(505) Soukup, O.; Jun, D.; Tobin, G.; Kuca, K. The Summary on Non-Reactivation Cholinergic Properties of Oxime Reactivators: The Interaction with Muscarinic and Nicotinic Receptors. *Archives of Toxicology* **2013**, *87* (4), 711–719.

(506) Taly, A.; Corringer, P. J.; Guedin, D.; Lestage, P.; Changeux, J. P. Nicotinic Receptors: Allosteric Transitions and Therapeutic Targets in the Nervous System. *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, *8* (9), 733–750.

(507) Tsung-Ming, S.; Whalley, C. E.; Valdes, J. J. A Comparison of Cholinergic Effects of HI-6 and Pralidoxime-2-Chloride (2-PAM) in Soman Poisoning. *Toxicology Letters* **1991**, *55* (2), 131–147.

(508) Araoz, R.; Servent, D.; Molgoí, J.; Iorga, B. I.; Fruchart-Gaillard, C.; Benoit, E.; Gu, Z.; Stivala, C.; Zakarian, A. Total Synthesis of Pinnatoxins A and G and Revision of the Mode of Action of Pinnatoxin A. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (27), 10499–10511.

(509) Quick, M. W.; Lester, R. A. J. Desensitization of Neuronal Nicotinic Receptors. *Journal of Neurobiology* **2002**, *53* (4), 457–478.

(510) Worek, F.; Wille, T.; Koller, M.; Thiermann, H. Toxicology of Organophosphorus Compounds in View of an Increasing Terrorist Threat. *Archives of Toxicology* **2016**, *90* (9), 2131–2145.

(511) Katalinić, M.; Hrvat, N. M.; Karasová, J. Ž.; Misik, J.; Kovarik, Z. Translation of in Vitro to in Vivo Pyridinium Oxime Potential in Tabun Poisoning. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* **2015**, *66* (4), 291–298.

(512) Ligtenstein, D. A.; Moes, G. W. H. The Synergism of Atropine and the Cholinesterase Reactivator HI-6 in Counteracting Lethality by Organophosphate Intoxication in the Rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1991**, *107* (1), 47–53.

(513) Elliott, S. Current Awareness of Piperazines: Pharmacology and Toxicology. *Drug Testing and Analysis* **2011**, *3* (7–8), 430–438.

(514) Taylor, R. D.; Maccoss, M.; Lawson, A. D. G. Rings in Drugs. **2014**.

(515) Shaquiquzzaman, M.; Verma, G.; Marella, A.; Akhter, M.; Akhtar, W.; Khan, M. F.; Tasneem, S.; Alam, M. M. Piperazine Scaffold: A Remarkable Tool in Generation of Diverse Pharmacological Agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *102*, 487–529.

(516) Albani, F.; Riva, R.; Baruzzi, A. Carbamazepine Clinical Pharmacology: A Review. *Pharmacopsychiatry* **1995**, *28* (6), 235–244.

(517) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry* **2009**, *30* (16), 2785–2791.

(518) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *Journal of Computational Chemistry* **2009**, *28* (1), NA-NA.

(519) Kovalevich, J.; Langford, D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. In *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 2013; Vol. 101, pp 9–21.

(520) Colletier, J. P.; Sanson, B.; Nachon, F.; Gabellieri, E.; Fattorusso, C.; Campiani, G.; Weik, M. Conformational Flexibility in the Peripheral Site of Torpedo c Alifornica Acetylcholinesterase Revealed by the Complex Structure with a Bifunctional Inhibitor. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (14), 4526–4527.

(521) Nachon, F.; Carletti, E.; Ronco, C.; Trovaslet, M.; Nicolet, Y.; Jean, L.; Renard, P. Crystal Structures of Human Cholinesterases in Complex with Huprine W and Tacrine: Elements of Specificity for Anti-Alzheimer's Drugs Targeting Acetyl- and Butyryl-Cholinesterase. *Biochemical Journal* **2013**, *453* (3), 393–399.

(522) Zheng, S.; Lan, J.; Khan, S. I.; Rubin, Y. Synthesis, Characterization, and Coordination Chemistry of the 2-Azaphenalenyl Radical. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (19), 5786–5791.

(523) France, S. P.; Aleku, G. A.; Sharma, M.; Mangas-Sanchez, J.; Howard, R. M.; Steflik, J.; Kumar, R.; Adams, R. W.; Slabu, I.; Crook, R.; Grogan, G.; Wallace, T. W.; Turner, N. J. Biocatalytic Routes to Enantiomerically Enriched Dibenz[c,e]Azepines. *Angewandte Chemie - International Edition* **2017**, *56* (49), 15589–15593.

(524) Rathi, A. K.; Syed, R.; Shin, H. S.; Patel, R. V. Piperazine Derivatives for Therapeutic Use: A Patent Review (2010-Present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2016**, *26* (7), 777–797.

(525) Gee, P.; Schep, L. 1-Benzylpiperazine and Other Piperazine-Based Derivatives. In *Novel Psychoactive Substances*; Elsevier, 2013; pp 179–209.

(526) Ghose, A. K.; Herbertz, T.; Hudkins, R. L.; Dorsey, B. D.; Mallamo, J. P. Knowledge-Based, Central Nervous System (CNS) Lead Selection and Lead Optimization for CNS Drug Discovery. *ACS Chemical Neuroscience* **2012**, *3* (1), 50–68.

(527) Serajuddin, A. T. M. Salt Formation to Improve Drug Solubility. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59* (7), 603–616.

(528) Abbott, N. J.; Rönnbäck, L.; Hansson, E. Astrocyte-Endothelial Interactions at the Blood-Brain Barrier. *Nature Reviews Neuroscience* **2006**, *7* (1), 41–53.

(529) Ballabh, P.; Braun, A.; Nedergaard, M. The Blood-Brain Barrier: An Overview: Structure, Regulation, and Clinical Implications. *Neurobiology of Disease* **2004**, *16* (1), 1–13.

(530) Jain, K. K. Nanobiotechnology-Based Strategies for Crossing the Blood–brain Barrier. *Nanomedicine* **2012**, *7* (8), 1225–1233.

(531) Fernández, C.; Nieto, O.; Fontenla, J. A.; Rivas, E.; de Ceballos, M. L.; Fernández-Mayoralas, A. Synthesis of Glycosyl Derivatives as Dopamine Prodrugs: Interaction with Glucose Carrier GLUT-1. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, *1* (5), 767–771.

(532) Heldman, E.; Ashani, Y.; Raveh, L.; Rachaman, E. S. Sugar Conjugates of Pyridinium Aldoximes as Antidotes against Organophosphate Poisoning. *Carbohydrate Research* **1986**, *151* (C), 337–347.

(533) Krasiński, A.; Radić, Z.; Manetsch, R.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. In Situ Selection of Lead Compounds by Click Chemistry: Target-Guided Optimization of Acetylcholinesterase Inhibitors. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (18), 6686–6692.

(534) Deng, D.; Sun, P.; Yan, C.; Ke, M.; Jiang, X.; Xiong, L.; Ren, W.; Hirata, K.; Yamamoto, M.; Fan, S.; Yan, N. Molecular Basis of Ligand Recognition and Transport by Glucose Transporters. *Nature* **2015**, *526* (7573), 391–396.

(535) Leitch, J. M.; Carruthers, A. $\alpha$- and $\beta$-Monosaccharide Transport in Human Erythrocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2009**, *296* (1), C151–C161.

(536) Carruthers, A.; Melchior, D. L. Transport of .Alpha.- and .Beta.-D-Glucose by the Intact Human Red Cell. *Biochemistry* **1985**, *24* (15), 4244–4250.

(537) Facchetti, A.; Denti, M. Perylene-Based Semiconductors. US 20160240789, 2016.

(538) Andersen, S. M.; Heuckendorff, M.; Jensen, H. H. 3-(Dimethylamino)-1-Propylamine: A Cheap and Versatile Reagent for Removal of Byproducts in Carbohydrate Chemistry. *Organic Letters* **2015**, *17* (4), 944–947.

(539) Lin, A. J.; Loo, T. L. Synthesis and Antitumor Activity of Halogen-Substituted 4-(3, 3-Dimethyl-1-Triazeno) Quinolines. *Journal of Medicinal Chemistry* **1978**, *21* (3), 268–272.

(540) Wu, H.; Long, C.; Lin, J.; Chen, X.; Liao, Y.; Liu, Z.; Wei, C.; Chen, L.; Chen, S. Process for Preparation of Salt Form and Crystal Form of Quinoline Derivative, and Intermediate. WO 2017050224, 2017.

(541) Renou, J. Synthèse de Nouveaux Réactivateurs de l'acétylcholinestérase Phosphorylée Par Des Neurotoxiques Organophosphorés, 2014.

(542) Zhu, H.; Liu, Y.; Liu, W.; Yin, F.; Cao, Z.; Bao, J.; Li, M. Synthesis , Characterisation and Acetylcholinesterase-Inhibition Activities Of. **2016**, *40*, 16–20.

(543) Faghih, R.; Gfesser, G. a; Gopalakrishnan, M. Advances in the Discovery of Novel Positive Allosteric Modulators of the Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Recent patents on CNS drug discovery* **2007**, *2* (2), 99–106.

(544) Serkov, I. V; Bachurin, S. O. 1 , 2 , 4 Thiadiazoles as Promising Multifunctional Agents for Treatment of Neurodegenerative Diseases. **2016**, *65* (6), 1586–1591.

(545) Vasiliy A. Bakulev; Wim Dehaen. *The Chemistry of 1,2,3-Thiadiazoles*; 1954; Vol. 1934.

(546) Grigoriev, V. V.; Makhaeva, G. F.; Proshin, A. N.; Kovaleva, N. V.; Rudakova, E. V.; Boltneva, N. P.; Gabrel'yan, A. V.; Lednev, B. V.; Bachurin, S. O. 1,2,4-Thiadiazole Derivatives as Effective NMDA Receptor Blockers with Anticholinesterase Activity and Antioxidant Properties. *Russian Chemical Bulletin* **2017**, *66* (7), 1308–1313.

(547) Li, Y.; Geng, J.; Liu, Y.; Yu, S.; Zhao, G. Thiadiazole-a Promising Structure in Medicinal Chemistry. *ChemMedChem* **2013**, *8* (1), 27–41.

(548) Chao, S. Synthèses de Ligands Multi-Cibles Contre La Maladie d'Alzheimer et Développement Des Sondes Fluorescentes Pour La Détection Des Acétylcholinestérases, 2016.

(549) Nguyen, J.; McEwen, C.-A.; Knaus, E. E. Hantzsch 1,4-Dihydropyridines Containing a Nitrooxyalkyl Ester Moiety to Study Calcium Channel Antagonist Structure-Activity Relationships and Nitric Oxide Release. *Drug Development Research* **2000**, *51* (4), 233–243.

(550) Heslin, J. C.; Moody, C. J. Rhodium Carbenoid Mediated Cyclisations. Part 2. Synthesis of Cyclic Ethers. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1988**, No. 6, 1417.

(551) Bloom, J. D.; Curran, K. J.; Digrandi, M. J.; Dushin, R. G.; Lang, S. A.; Norton;, E. B.; Ross, A. A.; O'Hara, B. M. Benzamide-Containing Aryl Thiourea Derivatives Useful as Inhibitors of Herpes Viruses. WO 2000034238, 2000.

(552) Smith, R. A.; Laping, N. J.; Venkatesan, A.; Thompson, S. K.; Kethiri, R. R.; Sivanandhan; Venkateshappa, D.; Chandregowda; Kulkarni, B.; Dewang, P.; Kristam, R.; Kasibhatla, S.; Devraj, R. Preparation of Imidazole Derivatives as CYP17 Inhibitors for the Treatment of Cancer. WO 2013049565.

(553) Cremin, D. J.; Hegarty, A. F.; Begley, M. J. Mechanism of Reaction of 2-Ethoxy-1-Ethoxycarbonyl-1,2-Dihydroquinoline (EEDQ) with Nucleophiles and Its Crystal Structure. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1980**, No. 2, 412.

(554) Ormerod, D.; Willemsens, B.; Mermans, R.; Langens, J.; Winderickx, G.; Kalindjian, S. B.; Buck, I. M.; McDonald, I. M. Development of a Scalable Synthesis of Gastrazole (JB95008): A Potent CCK2 Receptor Antagonist. *Organic Process Research and Development* **2005**, *9* (4), 499–507.

(555) Dunetz, J. R.; Magano, J.; Weisenburger, G. A. Large-Scale Applications of Amide Coupling Reagents for the Synthesis of Pharmaceuticals. *Organic Process Research and Development* **2016**, *20* (2), 140–177.

(556) Aliaga, W.; Somasundaran, P. Molecular Orbital Modeling and UV Spectroscopic Investigation of Absorption of Oxime Surfactants. *Langmuir* **1987**, *3* (6), 1103–1108.

(557) Saito, Y.; Matsumoto, K.; Bag, S. S.; Ogasawara, S.; Fujimoto, K.; Hanawa, K.; Saito, I. C8-Alkynyl- and Alkylamino Substituted 2′-Deoxyguanosines: A Universal Linker for Nucleic Acids Modification. *Tetrahedron* **2008**, *64* (16), 3578–3588.

(558) Cheung, F. K.; Hayes, A. M.; Morris, D. J.; Wills, M. The Use of a [4 + 2] Cycloaddition Reaction for the Preparation of a Series of 'Tethered' Ru( <scp>ii</Scp> )–diamine and Aminoalcohol Complexes. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5* (7), 1093–1103.

(559) Darses, B.; Michaelides, I. N.; Sladojevich, F.; Ward, J. W.; Rzepa, P. R.; Dixon, D. J. Expedient Construction of the [7–5–5] All-Carbon Tricyclic Core of the Daphniphyllum Alkaloids Daphnilongeranin B and Daphniyunnine D. *Organic Letters* **2012**, *14* (7), 1684–1687.

(560) Navakoski de Oliveira, K.; Chiaradia, L. D.; Alves Martins, P. G.; Mascarello, A.; Sechini Cordeiro, M. N.; Carvalho Guido, R. V.; Andricopulo, A. D.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J.; Vernal, J.; Terenzi, H. Sulfonyl-Hydrazones of Cyclic Imides Derivatives as Potent Inhibitors of the Mycobacterium Tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase B (PtpB). *MedChemComm* **2011**, *2* (6), 500.

(561) Takács, A.; Ács, P.; Farkas, R.; Kokotos, G.; Kollár, L. Homogeneous Catalytic Aminocarbonylation of 1-Iodo-1-Dodecene. The Facile Synthesis of Odd-Number Carboxamides via Palladium-Catalysed Aminocarbonylation. *Tetrahedron* **2008**, *64* (42), 9874–9878.

(562) Manley-King, C. I.; Bergh, J. J.; Petzer, J. P. Inhibition of Monoamine Oxidase by C5-Substituted Phthalimide Analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2011**, *19* (16), 4829–4840.

(563) Hsieh, J.-C.; Cheng, C.-H. Nickel-Catalyzed Coupling of Isocyanates with 1,3-Iodoesters and Halobenzenes: A Novel Method for the Synthesis of Imide and Amide Derivatives. *Chemical Communications* **2005**, No. 36, 4554.

(564) Worlikar, S. A.; Larock, R. C. Palladium-Catalyzed One-Step Synthesis of Isoindole-1,3-Diones by Carbonylative Cyclization of o -Halobenzoates and Primary Amines. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73* (18), 7175–7180.

(565) Das, S.; Addis, D.; Knöpke, L. R.; Bentrup, U.; Junge, K.; Brückner, A.; Beller, M. Selective Catalytic Monoreduction of Phthalimides and Imidazolidine-2,4-Diones. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (39), 9180–9184.

(566) Bartels, J.; Lu, P.; Maurer, K.; Walker, A. V.; Moeller, K. D. Site-Selectively Functionalizing Microelectrode Arrays: The Use of Cu(I)-Catalysts. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 11199–11205.

(567) Ngai, M. H.; Yang, P.-Y.; Liu, K.; Shen, Y.; Wenk, M. R.; Yao, S. Q.; Lear, M. J. Click-Based Synthesis and Proteomic Profiling of Lipstatin Analogues. *Chemical Communications* **2010**, *46* (44), 8335.

(568) Qiao, C.; Jeon, H. B.; Sayre, L. M. Selective Inhibition of Bovine Plasma Amine Oxidase by Homopropargylamine, a New Inactivator Motif. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (25), 8038–8045.

(569) Nagao, Y.; Yoshida, T.; Arimitsu, K.; Kozawa, K. Synthesis and Properties of Dicarboximide Derivatives of Perylene and Azaperylene. *Heterocycles* **2010**, *80* (2), 1197–1213.

(570) Luo, H.; Zeng, Q.; Liu, Z.; Wei, Y.; Li, B.; Wang, F. Mild and Efficient Synthesis of 1,8-Naphthalide and 1,8-Naphthalenedimethanol. *Synthetic Communications* **2004**, *34* (12), 2269–2275.

(571) Higashi, T.; Uemura, K.; Inami, K.; Mochizuki, M. Unique Behavior of 2,6-Bis(Bromomethyl)Naphthalene as a Highly Active Organic DNA Crosslinking Molecule. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2009**, *17* (10), 3568–3571.

(572) Zysman-Colman, E.; Nevins, N.; Eghball, N.; Snyder, J. P.; Harpp, D. N. Crossover Point between Dialkoxy Disulfides (ROSSOR) and Thionosulfites ((RO)2S=S): Prediction, Synthesis, and Structure. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (1), 291–304.

(573) Tolbert, L. M.; Ali, M. Z. 1-Phenyl-3,4:5,6-Dibenzocycloheptatrienyl Anion. A Stable Antiaromatic Carbanion. *The Journal of Organic Chemistry* **1982**, *47* (24), 4793–4795.

(574) Lin, Y. A.; Chalker, J. M.; Davis, B. G. Olefin Cross-Metathesis on Proteins: Investigation of Allylic Chalcogen Effects and Guiding Principles in Metathesis Partner Selection. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (47), 16805–16811.

(575) Tietze, L. F.; Bothe, U. Ortho-Carboranyl Glycosides of Glucose, Mannose, Maltose and Lactose for Cancer Treatment by Boron Neutron-Capture Therapy. *Chemistry - A European Journal* **1998**, *4* (7), 1179–1183.

(576) Dickschat, J. S.; Bode, H. B.; Kroppenstedt, R. M.; Müller, R.; Schulz, S. Biosynthesis of Iso-Fatty Acids in Myxobacteria. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2005**, *3* (15), 2824.

(577) Parekh, V.; Ramsden, J. A.; Wills, M. Asymmetric Transfer Hydrogenation of Quinolines Using Tethered Ru(II) Catalysts. *Tetrahedron Asymmetry* **2010**, *21* (11–12), 1549–1556.

(578) Smith, Roger, A.; Laping, Nicholas, J.; Thompson, Scott, K.; Kethiri, Raghava, R.; Sivanandhan, D.; Venkateshappa, C.; Kulkarni, B.; Dewang, P.; Kristam, R.; Kasibhatla, S.; Devraj, R. Imidazole Derivatives as CYP17 Inhibitors for the Treatment of Cancer, 2013.

(579) Katalinić, M.; Zandona, A.; Ramić, A.; Zorbaz, T.; Primožič, I.; Kovarik, Z. New Cinchona Oximes Evaluated as Reactivators of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Compounds. *Molecules* **2017**, *22* (7), 1234.

(580) Kovarik, Z.; Bosak, A.; Jeli, D. In Vitro Evaluation of Aldoxime Interactions with Human Acetylcholinesterase. *Croatica Chemica Acta* **2008**, *81* (1), 47–57.

(581) Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology* **1961**, *7* (2), 88–95.

(582) Carletti, E.; Li, H.; Li, B.; Ekström, F.; Nicolet, Y.; Loiodice, M.; Gillon, E.; Froment, M. T.; Lockridge, O.; Schopfer, L. M.; Masson, P.; Nachon, F. Aging of Cholinesterases Phosphylated by Tabun Proceeds through O-Dealkylation. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (47), 16011–16020.

(583) Kabsch, W. Integration, Scaling, Space-Group Assignment and Post-Refinement. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **2010**, *66* (2), 133–144.

(584) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser Crystallographic Software. *Journal of Applied Crystallography* **2007**, *40* (4), 658–674.

(585) Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkóczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. PHENIX: A Comprehensive Python-Based System for Macromolecular Structure Solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **2010**, *66* (2), 213–221.

(586) Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeerschd, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform. *Journal of Cheminformatics* **2012**, *4* (8).

(587) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and Development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **2010**, *66* (4), 486–501.

(588) Kwon, Y. *Handbook of Essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientists*; Kluwer Academic Publishers: Boston, 2002.

(589) Rispin, A.; Farrar, D.; Margosches, E.; Gupta, K.; Stitzel, K.; Carr, G.; Greene, M.; Meyer, W.; McCall, D. Alternative Methods for the Median Lethal Dose (LD 50) Test: The up-and-down Procedure for Acute Oral Toxicity. *ILAR Journal* **2002**, *43* (4), 233–243.

# PUBLICATIONS

# Potent 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime reactivators of organophosphate-inhibited cholinesterases with predicted blood-brain barrier penetration

Tamara Zorbaz,[a] Anissa Braïki,[b] Nikola Maraković,[a] Julien Renou,[b] Eugenio de la Mora,[c] Nikolina Maček Hrvat,[a] Maja Katalinić,[a] Israel Silman,[d] Joel L. Sussman,[e] Guillaume Mercey,[b] Catherine Gomez,[b] Romain Mougeot,[b] Belén Pérez,[f] Rachid Baati,[g] Florian Nachon,[h] Martin Weik,[c] Ludovic Jean,*[b] Zrinka Kovarik*[a] and Pierre-Yves Renard*[b]

**Abstract:** A new series of 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime compounds were designed, synthesized and tested *in vitro*, *in silico* and *ex vivo* as reactivators of human acetylcholinesterase (hAChE) and butyrylcholinesterase (hBChE) inhibited by organophosphates (OPs) (e.g., VX, sarin, cyclosarin, tabun and paraoxon). The reactivation rates of three oximes (**16**, **17**, **18**) were greater than those of 2-PAM, and comparable to HI-6, two pyridinium aldoximes currently used by the armies of several countries worldwide. The important interactions for a productive orientation of the oxime group within the OP-inhibited enzyme were clarified by molecular modelling studies and by the resolution of the crystal structure of the complex of **17** with *Torpedo californica* AChE. The prediction of blood-brain barrier penetration was carried out for oximes **15**−**18** based on their physicochemical properties and *in vitro* brain membrane permeation assay. Among the evaluated compounds, two morpholine-3-hydroxy pyridine aldoxime conjugates showed to be promising reactivators of OP-inhibited cholinesterases. Moreover, *ex vivo* efficient reactivation of phosphorylated native cholinesterases by selected oximes enabled significant hydrolysis of VX, sarin, paraoxon and cyclosarin in whole human blood implying a scavenging potential of the oximes.

[a] T. Zorbaz, Dr. N. Maraković, Dr. N. Maček Hrvat, Dr. M. Katalinić, Dr Z. Kovarik*
Institute for Medical Research and Occupational Health
Ksaverska cesta 2, HR-10000 Zagreb, Croatia
E-mail: zkovarik@imi.hr
[b] A. Braïki, Dr. J. Renou, G. Mercey, C. Gomez, R. Mougeot, Prof. L. Jean*, Prof. P.-Y. Renard*
COBRA (UMR 6014), INSA Rouen, CNRS, Normandie Univ, UNIROUEN, 76000 Rouen, France
E-mail: ludovic.jean@univ-rouen.fr; pierre-yves.renard@univ-rouen.fr
[c] Dr. E. de la Mora, Dr. M. Weik
Univ Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IBS, 38000 Grenoble, France
[d] Prof. I. Silman
Department of Neurobiology, Weizmann Institute of Science
6100 Rehovot, Israel
[e] Prof. J. Sussman
Department of Structural Biology, Weizmann Institute of Science
76100 Rehovot, Israel
[f] Prof. B. Perez
Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia
Universitat Autònoma de Barcelona
08193, Bellaterra, Barcelona, Spain
[g] Prof Rachid Baati
Institut de Chimie et Procédés pour l'Energie, l'Environnement et la Santé (ICPEES), ECPM, UMR 7515 CNRS - Université de Strasbourg, 25 rue Becquerel, Strasbourg 67087 Cedex 02, France
[h] Dr. F. Nachon
Département de Toxicologie et Risques Chimiques
Institut de Recherche Biomédicale des Armées
91220 Brétigny-sur-Orge, France

T.Z. and A.B. contributed equally to this study.

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document

## Introduction

Organophosphorus compounds (OPs) were originally developed as pesticides, but due to their non-selective species toxicity, they were also used as nerve agents (**Figure 1**). Annually, pesticide intoxication causes 200,000 fatalities worldwide,[1] while nerve agents have been used in several terrorist attacks against civilians (e.g., Matsumoto, Japan, 1994; Tokyo subway, 1995), and most recently during the civil war in Syria[2] and the assassination with VX at the Malaysian airport. Since September 11, 2001 research on the mechanisms of action of OPs, and pretreatments and treatments that prevent or reverse their severe biological effects has intensified.

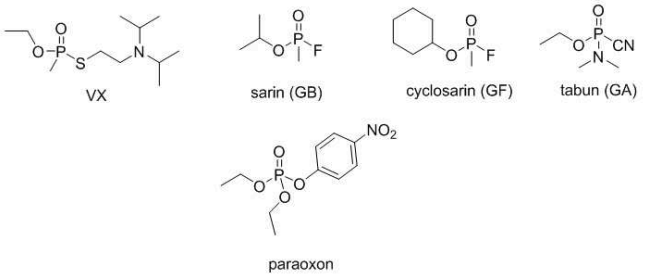



**Figure 1** Nerve agents (top line) and pesticide (lower line) used in this study

The acute toxicity of OPs is due to the irreversible inhibition of acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7). This key enzyme regulates the cholinergic transmission in the peripheral and central nervous systems by rapid hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh). AChE inhibition leads to accumulation of ACh at neuronal synapses and neuromuscular junctions, resulting in paralysis, seizures, respiratory arrest, and/or death.[3] In addition, long-term central nervous system impairments (i.e., cognitive and behavioural deficits) have been observed in survivors of OP poisoning due to neurotoxic

mechanisms that lead to neuronal damage in specific brain regions.[4] Butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) also hydrolyses ACh effectively. BChE's physiological role is not yet understood, but it protects AChE from OPs and may be indirectly involved in the regulation of the cholinergic system.[5] Emergency treatment of OP poisoning involves a rapid administration of a cocktail composed of an antimuscarinic agent (e.g., atropine), a pyridinium oxime as an AChE reactivator (standard oximes employed include 2-PAM, obidoxime and HI-6, and; **Figure 2**) and an anticonvulsant drug (e.g., diazepam).[6]

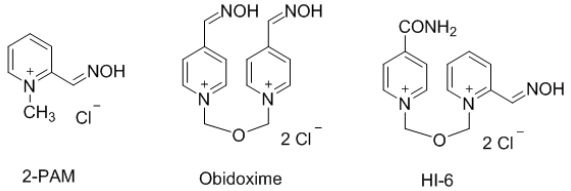



**Figure 2** Chemical structures of standard pyridinium oximes in use

An oxime reactivates the OP-inhibited enzyme by nucleophilic displacement of the OP moiety bound to the catalytic serine of the cholinesterase (ChE) active site.[7] Although both AChE and BChE share the same mechanism of hydrolysis of substrates that includes the formation of a Michaelis-type complex, acylation of the catalytic serine, and spontaneous deacylation with a water molecule, the difference in aminoacid residues composition in the active site domains, such as acyl pocket, choline binding site and peripheral site, directs the specificities and sensitivities of AChE and BChE to a wide range of ligands and inhibitors.[8] It is worth mentioning that the phosphylation of the enzymes by OPs is analogous to the mechanism of hydrolysis (i.e., OPs are structural analogues of substrate transition state in hydrolysis)[9] and results in a structurally different phosphylated enzyme conjugate. Therefore, no single oxime, reported in the literature, is equally efficient against a variety of OPs and potent for both AChE and BChE.

Numerous mono- and bispyridinium oximes with a quaternary nitrogen atom, analogous to the standard oximes (**Figure 2**), have been synthesized and tested so far.[10] However, due to their permanent positive charge, they do not cross the blood-brain barrier (BBB) efficiently[11] and hence do not reactivate brain AChE.[12] Therefore, in recent years, several research teams have focused their efforts on developing a new generation of AChE reactivators including uncharged molecules with protonatable groups.[13]

In this context we described the synthesis of new uncharged 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime reactivators connected *via* an aliphatic linker (with four to five methylene groups) to simple protonatable tertiary amines (morpholine, piperidine) that can be fused with dimethoxybenzene (dimethoxy-tetrahydroisoquinoline) and substituted with *N*,*N*-dimethylaniline (1-(4-*N*,*N*-dimethylamino phenyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline) (**Figure 3**). These substituents were chosen to improve the binding affinity facilitating cation-π or π-π stacking interactions with residues in the peripheral site of the enzyme. In addition, such oximes are more prone to passive transport across the membranes because they are ampholytes with a tertiary amine group with a p$K_a$~8, having also a fraction of non-ionized species.[13n, 14] Indeed, the neutral species can be expected to cross the blood-brain barrier delivering the reactivator into the brain, and upon establishing the pH-dependent ionization equilibrium in the CNS, the ionized form would have the best chance of productive interaction with the OP-inhibited enzyme, because the protonated amine form is efficiently attracted to the electron rich active centre environment of the inhibited AChE.[15]

The novel compounds were thoroughly characterized in terms of their inhibitory effect on human AChE (hAChE) and BChE (hBChE), and tested against VX-, tabun-, sarin-, cyclosarin- and paraoxon-inhibited hAChE and hBChE. The crystallographic structure of *Tc*AChE in complex with oxime **17**, together with molecular docking studies of several oximes within OP-inhibited cholinesterases revealed the favourable orientation and interactions of oximes within the enzymatic active site gorge. Furthermore, the potency of these oximes to cross the BBB was predicted by *in silico* studies based on their physicochemical properties and the *in vitro* parallel artificial membrane permeation assay (PAMPA). In addition to the potent *in vitro* reactivation, a pseudo-catalytic scavenging system (i.e., degradation of an OP by an oxime together with native cholinesterases) was investigated *ex vivo* as a potential approach to treatment of OP poisoning as previously reported.[16]

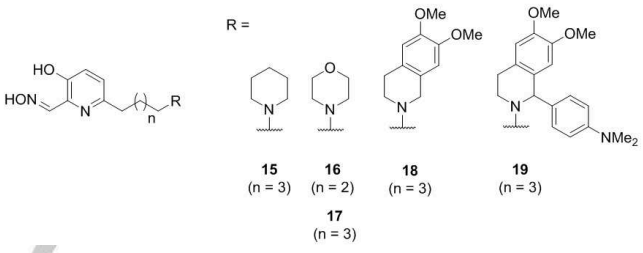
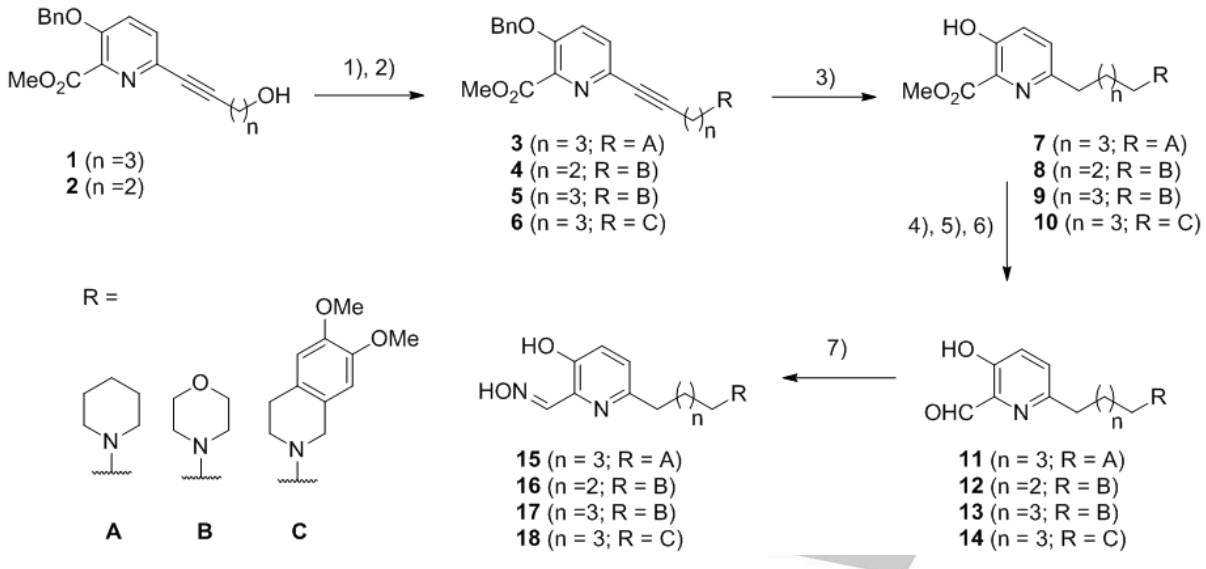



**Figure 3.** Structure of 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime reactivators

## Results

**Oxime synthesis.** The synthesis of oximes **15**−**19** followed the strategy for the preparation of uncharged reactivators (**Scheme 1**) developed previously (see supporting information).[13j, k] From compounds **1** or **2** the first step consisted in forming the corresponding mesylates followed by a nucleophilic substitution with the secondary amine **A**−**C**. Compounds **3**−**6** were prepared at a yield of 36−72% (two steps). Then concomitant reduction of the alkyne and deprotection of the phenol function was carried out using Pearlman's catalyst under a $H_2$ atmosphere to obtain compounds **7**−**10** with a 53−99% yield. This was followed by a sequence comprising the protection of the phenol group as a *t*-butyldimethylsilyl ether (TBS) and subsequent reduction of the methyl ester to the corresponding aldehyde using DIBAL-H, followed by deprotection with TBAF to furnish aldehydes **11**−**14** in 19−44% yield. The last step was to form the oxime function by condensation of the aldehyde with hydroxylamine. The desired oximes **15**−**18** were obtained in seven steps from **1** or **2** with an overall yield of 4−21%. Regarding the synthesis of oxime **19**, its preparation was reported earlier.[17]




**Scheme 1.** Conditions and reagents: 1) Mesyl chloride (1.5 equiv.), $Et_3N$ (3 equiv.), $CH_2Cl_2$, rt; 2) Amine RH **A**, **B**, or **C** (1 equiv.), $K_2CO_3$ (3 equiv.), $CH_3CN$, reflux; 3) $H_2$, $Pd(OH)_2$ (10% wt), EtOAc/MeOH (1/2), rt; 4) TBDMSCl (2.2 equiv.), imidazole (3 equiv.), DMF, rt, 2 h or TBDMSOTf (3 equiv.), 2,6-lutidine (3 equiv.), $CH_2Cl_2$, rt, 3.5 h; 5) DIBAL-H (2.5 equiv.), $CH_2Cl_2$, -78 °C, 15 min); 6) TBAF (1,1 equiv.), THF, rt, 1 h; 7) $NH_2OH.HCl$ (1.2 equiv.) NaOAc (1.3 equiv.), EtOH, rt, 1 h

**Reversible inhibition of hAChE and hBChE.** We tested oximes **15−19** as reversible hAChE and hBChE inhibitors. Enzyme activity was measured in the presence of the substrate acetylthiocholine and in an oxime concentration range to determine the inhibition dissociation constant ($K_i$). All of the oximes inhibited both hAChE and hBChE in a range of micromolar concentrations (**Table 1**) like standard pyridinium and bispyridinium aldoximes (e.g., 2-PAM, HI-6).[18] The highest inhibition of both hAChE and hBChE was observed for oximes **15** and **19** bearing a piperidine ring and a 1-(4-*N*,*N*-dimethylamino phenyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, respectively. It should be noted that all of these oximes – except compound **16** – inhibited both hAChE and hBChE with very similar potency. Thus, the selectivity for hBChE over hAChE was observed only for oxime **16** bearing a morpholine ring and the shortest linker (butyl). The affinities determined suggested that all of the tested oximes would bind to phosphylated hAChE and hBChE, and hopefully reactivate them by nucleophilic displacement.

**Table 1.** Dissociation inhibition constants ($K_i$ ± S.E.) of hAChE and hBChE for oximes **15-19** determined from at least three experiments at 25 °C.

| hAChE | | hBChE | |
|---|---|---|---|
| Oxime | $K_i$ (μM) | Oxime | $K_i$ (μM) |
| **15** | 10 ± 1.5 | **15** | 9.8 ± 3.0 |
| **16** | 135 ± 14 | **16** | 46 ± 20 |
| **17** | 168 ± 23 | **17** | 170 ± 15 |
| **18** | 37 ± 1.1 | **18** | 33 ± 1.2 |
| **19** | 5.4 ± 1.2 | **19** | 2.3 ± 0.5 |
| HI-6 | 46 ± 4.3 | HI-6 | 420 ± 100 |
| 2-PAM | 210 ± 45 | 2-PAM | 140 ± 16 |

**Oxime-assisted reactivation of OP-phosphylated hAChE and hBChE.** We tested oximes **15–19** as reactivators of hAChE and hBChE inhibited by five OPs (VX, sarin, cyclosarin, paraoxon and tabun) and compared them to the standard reactivator, HI-6.[16c, 19] The reactivation of phosphylated hAChE was evaluated over a wide oxime concentration range (**Figure S1**) enabling us to deconstruct reactivation constants (**Table 2**). The majority of the oximes reactivated all of the tested OP-inhibited hAChE to a high extent (i.e., 80-100 % of the enzyme activity). The most notable result was obtained for reactivation of VX-inhibited hAChE by oximes **16** and **17**, which displayed a ~2-fold higher maximal first-order reactivation rate constant ($k_{+2}$) compared to HI-6. The highest second order reactivation rate constant of 30 800 $M^{-1}min^{-1}$ was obtained for oxime **18**, primarily due to its low dissociation constant ($K_{OX}$ = 10 μM). In the case of sarin, oximes **16**, **18** and **19** were the most potent reactivators when comparing the overall rate constants ($k_r$), but oxime **16** was the most effective one due to its high first-order reactivation rate ($k_{+2}$), while the potency of oxime **19** resulted primarily from its low dissociation constant (i.e., the highest affinity). The reactivation of cyclosarin-inhibited hAChE by oximes **15**-**18** terminated at 100%, but this level was reached much more slowly than for of HI-6 (**Table 2**). Interestingly, in the case of tabun, the 3-hydroxy-2-pyridine aldoximes reactivated 50-90 % of the phosphoroamidated hAChE conjugate known as particularly resistant to reactivation with the standard oximes. Again, oximes **16**-**18** were the most productive in nucleophilic displacement of phosphorus moiety, although the maximal

**Table 2.** Reactivation of OP-inhibited human AChE by oximes **15-19** and HI-6[a]

| OP | Oxime (μM) | $k_{+2}$ ($min^{-1}$) | $K_{OX}$ (μM) | $k_r$ ($M^{-1}$ $min^{-1}$) | $React_{max}$ (%) | t (min) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **VX** | | | | | | |
| | **15** | 0.17 ± 0.03 | 90 ± 30 | 1890 ± 410 | 90 | 30 |
| | **16** | 0.68 ± 0.07 | 300 ± 60 | 2270 ± 240 | 100 | 10 |
| | **17** | 0.57 ± 0.08 | 120 ± 50 | 4900 ± 1250 | 100 | 10 |
| | **18** | 0.31 ± 0.01 | 10 ± 3 | 30900 ± 8100 | 100 | 10 |
| | **19** | 0.07 ± 0.01 | 30 ± 10 | 2310 ± 650 | 90 | 60 |
| | HI-6[b] | 0.33 ± 0.02 | 60 ± 10 | 5740 ± 1120 | 90 | 15 |
| **Sarin** | | | | | | |
| | **15** | 0.075 ± 0.003 | 160 ± 20 | 490 ± 50 | 100 | 60 |
| | **16** | 0.29 ± 0.03 | 270 ± 90 | 1080 ± 290 | 100 | 10 |
| | **17** | 0.12 ± 0.01 | 220 ± 60 | 560 ± 130 | 100 | 30 |
| | **18** | 0.180 ± 0.005 | 130 ± 10 | 1380 ± 60 | 90 | 15 |
| | **19** | 0.019 ± 0.001 | 20 ± 5 | 1000 ± 220 | 80 | >300[c] |
| | HI-6 | 0.9 ± 0.1 | 170 ± 40 | 5420 ± 780 | 60-90 | 4 |
| **Cyclosarin** | | | | | | |
| | **15** | 0.06 ± 0.01 | 330 ± 110 | 180 ± 40 | 100 | 60 |
| | **16** | 0.09 ± 0.01 | 430 ± 130 | 210 ± 40 | 100 | 45 |
| | **17** | 0.04 ± 0.01 | 120 ± 80 | 320 ± 140 | 100 | 100 |
| | **18** | 0.020 ± 0.006 | 120 ± 100 | 170 ± 90 | 100 | 120 |
| | **19**[d] | - | - | 80 ± 3 | 80 | >250[c] |
| | HI-6[d] | - | - | 22100 ± 1300 | 100 | <1 |
| **Tabun** | | | | | | |
| | **15** | 0.0033 ± 0.0004 | 110 ± 40 | 30 ± 5 | 50 | 400 |
| | **16** | 0.016 ± 0.007 | 410 ± 280 | 40 ± 10 | 80 | 420 |
| | **17** | 0.014 ± 0.001 | 310 ± 100 | 45 ± 10 | 90 | 240 |
| | **18** | 0.014 ± 0.002 | 140 ± 60 | 100 ± 40 | 80 | 210 |
| | **19** | 0.0029 ± 0.0002 | 7.6 ± 2.5 | 390 ± 120 | 60 | 520 |
| | HI-6 | nd[e] | nd | nd | 10 | 24 h |
| **Paraoxon** | | | | | | |
| | **15** | 0.07 ± 0.02 | 200 ± 110 | 340 ± 100 | 70 | 30 |
| | **16** | 0.36 ± 0.03 | 850 ± 150 | 430 ± 40 | 80 | 10 |
| | **17** | 0.27 ± 0.03 | 620 ± 180 | 440 ± 80 | 80 | 15 |
| | **18** | 0.24 ± 0.02 | 190 ± 70 | 1300 ± 350 | 80 | 10 |
| | **19** | 0.058 ± 0.006 | 30 ± 10 | 1800 ± 600 | 80 | 30 |
| | HI-6 | 0.026 ± 0.001 | 590 ± 50 | 50 ± 2.2 | 90 | 170 |

[a] The maximal first-order reactivation rate constant ($k_{+2}$ ± S.E.), the overall second-order reactivation rate constant ($k_r$ ± S.E.), the phosphylated enzyme-oxime dissociation constant ($K_{OX}$ ± S.E.), the maximal reactivation ($React_{max}$) and the time to maximal reactivation (t) were evaluated from at least three experiments at 25 °C; [b] from Maček Hrvat *et al.*[16c]; [c] reactivation had not terminated at this time point; [d] linear dependence of $k_{obs}$ *vs.* oxime concentration in the studied concentration range; [e] nd, not determined.

reactivation was achieved much more slowly than with other OPs. Oximes **15-19** were also evaluated for the reactivation of the diethyl phosphonylated hAChE conjugate obtained by inhibition of hAChE with paraoxon, the active metabolite of the insecticide parathion. In terms of the overall reactivation rate, $k_r$, the paraoxon-hAChE conjugate was the most productively reactivated by oxime **19** as a result of its high binding affinity. All of the novel oximes reactivated the paraoxon-inhibited hAChE more potently than HI-6 primarily due to a higher $k_{+2}$ (e.g., 15-fold higher for **16**). Moreover, in comparison with the other tested OPs, it seems that the tested 3-hydroxy-2-pyridine

aldoximes showed the largest improvement in reactivation over HI-6 for the diethyl phosphonylated hAChE.

In general, the reactivation of phosphylated hBChE still presents a challenge, since the standard pyridinium aldoximes are poor reactivators of hBChE, and only a few reactivators, recently described in the literature, exhibited promising potency for the reactivation of VX- and paraoxon-inhibited hBChE.[13j, 16d, 20] Reactivation of phosphylated hBChE was very efficient for conjugates with cyclosarin, VX and paraoxon, but weak for sarin and tabun (**Table 3**). In terms of overall hBChE reactivation, out of the tested oximes, including HI-6, oxime **18** could be highlighted as the most potent reactivator of VX-, cyclosarin-, paraoxon- and tabun-inhibited hBChE. Oximes **15-19** were much better reactivators of paraoxon-inhibited hBChE than HI-6. For instance, the maximal reactivation rates of oximes **16**, **17**

**Table 3.** Reactivation of OP-inhibited human BChE by oximes **15-19** and HI-6[a]

| OP | Oxime (μM) | $k_{+2}$ ($min^{-1}$) | $K_{OX}$ (μM) | $k_r$ ($M^{-1}$ $min^{-1}$) | React.$_{max}$ (%) | t (min) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **VX** | | | | | | |
| | 15 | 0.05 ± 0.01 | 270 ± 150 | 180 ± 50 | 90 | 120 |
| | 16 | 0.10 ± 0.04 | 370 ± 240 | 270 ± 70 | 100 | 60 |
| | 17 | 0.059 ± 0.004 | 160 ± 40 | 360 ± 65 | 80 | 60 |
| | 18 | 0.096 ± 0.007 | 130 ± 30 | 760 ± 150 | 80 | 45 |
| | 19 | 0.020 ± 0.002 | 190 ± 40 | 110 ± 10 | 80 | 150 |
| | HI-6[b] | 0.12 ± 0.03 | 370 ± 230 | 330 ± 230 | 85 | 120 |
| **Sarin** | | | | | | |
| | **15** | 0.0022 ± 0.0005[c] | - | - | 45 | 325 |
| | **16** | 0.005 ± 0.001[c] | - | - | 90 | 325 |
| | **17** | 0.0036 ± 0.0004[c] | - | - | 65 | 325 |
| | **18** | 0.007 ± 0.002[c] | - | - | 80 | 325 |
| | **19** | 0.0042 ± 0.0005[c] | - | - | 65 | 325 |
| | HI-6 | 0.04 ± 0.02 | 270 ± 200 | 150 ± 40 | 100 | 300 |
| **Cyclosarin** | | | | | | |
| | **15** | 0.32 ± 0.04 | 810 ± 200 | 390 ± 50 | 90 | 15 |
| | **16** | 0.5 ± 0.1 | 790 ± 420 | 610 ± 180 | 90 | 10 |
| | **17** | 0.39 ± 0.05 | 700 ± 190 | 560 ± 80 | 90 | 15 |
| | **18** | 0.32 ± 0.07 | 330 ± 140 | 980 ± 210 | 90 | 15 |
| | **19** | 0.11 ± 0.03 | 160 ± 70 | 710 ± 150 | 90 | 60 |
| | HI-6[d] | - | - | 780 ± 30 | 90 | 30 |
| **Tabun** | | | | | | |
| | **15** | nd[e] | nd | nd | < 10 | 24 h |
| | **16** | nd | nd | nd | < 10 | 24 h |
| | **17** | nd | nd | nd | < 20 | 24 h |
| | **18** | 0.004 ± 0.001 | 540 ± 290 | 7.9 ± 2.8 | 40 | 24 h |
| | **19** | nd | nd | nd | < 25 | 24 h |
| | HI-6[f] | 0.0016 ± 0.0004 | 1800 ± 1000 | 0.91 ± 0.57 | 25 | 18 h |
| **Paraoxon** | | | | | | |
| | **15** | 0.020 ± 0.003 | 140 ± 40 | 140 ± 30 | 90 | 270 |
| | **16** | 0.15 ± 0.02 | 1160 ± 310 | 130 ± 20 | 90 | 40 |
| | **17** | 0.056 ± 0.006 | 250 ± 80 | 230 ± 50 | 100 | 90 |
| | **18** | 0.075 ± 0.01 | 290 ± 110 | 260 ± 70 | 100 | 90 |
| | **19** | 0.023 ± 0.008 | 640 ± 280 | 35 ± 4 | 80 | 270 |
| | HI-6 | 0.0068 ± 0.0004 | 450 ± 70 | 15 ± 2 | 80 | 500 |

[a] the maximal first-order reactivation rate constant ($k_{+2}$ ± S.E.), the overall second-order reactivation rate constant ($k_r$ ± S.E.), phosphylated enzyme-oxime dissociation constant ($K_{OX}$ ± S.E.), maximal reactivation (React$_{max}$) and the time to maximal reactivation (t) were evaluated from at least three experiments at 25 °C; [b] from Katalinić *et al.*[20a]; [c] the observed first-order reactivation rate constant, $k_{obs}$ ($min^{-1}$) ± S.D., at a given oxime concentration; [d] linear dependence of $k_{obs}$ *vs.* oxime concentration; [e] nd, not determined; [f] from Lucić Vrdoljak *et al.*[21]

and **18** were up to 22-fold higher than those of HI-6. Much like as in the case of hAChE reactivation, oxime **16** had the highest $k_{+2}$, showing its versatility and potency to effectively reactivate the cyclosarin, VX and paraoxon conjugates of hBChE. It should also be emphasized that for cyclosarin, the evaluated $k_{+2}$ values for all tested oximes were at least 5-fold higher for hBChE than those for hAChE (cf. **Table 2**). However, the binding affinities of oximes **15**-**19** were not good enough for them to be promising reactivators of cyclosarin-inhibited hBChE. Indeed, all of the evaluated dissociation constants for reactivation of hBChE were generally higher than the ones determined for hAChE. Therefore, it seems that low binding affinity, which possibly results from the greater flexibility and conformational freedom of oximes due to a more voluminous hBChE active site than that of hAChE, is a major obstacle in the search for an efficient reactivator of hBChE.

**Scavenging of OPs with oximes in whole human blood.** The results obtained for reactivation of OP-inhibited cholinesterases by the most potent reactivators directed our research towards oximes **16** and **18** as a potential oxime-assisted catalytic bioscavenger. These two oximes were chosen as representatives of potent reactivators with high reactivation efficiency and high binding affinity, respectively. To be more precise, these oximes and native cholinesterases in whole blood could establish the catalytic cycle of OPs hydrolysis by rapid conjugation of OP with both erythrocyte AChE and plasma BChE followed by enhanced oxime-assisted hydrolysis of the OP-enzyme conjugates. The maximal achieved recovery of total cholinesterase activity is proof of complete OP degradation (i.e., there is no more OP available for cholinesterase inhibition). Hence, we tested the *ex vivo* degradation of VX, sarin, cyclosarin and paraoxon in human whole blood (hWB) by measuring the recovery of total cholinesterase activity upon cycles of inhibition by OP and reactivation with oxime **16** and **18** (**Figure 4**). Oxime **16** recovered more than 80% of total cholinesterase activity within 5−15 min (depending on the OP excess), except for cyclosarin where it took 60 min for the activity recovery regardless of the OP concentration. Slower recovery of total activity observed for cyclosarin can be explained by poor *in vitro* reactivation of the cyclosarin-inhibited hAChE (cf. **Table 2**) and the fact that 80% of total cholinesterase activity in the hWB originates from hAChE. In the case of a 50-fold excess of paraoxon, lower recovery (40%) of total cholinesterase activity was observed. In comparison to oxime **16**, oxime **18** recovered activity much more slowly, reaching its maximum in 40−60 min in the case of all OPs as expected from lower maximal reactivation rate constants, $k_{+2}$ (cf. **Table 2** and **3**). Scavenging of paraoxon and cyclosarin by oxime **18** ended at 40-60% and 40% of total activity, respectively. Although we cannot offer an explanation, it is interesting to note that the activity recovery with oxime **18** in the case of sarin and cyclosarin and oxime **16** and cyclosarin was not related to the OP concentration.

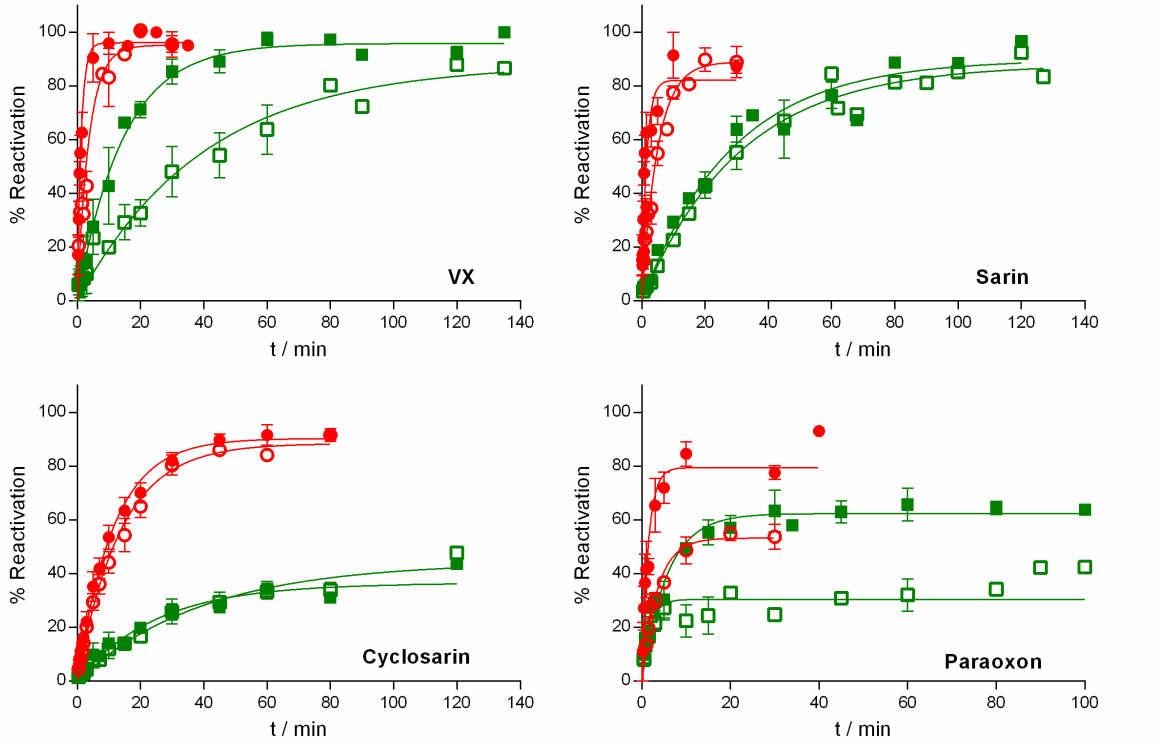



**Figure 4.** Recovery of total cholinesterase activity in whole human blood during scavenging of OPs (0.7 μM, full symbols and 3.4 μM, empty symbols) with oxime **16** (red) and **18** (green). Mean of at least 3 experiments ± SEM is presented.

**Crystal structure of the complex of oxime 17 with *Tc*AChE.** To understand how a representative oxime of the 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime group binds within the active site of AChE, we determined the crystal structure of the complex of oxime **17** with *Tc*AChE (PDB ID: 6EWK). **Figure 5** shows the reactivator bound within the *Tc*AChE active-site gorge in a productive conformation capable of a nucleophilic attack on an OP moiety covalently attached to catalytic Ser200. The morpholine group of **17** is bound to the peripheral anionic site (PAS) of *Tc*AChE, stabilized by interaction with Trp279 (equivalent to Trp286 in hAChE). Its binding at the PAS induces re-arrangements in the side chains of Tyr70 and Gln74 (Tyr72 and Leu76, respectively, in hAChE). The oxime moiety is located at the active site, being stabilized by an H-bond with $H_2O$ 14, and pointing towards catalytic Ser200 (Ser203 in hAChE) at a distance of 3.5 Å. The oxime moiety is also stabilized by a polyethylene glycol (PEG) molecule from the crystallization solution located between the aromatic ring of **17** and Trp84 (Trp 86 in hAChE). Comparison with the apo *Tc*AChE structure indicates that the 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime moiety displaces residues Phe330, Phe331 and His440 from their apo conformation (not shown). Superposition with the crystal structures of the sarin-hAChE (PDB ID: 5FPQ)[22] and VX-*Tc*AChE (PDB ID: 1VXR)[23] conjugates shows that **17** could bind to phosphonylated hAChE in the same active orientation as seen in the crystal structure of the **17**/*Tc*AChE complex. *In vivo,* in the absence of PEG, the oxime could oscillate between various conformations as observed in other crystal structures of complexes of oximes with AChE (e.g., bis-imidazolium oxime; PDB ID: 5BWB),[24] bis-pyridinium oxime ortho-7; PDB ID: 5BWC).[24] In complexes of other oximes with AChE, a conformational change in the side chain of Trp279 (Trp286 in hAChE) was reported.[24] However, in the **17**/*Tc*AChE complex, the Trp279 side chain retains its apo conformation.

The specific binding of the morpholine portion of **17** to the peripheral site confers it an advantage compared to 2-PAM, which binds only to the catalytic site stabilized by π-π interactions with Trp84 (Trp86 in hAChE) and that the oxime points to the opposite of the catalytic serine either phosphonylated or not (PDB ID 2VQ6; PDB ID: 2WG1).[25] Oxime **17** is anchored in a productive conformation directing the oxime to the catalytic serine, increasing the probability that reactivation occurs, HI-6 also binds to the peripheral site, as crystal structures have shown, however because of its lower $K_i$ (five times lower than that determined for **16** and **17**) it is also a high affinity inhibitor, a non-desired characteristic for AChE's reactivators. Even higher $K_i$ values were determined for compounds 15, 18 and 19 suggesting a different binding from 16 and 17 (see next section), either with additional interactions at the catalytic site or in analogous way to HI-6 by stabilizing an alternative conformation Trp279 (Trp286 in hAChE) at the peripheral site, being sandwiched between the indole group of the tryptophan and Tyr70 (Tyr72 in hAChE).

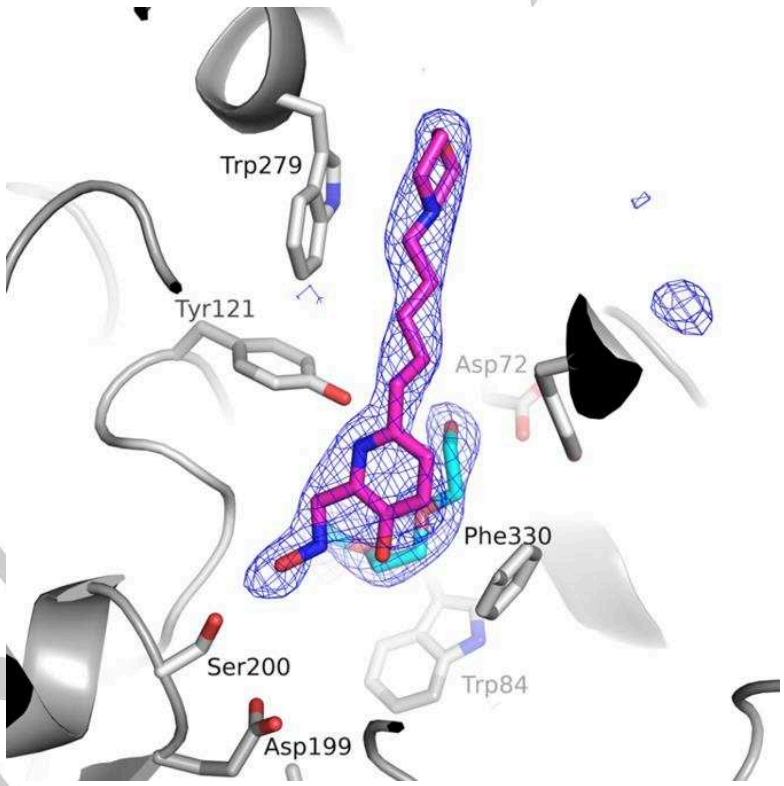



**Figure 5.** Crystal structure of the **17**/*Tc*AChE complex. The oxime moiety is at 3.5 Å from Ser200Oγ. The omit map Fo-Fc (blue mesh), shown around oxime **17** (magenta) and a PEG molecule (cyan) positioned between the oxime and Trp84 (not shown), is contoured at 3.5 σ.

**Docking of oximes into *Tc*AChE, and VX-mAChE and cyclosarin-hBChE.** Prior to docking analysis, we performed the amino sequence alignment of *Tc*AChE, mouse AChE (mAChE) and hAChE. **Figure S3** shows that, along with high indices of sequence identity (55.3%) and similarity (76.1%) there is a 92.9% identity in the active site domains such as the catalytic site, oxyanion hole, acyl pocket, choline-binding pocket of the active site, and the PAS.

We superimposed the crystal and model structures of *Tc*AChE and mAChE with oximes (**Figure 6)** to (a) analyse a model structure of the complex of **17** and apo *Tc*AChE for comparison with other molecular docking structures, (b) analyse how the conjugated OP moiety changes the binding mode of an oxime, and (c) reveal the nonbonding interactions in complexes that could be related to the reactivation efficacy of the oximes. The superposition of the crystal structure of the **17**/*Tc*AChE complex (cf. **Figure 5**) and its molecular docking model obtained by docking of **17** into the crystal structure (PDB ID: 6EWK) after the removal of both the oxime and the PEG molecule (**Figure S3**) showed that, in both structures, **17** has the same orientation, with its morpholine ring within the PAS, and its 3-hydroxy-2-pyridinealdoxime moiety directed towards the catalytic site. The major difference is a ~4 Å deeper positioning of the docked **17** within the active-site gorge, which in turn prevented the stabilisation of the morpholine group by interactions with Trp279 that resulted in multiple T-shaped π-π interactions between the 3-hydroxy-2-pyridinealdoxime moiety and Trp84 and His440, and shortened the distance between the oxime moiety and Ser200O$\gamma$ to only 2.6 Å (**Figure 6A**, **Table S4**). It seems that the PEG molecule present in the crystal structure largely predetermines the binding mode of **17** in the active-site gorge in the *Tc*AChE crystal structure. To examine the oxime's binding modes in phosphylated AChE, we superimposed the model structure of **17** docked into the *Tc*AChE crystal structure (cf. **Figure S3**) and the model obtained by docking it into the crystal structure of VX-inhibited mAChE (PDB ID: 2Y2U; **Figure 6B**).[26]

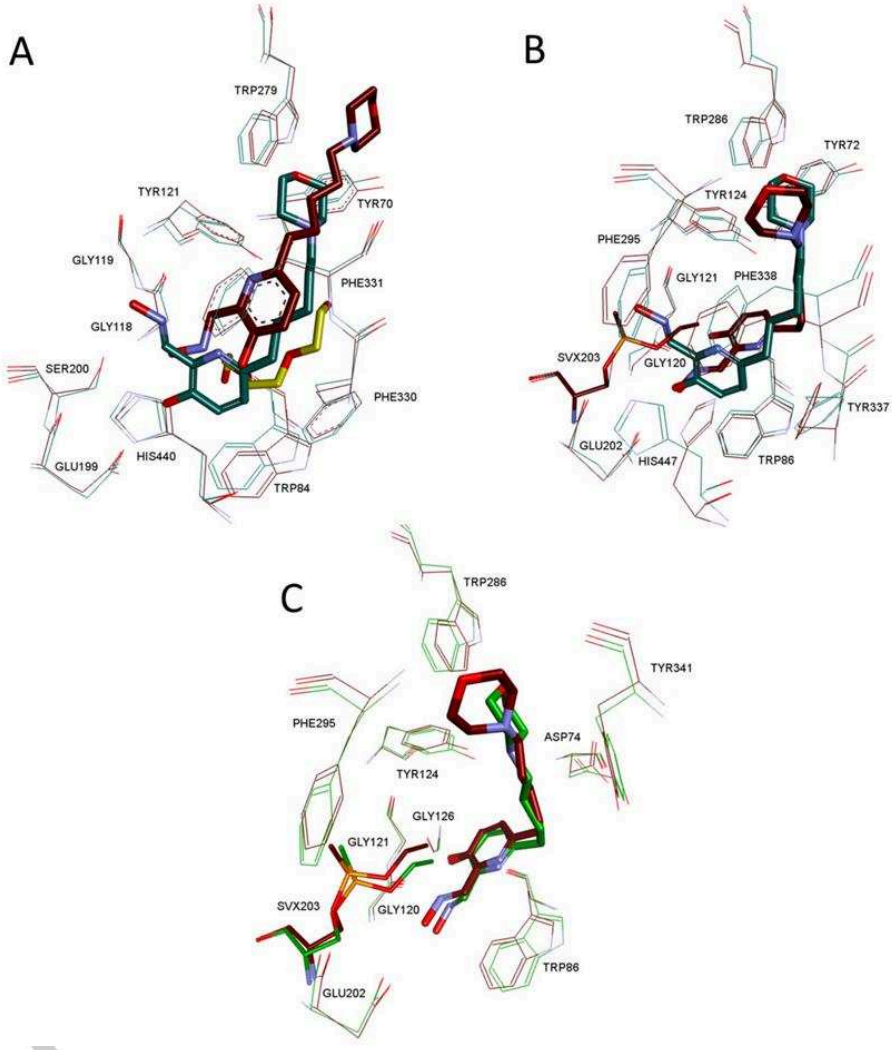



**Figure 6.** Superposition of A) The crystal structure of the **17**/*Tc*AChE complex (carbon atoms shown in purple) and the model structure of the complex **17** with apo *Tc*AChE (6EWK once the oxime and PEG were omitted) (carbon atoms shown in dark green); B) The model structures of **17** bound to apo *Tc*AChE (purple) and VX-mAChE conjugate (dark green); C) The model structures of the VX-mAChE conjugate complexed with **16** (green) or **17** (purple). Oxygen atoms are shown in red, nitrogen atoms in cyan, and the phosphorus atoms in orange.

As one might expect, the steric hindrance between the ethyl moiety of the conjugated VX and the oxime moiety obstructed binding of **17** in the orientations observed in the crystal structure of *Tc*AChE (**Figure 5**) or predicted by docking (**Figure 6B**). The superimposition of model structures of oximes **16** and **17** docked into VX-inhibited mouse AChE presented in **Figure 6C** showed that both oximes are bound in an elongated conformation with their 3-hydroxy-2-pyridinealdoxime moieties within the active site, forming a π-π interaction with Trp86 in the choline binding site, as has been shown for numerous compounds containing aromatic moiety,[27] including bispyridinium oxime reactivators (e.g., HI-6; PDB: 5FPP), when bound in a non-productive orientation in phosphylated mAChE.[22] Although the distance between the oxygen atom of the oxime group and the phosphorus atom (6.59 Å for oxime **16**, 5.49 Å for oxime **17**) is close to optimal (4–5 Å) for a nucleophilic attack on the P=O moiety,[28] both lack the optimal orientation of the oxime group for an in-line nucleophilic attack (i.e., the oxime group does not approach the P=O moiety at an angle of approximately 180° to the leaving group).[29] The only difference in the positioning of the two oximes is in the orientation of the morpholine ring, implying that the higher reactivation efficiency (in terms of $k_r$) of oxime **17** over **16** could result from a better stabilisation of **17** in the productive conformation. Indeed, while both oximes make the above-mentioned π-π interaction with Trp86, and the π-cation interaction with peripheral Tyr341 through their protonated morpholine nitrogens, the total number of H-bonds between the oxime and the surrounding amino acids is higher for **17** than for **16** (9 *vs.* 7; **Table S4**). This evaluation is in accordance with the kinetic parameters for the two oximes determined for the reactivation of VX-inhibited hAChE (cf. **Table 2**). Thus, while they have a similar $k_{+2}$ constant, $K_{OX}$ is almost 3-fold smaller for **17** than for **16**, which might reflect the observed difference in the non-bonding interactions of their morpholine moiety and the higher number of H-bonds in the case of **17**.

The molecular modelling of the complex of hBChE with oxime **16** was performed with the objective to examine the binding mode of **16**, which displays the highest reactivation efficiency in terms of $k_{+2}$ (cf. **Table 2** and **3**). We modelled two structures of the complex that display different conformations of the cyclosarin moiety, in terms of torsion angle around single P–*O*-isopropyl bond, which resemble those observed for the isopropyl group of the sarin in the crystal structure of a complex of HI-6 with the sarin-AChE conjugate (PDB ID: 5FPP)[22] The resulting model structures are superimposed as shown in **Figure 7.** When **16** was docked in the active site of hBChE conjugated with cyclosarin in the predominant conformation (i.e., analogous to the predominant conformation in the sarin/hBChE),[22] **16** bound in the centre of the active site, in a bent conformation, with the morpholine moiety positioned above the choline binding site; the 3-hydroxy-2-pyridinealdoxime group was positioned above the oxyanion hole, adjacent to the acyl binding pocket, while the alkyl linker was bent upwards towards the entrance of the gorge (**Figure 7**). The morpholine ring is stabilized by an electrostatic interaction between its protonated nitrogen and the Asp70 carboxyl, and by multiple H-bonds. Moreover, the distance and orientation of the oxime of the 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime moiety is optimal for an in-line nucleophilic attack on the phosphorus atom.[28-29] Surprisingly, when **16** is docked in the active site with cyclosarin moiety in the alternative conformation, the binding mode of oxime **16** changes only slightly, predominantly in the alkyl linker, as compared to its binding mode in the model with predominant conformation. Both the morpholine ring and the 3-hydroxy-2-pyridinealdoxime moiety largely maintain their positions, so that the oxime group is still optimally positioned in the productive conformation (**Figure 7**). It thus seems that the high $k_{+2}$ observed for the reactivation of cyclosarin-inhibited BChE could, at least partly, be a result of the ability of oxime **16** to bind in the productive conformation regardless of the dynamics of the conjugated cyclosarin moiety. Detailed information concerning the non-bonding interactions of oxime **16** within the active site of cyclosarin-inhibited BChE is supplied in the Supporting Information (**Table S4**).

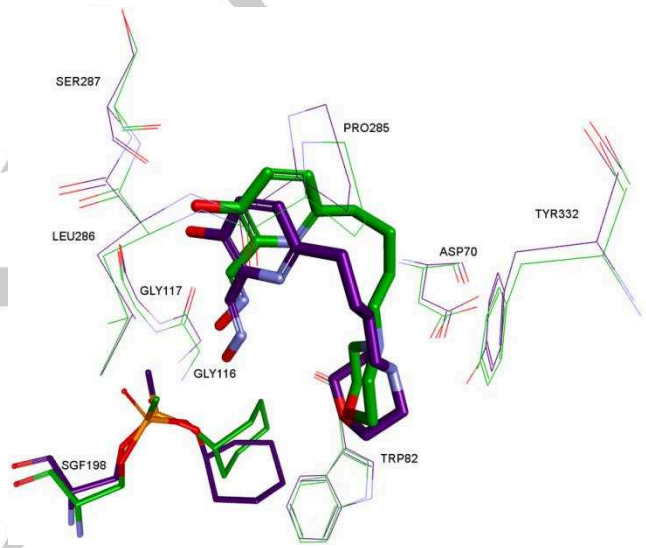



**Figure 7.** Superposition of model structures of the complex of lead oxime **16** and the cyclosarin-hBChE conjugate with a predominant conformation of the cyclosarin moiety (green) or an alternative conformation (purple). Oxygen atoms are shown in red, nitrogen atoms are shown in cyan, and the phosphorus atom in orange.

***In silico* and *in vitro* determination of p$K_a$ values.** Molecular properties of oximes in terms of their p$K_a$ values were analysed both *in silico* and *in vitro* to estimate their acid/base character and predict their propensity to penetrate the BBB (**Table 4**). *In silico* tests predicted the existence of up to 14-15 possible microspecies for oximes **15–18**, and 18 microspecies for oxime **19**, in the pH range of 0-14 depending upon the ionization status of four or five functional groups. Accordingly, the oxime absorbance scans at various pH values showed several absorption maxima in the range studied (**Figure 8**), with those at 315 and 360 nm assumed to correspond to the absorption of species with a protonated (=N–OH) and a deprotonated oxime group (=N–$O^-$), respectively.[30] Therefore, p$K_a$ values were determined from the absorption peak at 360 nm alone due to a bathochromic shift of the absorption maximum from 314 nm at pH 4.5 to 329 nm at pH 9.1 (**Figures 8** and **S5**). A similar shift

for 2-trimethylammonio-6-hydroxybenzaldehyde oximes was reported previously by Radić *et al.*[16d] Two dissociation constants were observed for oximes **16** and **18** in the pH range studied, most likely corresponding to the dissociation of the oxime group (=N-OH) and the hydroxyl group (-OH) on the pyridinium ring, since the absorption at 360 nm was presumed to originate from π→π* transitions within the pyridinium aromatic system.[31] Since strong isomerization of the oxime group is expected only in a strong acidic environment,[32] only spectra measured in solutions of pH ≥ 6 were studied. Due to its low solubility, *in vitro* evaluation of p$K_a$ values for oxime **19** was not possible. As presented in **Table 4**, there is good correlation between the *in silico* prediction and the *in vitro* determination of p$K_a$ values (i.e., for the p$K_a$ values of the oxime group (compounds **15**−**18**) and for the hydroxyl group (compounds **16** and **18**) on the pyridine ring)**.** Therefore, it could be expected that, at physiological pH, the tertiary amine of these oximes is mostly protonated ($R_3$-$NH^+$ group), while oximes **16** and **17** have the highest level of non-ionized species (20−30%) and would thus be expected to cross the BBB at a higher rate.

Furthermore, the oxime group of compounds **15**−**19** is mostly protonated at pH 7.4 (around 80%) according to both *in silico* and *in vitro* evaluation. It should be noted that their p$K_a$ values for the oxime group are in the range of standard pyridinium oximes: higher than the one of the *ortho*-pyridinium oxime HI-6 (p$K_a$ = 7.47) and lower than for the one of *para*-pyridinium oxime TMB-4 (p$K_a$ = 8.39).[30]

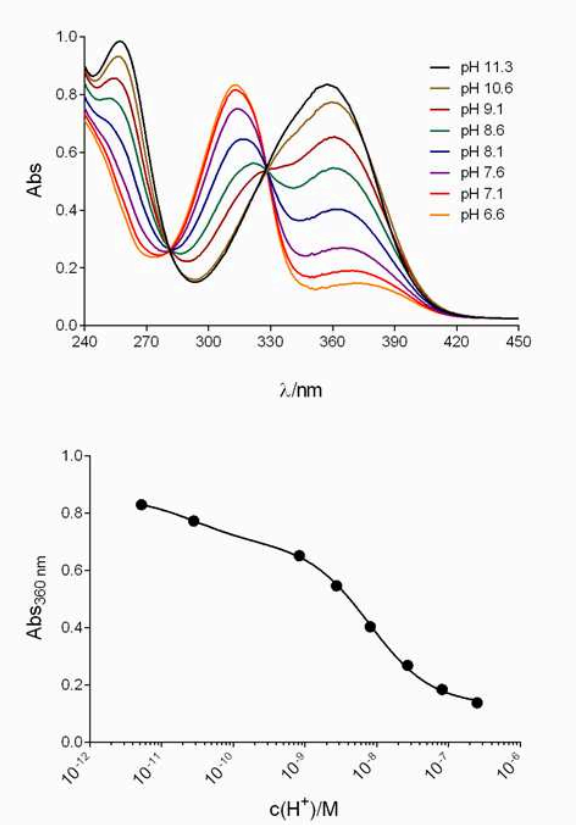



**Figure 8. A)** Absorption spectra at various pH values obtained for 100 μM **16** (at 25 °C) and **B)** pH-dependent absorbance change at 360 nm.

**Table 4**. Dissociation constants, p$K_a$, for the oxime group (=N–OH), the hydroxyl group (–OH), the nitrogen atom (R=N–R') in the pyridinium ring, and the tertiary amine of the substituent ($R_3$–$NH^+$)

| Oxime | *In silico* p$K_a$ | | | | *In vitro* p$K_a$ (360 nm)[a] | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | =N–OH | –OH | R=N–R' | $R_3$–$NH^+$ | p$K_{a1}$ | p$K_{a2}$ |
| **15** | 8.10 | 9.82 | 3.41 | 10.49 | 8.01 ± 0.04 | nd[b] |
| **16** | 8.33 | 10.33 | 3.29 | 7.32 | 8.08 ± 0.04 | 10.53 ± 0.21 |
| **17** | 8.37 | 10.33 | 3.41 | 7.50 | 8.03 ± 0.06 | nd |
| **18** | 8.52 | 10.33 | 3.44 | 7.89 | 8.20 ± 0.06 | 10.44 ± 0.27 |
| **19**[c] | 10.34 | 8.90 | 3.35 | 7.82 | - | - |

[a] mean ± S.E determined at 25 °C; [b] nd, not determined; [c] *in silico* evaluation predicted for **19** an additional dimethyl tertiary amino group with p$K_a$ = 4.17

***In silico* prediction of BBB penetration.** Other than the ionization status of molecules, there are some general molecular descriptors that are important in the evaluation of the BBB permeability potential (recommended by Pajouhesh and Lenz).[33] **Figure 9** shows the radar plot of such physicochemical properties of oximes **15**-**19** in relation to the properties of CNS-active drugs, which generally have lower molecular weight (MW<450), have moderate hydrophobicity (logP<5), have fewer hydrogen bonds and acceptors (HBD< 3 and HBA<7), fewer rotatable bonds (RB<8) and are less polar (polar surface area PSA<70 Å$^2$) than drugs that are not CNS-active.[33] All of them, except **19**, have optimal values of lipophilicity (logP = 0.9-4.6) and molecular weight (280−400), and optimal numbers of H-bond donors (2) and H-bond acceptors (5−7). Molecular flexibility, as characterized by the number of rotatable bonds (6−9), is favourable in three out of five oximes. Also, the p$K_a$ of the most basic group (i.e., the $R_3$-$NH^+$ group; c.f. **Table 4**) is in or almost in the recommended range (7.5−10.0) for oximes **16**−**19**. The only shortfall for this group of oximes is a higher polar surface area (78−87 Å$^2$), except for oxime **15** (69 Å$^2$). Using the algorithm described by Wager *et al.*[31, 34] the central nervous system multi-parameter optimization score was calculated based on the six fundamental physiochemical parameters (logP, logD, p$K_a$, HBD, PSA, MW) where the score for CNS candidates should be ≥4 (scale 0−6). Oximes **15**−**18** are all scored favourably, in the order: **16** (5.5) = **17** (5.5) > **15** (4.5) = **18** (4.5) > **19** (2.1).

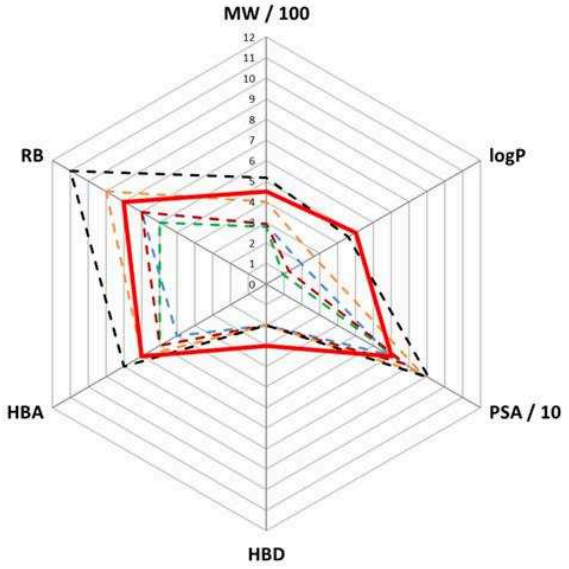



**Figure 9.** Radar plot of physicochemical properties (molecular weight, MW; lipophilicity coefficient, logP; number of hydrogen bonds donors, HBD, and acceptors HBA; rotatable bonds, RB; polar surface area, PSA) of the oximes **15** (blue), **16** (green), **17** (dark red), **18** (orange), **19** (black) and upper recommended values for the CNS-active drugs (full red line)

***In vitro* determination of BBB penetration for oximes.** Brain penetration of the candidate oxime reactivators by passive diffusion was evaluated using the parallel artificial membrane permeation assay (PAMPA−BBB). The *in vitro* permeability ($P_e$) of the oximes through a lipid extract of porcine brain was determined using phosphate-buffered saline (PBS)/EtOH 70:30. Assay validation was carried out by comparing the experimental and literature permeability values of 14 commercial drugs (see SI), which gave a good linear correlation: $P_e$ (exp) = 1.4525 $P_e$ (lit) − 0.4926 ($R^2$ = 0.9199). Using this equation and the limits established by Di et al. for BBB permeation,[35] the following ranges of permeability were established: $P_e$ ($10^{-6}$ cm $s^{-1}$) > 5.3 for compounds with high BBB permeation (CNS+), $P_e$ ($10^{-6}$ cm $s^{-1}$) < 2.4 for compounds with low BBB permeation (CNS−), and 5.3 > $P_e$ ($10^{-6}$ cm $s^{-1}$) > 2.4 for compounds with uncertain BBB permeation (CNS±). According to the PAMPA assay and results given in **Table 5**, passive transport across the BBB was observed for all of the tested oximes. For comparison, the standard oximes HI-6 and 2-PAM were shown to be impermeable with a similar PAMPA assay.[36]

**Table 5.** *In vitro* brain permeability ($P_e$ ± S.E.) of oximes 15−19 determined by the PAMPA−BBB assay (CNS+: high BBB permeation).

| Oxime | $P_e$ ($10^{-6}$ cm $s^{-1}$) |
|---|---|
| **15** | 30.1 ± 5.5 (CNS+) |
| **16** | 6.1 ± 0.5 (CNS+) |
| **17** | 8.1 ± 0.31 (CNS+) |
| **18** | 12.1 ± 1.9 (CNS+) |
| **19** | 12.8 ± 1.5 (CNS+) |

## Discussion

Our study included reactivation measurements of both hAChE and hBChE inhibited by nerve agents, VX, sarin, cyclosarin and tabun, and paraoxon, the active metabolite of a pesticide parathion, along with a structural study and initial assessments of their CNS penetration. All five oximes, 3-hydroxy-2-pyridine aldoximes, though devoid of a permanent cationic charge, showed a moderate to high binding affinity for cholinesterases meaning that the activity of hAChE and hBChE is reversibly inhibited by the oximes. Moderate binding affinity towards the uninhibited enzyme is an indication for potential reactivators that have the best chance of productive interaction with OP-hAChE conjugates. Considering the results shown in **Table 1**, compounds **16** and **17**, exhibited the closest $K_i$ to standard oximes (e.g., HI-6) towards hAChE and hBChE. It seems that the formation of protonation equilibria around two physiologically relevant ionisable groups in those oxime structures, an oxime group and a tertiary amine group, results in the coexistence of charged and uncharged reactivator species around physiological pH values. While cationic species have the best chance of productive interaction with OP-hAChE conjugates, the uncharged species can be expected to cross the blood-brain barrier delivering a reactivator into CNS. In addition, the combination of *in silico* prediction of BBB penetration and *in vitro* PAMPA assay highlighted compounds **16** and **17** as the most suitable to efficiently cross the BBB (**Figure 9**). Indeed, its high CNS-MPO scores (5.5 out of 6) predicted a very good brain penetration. Moreover, p$K_a$ values (**Table 4**) showed that compounds **16** and **17** had the highest level of uncharged species (20−30%) and would thus be expected to cross the BBB at a higher rate compared to oximes **15**, **18** and **19**. Additionally, the tertiary amine moieties that is positively charged at pH 7-8, as is the case for oximes **15-18**, can interact with negatively charged lipids of the membrane and the ionised form is then destabilised in the membrane which results in a decrease of the p$K_a$ value and increase in the non-ionized form that is again reprotonated after crossing the membrane.[14] All of these data suggested that compounds **16** and **17** have the best physicochemical properties to enter into the brain by passive transport. However, it should be kept in mind that the oxime concentration in the brain *in vivo* may be additionally influenced both by active transporters and efflux pumps widely present in the BBB.[37] Nevertheless, it is anticipated that these 3-hydroxy-2-pyridine aldoximes will achieve brain concentrations higher than 10% of their blood concentrations, which is the reported upper limit for the standard oximes.[38]

From the structure-activity relationship (SAR) perspective, the most important structural element governing reactivation efficiency of tested oximes is its moiety that supposed to be stabilised with residues from the peripheral site. A detailed examination of **Table 2** and **Table 3** drew our attention to oximes **16** and **17** both having a morpholine ring, which is stabilised in the peripheral site as observed in the crystal structure of AChE-**17** – and corroborated by docking for **16** – enabling a proper position of the 3-hydroxy-2-piridine aldoxime moiety for nucleophilic displacement, regardless of the different

steric shield provided by OPs. Oxime **16** had the highest first-order reactivation rate ($k_{+2}$) for all OP-inhibited hAChE and OP-inhibited hBChE, and stood out as an effective reactivator at higher oxime concentrations, since it exhibited the lowest binding affinity towards OP-inhibited enzymes. Our results showed a reversible binding leading to progressive reactivation is thus facilitated by a pentyl linker (all oximes except **16**), while the optimal geometry of AChE-OP-oxime transition state is achieved with a butyl linker (only oxime **16**). In other words, the increase in the length of an alkyl linker (i.e., oxime **17**) slightly reduces an oxime's efficiency against all OPs. The higher *in vitro* overall reactivation rate of **17** out of all OP-inhibited hAChE and hBChE (except for sarin-inhibited hAChE) is therefore largely a reflection of its improved molecular recognition (i.e., better binding to OP-hAChE conjugates as indicated by smaller $K_{OX}$ constants), while maintaining similar $k_{+2}$ constants, in comparison to oxime **16**. Oximes **18** and **19** with more complex structures exhibited the highest binding affinity towards phosphylated hAChE. Consequently, **18** showed good potencies to reactivate the VX and sarin-phosphylated hAChE, while oxime **19** was potent reactivator of the tabun- and paraoxon-inhibited hAChE. A recent paper by Soukup *et al.* reported a correlation between high binding affinity and high cytotoxicity of compounds similar to **18** and **19**, although the mechanism is unclear.[39] Thus, our data show the complexity of the reactivation and point to the properties that an efficient reactivator should have – not only a proper binding affinity for the phosphylated cholinesterase but also an orientation that directs the oxime group towards phosphylated serine within the active-site gorge. Besides, the resolution of the complex of *Tc*AChE with compound **17** confirmed a productive conformation within the active site of the enzyme and showed the productive orientation of the oxime function toward the catalytic serine. Nevertheless, it is important to note that the structural diversity of OP-hAChE conjugates was not reflected in reactivation trends because these morpholine-3-hydroxy-2-pyridine aldoximes conjugates efficiently reactivated hAChE inhibited by all five tested OPs; thus, their structural features could be highlighted as important for developing potentially universal reactivators of phosphylated ChEs.

Oxime structure requirements for an efficient reactivation of hBChE, while structurally and functionally a very close relative of hAChE, are clearly different (**Table 1** and **Table 2**) showing that relatively moderate variations of the active centre gorge size and shape in two enzymes have substantial consequences for forming a productive complementary fit of small reactivator molecules into OP conjugated enzymes. However, the case of OP-inhibited hBChE once again postulates that the combination of morpholine ring as peripheral site moiety and butyl linker (oxime **16**) gives the most efficient oxime (in terms of $k_{+2}$) against all OPs used except sarin, pointing out this combination as a possible property of an all-round reactivator. Therefore, oxime **16** showed the most optimal geometry of the hBChE-OP-oxime transition state and productive reactivation. An increase in the length of the alkyl linker again reduces the oxime's efficiency indicating that greater flexibility and conformational freedom of oxime **17**'s alkyl linker, permitted by a more voluminous hBChE active site, cannot compensate for the initial directing properties of the butyl linker.

A practical outgrowth of our results is the application of these oximes in combination with native erythrocyte hAChE and plasma hBChE enzyme to catalyse the hydrolysis of organophosphates shown in the *ex vivo* scavenging assay that serves the purpose of evaluating reactivator's efficiency in *in vivo* resembling conditions (e.g., the presence of plasma proteins, presence of both AChE and BChE, etc.) and general scavenging potential of OPs in blood before they reach the synaptic AChE. Cholinesterases in the plasma are efficient scavengers of organophosphates in terms of reactivity, however their capacity is limited by virtue of the 1:1 stoichiometry between the small organophosphate (100 – 200 D) and the ~ 70 kD subunit bearing the catalytic serine. Hence, an enzyme-reactivator combination catalytic to the organophosphate hydrolysis, rather than stoichiometric to conjugation, would greatly reduce doses needed for scavenging. The degradation of OPs in whole human blood observed with both oximes (**16** and **18**) represents a significant improvement compared to some of our previous *ex vivo* studies,[12, 16c, 20a] in which any significant scavenging effect was observed only when the blood was supplemented with suitable hAChE mutants or hBChE. Due to the financial costs of generating such exogenous enzymes, their short circulation time and the immunity challenges that arise, the design of oximes with an ability to reactivate native AChE and/or BChE effectively provides a much more desirable approach.

## Conclusions

The novel class of oximes presented here showed an improvement in reactivation potency for VX-, paraoxon-, and tabun-phosphylated hAChE when compared to the standard oxime HI-6. Oximes **16** and **17** appeared to be the most effective candidates with a broad spectrum of reactivation. Moreover, these oximes showed an exceptional potential for reactivation of cyclosarin-inhibited hBChE. The resolution of *Tc*AChE in complex with oxime **17** displayed a productive conformation that could explain the promising potency to reactivate both phosphylated hAChE and hBChE. Furthermore, oximes **16** and **17** are predicted to efficiently cross the BBB based both on *in silico* predictions and on the *in vitro* brain membrane permeability test. They could, therefore, potentially achieve significant concentrations both at the neuromuscular junction and in the brain. This, in turn, could result in an overall improved therapeutic outcome after OP poisoning.

## Experimental Section

**Chemistry.** Solvents were purified by a dry solvent station MB-SPS-800 (MBraun) immediately prior to use. Triethylamine was distilled from $CaH_2$ and stored over BaO or KOH. All reagents were obtained from commercial suppliers (Sigma Aldrich, Acros, TCI) unless otherwise stated. Column chromatography purifications were performed on silica gel (40–63 µm) from Macherey-Nagel. Thin-layer chromatography (TLC) was carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminium sheets.

Compounds were visualized by UV irradiation and/or spraying with a solution of potassium permanganate, followed by charring at 150 °C. $^1$H and $^{13}$C NMR spectra were recorded with a Bruker DPX 300 spectrometer (Bruker, Wissembourg, France). Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) from $CDCl_3$ ($\delta_H$ = 7.26 ppm, $\delta_C$ = 77.16 ppm), $CD_3OD$ ($\delta_H$ = 3.31 ppm, $\delta_C$ = 49.00 ppm). J values are expressed in Hz. Mass spectra were obtained with a Finnigan LCQ Advantage MAX (ion trap) apparatus equipped with an electrospray source. High-resolution mass spectra were obtained with a Varian MAT 311 spectrometer using electrospray analysis. Analytical HPLC was performed on a Thermo Electron Surveyor instrument equipped with a PDA detector under the following conditions: Thermo Hypersil GOLD C18 column (5 µm, 4.6 x 100 mm) with $CH_3CN$ and 0.1% aq. trifluoroacetic acid (TFA) as eluents [0.1% aq. TFA/ $CH_3CN$ (90/10) (5 min), followed by a linear 10% to 100% $CH_3CN$ gradient (45 min)] at a flow rate of 1.0 mL/min and with *UV detection Max Plot* 220−360 nm. The syntheses of alcohols **1** and **2** have been reported previously.[13j]

**Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(piperidin-1-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate (3).** To a mixture of alcohol **1** (200 mg, 0.62 mmol) in dry $CH_2Cl_2$ (6 mL), $Et_3N$ (259 µL, 1.8 mmol, 3 equiv.) and methanesulfonyl chloride (71 µL, 0.9 mmol, 1.5 equiv.) were added. The mixture was refluxed for 4 h. The resulting solution was cooled to rt, filtrated under celite and concentrated under reduced pressure. To a solution of the crude product in $CH_3CN$ (7 mL), piperidine (51 mg, 0.62 mmol, 1 equiv.) and $K_2CO_3$ (250 mg, 1.8 mmol, 3 equiv.) were successively added. The solution was heated under reflux for 16 h and then cooled at rt. Salts were removed by filtration. Concentration under reduced pressure and purification by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 2/8 to 100%, v/v) provided the desired product **3** as an orange oil (104 mg, 44%). *Rf* = 0.3 (cyclohexane/EtOAc 2/8, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta$ = 1.41−1.45 (m, 2H), 1.60−1.68 (m, 4H), 1.79−1.90 (m, 2H), 2.39 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.56−2.61 (m, 6H), 3.86 (s, 3H), 5.11 (s, 2H), 7.20−7.36 (m, 7H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): $\delta$ = 17.3, 23.5, 24.3, 24.6, 52.6, 54.0, 57.5, 70.8, 79.9, 89.0, 121.8, 126.9, 128.2, 128.7, 130.1, 135.1, 135.4, 140.0, 152.9, 164.8. MS (ESI+): *m/z* (%): 393 (100) $[M+H]^+$.

**Methyl 3-hydroxy-6-(4-(piperidin-1-yl)butyl)picolinate (7).** To a solution of compound **3** (60 mg, 0.16 mmol) in a degassed mixture of MeOH/EtOAc (7/3.5 mL), Pearlman's catalyst (45 mg, 0.03 mmol, 0.2 equiv., 20% Pd, moisture 50%) was added. The solution was bubbled with $H_2$ and the reaction was stirred at rt under $H_2$ atmosphere (1 atm) for 1 h. The mixture was filtrated through celite® and concentrated under reduced pressure to furnish the desired product **7** as a yellow solid (36 mg, 77%). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta$ = 1.48−1.59 (m, 2H), 1.66−1.89 (m, 8H), 2.73−2.86 (m, 8H), 3.97 (s, 3H), 7.24 (s, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 22.6, 23.2, 23.7, 27.3, 36.7, 53.2, 53.4, 57.6, 126.9, 128.9, 129.4, 152.9, 157.3, 170.0. MS (ESI+): *m/z* (%): 293 (100) $[M+H]^+$.

**3-Hydroxy-6-(5-(piperidin-1-yl)pentyl)picolinaldehyde (11).** To a solution of compound **7** (60 mg, 0.2 mmol) in dry $CH_2Cl_2$ (2 mL), lutidine (67 µL, 0.6 mmol, 3 equiv.) and TBDMSOTf (135 µL, 0.6 mmol, 3 equiv.) were successively added. The mixture was stirred at rt for 5 h under argon atmosphere. The mixture was washed with NaCl sat., dried over $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. To a solution of the resulting residue in dry $CH_2Cl_2$ (2 mL), dropwise DIBAL-H (490 µL, 1M in $CH_2Cl_2$, 0.5 mmol, 2.5 equiv.) was added at -78°C. Then, the reaction mixture was stirred at this temperature for 12 min. The reaction was quenched with MeOH (490 µL) and the mixture was allowed to warm at room temperature. The organic layer was washed with an aqueous solution of NaOH (1 M), dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. TBAF (215 µL, 1M in THF, 0.21 mmol, 1.1 equiv.) was added at 0 °C to the residue in dry THF (10 mL), and the mixture was stirred for 16 h at this temperature. After concentration under reduced pressure, chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH 9/1 + 1% solution of $NH_3$ 30%, v/v/v) afforded the desired compound **11** as a brown oil (24 mg, 44%). *Rf* = 0.3 (EtOAc/MeOH 9/1 + 1% solution of $NH_3$ 30%, v/v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta$ = 1.32−1.51 (m, 4H), 1.58−1.80 (m, 8H), 2.40−2.45 (m, 2H), 2.48−2.52 (m, 4H), 2.78 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.27−7.32 (m, 2H), 10.02 (s, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): $\delta$ = 24.0, 25.3, 26.1, 27.2, 29.6, 37.3, 54.5, 59.1, 126.5, 129.9, 135.8, 154.9, 157.1, 198.9. MS (ESI+): *m/z* (%): 277 (100) $[M+H]^+$.

**3-Hydroxy-6-(5-(piperidin-1-yl)pentyl)picolinaldehyde oxime (15).** To a solution of aldehyde **11** (24 mg, 0.087 mmol) in dry EtOH (1 mL), $NH_2OH.HCl$ (7.3 mg, 0.1 mmol, 1.2 equiv.) and NaOAc (9.2 mg, 0.11 mmol, 1.3 equiv.) were successively added. The mixture was stirred at rt for 1 h under an argon atmosphere. Concentration under reduced pressure and purification by silica gel chromatography (EtOAc/MeOH 8/2 + 1% solution of $NH_3$ 30%, v/v/v) afforded the desired oxime **15** as a white solid (11 mg, 43%). *Rf* = 0.1 (EtOAc/MeOH 9/1 + 1% solution of $NH_3$ 30%, v/v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$): $\delta$ = 1.28−1.42 (m, 2H), 1.57−1.63 (m, 2H), 1.58−1.77 (m, 8H), 2.69−2.76 (m, 4H), 2.81−2.87 (m, 4H), 7.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$): $\delta$ = 23.8, 25.3, 25.9, 27.7, 30.8, 37.6, 54.8, 59.2, 125.4, 126.2, 136.4, 152.8, 154.3. MS (ESI+): *m/z* (%): 292 (100) $[M+H]^+$. HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{16}H_{26}N_3O_2$ 292.2025; found: 292.2023. HPLC: $t_R$ = 7.48 min, purity = 99.8%.

**Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-morpholinobut-1-yn-1-yl)picolinate (4).** To a mixture of alcohol **2** (200 mg, 0.64 mmol) in dry $CH_2Cl_2$ (7 mL), $Et_3N$ (267 µL, 1.9 mmol, 3 equiv.) and methanesulfonyl chloride (74 µL, 0.95 mmol, 1.5 equiv.) were added. The mixture was refluxed for 4 h. The resulting solution was cooled to rt, filtrated under celite® and concentrated under reduced pressure. To a solution of the crude product in $CH_3CN$ (6 mL), morpholine (56 µL, 0.64 mmol) and $K_2CO_3$ (266 mg, 2 mmol, 3 equiv.) were added. The solution was heated under reflux for 14 h and then cooled at rt. Salts were removed by filtration. Concentration under reduced pressure and purification by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 9/1 + 1% solution of $NH_3$ 30%, v/v/v) gave the desired product **4** as a yellow oil (80 mg, 32%). *Rf* = 0.2 (cyclohexane/EtOAc 8/2 + 1% solution of $NH_3$ 30%, v/v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta$ = 2.49−2.52 (m, 4H), 2.57−2.69 (m, 4H), 3.71−3.74 (m, 4H), 3.96 (s, 3H), 5.20 (s, 2H), 7.27−7.46 (m, 7H$_r$). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): $\delta$ = 17.4, 52.6, 53.3, 57.1, 66.8, 67.0, 70.8, 80.0, 88.2, 121.8, 126.9, 128.2, 128.7, 129.9, 135.2, 135.5, 140.1, 152.9, 164.8. MS (ESI+): *m/z* (%): 381 (100) $[M+H]^+$.

**Methyl 3-hydroxy-6-(4-morpholinobutyl)picolinate (8)**. To a solution of **4** (80 mg, 0.2 mmol) in a degassed mixture of MeOH/EtOAc (8/4 mL), Pearlman's catalyst (58 mg, 0.04 mmol, 0.2 equiv., 20% Pd, moisture 50%) was added. The solution was bubbled with $H_2$ and the reaction was stirred at rt under $H_2$ atmosphere (1 atm) for 1 h. The mixture was filtrated through celite and concentrated under reduced pressure to furnish the desired product **8** as a yellow solid (55 mg, 89%). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta$ = 1.68 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H), 2.56−2.61 (m, 2H), 2.68−2.79 (m, 6H), 3.83 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 3.96 (s, 3H), 7.23 (s, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 24.3, 27.3, 36.8, 52.7, 53.1, 58.1, 65.2, 126.8, 128.8, 129.2, 153.1, 157.2, 170.0. MS (ESI+): *m/z* (%): 295 (100) $[M+H]^+$.

**3-Hydroxy-6-(4-morpholinobutyl)picolinaldehyde (12).** To a solution of methyl ester **8** (55 mg, 0.18 mmol) in dry $CH_2Cl_2$ (2 mL), 2,6-lutidine (63 µL, 0.54 mmol, 3 equiv.) and TBDMSOTf (63 µL, 0.54 mmol, 3 equiv.) were successively added. The mixture was stirred at rt for 3.5 h under argon atmosphere. It was then washed with a saturated aqueous solution of NaCl, dried over $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. To a solution of the resulting residue in dry $CH_2Cl_2$ (2 mL), DIBAL-H (450 µL, 1 M in $CH_2Cl_2$, 0.45 mmol, 2.5 equiv.) was added dropwise at -78°C. Then, the reaction mixture was stirred at this temperature for 12 min. The reaction was quenched with MeOH (450 µL), and the mixture was allowed to warm at room temperature. The organic layer was washed with an aqueous solution of NaOH (1 M), dried over

WILEY-VCH

$MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. TBAF (200 µL, 1M in THF, 0.20 mmol, 1.1 equiv.) was added at 0 °C to the residue in dry THF (2 mL), and the mixture was stirred overnight at this temperature. After concentration under reduced pressure, chromatography on silica gel ($CH_2Cl_2$/MeOH 95/5, v/v) afforded access to the desired product **12** as a yellow solid (12 mg, 24%). *Rf* = 0.1 ($CH_2Cl_2$/MeOH 96/4, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.56−1.61 (m, 2H), 1.70−1.80 (m, 2H), 2.39 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.44 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 2.79 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.71 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 7.25−7.31 (m, 2H), 10.01 (s, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 26.1, 27.6, 37.2, 53.8, 58.9, 66.9, 126.5, 129.8, 135.8, 154.7, 157.1, 198.8. MS (ESI+): *m/z* (%): 265 (100) $[M+H]^+$.

**3-Hydroxy-6-(4-morpholinobutyl)picolinaldehyde oxime (16).** To a solution of aldehyde **12** (12 mg, 0.043 mmol) in dry EtOH (1 mL), $NH_2OH.HCl$ (3.6 mg, 0.052 mmol, 1.2 equiv.) and NaOAc (4.6 mg, 0.056 mmol, 1.3 equiv.) were successively added. The mixture was stirred at rt for 1 h under an argon atmosphere. After concentration under reduced pressure, chromatography on a silica gel ($CH_2Cl_2$/MeOH 92/8 to 90/10, v/v) afforded access to oxime **16** as a yellow solid (10.8 mg, 86%). *Rf* = 0.3 ($CH_2Cl_2$/MeOH 90/10, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$): δ = 1.53−1.63 (m, 2H), 1.67−1.75 (m, 2H), 2.50 (t, *J* = 6 Hz, 2H), 2.57 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 2.75 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.71 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 7.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$): δ = 26.3, 28.8, 54.5, 59.6, 67.2, 125.4, 126.0, 136.3, 152.8, 153.8, 154.3. MS (ESI+): *m/z* (%): 280 (100) $[M+H]^+$. HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{14}H_{21}N_3O_3$ 280.1620; found: 280.1624. HPLC : $t_R$ = 14.8 min, purity = 98.1%.

**Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-morpholinopent-1-yn-1-yl)picolinate (5).** To a mixture of alcohol **1** (400 mg, 1.23 mmol) in dry $CH_2Cl_2$ (10 mL), $Et_3N$ (520 µL, 3.7 mmol, 3 equiv.) and methanesulfonyl chloride (143 µL, 1.9 mmol, 1.5 equiv.) were added. The mixture was refluxed for 4 h. The resulting solution was cooled to rt, filtrated under celite and concentrated under reduced pressure. To a solution of the crude product in $CH_3CN$ (12 mL), morpholine (106 µL, 1.23 mmol, 1 equiv.) and $K_2CO_3$ (511 mg, 3.7 mmol, 3 equiv.) were added. The solution was heated under reflux for 16 h and then cooled at rt. Salts were removed by filtration. Concentration under reduced pressure and purification by flash chromatography ($CH_2Cl_2$/MeOH 98/2 to 97/3, v/v) afforded the desired product **5** as a yellow oil (350 mg, 72%). *Rf* = 0.1 ($CH_2Cl_2$/MeOH 98/2, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.77 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.41−2.48 (m, 8H), 3.67−3.71 (m, 4H), 3.93 (s, 3H, $H_7$), 5.16 (s, 2H), 7.28−7.44 (m, 7H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 16.8, 24.9, 52.2, 53.2, 57.3, 66.5, 70.3, 79.2, 89.5, 121.4, 126.5, 127.7, 128.2, 129.6, 134.9, 135.2, 139.7, 152.4, 164.4. MS (ESI+): *m/z* (%): 395 (100) $[M+H]^+$.

**Methyl 3-hydroxy-6-(5-morpholinopentyl)picolinate (9)**. To a solution of **5** (350 mg, 0.89 mmol) in a degassed mixture of MeOH/EtOAc (50 mL, v/v: 2/1), Pearlman's catalyst (254 mg, 0.18 mmol, 0.2 equiv., 20% Pd, moisture 50%) was added. The solution was bubbled with $H_2$, and the reaction was stirred at rt under $H_2$ atmosphere (1 atm) for 2.5 h. The mixture was filtrated through celite and concentrated under reduced pressure to furnish the desired product **9** as a yellow solid (190 mg, 66%). *Rf* = 0.1 ($CH_2Cl_2$/MeOH 98/2 + 1% solution of $NH_3$ 30%, v/v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.21−1.32 (m, 2H), 1.39−1.47 (m, 2H), 1.54−1.64 (m, 2H), 2.22 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.33−2.33 (m, 4H), 2.67 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 3.57-3.60 (m, 4H), 3.91 (s, 3H), 7.17 (s, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 26.1, 27.0, 29.8, 37.4, 53.0, 53.6, 58.8, 66.7, 126.5, 128.6, 129.0, 153.8, 157.0, 170.0. MS (ESI+): *m/z* (%): 309 (100) $[M+H]^+$.

**3-Hydroxy-6-(5-morpholinopentyl)picolinaldehyde** (**13)**. To a solution of compound **9** (1.6 g, 5.2 mmol) in dry $CH_2Cl_2$ (70 mL), lutidine (1.5 mL, 15.8 mmol, 3 equiv.) and TBDMSOTf (4.6 mL, 15.8 mmol, 3 equiv.) were successively added. The mixture was stirred at rt overnight under argon atmosphere. The mixture was washed with NaCl sat., dried over $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. To a solution of the resulting residue in dry $CH_2Cl_2$ (100 mL), DIBAL-H (13 mL, 1M in $CH_2Cl_2$, 13 mmol, 2.5 equiv.) was added dropwise at -78 °C. Then, the reaction mixture was stirred at this temperature for 15 min. The reaction was quenched with MeOH (13 mL), and the mixture was allowed to warm at room temperature. The organic layer was washed with an aqueous solution of NaOH (1 M), dried over $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. Then, TBAF (5.7 mL, 1M in THF, 5.7 mmol, 1.1 equiv.) was added at 0 °C to the residue in dry THF (65 mL) and the mixture was stirred overnight at this temperature. After concentration under reduced pressure, chromatography on silica gel (DCM/MeOH 99/1 to 95/5, v/v) afforded the desired compound **13** as a yellow oil (573 mg, 40%). *Rf* = 0.1 (DCM/MeOH 95/5, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 10.06 (s, 1H), 7.33 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H), 3.73 (m, 4H), 2.82 (dd, *J* = 10.3, 5.2 Hz, 2H), 2.52–2.42 (m, 4H), 2.42–2.30 (m, 2H), 1.88–1.69 (m, 2H), 1.69–1.51 (m, 2H), 1.51–1.35 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 199.1, 157.3, 155.3, 136.1, 130.1, 126.7, 77.2, 67.3, 59.4, 54.1, 37.6, 29.9, 27.5, 26.7. MS (ESI+): *m/z* (%): 279 (100) [M+H]. HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{15}H_{23}N_2O_3$ 279.1709; found: 279.1707.

**3-Hydroxy-6-(5-morpholinopentyl)picolinaldehyde oxime (17).** To a solution of aldehyde **13** (573 mg, 2.06 mmol) in dry MeOH (50 mL), $NH_2OH.HCl$ (170 mg, 2.43 mmol, 1.2 equiv.) and NaOAc (217 mg, 2.62 mmol, 1.3 equiv.) were successively added. The mixture was stirred at rt for 1 h under argon atmosphere. Concentration under reduced pressure and purification by silica gel chromatography (DCM/MeOH 99/1 to 94/6, v/v) afforded the desired oxime **17** as a white solid (461 mg, 76%). *Rf* = 0.7 (EtOAc/MeOH 8/2, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.15 (s, 1H), 7.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.66–3.40 (m, 4H), 2.71–2.47 (m, 2H), 2.31 (s, 4H), 2.25–2.08 (m, 2H), 1.67–1.48 (m, 2H), 1.40 (m, 2H), 1.21 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, MeOD) δ 154.6, 153.8, 152.9, 136.2, 126.0, 125.3, 67.5, 60.0, 54.7, 37.8, 31.1, 28.1, 26.9. MS (ESI+): *m/z* (%): 294 (100) [M+H]. HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{15}H_{24}N_3O_3$ 294.1818; found: 294.1821. HPLC: $t_R$ = 15.5 min, purity = 97.9%.

**Methyl 3-(benzyloxy)-6- (5-(6,7-dimethoxy -3,4-dihydroisoquinolin -2(1H)-yl) pent-1-ynyl) picolinate (6).** Methanesulfonyl chloride (58 µL, 1.5 equiv.) was added dropwise to a solution of alcohol **1** (162 mg, 0.5 mmol) and triethylamine (210 µL, 3 equiv) in dry $CH_2Cl_2$ (5mL). The solution was heated under reflux for 4 h, and then concentrated under reduced pressure. To a solution of the crude product in dry $CH_3CN$ (20 mL), 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline hydrochloride (190 mg, 1 equiv.) and $K_2CO_3$ (261 g, 4 equiv.) were added. The mixture was refluxed for 48 h. The crude mixture was filtered, concentrated under reduced pressure, and purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH, 95:5, v/v) to give **6** (146 mg, 62%) as a colorless oil. $R_f$ = 0.1. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 1.93 (qt, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.51 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.63 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.72 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.83 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.57 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 5.19 (s, 2H), 6.53 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 7.25–7.45 (m, 7H).$^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 17.4, 26.0, 28.7, 51.0, 52.7, 55.7, 55.8, 55.9, 57.2, 70.7, 79.5, 90.1, 109.4, 112.3, 121.7, 126.2, 126.6, 126.9, 128.2, 128.7, 130.0, 135.4, 135.5, 139.9, 147.1, 147.4, 152.9, 164.8.

**6-(5-(6,7-Dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde (14).** To a solution of **6** (110 mg, 0.22 mmol) in degassed MeOH (20 mL), Pearlman's catalyst (63 mg, 0.2 equiv., 20% Pd, moisture 50%) was added. The solution was bubbled with $H_2$ and the reaction was stirred at rt under $H_2$ atmosphere (1 atm) for 15 h. The mixture was filtrated through celite and concentrated under reduced pressure to give the crude **10**. To a solution of the residue in dry DMF (3 mL), imidazole (45 mg, 3 equiv.) and TBDMSCl (72 mg, 2.2 equiv.) were successively added. The mixture was stirred at rt for 2 h under an argon atmosphere. The organic layer was washed with brine (5 times), dried over $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. To a solution of the resulting residue in dry $CH_2Cl_2$ (10 mL), DIBAL-H (0.44 mL, 1 M in

$CH_2Cl_2$, 2 equiv.) was added dropwise at -78 °C. Then, the reaction mixture was stirred at this temperature for 10 min. The reaction was quenched with MeOH (0.44 mL) and the mixture was allowed to warm at rt. The organic layer was washed with an aqueous NaOH (1 M), dried over $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. Then, TBAF (240 µL, 1.1 equiv., 1 M in THF) was added at 0 °C to the residue in dry THF (20 mL), and the mixture was stirred for 30 min at this temperature. After concentration under reduced pressure, purification by flash chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH 8:2, v/v) afforded **14** (9.0 mg, 11%) as a pale-yellow oil. $R_f$ = 0.2. $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 1.33–1.43 (m, 2H), 1.52–1.73 (m, 4H), 2.50–2.58 (m, 2H), 2.69–2.79 (m, 6H), 3.60 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.97 (br s, 1H), 6.45 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 7.18–7.25 (m, 2H), 9.96 (s, 1H), 10.60 (br s, 1H) .$^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 26.5, 27.1, 29.6, 37.2, 50.4, 55.8, 55.9, 57.3, 109.3, 111.2, 125.5, 126.4, 129.8, 135.7, 138.5, 147.4, 147.7, 154.9, 157.0, 198.8. MS (ESI+) *m/z* (%): 385 (100) $[M+H]^+$.

**6-(5-(6,7-Dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde oxime (18).** To a solution of **14** (13 mg, 28 µmol) in absolute EtOH (1 mL), $HONH_2$·HCl (2.9 mg, 1.5 equiv.) and NaOAc (3.5 mg, 1.5 equiv.) were added successively. The mixture was stirred at rt for 30 min under argon atmosphere. After concentration under reduced pressure, the residue was purified by flash chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 1:1) to give oxime **18** (10 mg, 76%) as a white solid. $R_f$ = 0.45 (cyclohexane/EtOAc 1:1). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 1.33–1.43 (m, 2H), 1.55–1.73 (m, 4H), 2.55–2.72 (m, 2H), 2.85–2.96 (m, 4H), 3.74 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 6.51 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.28 (s, 1H), 9.88 (br s, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 14.2, 22.7, 26.1, 26.9, 37.1, 50.3, 54.7, 55.8, 55.9, 57.3, 76.6, 109.3, 111.2, 123.8, 124.3, 125.1, 135.1, 147.5, 147.8, 152.4, 153.7, 160.6, 171.9. MS (ESI+) *m/z* (%): 476 (100) $[M+H]^+$. HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{22}H_{30}N_3O_4$ 400.2236; found: 400.2230. HPLC : $t_R$= 16.0 min (purity = 96%).

**Methyl 3-(benzyloxy)-6-(4-morpholinobut-1-yn-1-yl)picolinate (4).** To a mixture of alcohol **2** (200 mg, 0.64 mmol) in dry $CH_2Cl_2$ (7 mL), $Et_3N$ (267 µL, 1.9 mmol, 3 equiv.) and *methanesulfonyl chloride* (74 µL, 0.95 mmol, 1.5 equiv.) were added. The mixture was refluxed for 4 h. The resulting solution was cooled to rt, filtrated under celite and concentrated under reduced pressure. To a solution of the crude product in $CH_3CN$ (6 mL), morpholine (56 µL, 0.64 mmol) and $K_2CO_3$ (266 mg, 2 mmol, 3 equiv.) were added. The solution was heated under reflux for 14 h, and then cooled at rt. Salts were removed by filtration. Concentration under reduced pressure and purification by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc 9/1 + 1% solution of $NH_3$ 30%, v/v/v) gave the desired product **4** as a yellow oil (80 mg, 32%). *Rf* = 0.2 (cyclohexane/EtOAc 8/2 + 1% solution of $NH_3$ 30%, v/v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.49-2.52 (m, 4H), 2.57−2.69 (m, 4H), 3.71−3.74 (m, 4H), 3.96 (s, 3H), 5.20 (s, 2H), 7.27−7.46 (m, 7H$_r$). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 17.4, 52.6, 53.3, 57.1, 66.8, 67.0, 70.8, 80.0, 88.2, 121.8, 126.9, 128.2, 128.7, 129.9, 135.2, 135.5, 140.1, 152.9, 164.8. MS (ESI+): *m/z* (%): 381 (100) $[M+H]^+$.

**Methyl 3-hydroxy-6-(4-morpholinobutyl)picolinate (8)**. To a solution of **4** (80 mg, 0.2 mmol) in a degassed mixture of MeOH/EtOAc (8/4 mL), Pearlman's catalyst (58 mg, 0.04 mmol, 0.2 equiv., 20% Pd, moisture 50%) was added. The solution was bubbled with $H_2$ and the reaction was stirred at rt under $H_2$ *atmosphere* (1 atm) for 1 h. The mixture was filtrated through celite and concentrated under reduced pressure to furnish the desired product **8** as a yellow solid (55 mg, 89%). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.68 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H), 2.56-2.61 (m, 2H), 2.68−2.79 (m, 6H), 3.83 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 3.96 (s, 3H), 7.23 (s, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 24.3, 27.3, 36.8, 52.7, 53.1, 58.1, 65.2, 126.8, 128.8, 129.2, 153.1, 157.2, 170.0. MS (ESI+): *m/z* (%): 295 (100) $[M+H]^+$.

**3-Hydroxy-6-(4-morpholinobutyl)picolinaldehyde (12).** To a solution of methyl ester **8** (55 mg, 0.18 mmol) in dry $CH_2Cl_2$ (2 mL), 2,6-lutidine (63 µL, 0.54 mmol, 3 equiv.) and TBDMSOTf (63 µL, 0.54 mmol, 3 equiv.) were successively added. The mixture was stirred at rt for 3.5 h under argon atmosphere. The mixture was washed with a saturated aqueous solution of NaCl, dried over $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. To a solution of the resulting residue in dry $CH_2Cl_2$ (2 mL), DIBAL-H (450 µL, 1 M in $CH_2Cl_2$, 0.45 mmol, 2.5 equiv.) was added dropwise at -78 °C. Then, the reaction mixture was stirred at this temperature for 12 min. The reaction was quenched with MeOH (450 µL), and the mixture was allowed to warm at room temperature. The organic layer was washed with an aqueous solution of NaOH (1 M), dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. Then, TBAF (200 µL, 1M in THF, 0.20 mmol, 1.1 equiv.) was added at 0 °C to the residue in dry THF (2 mL), and the mixture was stirred overnight at this temperature. After concentration under reduced pressure, chromatography on silica gel ($CH_2Cl_2$/MeOH 95/5, v/v) afforded access to the desired product **12** as a yellow solid (12 mg, 24%). *Rf* = 0.1 ($CH_2Cl_2$/MeOH 96/4, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.56−1.61 (m, 2H), 1.70−1.80 (m, 2H), 2.39 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.44 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 2.79 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.71 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 7.25-7.31 (m, 2H), 10.01 (s, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 26.1, 27.6, 37.2, 53.8, 58.9, 66.9, 126.5, 129.8, 135.8, 154.7, 157.1, 198.8. MS (ESI+): *m/z* (%): 265 (100) $[M+H]^+$.

**3-Hydroxy-6-(4-morpholinobutyl)picolinaldehyde oxime (16).** To a solution of aldehyde **12** (12 mg, 0.043 mmol) in dry EtOH (1 mL), $NH_2OH$.HCl (3.6 mg, 0.052 mmol, 1.2 equiv.) and NaOAc (4.6 mg, 0.056 mmol, 1.3 equiv.) were successively added. The mixture was stirred at rt for 1 h under argon atmosphere. After concentration under reduced pressure, chromatography on silica gel ($CH_2Cl_2$/MeOH 92/8 to 90/10, v/v) afforded access to oxime **16** as a yellow solid (10.8 mg, 86%). *Rf* = 0.3 ($CH_2Cl_2$/MeOH 90/10, v/v). $^1$H NMR (300 MHz, $CD_3OD$): δ = 1.53−1.63 (m, 2H), 1.67−1.75 (m, 2H), 2.50 (t, *J* = 6 Hz, 2H), 2.57 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 2.75 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.71 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 7.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CD_3OD$): δ = 26.3, 28.8, 54.5, 59.6, 67.2, 125.4, 126.0, 136.3, 152.8, 153.8, 154.3. MS (ESI+): *m/z* (%): 280 (100) $[M+H]^+$. HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{14}H_{21}N_3O_3$ 280.1620; found: 280.1624. HPLC : $t_R$ = 14.8 min, purity = 98.1%.

**Reversible inhibition and reactivation measurements.** A stock solution of oximes was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO; Kemika, Zagreb, Croatia), methanol (Kemika, Zagreb, Croatia) or water. Further dilutions were prepared in water or 0.1 M sodium phosphate pH 7.4. HI-6 dichloride monohydrate was a gift from Dr. Kamil Kuča and Dr. Daniel Jun (Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Kralove, Czech Republic). Tabun, VX, sarin and cyclosarin were purchased from NC Laboratory (Spiez, Switzerland), while paraoxon-ethyl was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). OP stock solutions (5000 µg/mL) were made in isopropyl alcohol, and further dilutions were made in water just before use, except for paraoxon-ethyl whose stock (2750 µg/mL) and further dilutions were prepared in ethanol. Acetylthiocholine iodide (ATCh), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Reversible inhibition of enzymes by oximes was measured in the presence of ATCh (0.05–1.0 mM) in order to determine the enzyme-oxime dissociation constant ($K_i$). The oxime was added to the mixture containing the enzyme and DTNB (final 0.3 mM), and upon addition of the ATCh, enzyme activity was measured. The activity was corrected for non-enzymatic substrate degradation by an oxime (oximolysis), and DMSO was kept below 0.15% to attenuate its inhibitory effect on AChE activity. The $K_i$ was evaluated from the experimental data according to the Hunter-Downs equation and the procedure described previously.[20b]

For reactivation experiments, the enzyme was incubated with a 10-fold excess of the OP for 30-60 min, achieving 90−100% inhibition. The incubation mixture was filtrated using a filtration column Strata® C18-E tubes (Phenomenex, Torrance, CA, USA) to remove the excess of unconjugated OP. The inhibited enzyme was then added to the reactivation mixture containing the oxime in 0.01% BSA/0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 to initiate reactivation. At a designated time point, an aliquot was diluted in phosphate buffer containing DTNB, and upon addition of ATCh, enzyme activity was measured. The final concentrations of ATCh and DTNB were 1.0 and 0.3 mM, respectively. An equivalent sample of an uninhibited enzyme was passed through a parallel column, diluted to the same extent as the reactivation mixture, and control activity was measured in the presence of an oxime at the same concentrations used for reactivation. Both the activities of the control and the reactivation mixture were corrected for oximolysis. No significant spontaneous reactivation of the phosphylated enzyme occurred.

One oxime concentration (0.2 mM; or 0.1 mM for **19**) or a wide range of oxime concentrations were used to determine the first-order reactivation rate constant at a given oxime concentration ($k_{obs}$), maximal percentage of reactivation ($React_{max}$) and kinetic constants (maximal first-order reactivation rate constant $k_{+2}$, overall second-order reactivation rate constant $k_r$ and phosphylated enzyme-oxime dissociation constant $K_{OX}$) as described previously.[18b]

Reversible inhibition and reactivation measurements were performed at 25 °C using the Ellman spectrophotometric method[40] at 412 nm on a Tecan Infinite M200PRO microplate reader (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austria) or a CARY 300 spectrophotometer (Varian Inc., Mulgrave, Australia), respectively.

***Ex vivo* scavenging assay.** *Ex vivo* degradation of OPs with oximes **16** and **18** was performed in whole human blood (hWB) incubated with 10-fold and 50-fold concentrations (0.7 µM and 3.4 µM, respectively) of VX, sarin, cyclosarin and paraoxon relative to the concentration of the AChE in hWB, which accounts for 80% of total blood cholinesterase activity (20% BChE). After 1 h of incubation (achieving 95–100% inhibition), oxime (1.0 mM) was added to the mixture. At specified time intervals, an aliquot was taken for enzyme activity measurements and results were expressed as percentage reactivation, as described previously.[16c] Enzyme activity measurements were performed as described for the reactivation assay at 436 nm on a CARY 300 spectrophotometer (Varian Inc., Mulgrave, Australia) at 25 °C. hWB was collected from a healthy female donor at the Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Croatia following approval by the Ethics Committee of the Institute.

**Crystallization and structure determination.** *Torpedo californica* AChE (*Tc*AChE) was purified as described previously.[41] Trigonal crystals were obtained in hanging drops with the vapor diffusion method by mixing an equal volume of protein solution (13 mg/mL) and precipitant solution (28−36% PEG 200, MES 100 mM pH 5.4) at 21 °C. Before carrying out soaking experiments, the DMSO solvent was evaporated from oxime **17**. To achieve evaporation, 2 µL of reactivator solutions (at 2-20 mM) in 100 % DMSO were added onto the surface of crystallization supports from EasyXtal crystallization trays (Qiagen) and stored in a fume hood during 24 h. After complete DMSO evaporation, 2 µl of the precipitant solution were added and pipetted exhaustively to dissolve the maximum amount of reactivator remaining on the surface of the crystallization supports. *Tc*AChE crystals were then transferred into the resulting drop and incubated during 24 h before flash-cooling in liquid nitrogen. Data collection was performed at 100 K on BM30A-FIP beamline at the European Synchrotron Radiation Facility, with λ = 0.98 Å and an ADSC Q315r CCD detector. Diffraction patterns were indexed, integrated and scaled using XDS and XSCALE[42]. Phase determination was performed by molecular replacement in Phaser,[43] and refinement was carried out with Phenix[44]. Reactivator's geometry descriptions and restraints were obtained from Avogadro[45] and Phenix.elbow[46], respectively. Real space refinement and model analysis were performed using Coot.[47] Coordinates and structure factors were deposited in the PDB with the assigned code 6EWK. For data collection and refinement statistics see **Table S1**.

**Molecular modelling of oxime complexes with phosphylated AChE and BChE.** The crystal structures of VX-inhibited mouse AChE (PDB: 2Y2U)[26] and human BChE (PDB: 2PM8)[48] were used for molecular docking using Biovia Discovery Studio Client v17.2 (Accelrys, San Diego, CA, USA). The model of the cyclosarin-hBChE conjugate was prepared by superposition of the crystal structures of hBChE and cyclosarin-inhibited mouse AChE (PDB:3ZLU),[42] and translation of cyclosarin moiety to the BChE Ser198O$_\gamma$. The structural model of the cyclosarin-hBChE conjugate with an alternate conformation of the cyclosarin moiety was obtained by a 90° rotation of the cyclohexyl ring.

Oxime structures were created and minimized using the MMFF94 force field implemented in ChemBio3D Ultra 12.0 (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA). The Dock Ligands protocol (CDOCKER) was used to generate 30 top-scored docking poses of each oxime in the defined active site of the enzyme (r = 13 Å) sorted by CHARMm energy (interaction energy plus ligand strain), where a more negative value corresponds to more favourable binding. Depending on the orientations of specific functional groups, two or three generated poses were selected for minimization (Minimization protocol with Smart Minimizer algorithm, as implemented in Biovia Discovery Studio Client v17.2, Accelrys, San Diego, CA, USA) and intermolecular bond analyses (i.e., electrostatic, hydrophobic, and H-bonds).

The alignment of amino acid sequences of hAChE, mAChE, and *Tc*AChE was done using AlignSequences protocol from Biovia Discovery Studio Client v17.2 (Accelrys, San Diego, CA, USA).

**p*Ka* determination.** The absorption spectra of oximes were scanned at 220-450 nm at 0.1 M phosphate pH 6.0-11.3 on a CARY 300 spectrophotometer (Varian Inc., Mulgrave, Australia) at 25 °C. Dissociation constants, $K_a$, were determined from the absorption maximums as described previously using the equation[30]:

$$A_{tot} = \frac{A_1 \times [H^+]^2 + A_2 \times [H^+] \times K_{a1} + A_3 \times K_{a1} \times K_{a2}}{[H^+]^2 + [H^+] \times K_{a1} + K_{a1} \times K_{a2}} \qquad (1)$$

where $A_{tot}$ is the sum of the absorption fractions of all ionization species, while $A_1$, $A_2$ and $A_3$ are values of absorbance that correspond to different ionization species. The hydrogen ion concentration is represented by $[H^+]$. The acid-base equilibrium between the various species is defined by dissociation constants $K_{a1}$ and $K_{a2}$, and was determined using Prism6 software (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).[16d, 30]

**Calculation of molecular properties and *in silico* prediction of BBB penetration.** The physicochemical properties of the oximes such as the logarithm of the octanol-water partition coefficient (logP), pH-dependent lipophilicity coefficient (logD), polar surface area (PSA/Å$^2$), number of H-bond donors (HBD) and acceptors (HBA), number of rotatable bonds (RB), p$K_a$ values, and microspecies at a specific pH, were determined using Marvin software (version 16.11.7.0, ChemAxon, Budapest, Hungary) at an ionic strength of $c(Na^+,K^+)$ = 0.1 M and $c(Cl^-)$ = 0.1 M and 25 °C. The obtained results were compared to the recommendations for physicochemical properties of a successful central nervous system drug[33] or used in an algorithm for calculating the CNS MPO score (Central Nervous System Multi-Parameter Optimization) that defines the probability of a compound being a CNS-active drug.[34b]

**Permeability test (PAMPA−BBB).** A parallel artificial membrane permeation assay for the BBB was used, following the method described

by Di *et al.*[35] The *in vitro* permeability ($P_e$) of fourteen commercial drugs through a lipid extract of the porcine brain membrane together with the test compounds was determined. Commercial drugs and assayed compounds were tested using a mixture of PBS:EtOH (70:30). Assay validation was performed by comparing the experimental permeability with reported values of the commercial drugs, and linear correlation between the experimental and reported permeability of the fourteen commercial drugs using the parallel artificial membrane permeation assay was evaluated (y = 1.5758x-1.1459; $R^2$ = 0.9241). From this equation, and taking into account the limits for BBB permeation reported by Di et al., the ranges of permeability were established as follows: compounds with high BBB permeation (CNS+): $P_e$ ($10^{-6}$ cm $s^{-1}$) > 5.157; compounds with low BBB permeation(CNS-): $P_e$ ($10^{-6}$ cm $s^{-1}$) < 2.006, and compounds with uncertain BBB permeation (CNS+/-): 5.157 > $P_e$ ($10^{-6}$ cm $s^{-1}$) > 2.006.

## Acknowledgements

This work was supported by the *Direction Générale de l'Armement* (through a PhD Fellowship to A.B.), the *Agence Nationale de la Recherche* (ANR) (project ReCNS-AChE, grant number ANR-13-ASTR-0002-02), the program PHC COGITO (2015−2016) (33068WE), the interministerial program of R&D against CBRNE risks and the Croatian Science Foundation (project CHOLINESTERASE, grant number IP-11-2013-4307). This work was partially supported by INSA Rouen, Rouen-Normandie University, Centre *National de la Recherche Scientifique* (CNRS), *Région Haute-Normandie* (CRUNCh network), and the Labex SynOrg (ANR-11-LABX-0029).

**Keywords:** acetylcholinesterase • butyrylcholinesterase • oxime • nerve agents • CNS

**Supporting Information**. Content: **S1**. Reactivation of OP-phosphylated hAChE with oximes; **S2**. Crystal structure of the complex of *Tc*AChE and oxime **17**; **S3**. Sequence alignment between mouse, human, and *Torpedo californica* AChE; **S4**. Docking of oximes into *Tc*AChE, VX-mAChE and cyclosarin-hBChE; **S5**. *In vitro* determination of p$K_a$ values. This material is available free of charge via the Internet at http://....

[1] a) M. Eddleston, N. A. Buckley, P. Eyer and A. H. Dawson, *Lancet* **2008**, *371*, 597-607; b) M. Eddleston, L. Karalliedde, N. Buckley, R. Fernando, G. Hutchinson, G. Isbister, F. Konradsen, D. Murray, J. C. Piola, N. Senanayake, R. Sheriff, S. Singh and S. B. Siwach, *Lancet* **2002**, *360*, 1163-1167.

[2] a) E. Dolgin, *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1194-1195; b) A. T. Tu, *Toxin Rev.* **2007**, *26*, 231-274.

[3] P. Taylor in *Anticholinesterase agents*, Eds.: A. G. Hardman, J. G. Limbird and L. E. Gilman), McGraw-Hill, New York, **1995**, pp. 161-176.

[4] a) J. H. McDonough, Jr. and T. M. Shih, *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1997**, *21*, 559-579; b) T. Okumura, K. Taki, K. Suzuki, T. Yoshida, Y. Kuroiwa and T. Satoh in *Chapter 4 - The Tokyo subway sarin attack: Acute and delayed health effects in survivors*, (Ed. R. C. Gupta), Academic Press, Boston, **2015**, pp. 27-35.

[5] a) B. Li, J. A. Stribley, A. Ticu, W. Xie, L. M. Schopfer, P. Hammond, S. Brimijoin, S. H. Hinrichs and O. Lockridge, *J. Neurochem.* **2000**, *75*, 1320-1331; b) J. Minic, A. Chatonnet, E. Krejci and J. Molgo, *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *138*, 177-187; c) K. A. Petrov, E. Girard, A. D. Nikitashina, C. Colasante, V. Bernard, L. Nurullin, J. Leroy, D. Samigullin, O. Colak, E. Nikolsky, B. Plaud and E. Krejci, *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 11870-11883.

[6] M. P. Stojiljković and M. Jokanović, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **2006**, *57*, 435-443.

[7] a) Z. Kovarik, M. Čalić, G. Šinko, A. Bosak, S. Berend, A. Lucić Vrdoljak and B. Radić, *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *175*, 173-179; b) Z. Kovarik, Z. Radić, H. A. Berman, V. Simeon-Rudolf, E. Reiner and P. Taylor, *Biochemistry* **2004**, *43*, 3222-3229; c) F. Worek and H. Thiermann, *Pharmacol. Ther.* **2013**, *139*, 249-259.

[8] a) Z. Radic, N. A. Pickering, D. C. Vellom, S. Camp and P. Taylor, *Biochemistry* **1993**, *32*, 12074-12084; b) P. Taylor and Z. Radic, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1994**, *34*, 281-320; c) Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J. C. Fontecilla-Camps and F. Nachon, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41141-41147.

[9] W. N. Aldridge and E. Reiner, *Enzyme Inhibitors as Substrates. Interactions of Esterases with Esters of Organophosphorus and Carbamic Acids (Frontiers of Biology, Vol. 26)*, Elsevier, **1972**, p. 328 pp.

[10] G. Mercey, T. Verdelet, J. Renou, M. Kliachyna, R. Baati, F. Nachon, L. Jean and P.-Y. Renard, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 756-766.

[11] D. E. Lorke, H. Kalasz, G. A. Petroianu and K. Tekes, *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 743-753.

[12] M. Katalinić, N. Maček Hrvat, J. Žďárová Karasová, J. Misik and Z. Kovarik, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **2015**, *66*, 291-298.

[13] a) M. C. de Koning, M. van Grol and D. Noort, *Toxicol. Lett.* **2011**, *206*, 54-59; b) J. Kalisiak, E. C. Ralph and J. R. Cashman, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 465-474; c) J. Kalisiak, E. C. Ralph, J. Zhang and J. R. Cashman, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3319-3330; d) Z. Kovarik, N. Maček, R. K. Sit, Z. Radić, V. V. Fokin, K. B. Sharpless and P. Taylor, *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *203*, 77-80; e) N. Maraković, A. Knežević, V. Vinković, Z. Kovarik and G. Šinko, *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *259*, 122-132; f) G. Mercey, J. Renou, T. Verdelet, M. Kliachyna, R. Baati, E. Gillon, M. Arboléas, M. Loiodice, F. Nachon, L. Jean and P.-Y. Renard, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10791-10795; g) G. Mercey, T. Verdelet, G. Saint-André, E. Gillon, A. Wagner, R. Baati, L. Jean, F. Nachon and P.-Y. Renard, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5295-5297; h) Z. Radić, R. K. Sit, E. Garcia, L. Zhang, S. Berend, Z. Kovarik, G. Amitai, V. V. Fokin, K. Barry Sharpless and P. Taylor, *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *203*, 67-71; i) J. Renou, J. Dias, G. Mercey, T. Verdelet, C. Rousseau, A.-J. Gastellier, M. Arboleas, M. Touvrey-Loiodice, R. Baati, L. Jean, F. Nachon and P.-Y. Renard, *RSC Advances* **2016**, *6*, 17929-17940; j) J. Renou, M. Loiodice, M. Arboleas, R. Baati, L. Jean, F. Nachon and P.-Y. Renard, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3947-3950; k) J. Renou, G. Mercey, T. Verdelet, E. Păunescu, E. Gillon, M. Arboléas, M. Loiodice, M. Kliachyna, R. Baati, F. Nachon, L. Jean and P.-Y. Renard, *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *203*, 81-84; l) R. K. Sit, V. V. Fokin, G. Amitai, K. B. Sharpless, P. Taylor and Z. Radić, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1378-1389; m) R. K. Sit, Z. Radić, V. Gerardi, L. Zhang, E. Garcia, M. Katalinić, G. Amitai, Z. Kovarik, V. V. Fokin, K. B. Sharpless and P. Taylor, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 19422-19430; n) Z. Radic, R. K. Sit, Z. Kovarik, S. Berend, E. Garcia, L. Zhang, G. Amitai, C. Green, B. Radic, V. V. Fokin, K. B. Sharpless and P. Taylor, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 11798-11809; o) Z. Radic, T. Dale, Z. Kovarik, S. Berend, E. Garcia, L. Zhang, G. Amitai, C. Green, B. Radic, B. M. Duggan, D. Ajami, J. Rebek and P. Taylor, *Biochem. J* **2013**, *450*, 231-242.

[14] M. Lobell, L. Molnár and G. M. Keserü, *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 360-370.

[15] R. K. Sit, Z. Radic, V. Gerardi, L. Zhang, E. Garcia, M. Katalinic, G. Amitai, Z. Kovarik, V. V. Fokin, K. B. Sharpless and P. Taylor, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 19422-19430.

[16] a) Z. Kovarik, N. Maček Hrvat, M. Katalinić, R. K. Sit, A. Paradyse, S. Žunec, K. Musilek, V. V. Fokin, P. Taylor and Z. Radić, *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, *28*, 1036-1044; b) Z. Kovarik, Z. Radić, H. A. Berman

and P. Taylor, *Toxicology* **2007**, *233*, 79-84; c) N. Maček Hrvat, S. Žunec, P. Taylor, Z. Radić and Z. Kovarik, *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *259*, 148-153; d) Z. Radić, T. Dale, Z. Kovarik, S. Berend, E. Garcia, L. Zhang, G. Amitai, C. Green, B. Radic, B. M. Duggan, D. Ajami, J. Rebek and P. Taylor, *Biochem. J* **2013**, *450*, 231-242.

[17] A. G. Calas, J. Dias, C. Rousseau, M. Arboleas, M. Touvrey-Loiodice, G. Mercey, L. Jean, P. Y. Renard and F. Nachon, *Chem. Biol. Interact.* **2017**, *267*, 11-16.

[18] a) Z. Kovarik, N. Ciban, Z. Radić, V. Simeon-Rudolf and P. Taylor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *342*, 973-978; b) Z. Kovarik, M. Čalić, A. Bosak, G. Šinko and D. Jelić, *Croat. Chem. Acta* **2008**, *81*, 47-57.

[19] P. M. Lundy, M. G. Hamilton, T. W. Sawyer and J. Mikler, *Toxicology* **2011**, *285*, 90-96.

[20] a) M. Katalinić, N. Maček Hrvat, K. Baumann, S. Morasi Piperčić, S. Makarić, S. Tomić, O. Jović, T. Hrenar, A. Miličević, D. Jelić, S. Žunec, I. Primožič and Z. Kovarik, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2016**, *310*, 195-204; b) M. Katalinić, A. Zandona, A. Ramić, T. Zorbaz, I. Primožič and Z. Kovarik, *Molecules* **2017**, *22*.

[21] A. Lucić Vrdoljak, M. Calić, B. Radić, S. Berend, D. Jun, K. Kuca and Z. Kovarik, *Toxicology* **2006**, *228*, 41-50.

[22] A. Allgardsson, L. Berg, C. Akfur, A. Hornberg, F. Worek, A. Linusson and F. J. Ekstrom, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 5514-5519.

[23] C. B. Millard, G. Koellner, A. Ordentlich, A. Shafferman, I. Silman and J. L. Sussman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9883-9884.

[24] P. M. Legler, I. Soojhawon and C. B. Millard, *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* **2015**, *71*, 1788-1798.

[25] a) B. Sanson, F. Nachon, J.-P. Colletier, M.-T. Froment, L. Toker, H. M. Greenblatt, J. L. Sussman, Y. Ashani, P. Masson, I. Silman and M. Weik, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7593-7603; b) M. C. Franklin, M. J. Rudolph, C. Ginter, M. S. Cassidy and J. Cheung, *Proteins* **2016**, *84*, 1246-1256.

[26] C. Akfur, E. Artursson and F. Ekstrom, *To be published*.

[27] a) M. Harel, I. Schalk, L. Ehret-Sabatier, F. Bouet, M. Goeldner, C. Hirth, P. H. Axelsen, I. Silman and J. L. Sussman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 9031-9035; b) F. Nachon, E. Carletti, C. Ronco, M. Trovaslet, Y. Nicolet, L. Jean and P. Y. Renard, *Biochem. J* **2013**, *453*, 393-399; c) E. H. Rydberg, B. Brumshtein, H. M. Greenblatt, D. M. Wong, D. Shaya, L. D. Williams, P. R. Carlier, Y. P. Pang, I. Silman and J. L. Sussman, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5491-5500.

[28] A. d. S. Gonçalves, T. C. C. França, J. D. Figueroa-Villar and P. G. Pascutti, *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 155-165.

[29] Y. Li, L. Du, Y. Hu, X. Sun and J. Hu, *Can. J. Chem.* **2012**, *90*, 376-383.

[30] G. Šinko, M. Calić and Z. Kovarik, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 3167-3172.

[31] A. E. Gillam in Eds.: E. S. Stern and C. J. Timmons), Edward Arnold, London, **1970**, p. 149.

[32] D. S. Bohle, Z. Chua, I. Perepichka and K. Rosadiuk, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4223-4229.

[33] H. Pajouhesh and G. R. Lenz, *NeuroRx* **2005**, *2*, 541-553.

[34] a) T. T. Wager, R. Y. Chandrasekaran, X. Hou, M. D. Troutman, P. R. Verhoest, A. Villalobos and Y. Will, *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 420-434; b) T. T. Wager, X. Hou, P. R. Verhoest and A. Villalobos, *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 435-449; c) T. T. Wager, X. Hou, P. R. Verhoest and A. Villalobos, *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, *7*, 767-775.

[35] L. Di, E. H. Kerns, K. Fan, O. J. McConnell and G. T. Carter, *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 223-232.

[36] B. J. Bennion, N. A. Be, M. W. McNerney, V. Lao, E. M. Carlson, C. A. Valdez, M. A. Malfatti, H. A. Enright, T. H. Nguyen, F. C. Lightstone and T. S. Carpenter, *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 5228-5237.

[37] a) N. J. Abbott, A. A. Patabendige, D. E. Dolman, S. R. Yusof and D. J. Begley, *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 13-25; b) A. M. Palmer and M. S. Alavijeh, *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2013**, *62*, Unit 7.15.

[38] a) G. Cassel, L. Karlsson, L. Waara, K. W. Ang and A. Goransson-Nyberg, *Eur. J. Pharmacol.* **1997**, *332*, 43-52; b) H. Kalasz, S. M. Nurulain, G. Veress, S. Antus, F. Darvas, E. Adeghate, A. Adem, F. Hashemi and K. Tekes, *J. Appl. Toxicol.* **2015**, *35*, 116-123.

[39] O. Soukup, J. Korabecny, D. Malinak, E. Nepovimova, N. L. Pham, K. Musilek, M. Hrabinova, V. Hepnarova, R. Dolezal, P. Pavek, P. Jost, T. Kobrlova, J. Jankockova, L. Gorecki, M. Psotka, T. D. Nguyen, K. Box, B. Outhwaite, M. Ceckova, A. Sofr, D. Jun and K. Kuca, *Med. Chem.* **2018**.

[40] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, Jr. and R. M. Feather-Stone, *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-95.

[41] J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, L. Varon, L. Toker, A. H. Futerman and I. Silman, *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 821-823.

[42] W. Kabsch, *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 133-144.

[43] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni and R. J. Read, *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658-674.

[44] P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkóczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L. W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger and P. H. Zwart, *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 213-221.

[45] M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek and G. R. Hutchison, *J. Cheminform.* **2012**, *4*, 17.

[46] N. W. Moriarty, R. W. Grosse-Kunstleve and P. D. Adams, *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 1074-1080.

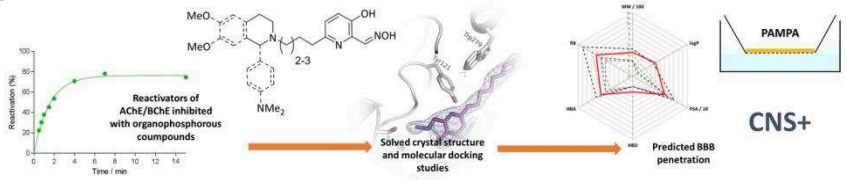
[47] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott and K. Cowtan, *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486-501.

[48] M. N. Ngamelue, K. Homma, O. Lockridge and O. A. Asojo, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2007**, *63*, 723-727.

…

**Entry for the Table of Contents**

# FULL PAPER




A new class of uncharged oximes tested as reactivators of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited with nerve agents were more efficient than oximes in use. The crystal structure displayed a productive conformation for reactivation of both phosphylated enzymes. Furthermore, oximes are predicted to efficiently cross the blood-brain-barier and they could, therefore, potentially achieve significant concentrations both at the neuromuscular junction and in the brain. This, in turn, could result in an overall improved therapeutic outcome after nerve agents poisoning.

*Tamara Zorbaz, Anissa Braïki, Nikola Maraković, Julien Renou, Eugenio de la Mora, Nikolina Maček Hrvat, Maja Katalinić, Israel Silman, Joel L. Sussman, Guillaume Mercey, Catherine Gomez, Romain Mougeot, , Belén Pérez, Rachid Baati, Florian Nachon, Martin Weik, Ludovic Jean,* Zrinka Kovarik,* and Pierre-Yves Renard**

**Potent 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime reactivators of organophosphate-inhibited cholinesterases with predicted blood-brain barrier penetration**

WILEY-VCH

**SUPPORTING INFORMATION**

# Potent 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime reactivators of organophosphate-inhibited cholinesterases with predicted blood-brain barrier penetration

Tamara Zorbaz,[a] Anissa Braïki,[b] Nikola Maraković,[a] Julien Renou,[b] Eugenio de la Mora,[c] Nikolina Maček Hrvat,[a] Maja Katalinić,[a] Israel Silman,[d] Joel L. Sussman,[e] Guillaume Mercey,[b] Catherine Gomez,[b] Romain Mougeot,[b] Belén Pérez,[f] Rachid Baati,[g] Florian Nachon,[h] Martin Weik,[c] Ludovic Jean,*[b] Zrinka Kovarik*[a] and Pierre-Yves Renard*[b]

## Contents

S1. Reactivation of OP-phosphylated hAChE with oximes ..... 2

S2. Crystal structure of the complex of *Tc*AChE and oxime 17 ..... 3

S3. Sequence alignment between mouse, human, and *Torpedo californica* AChE ..... 4

S4. Docking of oximes into *Tc*AChE, VX−mAChE and cyclosarin−hBChE ..... 5

S5. *In vitro* determination of p$K_a$ values ..... 7

[a] T. Zorbaz, Dr. N. Maraković, Dr. N. Maček Hrvat, Dr. M. Katalinić, Dr Z. Kovarik*
Institute for Medical Research and Occupational Health
Ksaverska cesta 2, HR-10000 Zagreb, Croatia
E-mail: zkovarik@imi.hr

[b] A. Braïki, Dr. J. Renou, G. Mercey, C. Gomez, R. Mougeot, Prof. L. Jean*, Prof. P.-Y. Renard*
COBRA (UMR 6014), INSA Rouen, CNRS, Normandie Univ, UNIROUEN, 76000 Rouen, France
E-mail: ludovic.jean@univ-rouen.fr; pierre-yves.renard@univ-rouen.fr

[c] Dr. E. de la Mora, Dr. M. Weik
Univ Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IBS, 38000 Grenoble, France

[d] Prof. I. Silman
Department of Neurobiology, Weizmann Institute of Science
6100 Rehovot, Israel

[e] Prof. J. Sussman
Department of Structural Biology, Weizmann Institute of Science
76100 Rehovot, Israel

[f] Prof. B. Perez
Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia
Universitat Autònoma de Barcelona
08193, Bellaterra, Barcelona, Spain

[g] Prof Rachid Baati
Institut de Chimie et Procédés pour l'Energie, l'Environnement et la Santé (ICPEES), ECPM, UMR 7515 CNRS - Université de Strasbourg, 25 rue Becquerel, Strasbourg 67087 Cedex 02, France

[h] Dr. F. Nachon
Département de Toxicologie et Risques Chimiques
Institut de Recherche Biomédicale des Armées
91220 Brétigny-sur-Orge, France

T.Z. and A.B. contributed equally to this study.

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document

# S1. Reactivation of OP-phosphylated hAChE with oximes

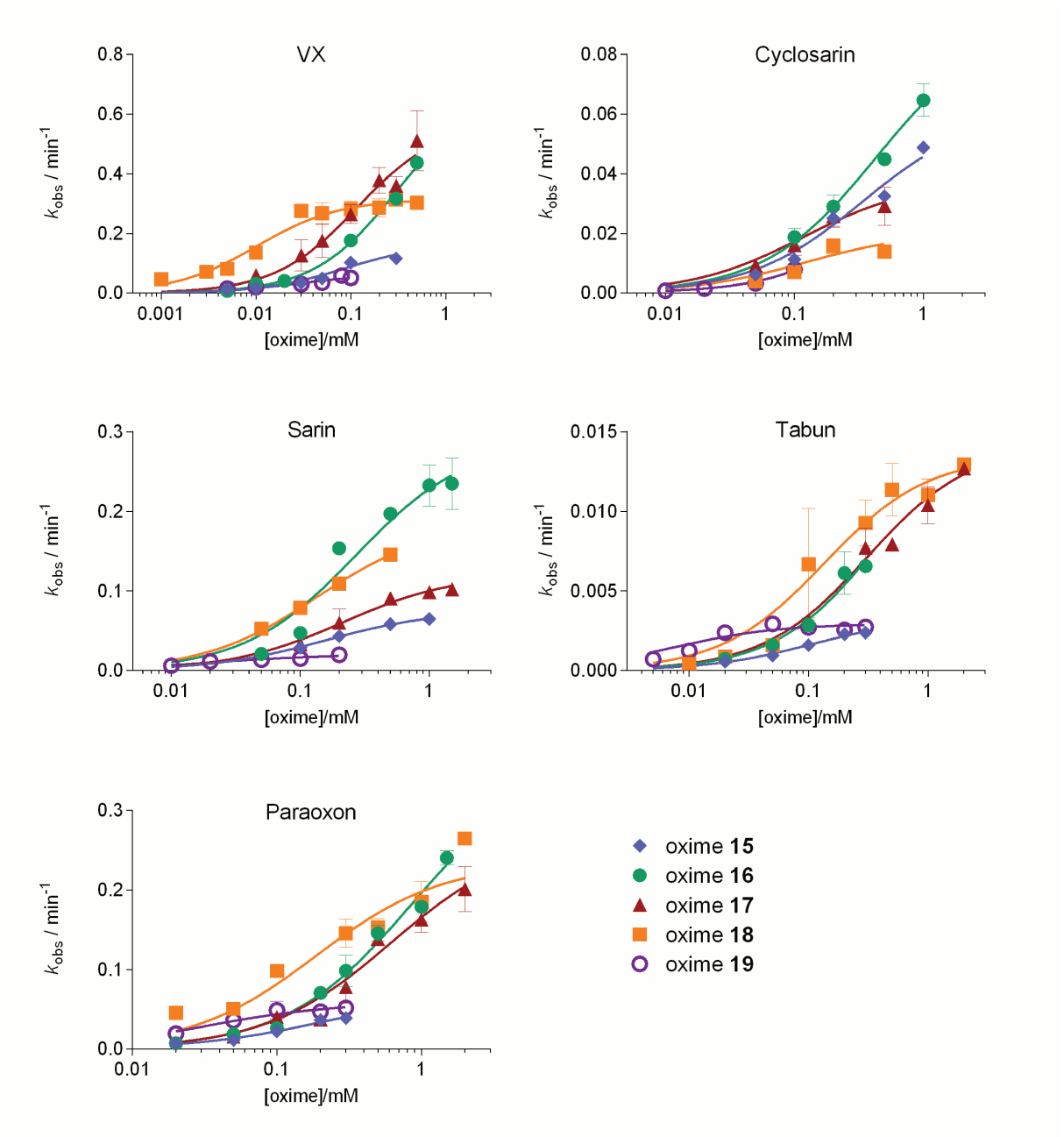



**Figure S1.** The first-order reactivation rate plotted against oxime concentration for human AChE inhibited by different OP compound. The results are obtained from at least three experiments.

# S2. Crystal structure of the complex of *Tc*AChE and oxime 17

**Table S1.** X-ray data processing and refinement statistics for crystal structure *Tc*AChE and oxime 17

| X-ray data collection and processing statistics | |
|---|---|
| PDB ID | 6EWK |
| Wavelength (Å) | 0.98 |
| Temperature (K) | 100 |
| Space group | P $3_12_11$ |
| Unit cell parameters (Å) | 111.5, 111.5 136.6 |
| Resolution range (Å) | 29.1-2.2 (2.3 – 2.2)* |
| Total reflections | 179293 (17897) |
| Unique reflections | 48656 (4819) |
| I/σ(I) | 9.1 (2.1) |
| Completeness (%) | 99.1 (99.3) |
| Multiplicity | 3.7 (3.7) |
| R-meas | 12.4 (68.5) |
| CC1/2 | 99.4 (77.2) |
| **Refinement** | |
| Rwork (%) | 17.7 |
| Rfree (%) | 22.0 |
| Wilson B ($Å^2$) | 30.2 |
| R.m.s. deviations | |
| Bond lengths (Å) | 0.010 |
| Bond angles (°) | 1.18 |
| Number of non-hydrogen atoms | |
| Protein | 4277 |
| Ligands | 90 |
| Solvent | 407 |
| Protein residues | 532 |
| Ramachandran favored (%) | 95.5 |
| Ramachandran outliers (%) | 0 |
| Average B-factor | 34.4 |
| Protein | 33.6 |
| Ligands | 49.6 |
| Solvent | 40.1 |

(*)Values in brackets are for the highest resolution shells.

# S3. Sequence alignment between mouse, human, and *Torpedo californica* AChE

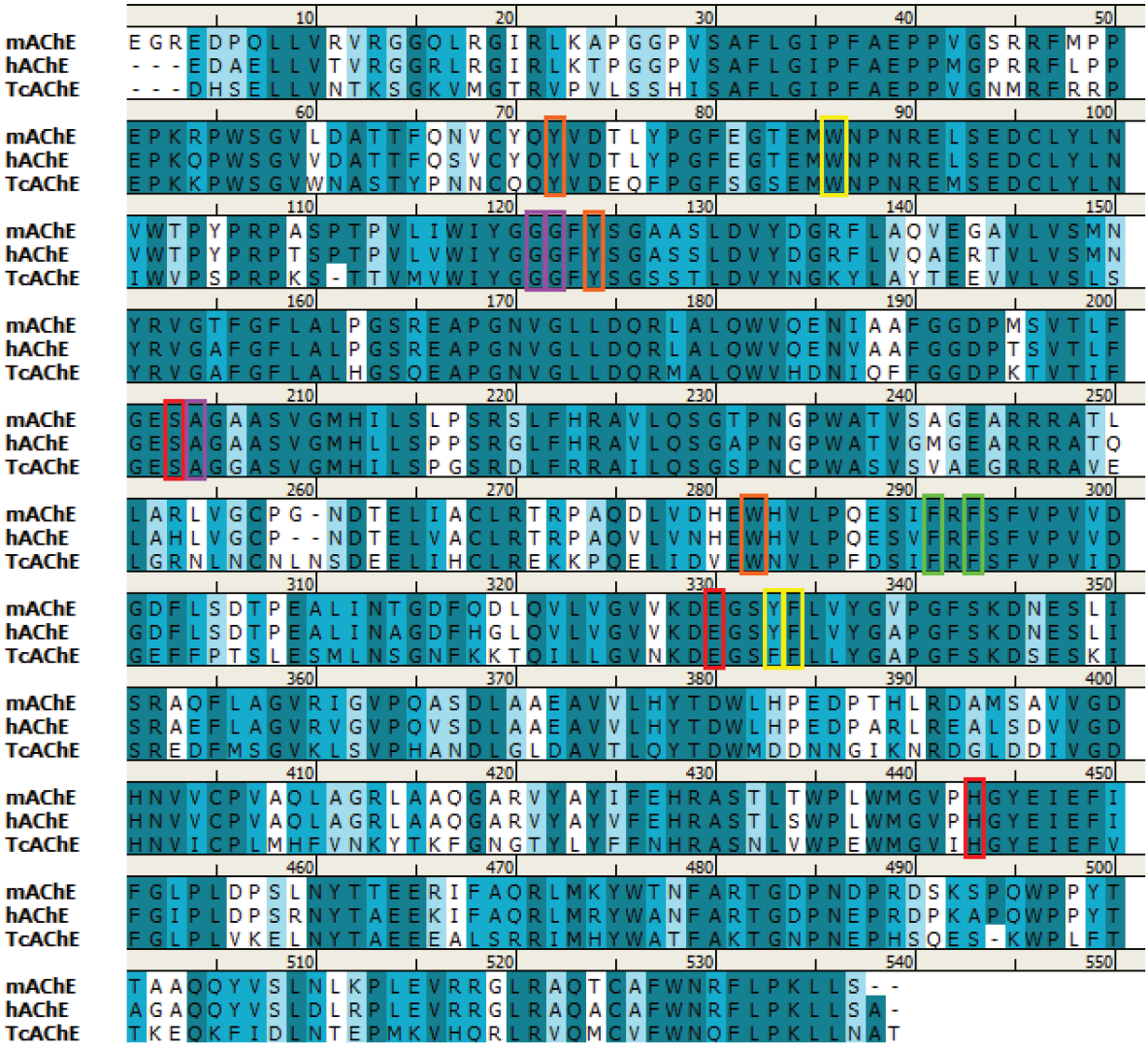



**Figure S2.** Sequence alignment between mouse AChE (mAChE), human AChE (hAChE), and *Torpedo californica* AChE (*Tc*AChE). The distinctive amino acids comprising specific active site domains were highlighted aligned between the three sequences, as follows: acyl pocket: , choline binding site: , oxyanione hole: , catalytic triade: , and peripheral alosteric site: . Sequence identity between the three sequences was calculated to be 55.3%, while sequence similarity was calculated to be 76.1%.

## S4. Docking of oximes into *Tc*AChE, VX−mAChE and cyclosarin−hBChE

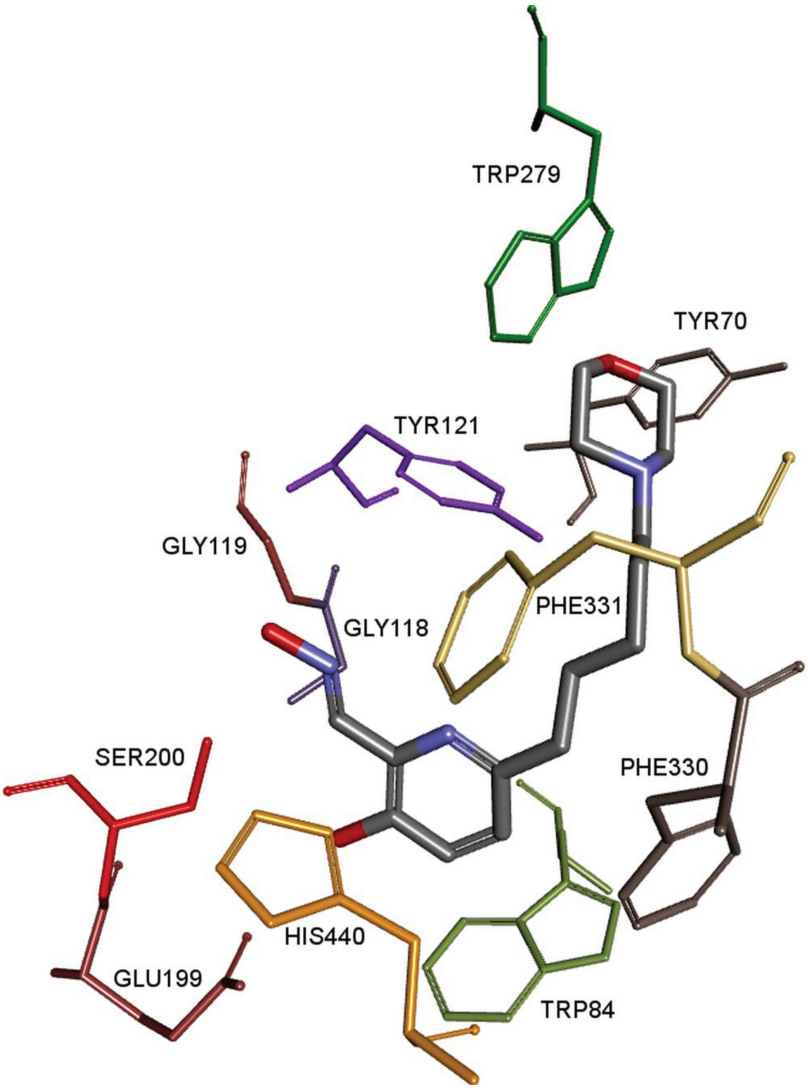



**Figure S3.** The model structure of the complex of oxime **17** (grey) and apo *Tc*AChE from the crystal structure (PDB ID: 6EWK).

**Table S2**. Non-bonding ChE/ChE-OP–oxime interactions as predicted by molecular docking studies.

| ChE/ChE-OP | Oxime | Amino acid | Type of interaction | CHARMm energy (kcal/mol) |
|---|---|---|---|---|
| *Tc*AChE | **17** | Glu199 | Conventional hydrogen bond; H-donor | 29554.53 |
| | | Gly119 | Carbon hydrogen bond; H-acceptor | |
| | | Tyr121 | Carbon hydrogen bond; H-donor | |
| | | Tyr121 | Carbon hydrogen bond; H-donor | |
| | | Tyr121 | Carbon hydrogen bond; H-donor | |
| | | Trp84 | π-π T-shaped | |
| | | Trp84 | π-π T-shaped | |
| | | His440 | π-π T-shaped | |
| VX−mAChE | **16** | Gly120 | Conventional hydrogen bond; H-donor | 27730.18 |
| | | Gly120 | Conventional hydrogen bond; H-donor | |
| | | Tyr124 | Conventional hydrogen bond; H-donor | |
| | | Gly126 | Carbon hydrogen bond; H-acceptor | |
| | | Asp74 | Carbon hydrogen bond; H-donor | |
| | | Asp74 | Carbon hydrogen bond; H-donor | |
| | | Asp74 | Carbon hydrogen bond; H-donor | |
| | | Tyr341 | π-cation | |
| | | Trp86 | π-π stacked | |
| | **17** | Phe295 | Conventional hydrogen bond; H-acceptor | 27718.78 |
| | | Gly120 | Conventional hydrogen bond; H-donor | |
| | | Glu202 | Conventional hydrogen bond; H-donor | |
| | | Gly120 | Carbon hydrogen bond; H-acceptor | |
| | | Gly121 | Carbon hydrogen bond; H-acceptor | |
| | | Gly121 | Carbon hydrogen bond; H-acceptor | |
| | | Gly126 | Carbon hydrogen bond; H-acceptor | |
| | | Gly126 | Carbon hydrogen bond; H-acceptor | |
| | | Tyr124 | Carbon hydrogen bond; H-donor | |
| | | Trp86 | π-cation | |
| cyclosarin−hBChE (predominant conformation) | **16** | Asp70 | Electrostatic; attractive charge | 28812.55 |
| | | Ser287 | Conventional hydrogen bond; H-donor | |
| | | Asp70 | Conventional hydrogen bond; H-donor | |
| | | Gly116 | Carbon hydrogen bond; H-acceptor | |
| | | Tyr332 | Carbon hydrogen bond; H-donor | |
| | | Asp70 | Carbon hydrogen bond; H-donor | |
| | | Asp70 | Carbon hydrogen bond; H-donor | |
| | | Pro285–Leu286 | Amide-π stacked | |
| cyclosarin−hBChE (alternative conformation) | **16** | Asp70 | Electrostatic; attractive charge | 28803.53 |
| | | Gly117 | Conventional hydrogen bond; H-acceptor | |
| | | Ser287 | Conventional hydrogen bond; H-donor | |
| | | cyclosarin | Conventional hydrogen bond; H-donor | |
| | | Asp70 | Conventional hydrogen bond; H-donor | |
| | | Gly116 | Carbon hydrogen bond; H-acceptor | |
| | | Asp70 | Carbon hydrogen bond; H-donor | |
| | | Asp70 | Carbon hydrogen bond; H-donor | |
| | | Tyr332 | Carbon hydrogen bond; H-donor | |

# S5. *In vitro* determination of p$K_a$ values

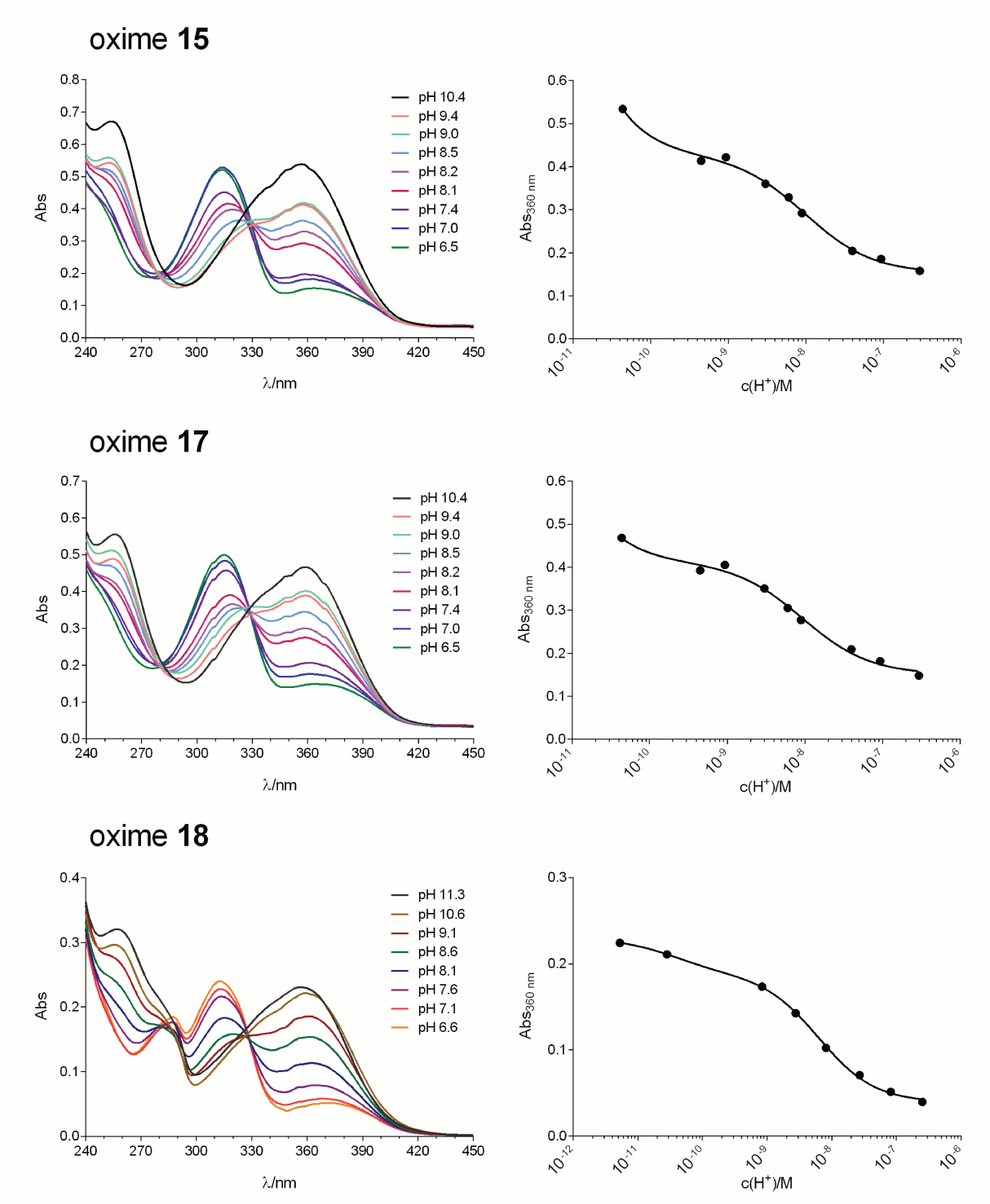



**Figure S4**. [$H^+$]-dependent absorption change at 360 nm for oximes **15**, **17** and **18**.

# Combination delivery of two oximes-loaded lipid nanoparticles: different release profiles for synergistic effect of rat brain protection

*Tatiana N. Pashirova[†*], Anissa Braiki[‡], Irina V. Zueva[†], Konstantin A. Petrov[†⊥], Vasily M. Babaev[†], Evgenia A. Burilova[†⊥], Darya A. Samarkina[†], Ildar Kh. Rizvanov[†], Eliana B. Souto[#§], Ludovic Jean[‡], Pierre-Yves Renard[‡], Patrick Masson[⊥], Lucia Ya. Zakharova[†*], Oleg G. Sinyashin[†]*

[†]*Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Arbuzov St., 8, Kazan, 420088, Russia*

[‡]*NormandieUniv, UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, COBRA (UMR 6014), Rouen, France*

[⊥]*Kazan Federal University, Kremlyovskaya St., 18, Kazan, 420008, Russia*

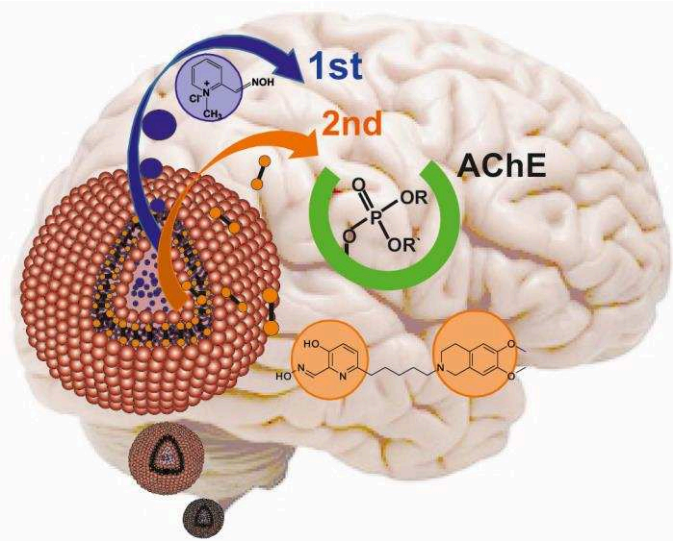
[§]*Department of Pharmaceutical Technology and* [#]*REQUIMTE/LAQV, Group of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Coimbra, Portugal*

KEYWORDS: Solid-Lipid Nanoparticles, Blood-brain barrier, Acetylcholinesterase, Organophosphorus agent, Oxime, Paraoxon.

ABSTRACT

A novel approach for brain protection against poisoning by organophosphorus agents is developed based on the combination treatment of dual delivery of two oximes. Pralidoxime chloride (2-PAM) and a novel reactivator, 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime (3-HPA), have been loaded in solid-lipid nanoparticles (SLNs) to offer distinct release profile and systemic half-life for both oximes. To increase the therapeutic time window of both oximes, SLNs with two different compartments were designed to load each respective drug. Oxime-loaded SLNs of hydrodynamic diameter between 100 and 160 nm and negative zeta potential (-30 to -25 mV) were stable for a period of 10 months at 4 ºC. SLNs displayed longer circulation time in the bloodstream compared to free 3-HPA and free 2-PAM. Oxime-loaded SLNs were suitable for intravenous (*iv*) administration. Paraoxon-poisoned rats ($0.8\times LD_{50}$) were treated with 3-HPA-loaded SLNs and 2-PAM+3-HPA-loaded SLNs at the dose of 3-HPA and 2-PAM of 5 mg/kg. Brain AChE reactivation up to 30% was slowly achieved in 5 hours after administration of 3-HPA-SLNs. For combination therapy with two oximes, synergistic effect and increased reactivation up to 35% was observed.

TOC GRAPHICS



Multidrug combination therapy is one of the promising approaches for treatment of serious chronic diseases. Nanotechnological "two-in-one" approach using nanoparticles for packaging multiple drugs in single carriers allows the improvement of drugs' bioavailability, with the simultaneous decrease of administered doses and adverse side-reactions. Nanoparticles exhibit targeted delivery of drugs and modified release profile and, when loaded with two drugs, may foster synergistic therapeutic outcomes.[1-4] To date, prevention of irreversible brain damages after acute organophosphorus (OP) poisoning is still a difficult problem, in particular in case of delayed medical care.[5] OP threat has become increasingly important due to acts of terrorism around the globe that have increased markedly in recent decades, and due to the proved use of these agents against civilian populations in Iraq or Syria. The current emergency treatment of acute OP poisoning consists in administering a combination of acetylcholinesterase (AChE) reactivator (quaternary oximes), atropine as anticholinergic drug, and an anticonvulsant to prevent brain damage.[5,6] However, current quaternary oximes are unable to reactivate phosphylated AChE in the central nervous system (CNS) because they do not cross significantly the blood-brain barrier (BBB).[7] Combination of two oximes has been shown to improve the emergency treatment of OP poisoning by covering a wide spectrum of organophosphorus agents.[8-10] Moreover, association of two oximes revealed synergistic enhancement of reactivatability of phosphylated AChE.

Nanoparticles as oxime delivery vehicles are therefore promising for this purpose.[11,12] Recently, our group showed that 2-PAM-loaded solid lipid nanoparticles are able to protect

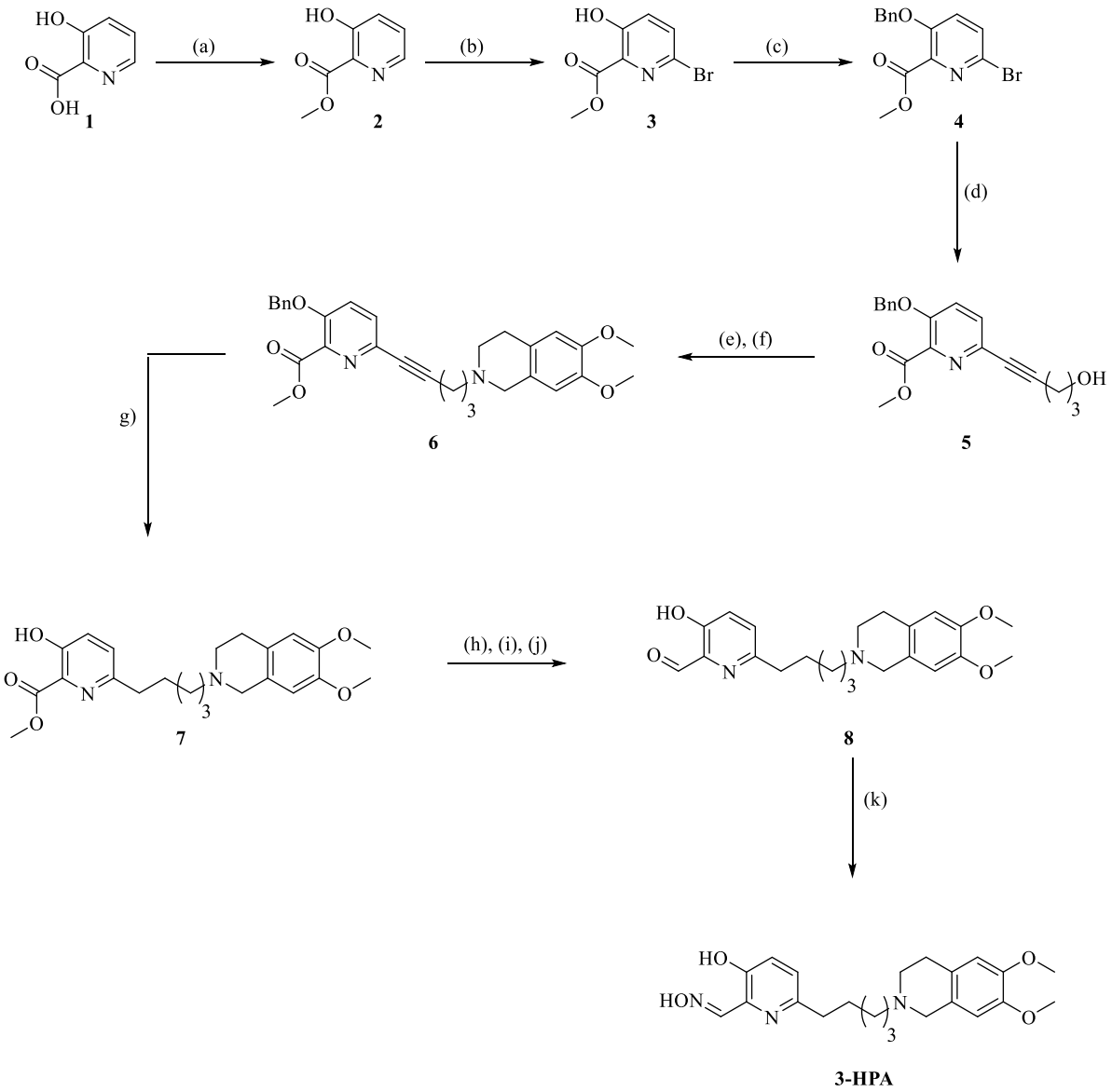
against paraoxon central toxicity.[13] Other researchers have also been working in that direction.[11] However, through the rapid elimination of 2-PAM, the percentage of reactivation of central AChE of the brain was still too low. To realize the potential of combination therapy, design of formulations for delivery of two oximes with different physiochemical properties was investigated, in particular, the water-soluble charged oxime pralidoxime chloride (2-PAM) and a poorly water soluble new uncharged hydrophobic oxime 6-(5-(6,7-Dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxy picolinaldehyde oxime, which displays a key 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime structure as the reactivator moiety linked to a dimethoxy dihydroisoquinolin as the AChE peripheral site binder in order to increase its affinity for phosphylated enzyme. In the rest of the manuscript, this oxime will be designated as 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime (3-HPA), see scheme 1 for their respective structures. 3-HPA showed an exceptional potential for reactivation of VX-, paraoxon-, and tabun-phosphylated AChE.[14] Owing to the difficulty to reactivate cholinesterases inhibited by phosphoramidates such as tabun as the prototype, 3-HPA constitutes a real *progress* in medical countermeasures of OP poisoning. For this purpose, biocompatible and biodegradable solid-lipid nanoparticles (SLNs),[15,16] prepared by the double emulsion method[17] with two different compartments to incorporate both oximes with different release times, are appropriate. These encapsulated oximes would be suitable for intravenous (*iv*) administration, and *in vivo* efficient therapy of rats poisoned by paraoxon. Here we have extended our previous work[13] and pursued several tasks that remain to be solved: i) overcoming BBB for 2-PAM and its reactivating action of brain AChE; ii)

increasing the bioavailability of the novel oxime 3-HPA; iii) achieving sequential release of both oxime and expanding the time window of oxime therapy.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Synthesis of 3-HPA

The synthesis of 3-HPA has been improved in comparison with those reported in.[14] The synthetic routes of 3-HPA are shown in Scheme 1. All the compounds were carefully purified and characterized by $^{1}H$ NMR and $^{13}C$ NMR.




(a) $H_2SO_4$, MeOH, reflux, 6h, ***99%***; (b) $Br_2$, $H_2O$, ice, 0°C, 1-2h, ***99%***; (c) BnBr, $K_2CO_3$, acetone, reflux, 12h, ***95%***; (d) 4-pentyn-1-ol, $Pd(PPh_3)_4$, CuI, TEA/ DCM (1:1, v/v), rt, 12h, ***96%***; (e) MsCl, TEA, DCM,rt, 3h, ***quant.***; (f)TIQ.HCl, $K_2CO_3$, ACN, reflux, 12h, ***74%***; (g) $H_2$ (1 atm), $Pd(OH)_2$, MeOH, rt, 12h, ***quant.***; (h), TBDMSOTf, TEA, DCM, rt, 2h; (i) DIBAL-H, DCM, -78°C, 15 min; (j) TBAF, THF, 0°C, 30 min, ***67% over 3 steps***; (k) AcONa, $NH_2OH.HCl$, MeOH, rt, 4h, ***73%***.

**Scheme 1.** Synthetic route of hydrophobic oxime 6-(5-(6,7-Dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)pentyl)-3-hydroxy picolinaldehyde oxime (3-HPA)

**Characterization of oxime-loaded lipid nanoparticles and study of *in vitro* oxime release** To prepare 3-HPA- loaded SLN and SLN with dual delivery of oximes (2-PAM and 3-HPA) we

used the technique described earlier.[13] To characterize stability of oxime-loaded SLNs, particle sizes and zeta potential by dynamic light scattering during time were evaluated. Results are presented in Table 1 and Supporting Information (SI) (Figure 1S, 2S).

**Table 1.** Size (Hydrodynamic diameter), Polydispersity index (PdI), Zeta potential (ZP), encapsulation efficiency (EE, %), and loading capacity (LC, %) of nanoparticles (data are expressed as mean ± SD)

| Formulation | 1-day storage | | | 10-month storage | | | EE, % | | LC, % | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Size, nm | PdI | ZP, mV | Size, nm | PdI | ZP, mV | 2-PAM | 3-HPA | 2-PAM | 3-HPA |
| Empty SLN | 68±13 | 0.26±0.01 | -55±1.5 | - | - | - | | - | - | |
| 3-HPA-SLN | 106±19 | 0.38±0.02 | -30.0±0.7 | 106±19 | 0.39±0.1 | -19.2±0.5 | - | 52±2 | | 3.5±0.1 |
| 2-PAM+3-HPA-SLN | 164±23 | 0.61±0.02 | -25±5 | 106±16 | 0.49±0.2 | -10.3±0.3 | 94.7±2 | 63.1±3 | 6.3±0.1 | 4.2±0.2 |

The size of 3-HPA-SLNs is around 100 nm and it increased to 160 nm for dual delivery of 2-PAM+3-HPA-SLNs. Polydispersity index of 2-PAM-3-HPA-loaded SLNs is 0.61, it is higher than for empty SLNs (70 nm). The zeta potential of nanoparticles is reduced with increasing of the concentration of 3-HPA (Fig, 2S, SI) and in the case of dual delivery SLN. After 10-month storage at 4 ºC 3-HPA-SLNs and 2-PAM+3-HPA-SLNs showed a good stability. The size and polydispersity index did not change, the zeta potential slightly decreased. The encapsulation efficiency for 2-PAM is around 95%; and it is comparable with previous 2-PAM-loaded SLNs formulation. The encapsulation efficiency for 3-HPA of 3-HPA-SLNs and 2-PAM-3+HPA-SLNs formulations equals 52±2 % and 63.1±3%, respectively. The loading capacity is close to 4% for 3-HPA and 6% for 2-PAM.

The *in vitro* release of oximes was analyzed by HPLC-MS and spectrophotometry methods. As seen in Figure 1, both 2-PAM for single delivery (2-PAM-loaded SLNs) and dual delivery (2-PAM+3-HPA-loaded SLNs) show the same release profile.

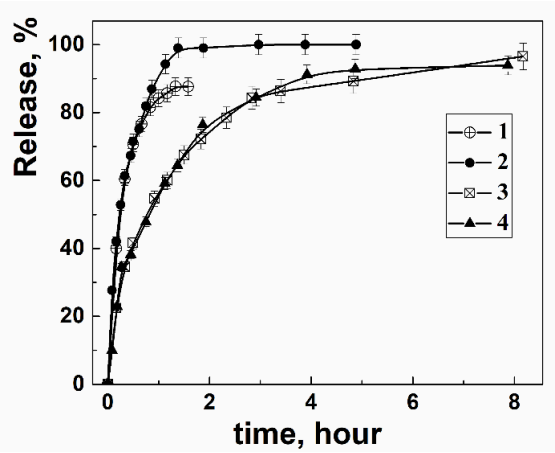



**Figure 1.** *In vitro* release of 2-PAM (1, 2) and 3-HPA (3, 4) using the dialysis bag method (n =3). 1: 2-PAM-loaded SLNs; 2 and 4: 2-PAM+3-HPA-loaded SLNs; 3: 3-HPA-loaded SLNs. The concentration of 2-PAM and 3-HPA is 0.1% (w/w). Phosphate buffer, 0.025 M (1), methanol-phosphate buffer (50% v/v) (2, 3, 4), pH = 7.4, 37 °C.

The obtained results show that 50% of 2-PAM was released within 14 minutes. The release time of 3-HPA was also not dependent on the composition of SLN, i.e. 3-HPA-loaded SLNs versus 2-PAM+3-HPA-loaded SLN, but it was 3.4 fold slower than for 2-PAM. For 3-HPA, 50% was released within 48 minutes. The full release of 2-PAM took 1.5 hours, whereas the full release time of 3-HPA was close to 10 hours.

**Pharmacokinetic study.** The concentration of 3-HPA in plasma after one single intravenous injection of 3-HPA in DMSO-water solution (5mg/kg) and loaded in SLNs with same dose is shown in Figure 2A.

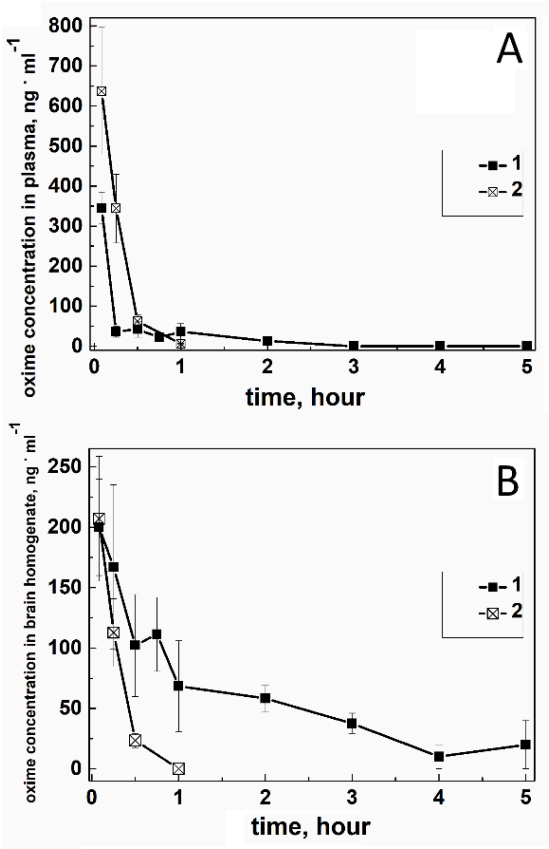



**Figure 2.** Concentration of 3-HPA in rat plasma (A) and in rat brain homogenate (B) after intravenous injection of 3-HPA-loaded SLNs (1) free 3-HPA (2) in DMSO-water solutions (50% w/w). The dose of 3-HPA is 5 mg/kg for 3-HPAin DMSO-water solutions and 3-HPA-loaded-SLNs. Each point represents the mean ± SD in five rats.

The pharmacokinetics of 3-HPA in rat blood can be described by a two-compartment model (1),

$$[C]_t = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \quad (1)$$

where $[C]_t$ is 3-HPA concentration in plasma at time t, α and β are distribution and elimination rate constants, respectively. The distribution phase α is very fast. Thus, we only monitored the elimination phase (β). At 5 min, the 3-HPA maximum concentration in plasma was 640 ng/ml; it progressively decreased to 6 ng/ml over 60 min.

Calculated pharmacokinetic parameters for elimination are summarized in Table 2. The elimination half-time ($t_{1/2\beta}$) for 3-HPA is 18 min, which is similar to elimination half-time of 2-PAM ($t_{1/2\beta}$ = 24 min). The 3-HPA-loaded-SLNs exhibited an elimination half-time ($t_{1/2\beta}$) of 154 min, i.e. 8.5-fold longer than for free 3-HPA.

**Table 2.** Pharmacokinetic parameters observed in rats after intravenous injection of 3-HPA in DMSO-water solutions (50% w/w), 3-HPA-loaded SLNs. The dose of 3-HPA is 5 mg/kg for 3-HPA in DMSO-water solutions (50% w/w) and in 3-HPA-SLNs preparation. Results represent the mean ± SE for five rats.

| Samples | β, $min^{-1}$ | $t_{1/2\beta}^{*}$, min |
|---|---|---|
| 3-HPA solution | 0.03833±0.004 | 18±1 |
| 3-HPA-SLNs | 0.00451±0.002 | 154 ±10 |

*$t_{1/2\beta}$= ln2/β, according to Eq.1 in which β is the elimination rate ($min^{-1}$) from blood.

To determine the ability of 3-HPA to cross the blood-brain barrier, 3-HPA in DMSO-water solution and 3-HPA-loaded SLNs were analyzed in brain tissues (Fig.2B). It is clearly

observed that the concentration of 3-HPA in the brain tissue in the case of 3-HPA-loaded SLNs is much higher than for injected free 3-HPA.

**Reactivation of Brain AChE *in Vivo.*** To test the *in vivo* efficacy of 3-HPA in DMSO-water solution (Fig 3A) and 3-HPA-loaded SLNs (Fig. 3 B) against OPs, we used a rat model for OP toxicity using POX. After 1 hr of poisoning by 0.8×$LD_{50}$ of POX (600 μg/kg, *i.p.*), brain samples were collected and AChE activity was analyzed. One hour after administration, this sub-lethal dose of POX (600 μg/kg, *i.p.*) inhibited 69±4% of AChE activity in the brain. One hour after injection, the inhibitory effect of POX on brain AChE reached a plateau, as evidenced by the level of AChE inhibition after one and two hours (data not shown).

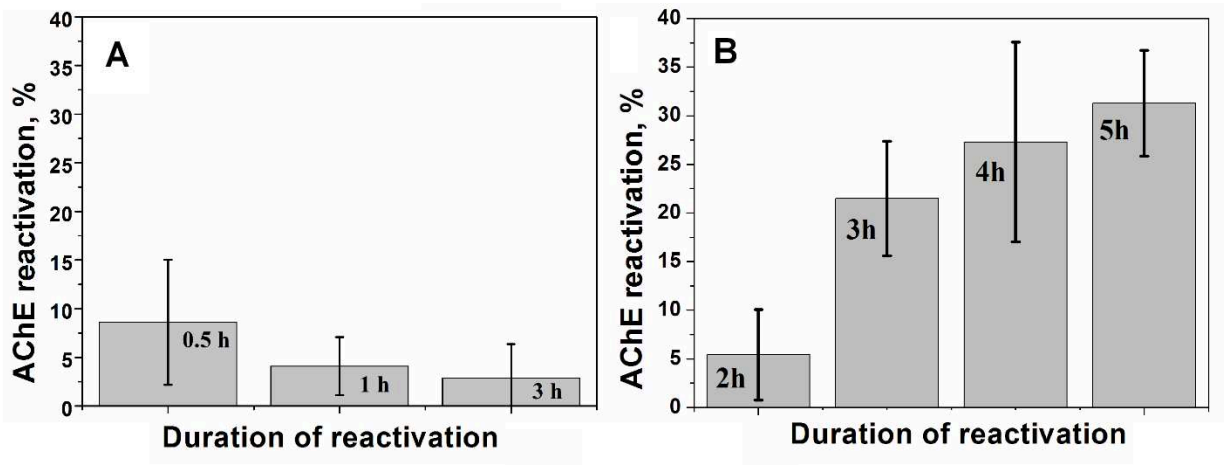



**Figure 3.** Determination of brain AChE reactivation level (%) *in vivo* as a function of time (from 0.5 to 5 hours); mean AChE activity of brain homogenates was measured in a control group of rats (taken as 100%), after poisoning by 0.8 × $LD_{50}$ of POX (6 mg/kg, ip) and after

injection of 3-HPA in 50% w/w DMSO-water solution (A) and 3-HPA-loaded SLNs (B), dose of 3-HPA is 5 mg/kg.

One hour after POX (600 μg/kg, *i.p.*), we injected free 3-HPA (5 mg/kg) in DMSO-water solution (50% w/w), or 3-HPA-loaded SLNs with the same dose (5 mg/kg). After 3-HPA injection, activity of AChE was analyzed. We observed that free 3-HPA reactivates phosphylated brain AChE, but activity recovery is very low (less than 7%) (Fig 3A). Likely, low brain AChE reactivation induced by free 3-HPA is associated with its high elimination rate. On the other hand, with 3-HPA-SLNs, 30 % brain AChE reactivation is slowly achieved in 5 hours (Figure 3B). It should be noted that this is the first example of high reactivation of brain AChE. But there is a threshold (until 3 hours after oxime injection) when brain AChE reactivation was only around 5%. This could be attributed to slow release of 3-HPA from SLNs (Fig.1). Therefore, to increase the therapeutic time window for oximes, we decided to design SLNs formulation for dual delivery of two oximes (2-PAM+3-HPA-loaded SLNs) with different release properties and elimination rate. In figure 4 it is clearly seen that the brain AChE reactivation takes place from 0.5 to 7 hours. It should be noted that for combinational therapy with two oximes, prolonged reactivation (35%) and synergistic effect is observed.

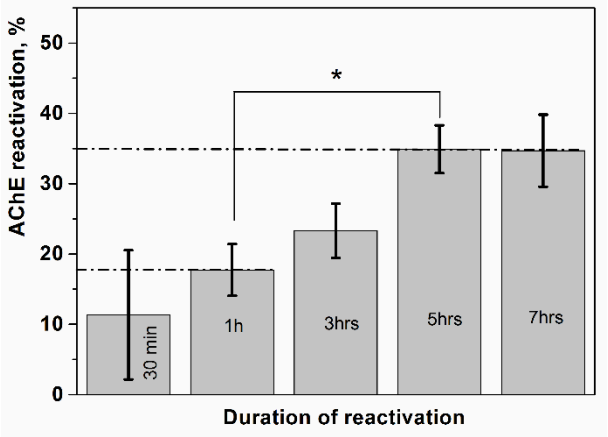



**Figure 4.** Determination of brain AChE reactivation level *in vivo* as a function of time (from 0.5 to 7 hours); mean AChE activity of brain homogenates was measured in a control group of rats (taken as 100%), after poisoning by 0.8 × $LD_{50}$ of POX (600 mg/kg, *ip*) and after injection of combination of 2-PAM+3-HPA-loaded SLNs (dose of 2-PAM 5 mg/kg, 3-HPA 5 mg/kg). Data are expressed as mean ± SEM. *$p < 0.05$. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test.

In conclusion, several tasks were solved: i) encapsulation of 3-HPA in solid lipid nanoparticles increased the bioavailability (solubility) of 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime (3-HPA) and prolonged circulation time in the bloodstream by 8.5 times compared to free 3-HPA; ii) 3-HPA-SLNs showed high reactivation of brain AChE (30%) inhibited by paraoxon; iii) overcoming BBB for 2-PAM and achieve sequential release of both oximes (2-PAM and 3-HPA) and prolongation of the time window of oxime therapy and synergetic effect leading to 35% brain AChE reactivation were reached. Further studies are needed to determine

whether this SLNs association of 2-PAM and 3-HPA can reactivate *in vivo* tabun-inhibited AChE.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** DYNASAN® 114 (Trimyristin) triglycerides was a gift from CREMER OLEO GmbH & Co. KG (Hamburg, Germany), Lipoid® S75, 75% soybean phosphatidylcholine was a gift from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany), Tween® 80 (Polysorbate 80) (BioXtra, Sigma-Aldrich, product of France), Glycerol (≥ 99.5 %, Sigma-Aldrich ChemieGmbh, Steinheim, Germany), Pyridine-2-aldoxime methochloride (2-PAM chloride, Pralidoxime chloride) (≥ 97 %, Sigma-Aldrich), Dichloromethane for HPLC (PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany), Ultra-purified water (18.2 MΩcm resistivity at 25°C) was produced from Direct-Q 5 UV equipment (Millipore S.A.S. 67120 Molsheim-France). Solvents were purified by a dry solvent station MB-SPS-800 (MBraun) immediately prior to use. Triethylamine was distilled from $CaH_2$ and stored over BaO or KOH. All reagents were obtained from commercial suppliers (Sigma Aldrich, Acros, TCI) unless otherwise stated.

**General**. Column chromatography purifications were performed on silica gel (40–63 μm) from Macherey-Nagel. Thin-layer chromatography (TLC) was carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminium sheets. Compounds were visualized by UV irradiation and/or spraying with a stain solution (KMnO4, ninhydrin or 2,4-DNP), followed by charring at 150 °C. $^{1}H$ and $^{13}C$ NMR spectra were recorded with a Bruker DPX 300 spectrometer (Bruker,

Wissembourg, France). Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) from $CDCl_3$ ($\delta_H$ = 7.26 ppm, $\delta_C$ = 77.16 ppm). *J* values are expressed in Hz. Mass spectra were obtained with a Finnigan LCQ Advantage MAX (ion trap) apparatus equipped with an electrospray source. High-resolution mass spectra were obtained with a Varian MAT 311 spectrometer using electrospray analysis. Analytical HPLC was performed on a Thermo Electron Surveyor instrument equipped with a PDA detector under the following conditions: Thermo Hypersil GOLD C18 column (5 µm, 4.6 x 100 mm) with $CH_3CN$ and 0.1% aq. trifluoroacetic acid (TFA) as eluents [0.1% aq. TFA/ $CH_3CN$ (100/0) (5 min), followed by linear gradient from 0% to 100% of $CH_3CN$ (45 min), then 100% $CH_3CN$ (10 min)], at a flow rate of 1.0 mL/min and *UV detection Max Plot* 220–360 nm.

**Synthesis of Methyl 3-hydroxypicolinate (Compound 2).** To a suspension of 3-hydroxypicolinic acid (10 g, 72 mmol, 1 equiv) in methanol (150 mL, 0.5 M) was added dropwise at 0°C a concentrated sulfuric acid (12 mL, 216 mmol, 3 equiv.). The obtained solution was stirred at reflux 6h. The cooled reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The pH was adjusted at 8.5 with an aqueous solution of saturated $NaHCO_3$ and solid $NaHCO_3$. The aqueous layer was extracted with EtOAc and the combined organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure to give **2** as a white solid (10.9 g, 99%). *Rf* =0.3 (PE/EtOAc 1/1, v/v). m.p. = 74 °C. $^1H$ NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 4.06 (s, 3H, Me), 7.34 (dd, *J* = 3.9, 8.4 Hz, 1H, $H_4$), 7.38 (dd, *J* = 1.5, 8.4 Hz, 1H, $H_5$), 8.38 (dd, *J* = 1.5, 3.9 Hz, 1H, $H_3$), 10.64 (s, 1H, $H_8$). $^{13}C$ NMR (75 MHz,

$CDCl_3$): δ = 53.2, 126.3, 129.8, 130.2, 141.6, 158.9, 169.9. MS (ESI+): *m/z* (%): 154 (100) $[M+H]^+$.

**Synthesis of Methyl 3-hydroxy-6-bromopicolinate (Compound 3).** To a solution of methyl 3-hydroxypicolinate **2** (10 g, 65.36 mmol) in osmosed water (0.1 M) with crushed ice at 0 °C, was added portionwise bromine (4 x 1.02 mL every 30 min, 78.4 mmol, 1.2 equiv) under vigorous stirring. The mixture was vigorously stirred at 0 °C for 1-2 h. The solution was extracted by DCM and the combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure to give **3** as a white-off solid (15.08 g, 99%). *Rf* = 0.3 (PE/EtOAc 6/4, v/v). $^1H$ NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 4.07 (s, 3H), 7.29 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.58 (dd, *J* = 0.3, 8.7 Hz, 1H), 10.72 (br s, 1H). $^{13}C$ NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 53.5, 129.5, 130.0, 130.7, 134.5, 158.5, 169.1. MS (ESI+): *m/z* (%): 234 (85) and 232 (100) $[M+H]^+$ .

**Synthesis of Methyl 3-(benzyloxy)-6-bromopicolinate (Compound 4).** To a solution of methyl 3-hydroxy-6-bromopicolinate **3** (11.6 g, 49.8 mmol), in acetone (200 mL, 0.25 M) was added successively $K_2CO_3$ (21 g, 149 mmol, 3 equiv) and benzyl bromide (12 mL, 100 mmol, 2.0 equiv). The heterogeneous reaction mixture was reflux overnight. Salts were removed by filtration and the crude product was concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (PE/EtOAc 95/5 to 60/40, v/v) afforded the desired product **4** as a white solid (15.2 g, 95%). *Rf* = 0.4 (PE/EtOAc 8/2, v/v). $^1H$ NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.97 (s, 3H), 5.21 (s, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.47-7.34 (m, 5H), 7.51 (d, *J* = 8.7 Hz,

1H). $^{13}C$ NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 52.9, 71.2, 125.0, 126.9, 128.4, 128.8, 131.2, 131.4, 135.2, 139.8, 154.0, 164.0. MS (ESI+): *m/z* (%): 324 (85) and 322 (100) $[M+H]^+$.

**Synthesis of Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-hydroxypent-1-ynyl)picolinate (Compound 5).** To a solution of methyl 3-(benzyloxy)-6-bromopicolinate **4** (3.19 g, 9.90 mmol) in DCM (66 mL) and TEA (33 mL) was added 4-pentyn-1-ol (650 µL, 9.93 mmol, 1 equiv). The resulting mixture was degassed for 20 min with argon. CuI (200 mg, 1.02 mmol, 0.1 equiv.) and $Pd(PPh_3)_4$ (527 mg, 0.50 mmol, 0.05 equiv.) were then poured and the solution was stirred under argon at rt overnight. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. Purification by flash chromatography (PE/EtOAc 7/3 to 3/7, v/v) afforded the desired product **5** as a yellow oil that crystallized upon standing (3.1 g, 96%). *Rf* = 0.33 (PE/EtOAc 3/7, v/v). $^1H$ NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 1.86 (qt, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.38 (br s, 1H), 2.54 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.78 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 5.20 (s, 2H), 7.30-7.45 (m, 7H). $^{13}C$ NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 15.9, 31.0, 52.7, 61.4, 70.9, 79.6, 89.8, 121.9, 127.0, 128.3, 128.8, 130.1, 135.4, 135.6, 140.0, 153.0, 164.9. MS (ESI+): *m/z* (%): 673 (100) $[2M + Na]^+$, 348 (95) $[M+Na]^+$ and 326 (100) $[M+H]^+$.

**Synthesis of Methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)pent-1-yn-1-yl)picolinate (Compound 6).** Methanesulfonyl chloride (1.6 mL, 20.45 mmol, 1.5 equiv.) was added dropwise to a solution of methyl 3-(benzyloxy)-6-(5-hydroxypent-1-ynyl)picolinate **5** (4.73 mg, 13.63 mmol) and TEA (5.6 mL, 40.89 mmol, 3 equiv) in dry $CH_2Cl_2$ (0.1 M) at 0 °C. The solution was stirred rt for 3 h, washed with brine, dried under

$MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. To a solution of the crude product in dry $CH_3CN$ (0.1 M) were added 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline hydrochloride (TIQ.HCl, 2.1 g, 1.5 equiv.) and $K_2CO_3$ (3.4 g, 3 equiv.). The mixture was refluxed overnight. The crude mixture was filtered, concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography on silica gel ($CH_2Cl_2$/MeOH, 100/0 to 95:5, v/v) to give the desired product **6** (2.86 g, 74%) as an orangeous oil. $R_f$ = 0.2 ($CH_2Cl_2$/MeOH 95/5). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 1.93 (qt, $J$ = 6.9 Hz, 2H), 2.51 (t, $J$ = 6.9 Hz, 2H), 2.63 (t, $J$ = 6.9 Hz, 2H), 2.72 (t, $J$ = 5.4 Hz, 2H), 2.83 (t, $J$ = 5.4 Hz, 2H), 3.57 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 5.19 (s, 2H), 6.53 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 7.25–7.45 (m, 7H).$^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 17.4, 26.0, 28.7, 51.0, 52.7, 55.7, 55.8, 55.9, 57.2, 70.7, 79.5, 90.1, 109.4, 112.3, 121.7, 126.2, 126.6, 126.9, 128.2, 128.7, 130.0, 135.4, 135.5, 139.9, 147.1, 147.4, 152.9, 164.8. MS (ESI$^+$): *m/z* (%): 501 (100) $[M+H]^+$.

**Synthesis of Methyl 6-(5-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate (Compound 7).** To a solution of **6** (2.5 g, 5 mmol) in Argon degassed MeOH (0.05 M) was added Pearlman's catalyst (500 mg, 20% Pd, moisture 50%). The solution was bubbled with $H_2$ and the reaction was stirred overnight at rt under $H_2$ atmosphere (1 atm). The mixture was filtrated through celite and concentrated under reduced pressure to give the desired product **7** as a orangeous oil that crystallized upon standing (2.07 g, 99%). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 10.59 (s, 1H), 7.30 (br s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 4.04 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.53 (s, 2H), 2.87 – 2.74 (m, 4H), 2.68 (t, $J$ = 5.7

Hz, 2H), 2.55 – 2.42 (m, 2H), 1.67 (m, 4H), 1.53 – 1.35 (m, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 169.8, 156.9, 153.6, 147.7, 147.3, 129.0, 128.5, 126.4, 124.9, 111.1, 109.2, 56.9, 55.7, 55.6, 54.4, 52.9, 50.1, 37.2, 29.6, 27.0, 26.8, 25.9. MS ($ESI^+$): *m/z* (%): 415 (100) $[M+H]^+$.

**Synthesis of 6-(5-(6,7-Dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde (Compound 8).** To an ice-bath cooled solution of methyl 6-(5-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinate **7** (2.07 g, 5.0 mmol, 1 equiv) in dry $CH_2Cl_2$ (0.05 M) were successively added dry triethylamine (1.6 mL, 11 mmol, 2.2 equiv.) and TBDMSOTf (1.3 mL, 5.5 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred at rt for 2 h under argon atmosphere. The organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. To a solution of the resulting residue in dry $CH_2Cl_2$ (0.05 M) at -78 °C, was added dropwise DIBAL-H (12.5 mL, 1 M in $CH_2Cl_2$, 12.5 mmol, 2.5 equiv.). Then, the reaction mixture was stirred at this temperature for 15 min. The reaction was quenched with MeOH (12.5 mL) and the mixture was allowed to warm at rt. The organic layer was washed with an aqueous solution of NaOH (1 M), dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. Then, TBAF (5.5 mL, 1.1 equiv., 1 M in THF) was added at 0 °C to the residue in dry THF (0.1 M) and the mixture was stirred for 30 min at 0-5 °C. After concentration under reduced pressure, a purification by flash chromatography on silica gel ($CH_2Cl_2$/MeOH 100:0 to 95:5, v/v) afforded **8** (1.29 g, 67%) as a yellow oil. *Rf* = 0.27 ($CH_2Cl_2$/MeOH, 95 :5). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 10.03 (br s, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 3.84 (d, *J* = 1.6 Hz, 6H), 3.59 (s, 2H),

2.95 – 2.67 (m, 6H), 2.63 – 2.41 (m, 2H), 1.90 – 1.57 (m, 4H), 1.46 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H). $^{13}$C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 198.5, 156.8, 154.7, 147.4, 147.1, 135.6, 129.6, 126.2, 126.1, 125.9, 111.2, 109.4, 77.1, 57.9, 55.8, 55.7, 55.5, 50.7, 37.1, 29.5, 28.3, 27.0, 26.8. MS (ESI+): *m/z* (%): 385 (100) $[M+H]^+$.

**Synthesis of 6-(5-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)pentyl)-3-hydroxy-2-pyridine aldoxime (3-HPA).** To a solution of aldehyde **8** (1.29 g, 3.35 mmol) in MeOH (stored on MS 3 Å, under argon, 0.1 M) were added successively $NH_2OH.HCl$ (245 mg, 3.52 mmol, 1.05 equiv.) and NaOAc (305 mg, 3.68 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred at rt under argon atmosphere until completion (3-4 h). After concentration under reduced pressure, the residue was purified by flash chromatography on silica gel (gradient $CH_2Cl_2$/MeOH, 98 :2 to 90 :10) to give the desired oxime 3-HPA as a white solid (976 mg, 73%). *Rf* = 0.2 ($CH_2Cl_2$/MeOH 95:5). $^1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) = 1.33–1.43 (m, 2H), 1.55–1.73 (m, 4H), 2.55–2.72 (m, 2H), 2.85–2.96 (m, 4H), 3.74 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 6.51 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.28 (s, 1H), 9.88 (br s, 1H). $^{13}$C NMR (75 MHz, CDCl3) δ (ppm) = 14.2, 22.7, 26.1, 26.9, 37.1, 50.3, 54.7, 55.8, 55.9, 57.3, 76.6, 109.3, 111.2, 123.8, 124.3, 125.1, 135.1, 147.5, 147.8, 152.4, 153.7, 160.6, 171.9. MS (ESI+): *m/z* (%): 400 (100) $[M+H]^+$. HRMS (ESI+): *m/z* calcd for $C_{22}H_{30}N_3O_4$ 400.2236; found: 400.2230. HPLC: $t_R$ = 19.15 min (purity = 97.83%).

**Preparation of 3-HPA-loaded SLNs and 2-PAM+3-HPA-loaded SLNs.** The multiple emulsion (w/o/w) method described by Pashirova et al.[13] was chosen for preparing SLNs. The

hydrophobic oxime 3-HPA (0.04 g) was melted in the lipid phase composed of lipid (Dynasan 114), 5 mL glycerol and Lipoid® S75). Temperature was 5-10°C above the melting point of lipid. Then the aqueous phase (1 ml) was added to the lipid phase composed of lipid (Dynasan 114), 5 mL glycerol, Lipoid® S75 and the hydrophobic oxime 3-HPA (0.04 g) at the same temperature and homogenized with high shear homogenizer (Ultra-Turrax®, IKA, T18, Germany) for 10 minutes, under stirring intensity of 10,000 rpm. The mixture was kept at constant temperature during homogenization. Then, this w/o emulsion was poured into a total weight (40g) of cooled solutions of surfactant (Tween® 80) under magnetic stirring (750 rpm) (Heidolph, Germany) for 20 min to allow the formation of SLNs. Briefly, for production of SLNs loading two oximes (hydrophilic oxime (2-PAM) and hydrophobic oxime 3-HPA) the same method was used by replacing the inner aqueous phase (1 ml), which was prepared by dissolving 2-PAM (0.04 g) in ultra-purified water. Dynasan 114 was selected as the solid lipid and Tween 80 as surfactant added to the external aqueous phase of the multiple emulsion.

**Characterization of SLNs.** The mean particle size, zeta potential and polydispersity index of SLNs were determined by dynamic light scattering (DLS) measurements, using the Malvern Instrument Zetasizer Nano (Worcestershire, UK). The measured autocorrelation functions were analyzed by Malvern DTS software, applying the second-order cumulant expansion methods. The effective hydrodynamic radius ($R_H$) was calculated according to the Einstein-Stokes equation $D=k_BT/6\pi\eta R_H$, in which D is the diffusion coefficient, $k_B$ the Boltzmann's

constant, $T$ the absolute temperature, and $\eta$ the viscosity. The diffusion coefficient was measured at least in triplicate for each sample. The average error of measurements was approximately 4%. All samples were diluted with ultra-purified water to suitable concentration and analyzed in triplicate.

**Encapsulation efficiency and loading capacity.** Encapsulation efficiency (*EE*, %) and loading capacity (*LC*, %) were assessed for samples containing 2-PAM. These parameters were determined indirectly by filtration/centrifugation technique, measuring free 2-PAM (non-encapsulated) by spectrophotometry. A volume of 0.5 mL of each 2-PAM+3-HPA-loaded SLNs was placed in centrifugal filter devices Ultracel 100K (100,000 MWCO, Amicon Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts) to separate lipid and aqueous phases and centrifuged at 10,000 rpm, for 15 minutes (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Free 2-PAM was quantified by measuring the absorbance using a Specord 250 Plus (Analytik Jena AG, Germany) at 294 nm (the molar extinction coefficient of 2-PAM at 294 nm is 11962 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ at pH = 7.4). Encapsulation efficiency (*EE*, %) and loading capacity (*LC*, %) were assessed for samples containing 3-HPA. These parameters were determined indirectly by centrifugation technique, measuring free 3-HPA (non-encapsulated) by spectrophotometry. A volume of 1 mL of each 3-HPA-loaded SLNs or 2-PAM+3-HPA-loaded SLNs were placed in 2 mL Eppendorf tube and was centrifuged (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) for 10 min at 5000 rpm to remove precipitated free 3-HPA compound. A volume of 0.2 mL of each ABH-loaded cationic liposomes was placed in new 2 mL Eppendorf tube and 1mL of dichloromethane was

added to each sample. Then extraction of 3-HPA was performed, using the Vortex shaker (Neutec F202A0176 Model ZX3 Advanced Vortex Mixer) at 4000 rpm for 10 min. The mixture (~1.2 mL) was centrifuged (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) for 6 min at 5000 rpm to separate the layers. The lower organic layer was transferred to a flask and evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen. 3-HPA extraction procedure was repeated 2 times. The residue was then reconstituted with 3 mL of dichloromethane. Loaded 3-HPA was quantified by UV absorbance using a Specord 250 Plus (Analytik Jena AG, Germany) at 315 nm (the extinction coefficient of 3-HPA at 315 nm is 8686 $M^{-1}{\cdot}cm^{-1}$ (Fig 3S, SI). The parameters were calculated against appropriate calibration curve, using the following equation[18]:

$$EE(\%) = \frac{\text{Total amount of oxime} - \text{Free oxime}}{\text{Total amount of oxime}} \times 100\% \qquad (2)$$

$$LC(\%) = \frac{\text{Total amount of oxime} - \text{Free oxime}}{\text{Total amount of oxime}} \times 100\% \qquad (3)$$

***In vitro* 2-PAM or 3-HPA release profile.** The release of 2-PAM or 3-HPA from SLNs was performed using the dialysis bag diffusion method. The dialysis bags retain SLNs and allow released 2-PAM or 3-HPA to diffuse into the medium. The bags were soaked in Milli-Q water for 12 h before use. 5 milliliters of SLNs were poured into the dialysis bag and the two ends of the bag were sealed with clamps. 50 mL methanol and 50 mL of 0.025 M sodium phosphate buffer pH 7.4were used as the receiving phase. The vessel was placed in a

thermostatic shaker (New Brunswick, USA), at 37ºC, under a stirring rate of 150 rpm. At predetermined time intervals, 1 mL samples were withdrawn, and analyzed by determining the absorbance at 294 nm for 2-PAM and at 315 nm for 3-HPA using a Specord 250 Plus (Analytik Jena AG, Germany). All samples were analyzed in triplicate.

**Pharmacokinetic and tissue distribution study.** All experiments involving animals were performed in accordance with the guidelines set forth by the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) and the protocol of experiments approved by the Animal Care and Use Committee of Kazan Federal University.

Wistar rats of both sexes were purchased from the Laboratory Animal Breeding Facility (Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Puschino, Moscow Region, Russia) and were allowed to acclimate to their environment in the vivarium for at least 1 week before experiments. Animals were kept in sawdust-lined plastic cages in a well-ventilated room at 20–22 °C in a 12-h light/dark cycle, 60–70% relative humidity and given *ad libitum* access to food and water.

The maximum recommended volume for *i.v.* administration into rats is 1-2 ml.[19] Proceeding from this maximum recommended volume, the dose of 5 mg/kg 2-PAM and/or 5 mg/kg 3-HPA was selected. Sample was slowly administered into the tail vein of rats weighing 200-250g.

Two groups of animals were set: 3-HPA solution (DMSO-water (50 w/w) or 3-HPA-SLNs or 2-PAM+3-HPA-SLNs, respectively at a dose of 5 mg/kg (~ 1 ml 0.1% w/w of 3-HPA) were injected in the tail vein of each group. At predetermined time intervals (5, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 and 300 min after injection), five rats at each time point from each group were deeply anesthetized by isoflurane inhalation until the tail-pinch reflex disappeared, and blood samples (1ml) were collected, placed into heparinized test tubes and centrifuged (at 12,000 rpm, 10 min, 4ºC) to get plasma. Thereafter, animals were quickly decapitated and tissue samples (whole brain) were immediately collected, washed with physiological saline (NaCl 0.9%) and dried with filter paper. Brain samples were weighed and homogenized with a nine-fold aliquot of saline (NaCl 0.9%) under ice bath. Tissue homogenates were processed similarly as plasma samples. Plasma and tissue samples were frozen and stored at -80°C until analysis.

**Assay of 3-HPA in plasma and brain tissue.** HPLC-MS was used to analyze 3-HPA in samples. Briefly, 100 µL plasma samples (or 500 µL brain homogenate) of were transferred into 2 mL Eppendorf tubes. A volume of 200 µL (or 1 ml in case brain homogenate) of dichloromethane was added to each sample and mixed, using a vortex shaker (Neutec F202A0176 Model ZX3 Advanced Vortex Mixer, VELP Scientifica, Italy) at 4,000 rpm for 10 min. Thereafter, the mixture was centrifuged (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) for 6 min at 5,000 rpm to separate the layers. The lower organic layer was transferred to a flask and evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen. 3-HPA extraction procedure was

repeated 2 times. The residue was then reconstituted with 1mL of dichloromethane, and centrifuged at 12,000 rpm for 5 min.

An aliquot (100 μL) of the clear supernatant was diluted in methanol and water (70:30, v/v). A system from the Agilent HPLC 1200 series (Agilent Technologies, USA) equipped with binary pump, vacuum degasser and autosampler was used to inject the samples. Aliquots of 10 μL were run using isocratic mobile phase consisting of methanol and water (70:30, v/v) pumped at a constant flow rate of 0.3 mL/min.

Quantitation was achieved by MS-MS detection in positive mode using AmazonX (Bruker Daltonik GmbH, Germany) mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The optimized operational parameters for MS analysis were –4500 V as the voltage on the capillary and 10 L/min the flux of nitrogen as a drying gas (250°C). Detection of ions was performed in the multiple reaction monitoring (MRM) mode, the transition pair of 3-HPA at the m/z 400 precursor ion to the m/z 382 product ion (Fig. 5).

The analytical data were processed using the Bruker Daltonics software. Calibration curves were acquired by plotting the peak area of the transition pair of analyte against the nominal concentration of 3-HPA calibration standards in plasma (or brain homogenate). The concentrations used were 5, 10, 20, 50, 80 ng/mL. The calibration curve was linear over the concentration range of 5-100 ng/mL of 3-HPA in both rat plasma and in brain homogenate (Fig. 5d).

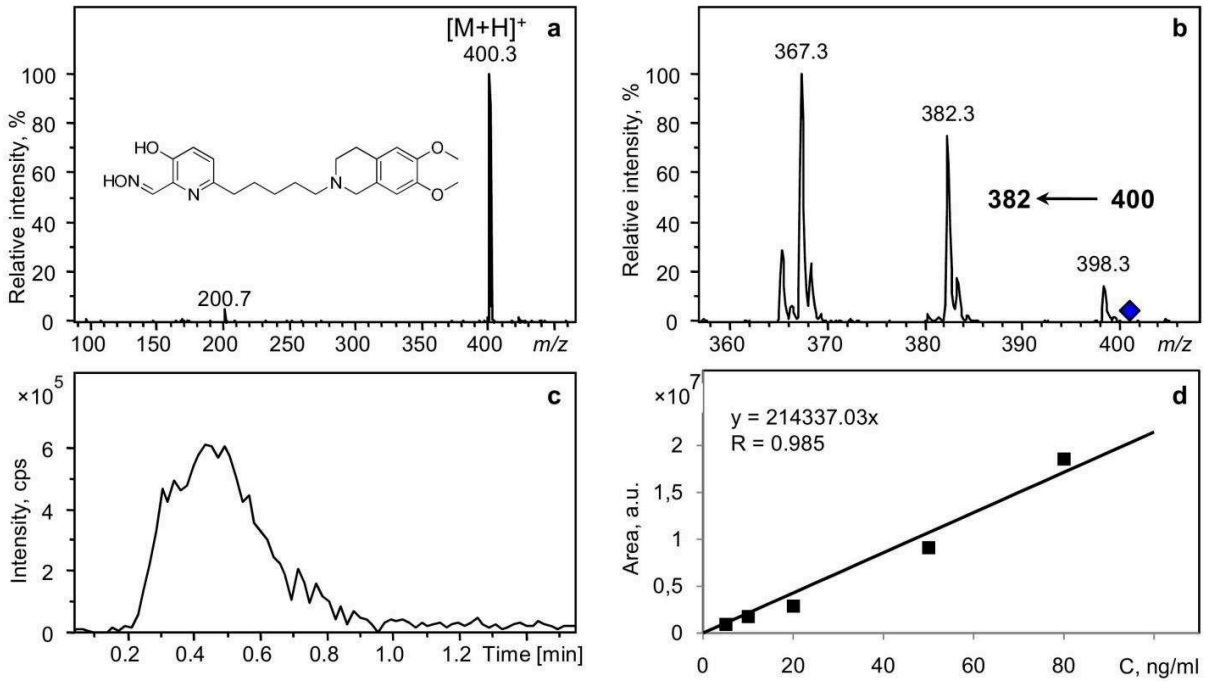



**Figure 5.** Full scan mass (a) and product ion (b) mass spectra of 3-HPA in positive ionization mode. Typical MRM chromatogram of 3-HPA (c). Calibration curve of 3-HPA in brain homogenate(d).

**Measurement of brain AChE inhibition and reactivation level.** For brain AChE inhibition assays, rats were poisoned by 0.8×$LD_{50}$ of POX (600 μg/kg, *i.p.*). Whole brains were collected 1 h or 2 h after POX administration and frozen in liquid nitrogen. Whole brains of control group of rats were collected 1h or 2hrs after intraperitoneal (*i.p.*) injection of physiological saline. Thereafter, AChE activity of brain homogenates was analyzed. The mean brain AChE activity of poisoned animals (5 rats per group) was compared with mean brain AChE activity of control group (5 rats).

For *in vivo* brain AChE reactivation assay, 1 h after poisoning by 0.8×$LD_{50}$ of POX, rats were *i.v.* injected 3-HPA-loaded SLNs, 3-HPA solution (DMSO-water (50 w/w) and 2-PAM+3-HPA-loaded SLNs at the same dose of 3-HPA (5 mg/kg) 2-PAM (5 mg/kg). Whole brains were then collected 1h after administration of free 3-HPA or 2-PAM+HPA-SLNs or 3-HPA-SLNs and frozen in liquid nitrogen. The mean activity of brain AChE after injection of free 3-HPA or 3-HPA-loaded-SLNs or 2-PAM+3-HPA-SLNs were compared to the mean brain AChE activity of poisoned group.

Whole brains homogenates were prepared in a Potter homogenizer with 0.05 M Tris-HCl, 1 % Triton X-100, 1 M NaCl, 2 mM EDTA; pH 7.0 (1 volume of brain for 2 volumes of buffer) at 4°C. The homogenates were centrifuged (10,000 rev/min, at 4°C) for 10 minutes using Eppendorf 5430R centrifuge with FA-45-30-11 rotor (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

For AChE activity assay, 50µl supernatant was incubated with 5µl of tetra-isopropyl pyrophosphoramide (iso-OMPA) – as a butyrylcholinesterase specific irreversible inhibitor - in final concentration 0.1 mM, for 30 minutes. Then, AChE-catalyzed hydrolysis reaction of substrate was started by adding of 10 µl of acetylthiocholine iodide (final concentration 1 mM). After 10, 20 or 30 min of hydrolysis at 25°C, reactions were stopped by adding the carbamylating agent neostigmine (0.1 mM). Samples were diluted in 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) and DTNB (0.1 mM) was added. AChE activity was measured according to the Ellman method[20] by determining the production of yellow 5-thio-2-nitro-benzoate

anion, resulting from reduction of DTNB by thiocholine (the product of substrate hydrolysis) at 412 nm by spectrophotometry (PerkinElmer λ25). The amount of thiocholine produced during 20 min (10th–30th min) was calculated. Sample without substrate was used as a blank. Three samples of each brain homogenate were measured independently. AChE activity was expressed in relation to the amount of total protein, which was determined by the Bradford method.[21] Data were analyzed using Origin 8 and expressed as the mean ± SEM. Two group comparisons were performed using Mann-Whitney test. $P < 0.05$ were considered statistically significant.

## ASSOCIATED CONTENT

**Supporting Information**. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org

## AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Lucia Ya. Zakharova, Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Arbuzov St. 8, Kazan, 420088, Russian Federation, tel: (007) 843 273 22 93, fax: (007) 843 273 22 53, E-mail: lucia@iopc.ru

Tatiana N. Pashirova, Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan

Scientific Center of RAS, Arbuzov str. 8, Kazan, 420088, Russian Federation, tel: (007) 843 273 22 93, fax: (007) 843 273 22 53, E-mail: tatyana_pashirova@mail.ru

Author Contributions

Tatiana N. Pashirova developed preparation and characterization of SLN and performed *in vitro* drug release experiment; Irina V. Zueva and Konstantin A. Petrov performed biochemical experiments; Vasily M. Babaev and Ildar Kh. Rizvanov developed the technique of assay of 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime in plasma and brain tissue by the HPLC-MS and analyze data obtained performed the experimental work on mass spectrometer equipped; Evgenia A. Burilova and Darya A. Samarkina performed extraction experiment for plasma and brain tissue; Anissa Braïki synthesized oxime 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime and characterized properties of this oxime; Pierre-Yves Renardand and Ludovic Jean proposed the idea of synthesis of oxime 3-hydroxy-2-pyridine aldoxime and controlled it; Eliana B. Souto controlled the synthesis of SLNs; Lucia Ya. Zakharova proposed the idea of physico-chemical part of the work and controlled it; Patrick Masson designed experiment; Oleg G. Sinyashin proposed the idea of the whole work.

Conflict of interests

None

ACKNOWLEDGMENT

The work was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 14-50-00014 to Tatiana N. Pashirova, Irina V. Zueva, Konstantin A. Petrov, Lucia Ya. Zakharova, Oleg G. Sinyashin

ABBREVIATIONS

AChE, acetylcholinesterase; BBB, blood brain barrier; OP, organophosphorus agent; BChE, butyrylcholinesterase; 2-PAM, Pralidoxime chloride; SLN, solid lipid nanoparticle; SNC, central nervous system.

REFERENCES

(1) Hartshorn, C. M.; Bradbury, M. S.; Lanza, G. M.; Nel, A. E.; Rao, J.; Wang, A. Z.; Wiesner, U. B.; Yang, L.; Grodzinski, P. Nanotechnology Strategies To Advance Outcomes in Clinical Cancer Care. *ACS Nano*. **2018,** 12(1), 24-43. DOI:10.1021/acsnano.7b05108.

(2) Fan, W.; Yung, B.; Huang, P.; Chen, X. Nanotechnology for Multimodal Synergistic Cancer Therapy. *Chem. Rev.* **2017**, *117 (22)*, 13566–13638. DOI:10.1021/acs.chemrev.7b00258.

(3) Huang, M.; Hu, M.; Song, Q.; Song, H.; Huang, J.; Gu, X.; Wang, X.; Chen, J.; Kang, T.; Feng, X.; Jiang, D.; Zheng, G.; Chen, H.; Gao, X. GM1-Modified Lipoprotein-like Nanoparticle: Multifunctional Nanoplatform for the Combination Therapy of Alzheimer's Disease. *ACS Nano*. **2015**, *9(11)*, 10801-10816. DOI:10.1021/acsnano.5b03124.

(4) Gadde, S. Multi-Drug Delivery Nanocarriers for Combination Therapy. *Med. Chem. Commun*. **2015**, *6*, 1916-1929. DOI: 10.1039/C5MD00365B.

(5) Gupta, R. C. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents, 2nd ed; Academic Press-Elsevier: Amsterdam, 2015.

(6) Worek, F.; Jenner, J.; Thiermann, H. Chemical Warfare Toxicology: Management of Poisoning; Royal Chemical Society: Abington, UK, 2016.

(7) Masson, P. Novel Approaches in Prophylaxis/Pretreatment and Treatment of Organophosphorus Poisoning. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2016**, *191*, 1433–1443. DOI:10.1080/10426507.2016.1211652

(8) Clement, J. G.; Shiloff, J. D.; Gennings, C. Efficacy of a Combination of Acetylcholinesterase Reactivators, HI-6 and Obidoxime, Against Tabun and Soman Poisoning of Mice. *Arch Toxicol*. **1987**, *61(1)*, 70-75. DOI:10.1007/BF00324551

(9) Worek, F.; Aurbek, N.; Thiermann, H. Reactivation of Organophosphate-Inhibited Human AChE by Combinations of Obidoxime and HI 6 *In Vitro*. *J Appl. Toxicol.* **2007,** *27(6)*, 582-588. DOI:10.1002/jat.1241

(10) Kassa, J.; Musilek, K.; Karasova, J. Z.; Kuca, K.; Bajgar, J. Two Possibilities How to Increase the Efficacy of Antidotal Treatment of Nerve Agent Poisonings. *Mini Rev Med Chem*. **2012**, *12(1)*, 24-34. DOI:10.2174/138955712798869011

(11) Vilela, S.; Salcedo-Abraira, P.; Colinet, I.; Salles, F.; de Koning, M.; Joosen, M.; Serre, C.; Horcajada, P. Nanometric MIL-125-NH2 Metal–Organic Framework as a Potential Nerve Agent Antidote Carrier. *Nanomaterials*. **2017**, *7 (12)*, E321. DOI:10.3390/nano7100321

(12) Yang, J.; Fan, L.; Wang, F.; Luo, Y.; Sui, X.; Li, W.; Zhang, X.; Wang, Y. Rapid-Releasing of HI-6 Via Brain-Targeted Mesoporous Silica Nanoparticles for Nerve Agent Detoxification. Nanoscale. **2016**, *8*, 9537–9547. DOI:10.1039/C5NR06658A.

(13) Pashirova, T. N.; Zueva, I. V.; Petrov, K. A.; Babaev, V. M.; Lukashenko, S. S.; Rizvanov, I. K.; Souto, E. B.; Nikolsky, E. E.; Zakharova, L. Y.; Masson, P.; Sinyashin, O. G. Nanoparticle-Delivered 2-PAM for Rat Brain Protection against Paraoxon Central Toxicity. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **2017**, 9, 16922-16932. DOI:10.1021/acsami.7b04163.

(14) Zorbaz, T.; Braïki, A.; Maraković, N.; Renou, J.; de la Mora, E.; Maček Hrvat, N.; Katalinić, M.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Mercey, G.; Gomez, C.; Mougeot, R.; Pérez, B.; Baati, R.; Nachon, F.; Weik, M.; Jean, L.; Kovarik, Z.; Renard: P.-Y. Potent 3-hydroxy-2-pyridine Aldoxime Reactivators of Organophosphate-Inhibited Cholinesterases with Predicted Bloodbrain Barrier Penetration, *Chem. Eur. J.*, **2018**, In press. DOI:10.1002/chem.201801394.

(15) Müller, R. H.; Alexiev, U.; Sinambela, P.; Keck, C. M. Nanostructured Lipid Carriers (NLC): The Second Generation of Solid Lipid Nanoparticles In Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Nanocarriers; Dragicevic, N.; Maibach, H. I., Eds.; Springer: Berlin, **2016**; Chapter 11, pp 161–185. DOI:10.1007/978-3-662-47862-2_11.

(16) Doktorovová, S.; Kovačević, A. B.; Garcia, M. L.; Souto, E. B. Preclinical Safety of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Current Evidence from *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. **2016**, *108*, 235–252. DOI:10.1016/j.ejpb.2016.08.001.

(17) Fangueiro, J. F.; Andreani, T.; Fernandes, L.; Garcia, M. L.; Egea, M. A.; Silva, A. M.; Souto, E. B. Physicochemical Characterization of Epigallocatechin Gallate Lipid

Nanoparticles (EGCG-LNs) for Ocular Instillation. *Colloids Surf., B* **2014**, *123*, 452–60. DOI:10.1016/j.colsurfb.2014.09.042.

(18) Souto, E. B.; Almeida, A. J.; Müller, R. H. Lipid Nanoparticles (SLN®, NLC®) for Cutaneous Drug Delivery: Structure, Protection & Skin Effects. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2007**, *3*, 317-331. DOI: 10.1166/jbn.2007.049

(19) Nebendahl, K. Routes of Administration. In The Laboratory Rat; Krinke, G. J., Ed.; Academic Press: London, 2000; pp 463–483.

(20) Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V., Jr.; Feather-Stone, R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. Biochem. Pharmacol. 1961, 7, 88–95. DOI:10.1016/0006-2952(61)90145-9.

(21) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 1976, 72, 248–254. DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

## RESUME

Les neurotoxiques organophosphorés (NOPs) sont des inhibiteurs irréversibles de l'acétylcholinestérase, une enzyme jouant un rôle clé dans la transmission de l'influx nerveux. Une intoxication par ces substances provoque de graves symptômes pouvant aboutir au décès des sujets empoisonnés. Bien qu'interdits par une convention internationale ratifiée par 190 pays, le contexte géopolitique actuel ravive la hantise d'une menace chimique contre des populations civiles, renouvelant l'intérêt de développer de nouveaux remèdes contre une intoxication aux NOP. A l'heure actuelle, les antidotes utilisés contre ces intoxications sont les mono- et bis- pyridinium aldoximes portant une ou deux charge(s) positive(s) permanente(s), qui présentent de nombreuses limitations, dont leur très faible capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique et à réactiver efficacement les AChEs inhibées par les NOP dans le système nerveux central (SNC). Par ailleurs, leur efficacité est très dépendante de la nature du NOP utilisé, et il n'existe pas, aujourd'hui, de réactivateur universel. Dans ce contexte, le développement de nouveaux réactivateurs efficaces est un réel défit.

Au cours de cette thèse, l'optimisation de la synthèse de cinq réactivateurs non chargés incorporant une amine cyclique en tant que ligand du site périphérique et la 3-hydroxypyridine aldoxime en tant que fonction réactivatrice a été développée pour évaluation *in vivo*. Dans cette continuité, vingt-et-un réactivateurs non chargés inédits comportant un ligand aminé du site périphérique de l'enzyme associée à la même fonction réactivatrice 3-hydroxypyridine aldoxime ont été conçus, synthétisés et testés sur l'AChE humaine inhibée par différents NOPs mais aussi sur les récepteurs nicotiniques. Certains d'entre eux ont été testés *in vivo* sur la souris. Parmi les réactivateurs synthétisés, certains possèdent des efficacités de réactivation identiques voire meilleures que les oximes de référence utilisées de nos jours tout en ayant un effet antagoniste des récepteurs nicotiniques ouvrant ainsi la voie aux réactivateurs dits « Multi-cibles ». Avec comme objectif de traverser la barrière hémato-encéphalique en utilisant les transporteurs GLUTs présents sur les cellules endothéliales constituant cette barrière, quatre réactivateurs incorporant un motif carbohydrate ont été resynthétisés et évalués *in vivo* et *in vitro*. Enfin, de nouvelles fonctions réactivatrices constituées d'un motif thiadiazole- aldoxime et naphtaldoxime ont été étudiées ouvrant la voie à de nouvelles familles de réactivateurs et, pour la dernière fonction, remettant en cause le cahier des charges utilisé jusqu'alors pour la conception de nouveaux réactivateurs.



***Mots clefs :*** Oxime, réactivateurs non chargés, Cholinestérase, neurotoxiques organophosphorés, antidote, carbohydrate, hétérocycles.


---


## SUMMARY

Organophosphorus nerve agents (OPNA) are irreversible acetylcholinesterase (AChE) inhibitors, a key enzyme in the central nervous system playing a pivotal role in neurotransmission. OPNA poisoning induces to serious symptoms that can lead to death by respiratory failure. Despite an international convention prohibiting the use of chemical weapons, the current geopolitical context is reviving the fear of a chemical threat against civilian populations, and has renewed the interest of developing new remedies for OPNA poisoning. Nowadays, medical countermeasure used against OPNA intoxications are based on mono- and bis-pyridinium aldoximes carrying one or two permanent positive charge(s), which present many limitations, including their very low capacity to cross the blood-brain barrier and to reactivate effectively ChEs inhibited by NOPs in the central nervous system (CNS). Moreover, their effectiveness is highly dependent on the nature of the NOP used, therefore, there is no universal reactivator. In this context, the development of new effective reactivators is a real challenge.

In this PhD, an optimized synthetic access to five uncharged reactivators incorporating a cyclic amine as peripheral site ligand and 3-hydroxypyridine aldoxime as reactivating function was developed for *in vivo* evaluation. Following up on this, twenty-one new uncharged reactivators bearing unprecedented cyclic amines as peripheral site ligand associated with our reactivating function were designed, synthetized and evaluated for reactivation on human AChE inhibited by several NOPs but also *in vivo* on mice and as antagonists on nicotinic receptors *in vitro*. Among these reactivators, some have identical or better reactivation efficiencies than the reference oximes used today while having a nicotinic receptor antagonist effect; thus, paving the way for "Multi-target" reactivators. Aiming at an active BBB crossing using the GLUTs receptors, four reactivators including a carbohydrate moiety have been resynthesized and biologically evaluated. Last but not least, new reactivator functions consisting of a thiadiazole-aldoxime and naphtaldoxime moieties have been studied, paving the way to new families of uncharged reactivators and, especially for the last function, calling into question design specifications of new reactivators.



***Key words :*** Oxime, uncharged reactivators, Cholinesterase, organophophorus nerve agents, antidote, carbohydrate, heterocycles.