UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

Centre d'Étude des Pathologies Respiratoires (CEPR) - Inserm U1100
Équipe 2 : "Mécanismes protéolytiques dans l'inflammation"

THÈSE présentée par :

Camille BLOUET

soutenue le : **15 Décembre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Tours**
Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé / Chimie Thérapeutique

DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX INHIBITEURS MACROCYCLIQUES DES KINASES PIM-1/2, A POTENTIEL ANTI-LEUCEMIQUE

THÈSE dirigée par :

Mme DENEVAULT-SABOURIN Caroline	Maître de Conférences - HDR, Université de Tours

RAPPORTEURS :

M MARCHAND Pascal	Professeur des Universités, Université de Nantes
M PROVOT Olivier	Maître de Conférences, Université Paris-Saclay

PRESIDENT DU JURY :

M BONNET Pascal	Professeur des Universités, Université d'Orléans

---

JURY : ***(directeurs, rapporteurs, examinateurs)***

M MARCHAND Pascal	Professeur des Universités, Université de Nantes
M PROVOT Olivier	Maître de Conférences - HDR, Université Paris-Saclay
Mme PATINEC Véronique	Maître de Conférences - HDR, Université de Brest
M BONNET Pascal	Professeur des Universités, Université d'Orléans
Mme DENEVAULT-SABOURIN Caroline	Maître de Conférences - HDR, Université de Tours
Mme VIAUD-MASSUARD Marie-Claude	Professeur des Universités, Université de Tours

CAMILLE BLOUET

DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX INHIBITEURS MACROCYCLIQUES DES KINASES PIM-1/2, A POTENTIEL ANTI-LEUCEMIQUE

Remerciements

Les travaux de cette thèse ont tout d'abord été réalisés au sein de l'équipe IMT (Innovation Moléculaire et Thérapeutique appartenant à l'unité EA7501 GICC) dirigée par le Professeur Marie-Claude Viaud-Massuard, qui depuis janvier 2023, a rejoint l'équipe 2 (« mécanisme protéolytique dans l'inflammation ») du CEPR (Centre d'Etudes des Pathologie Respiratoires – U1100), dirigé par M. Mustapha Si-Tahar.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Marie-Claude Viaud-Massuard puis M. Mustapha Si-Tahar, qui m'ont tous les deux donné l'opportunité de travailler dans leurs laboratoires ainsi que le Docteur Caroline Denevault-Sabourin pour son encadrement.

Je remercie sincèrement les membres du jury pour leur participation dans la validation de ces travaux de thèse. Merci au Professeur Pascal Marchand et au Docteur Olivier Provot d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Merci également au Professeur Pascal Bonnet, au Docteur Véronique Patinec, au Professeur Marie-Claude Viaud-Massuard d'avoir accepté de l'examiner.

Je remercie l'ensemble des partenaires biologistes de Bordeaux et de Roscoff qui ont réalisé les évaluations de nos composés. Je remercie également nos collaborateurs en modélisation moléculaire de Nantes et d'Orléans pour les études *in silico*. Merci également au Docteur Cyril Colas et à M. Frédéric Montigny pour les analyses HRMS de nos composés.

Je tiens à remercier particulièrement le Docteur Damien Hedou, même si nous n'avons travaillé ensemble que pendant 6 mois, je le remercie pour ses nombreux conseils et le partage de ses nombreuses connaissances tant pratiques que théoriques.

Je tiens à dire un grand merci à « la team déménagement » ! Merci à Cécile Croix et Stéphanie Letast, pour votre gentillesse et pour avoir fait votre maximum pour que nos projets avancent le plus vite possible. Je tiens surtout à remercier Etienne Auvert avec qui j'ai commencé cette thèse et Benjamin Victoir qui nous a rejoint en cours de route pour former « El trio del labo ». Merci pour la bonne humeur, les discussions scientifiques (et pas que) et les fous rires.

Je tiens enfin à remercier toute ma famille pour m'avoir soutenu et permis d'en arriver jusque-là.

CV

- Publications
  - **Blouet, C**.; Letast, S.; Robert, T.; Bach, S.; Pinaud, N.; Joubert, N.; Viaud-Massuard, M.-C.; Guillon, J.; Logé, C.; Denevault-Sabourin, C. Potassium 6-Oxo-7,13,16,22-tetraazatetracyclo[12.6.2.1^{8,12}.0^{17,21}]tricosa-1(20),8(23),9,11,14,16,18,21-octaen-2-yne-15-carboxylate. **Molbank**, 2023, M1735.
  - 2 en cours de rédaction : 1 article dans **MDPI Molecules,** 1 article dans **ACS MedChem letters.**
- Communications orales
  - **CO1 Blouet, C.**; Brachet-Botineau, M.; Aci-Sèche, S.; Peyrat, G. ; Bonnet, P.; Robert, T.; Bach, S.; Gouilleux, F.; Viaud-Massuard, M.-C.; Denevault-Sabourin, C. Targeting Pim kinases in leukemia: development of new macrocyclic pan-Pim inhibitors**,** ***Journée des doctorants de l'EA 7501 GICC***, Tours, 15 janvier **2021**.
  - **CO1 Blouet, C.**; Peyrat, G; Robert, T.; Bach, S.; Gouilleux, F.; Bonnet, P.; Viaud-Massuard, M.-C.; Aci-Sèche, S., Denevault-Sabourin, C. Targeting Pim kinases in leukemia: development of new macrocyclic pan-Pim inhibitors, **Labex SynOrg - Séminaire Scientifique,** Forges-les-Eaux, 13-14 octobre, **2022**.
- Communications par affiche
  - **P1 Blouet, C.**; Peyrat, G; Robert, T.; Bach, S.; Gouilleux, F.; Bonnet, P.; Viaud-Massuard, M.-C.; Aci-Sèche, S., Denevault-Sabourin, C. Targeting Pim kinases in leukemia : development of new macrocyclic pan-pim inhibitors, ***XXIX^{èmes} Journées Jeunes Chercheurs***, SCT, Nantes, 4-8 juillet **2022**.
  - **P2 Blouet, C.**; Peyrat, G; Robert, T.; Bach, S.; Desplat, V; Guillon, J.; Bonnet, P.; Viaud-Massuard, M.-C.; Aci-Sèche, S., Denevault-Sabourin, C. Development of new macrocyclic inhibitors of Pim-1/2 kinases, with antileukemic potential, ***Biotechnocentre***, Nouan-le-Fuselier, 20 et 21 octobre **2023.**

- Prix
  - Prix du meilleur poster, *XXIX*^{èmes} Journées jeunes chercheurs **2022**, Prix de la SCT, Nantes.
- Enseignements
  - 32 heures TP/TD : modèles moléculaires avec les étudiants de L1 Sciences de la vie, UFR de Sciences et Techniques, Tours.
- Formations de l'école doctorale
  - Monde de l'entreprise : construire son projet et valoriser son parcours (16 juin 2021 - 18 juin 2021) : 17 h
  - Propriété intellectuelle - Domaine SST (17 mars 2023) : 3 h
  - Module Enseignement (Novembre 2020 – mars 2023) : 43 h
  - Trouver l'information pertinente en sciences et techniques (04 mai 2022) : 6 h

Résumé

Les kinases Pim (Pim-1, 2 et 3) sont des sérine/thréonine kinases codées par un proto-oncogène, surexprimées dans une grande variété de cancers hématopoïétiques, notamment dans les leucémies myéloïdes aiguës et chroniques, et considérées comme des cibles d'intérêt en cancérologie. Par ailleurs, elles possèdent des caractéristiques structurales singulières par rapport aux autres kinases, pouvant être exploitées pour concevoir des inhibiteurs sélectifs. Des travaux préliminaires nous ont permis d'identifier une nouvelle quinoxaline chef de file capable d'inhiber l'activité enzymatique de Pim-1 et de Pim-2 au submicromolaire (CI_{50} de 130 et 170 nM sur Pim-1 et Pim-2, respectivement). L'objectif de ce projet de thèse était de développer de nouveaux inhibiteurs macrocycliques des kinases Pim, dérivés de la quinoxaline chef de file, possédant une activité cellulaire optimisée et un bon profil de sélectivité, en utilisant une approche de conception assistée par ordinateur. Au terme de ce travail, 10 macrocycles ont été développés dont 6 possédant une activité anti – Pim-1/2 submicromolaire comparable à celles de la quinoxaline chef de file et du composé de référence SGI-1776. Parmi ces 6 macrocycles, 4 d'entre eux ont montré un profil de sélectivité largement amélioré (CI_{50} > 10 µM) sur un petit panel de kinases de mammifères *off-target*. La stratégie de macrocyclisation utilisée dans cette thèse a donc permis d'améliorer le profil de sélectivité des inhibiteurs. Elle n'a en revanche pas permis d'optimiser leur activité *in vitro* sur lignée cellulaire leucémique humaine.

Abstract

Pim kinases (Pim-1, 2 et 3) are proto-oncogene-encoded serine/threonine kinases, over-expressed in a large range of hematopoietic malignancies, particularly in acute and chronic myeloid leukemias, and considered as relevant targets for cancer therapy. Moreover, they possess unique structural features in comparison to other kinases, providing an opportunity for the design of selective inhibitors. Preliminary studies allowed us to identify a new quinoxaline lead compound, able to block Pim-1 and Pim-2 enzymatic activity at submicromolar concentrations (IC_{50} of 130 and 170 nM on Pim-1 and Pim-2, respectively). The aim of this PhD project was to use a computer-based drug design approach to develop new macrocyclic Pim kinases

inhibitors, derived from the quinoxaline lead compound, with an improved cellular potency and a good selectivity profile. At the end of this work, 10 macrocycles were developed and 6 of them showed anti- Pim-1/2 submicromolar activity, comparable to the quinoxaline lead compound and to the SGI-1776 reference activities. Four of these 6 macrocycles showed an improve selectivity profile (IC_{50} > 10 µM for the 6 *off-target mammalian* kinases tested). The macrocyclization used in this thesis has therefore improved the inhibitors selectivity profile. However, it did not optimize their *in vitro* activity on human leukemia cell lines.

Liste des abréviations

δ	Déplacement chimique
HRMS	*High-resolution mass spectrometry*
µL	Microlitre (s)
mL	Millilitre (s)
mmol	Millimole (s)
MP	*Melting point*
MTS	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium
µM	Micromole (s) par litre
nM	Nanomole par litre
A	
ABC	*ATP-binding cassette*
Ac. citrique	Acide citrique
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADMET	Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Toxicité
ADP	Adénosine diphosphate
Asp186	Acide aspartique 186
ATP	Adénosine triphosphate
B	
BAD	*Bcl-2-associated death promoter*
Bcl	*B-cell lymphoma*
Boc_2O	Dicarbonate de di-*tert*-butyle
Brett-phos	2-(Dicyclohexylphosphino)-3,6-diméthoxy-2′,4′,6′-triisopropyl-1,1′-biphényl
C	
Cat.	*Catalyseur*
Cdc25a	*Cell Division Cycle 25 homolog A; M-phase inducer phosphatase 1*
Cdc25c	*Cell Division Cycle 25 homolog C; M-phase inducer phosphatase 13*
CDK	*Cyclin-Dépendent Kinases*
CE_{50}	Concentration effectrice 50 %
CI_{50}	Concentration inhibitrice 50 %
c-TAK	*Cdc25c associated protein kinase*
D	
d	Doublet
DCM	Dichlorométhane
dd	Doublet de doublet
ddd	Doublet de doublet de doublet
DIPEA	*N*,*N*-diisopropyléthylamine
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	*N*,*N*-diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMSO-d_6	Diméthylsulfoxyde deutéré
dt	Doublet de triplet
E	
EtOH	Ethanol
Et_3N	Tréthylamine
F	
FLT3-ITD	*FMS-like tyrosine kinase 3 - internal tandem duplication*
Fmoc	fluorénylméthoxycarbonyle

G

Glu121	Glutamate 121

H

HATU	Hexafluorophosphate de-*N*,*N*-diméthylméthaniminium

J

J	Constante de couplage
JAK	*Janus Kinase*

K

K_2CO_3	Carbonate de potassium

L

LiHMDS	Lithium bis(triméthylsilyl)amide
LMA	Leucémie Myéloïde Aigüe
Lys67	Lysine 67

M

MeOH	Méthanol
$MgCl_2$	Chlorure de magnésium
MeCN	Acétonitrile
$MgSO_4$	Sulfate de magnésium
MW	*Microwaves*

N

NaOH	Hydroxyde de sodium

P

P21	Protéine 21
P27	Protéine 27
Pd/C	Palladium sur charbon
$PdCl_2(PPH_3)_3$	Dichlorobis(triphénylphosphine)palladium(**II**)
$Pd_2(dba)_3$	Tris(dibenzylideneacétone)dipalladium (0)
$Pd(OAC)_2$	Acétate de palladium (II)
$Pd(PPH_3)_4$	Palladium-tétrakis(triphénylphosphine)
pH	Potentiel hydrogène
Pim	*Provirus Integration site for Moloney leukemia virus*
$POCl_3$	Oxychlorure de phosphore
Pro	Proline

Q

q	Quadruplet
Quant.	Quantitatif

S

s	Singulet
SOCS	*Suppressor of Cytokine Signalling*
SN_{ar}	Substitution nucléophile aromatique
STAT	*Signal Transducers and Activators of Transcription*

T

t	Triplet
TBAF	Fluorure de tétra-*n*-butylammonium
TBDMSCl	Chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane

X

X-phos	2-Dicyclohéxylphosphino-2',4',6'-triisopropylbiphényl
Xant-phos	4,5-bis(diphénylphosphino)-9,9-diméthylxanthène

Sommaire

AVANT PROPOS ***1***

INTRODUCTION ***3***

I. Les kinases Pim 3

A. Généralités sur les kinases 3

B. Les kinases Pim 4

C. Les kinases Pim en cancérologie 6

1. Exemples de mécanismes induisant la surexpression des kinases Pim 6
2. Conséquences de la surexpression des kinases Pim au sein des cellules cancéreuses 8
3. Kinases Pim et chimiorésistance 10

D. Structure des kinases Pim 11

1. Structure de Pim-1 12
2. Caractéristiques des kinases Pim par rapport aux autres kinases : 12
3. Structure de Pim-2 13

E. Inhibiteurs de Pim en cours de développement 14

1. Imidazo[1,2-*b*]pyridazines 15
2. Thiazolidine-2,4-dione 16
3. 5-Fluoropicolinamides 16
4. Benzo[*d*]imidazole 17
5. Diaminopyrazole 18

OBJECTIFS ***19***

I. Contexte de la recherche 19

A. Kinases Pim et Leucémies 19

B. Travaux antérieurs 20

II. Objectifs de la thèse 23

A. Intérêt des macrocycles en pharmacochimie 23

1. Amélioration de l'activité sur la cible 24
2. Amélioration de la sélectivité 24
3. Modulation de la perméabilité 26
4. Originalité structurale 26
5. Quelques exemples d'inhibiteurs macrocycliques pan-Pim 27

B. Pharmacomodulations envisagées 27

1. Approche 1 : conception guidée par le docking 28
2. Approche 2 : conception par criblage de fragments (*Fragment-based drug design (FBDD)*) 31

C. Conclusion 35

ETUDE CHIMIQUE 36

I. Aperçu bibliographique 36

A. Formation du noyau quinoxaline 36

1. Les réactions de condensation 37
2. La réaction de Schmidt 39
3. La condensation oxydante 41
4. La déshydrogénation oxydante 42

B. Fermeture de cycle par macrocyclisation 42

1. Fermeture par réaction de métathèse 44
2. Fermeture par réaction de substitution nucléophile 45
3. Fermeture de cycle par réaction pallado-catalysée 46

II. Travaux réalisés 48

A. Accès aux synthons intermédiaires 48

1. Accès au noyau 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 49
2. Accès aux 3-chloroquinoxaline-2-carboxylates d'éthyle 54

B. Approche 1 56

1. Macrocycle possédant un lien amidique 57
2. Macrocycles possédant un lien aminé 73

C. Approche 2 97

1. Synthèse du macrocycle simplifié de l'approche 2 97
2. Synthèse du macrocycle cible de l'approche 2 et de son analogue simplifié non *N*-méthylé 107

D. Conclusion 111

ETUDE ET RESULTATS PHARMACOLOGIQUES 113

I. Matériels et méthodes 113

A. Tests enzymatiques 113

B. Tests cellulaires 115

1. Cultures cellulaires 115
2. Activité cytotoxique 115

II. Résultats 116

A. Tests enzymatiques 116

1. Approche 1 116
2. Approche 2 119

B. Tests cellulaires 121

C. Conclusion 122

ETUDES IN SILICO ____ *123*

I. Matériels et méthodes ____ **123**

A. Approche 1 ____ 123

B. Approche 2 ____ 124

1. Préparation du macrocycle **62** ____ 124
2. Préparation des récepteurs protéiques ____ 124
3. Docking du macrocycle **62** ____ 125

II. Résultats ____ **125**

A. Approche 1 ____ 125

B. Approche 2 ____ 127

CONCLUSION ET PERSPECTIVES ____ *129*

I. Conclusion ____ **129**

II. Perspectives ____ **131**

A. Approche 1 ____ 131

B. Approche 2 ____ 133

C. Etude Pharmacologique ____ 135

PARTIE EXPERIMENTALE ____ *136*

I. Généralité ____ **136**

A. Material and Instrumentation ____ 136

1. Reaction monitoring ____ 136
2. Hydrogenation ____ 136
3. Melting points (Mp) ____ 136
4. High-resolution mass spectra (HRMS) ____ 136
5. Purity of final compounds ____ 137
6. Purification ____ 137
7. Nuclear magnetic resonance ____ 137
8. Microwave irradiation ____ 137

II. Synthesis of the quinoxaline scaffold ____ **138**

A. 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline scaffold synthesis ____ 138

1. Ethyl 3-((2'-bromo-6'-nitrophenyl)amino)-3-oxopropanoate (**3**) ____ 138
2. Ethyl 5/8-bromo-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**4** and **5**) ____ 139
3. Ethyl 5/8-iodo-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**6** and **7**) ____ 141
4. Ethyl 5/8-nitro-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**8** and **9**) ____ 142
5. Ethyl 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**10**) ____ 143

B. Chloration on position 3 ____ 144
1. Ethyl 5-bromo-3-chloroquinoxaline-2-carboxylate (**11**) ____ 144
2. Ethyl 3-chloro-5-iodoquinoxaline-2-carboxylate (**12**) ____ 145
3. Ethyl 3-chloro-8-iodoquinoxaline-2-carboxylate (**13**) ____ 146
4. Ethyl 3-chloro-5-nitroquinoxaline-2-carboxylate (**14**) ____ 147

III. Approach 1 ____ 148

A. Macrocycle **23** ____ 148
1. *N*-(3-nitrophenyl)pent-4-ynamide (**15**) ____ 148
2. Ethyl 5-(5-((3-nitrophenyl)amino)-5-oxopent-1-yn-1-yl)-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**16a**) ____ 149
3. N^1,N^{10}-bis(3-nitrophenyl)deca-4,6-diynediamide (**16b**) ____ 150
4. *Tert*-butyl (3-(pent-4-ynamido)phenyl)carbamate (**17**) ____ 151
5. Ethyl 5-(5-((3-((tert-butoxycarbonyl)amino)phenyl)amino)-5-oxopent-1-yn-1-yl)-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**18**) ____ 152
6. (Pent-4-ynamido)benzenaminium trifluoroacetic salt (**19**) ____ 153
7. Ethyl 5-bromo-3-((3-(pent-4-ynamido)phenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**20**) ____ 154
8. Ethyl 6-oxo-7,13,16,22-tetraazatetracyclo[12.6.2.$1^{8,12}$.$0^{17,21}$]tricosa-1(20),8(23),9,11,14,16,18,21-octaen-2-yne-15-carboxylate (**21a**) ____ 155
9. Diethyl 3,3'-((((deca-4,6-diynedioyl)bis(azanediyl))bis(3,1-phenylene))bis(azanediyl))bis(5-bromoquinoxaline-2-carboxylate) (**21b**) ____ 156
10. Ethyl 5-iodo-3-((3-(pent-4-ynamido)phenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**22**) ____ 157
11. Potassium 6-oxo-7,13,16,22-tetraazatetracyclo[12.6.2.$1^{8,12}$.$0^{17,21}$]tricosa-1(20),8(23),9,11,14,16,18,21-octaen-2-yne-15-carboxylate (**23**) ____ 158

B. Phenyl series ____ 159
1. *tert*-butyl (3-iodophenyl)carbamate (**24**) ____ 159
2. *tert*-butyl (3-(pent-4-yn-1-ylamino)phenyl)carbamate (**25**) ____ 160
3. Pent-4-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate (**26**) ____ 161
4. *tert*-butyl (3-((5-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)amino)pent-1-en-2-yl)amino)phenyl)carbamate (**27**) ____ 162
5. 2,2,2-Trifluoro-1-((3-(pent-4-yn-1-ylamino)phenyl)-l5-azaneyl)ethan-1-one (**28**) ____ 163
6. Ethyl 3-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)amino)-5-iodo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**29**) ____ 164
7. Ethyl 3-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)amino)-5-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)quinoxaline-2-carboxylate (**30**) ____ 165
8. Ethyl 3-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)amino)-5-(5-(tosyloxy)pent-1-yn-1-yl)quinoxaline-2-carboxylate (**31**) ____ 166
9. Ethyl 3-((3-aminophenyl)amino)-5-(5-(tosyloxy)pent-1-yn-1-yl)quinoxaline-2-carboxylate (**32**) 167

10. Ethyl 7, 13, 16, 22-tetraazatetracyclo[12.6.2.1^{8,12}.0^{17,21}]tricosa-1(20), 8(23), 9, 11, 14, 16, 18, 21-octaen-2-yne-15-carboxylate (**33**) 168

11. 7, 13, 16, 22-tetraazatetracyclo[12.6.2.1^{8,12}.0^{17,21}]tricosa-1(20), 8(23), 9, 11, 14, 16, 18, 21-octaen-2-yne-15-carboxylique acid (**34**) 169

12. Ethyl (E)-2,4-diaza-1(2,8)-quinoxalina-3(1,3)-benzenacyclononaphan-8-ene-1^{3}-carboxylate (**35a**) 170

13. (E)-2,4-diaza-1(2,8)-quinoxalina-3(1,3)-benzenacyclononaphan-8-ene-1^{3}-carboxylic acid (**36a**) 171

14. Ethyl (Z)-2,4-diaza-1(2,8)-quinoxalina-3(1,3)-benzenacyclononaphan-8-ene-1^{3}-carboxylate (**35b**) 172

15. (Z)-2,4-diaza-1(2,8)-quinoxalina-3(1,3)-benzenacyclononaphan-8-ene-1^{3}-carboxylic acid (**36b**) 173

16. Ethyl 2,4-diaza-1(2,8)-quinoxalina-3(1,3)-benzenacyclononaphane-1^{3}-carboxylate (**35c**) 174

17. 2,4-diaza-1(2,8)-quinoxalina-3(1,3)-benzenacyclononaphane-1^{3}-carboxylic acid (**36c**) 175

C. Phenol series 176

1. *Tert*-butyl (3-amino-5-hydroxyphenyl)carbamate (**37**) 176

2. Ethyl 3-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-hydroxyphenyl)amino)-5-iodoquinoxaline-2-carboxylate (**38**) 177

3. Ethyl 3-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)amino)-5-iodoquinoxaline-2-carboxylate (**39**) 178

4. Ethyl 3-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)amino)-5-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)quinoxaline-2-carboxylate (**40**) 179

5. Ethyl 3-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)amino)-5-(5-(tosyloxy)pent-1-yn-1-yl)quinoxaline-2-carboxylate (**41**) 180

6. Ethyl 3-((3-amino-5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)amino)-5-(5-(tosyloxy)pent-1-yn-1-yl)quinoxaline-2-carboxylate (**42**) 181

7. Ethyl 10-(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy-7, 13, 16, 22-tetraazatetracyclo[12.6.2.1^{18,12}.0^{17,21}]tricosa-1(20), 8(23), 9, 11, 14, 16, 18, 21-octaen-2-yne-15-carboxylate **43** 182

8. Ethyl 10 - hydroxy - 7, 13, 16, 22-tetraazatetracyclo[12.6.2.1^{18,12}.0^{17,21}]tricosa-1(20), 8(23), 9, 11, 14, 16, 18, 21-octaen-2-yne-15-carboxylate **44** 183

9. 10 - hydroxy - 7, 13, 16, 22-tetraazatetracyclo[12.6.2.1^{18,12}.0^{17,21}]tricosa-1(20), 8(23), 9, 11, 14, 16, 18, 21-octaen-2-yne-15-carboxylic acid **45** 184

10. Ethyl 3^{5}-hydroxy-2,4-diaza-1(2,8)-quinoxalina-3(1,3)-benzenacyclononaphane-1^{3}-carboxylate (**46**) 185

11. 3^{5}-hydroxy-2,4-diaza-1(2,8)-quinoxalina-3(1,3)-benzenacyclononaphane-1^{3}-carboxylic acid (**47**) 186

IV. Approach 2 187

A. Macrocycle **55** 187

1. *tert*-butyl (5-aminopentyl)carbamate (**48**) 187
2. Ethyl 5-bromo-3-((5-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)pentyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**49**) 188
3. 5-((8-bromo-3-(ethoxycarbonyl)quinoxalin-2-yl)amino)pentan-1-aminium (**50**) 189
4. Ethyl 3-((5-hydroxypentyl)amino)-5-nitroquinoxaline-2-carboxylate (**51**) 190
5. Ethyl 5-nitro-3-((5-(tosyloxy)pentyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**52**) 191
6. Ethyl 5-amino-3-((5-(tosyloxy)pentyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**53**) 192
7. Ethyl 4,5,6,7,8,9-hexahydro-3H-13,2-(azenometheno)benzo[d][1,3,6]triazacycloundecine-15-carboxylate (**54**) 193
8. Sodium 4,5,6,7,8,9-hexahydro-3*H*-13,2-(azenometheno)benzo[*d*][1,3,6]triazacycloundecine-15-carboxylate salt (55) 194

B. Macrocycle **60** 195
1. Ethyl 3-((5-hydroxy-2,2-dimethylpentyl)amino)-5-nitroquinoxaline-2-carboxylate (**56**) 195
2. Ethyl 3-((2,2-dimethyl-5-(tosyloxy)pentyl)amino)-5-nitroquinoxaline-2-carboxylate (**57**) 196
3. Ethyl 5-amino-3-((2,2-dimethyl-5-(tosyloxy)pentyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**58**) 197
4. Ethyl 5,5-dimethyl-4,5,6,7,8,9-hexahydro-3*H*-13,2-(azenometheno)benzo[*d*][1,3,6]triazacycloundecine-15-carboxylate (**59**) 198
5. 5,5-dimethyl-4,5,6,7,8,9-hexahydro-3H-13,2-(azenometheno)benzo[d][1,3,6]triazacycloundecine-15-carboxylate salt (**60**) 199

C. Macrocycle **62** 200
1. Ethyl 5,5,9-trimethyl-4,5,6,7,8,9-hexahydro-3*H*-13,2 (azenometheno)benzo[*d*][1,3,6]triazacycloundecine-15-carboxylate (**61**) 200
2. 5,5,9-trimethyl-4,5,6,7,8,9-hexahydro-3*H*-13,2-(azenometheno)benzo[*d*][1,3,6]triazacycloundecine-15-carboxylate salt (**62**) 201

BIBLIOGRAPHIE ***202***

ANNEXE ***A***

A. Annexe 1 : Structure cristallographique intermédiaire 13 A
B. Annexe 2 : Structure cristallographique du macrocycle 36c B
C. Annexe 3 : Alignement de séquences d'acides aminés 2D de Pim1 humain, Pim2, DYRK1A et GSK3β. C

Liste des figures

Figure 1. Bilan des différents macrocycles synthétisés. ____ *XIX*

Figure 2. Organigramme des collaborations. ____ *2*

Figure 3. Activation d'une protéine kinase, d'après H. Patterson et al., Clinical and Experimental Immunology, 2013. ____ *3*

Figure 4. Localisation et site d'initiation des gènes Pim ainsi que les différentes isoformes de kinase Pim, d'après M. C. Nawijn et al., Nature Reviews, 2011. ____ *5*

Figure 5. Voie d'expression des kinases Pim, d'après P.Mondello et al., Journal of Hematology and Oncology, 2014. ____ *6*

Figure 6. Duplication interne en tandem du récepteur FLT3, d'après J. P. Marie, Horizons Hémato, 2013. ____ *7*

Figure 7. Actions cellulaires des kinases Pim, d'après X. Zhang et al., Journal of Cancer Prevention, 2018. ____ *8*

Figure 8. Cycle cellulaire, d'après S. C. Yahouédéhou et al., JSSN, 2012. ____ *9*

Figure 9. Impact des kinases Pim sur différents processus biologiques, J. R. Julson et al., Cancers, 2022. ____ *11*

Figure 10. Structure de Pim-1, d'après S. Alnabulsi et al., Drug Discovery Today, 2020. ____ *12*

Figure 11. Spécificité de liaison de la kinase Pim-1 humaine à l'adénine de l'ATP par rapport à la majorité des autres kinases. ____ *13*

Figure 12. Comparaison de structure entre HsPim-1 (en orange) et HsPim-2 (Rouge pour l'hélice alpha et Vert pour l'hélice béta), d'après A. N. Bullock et al., PlosOne, 2009. ____ *14*

Figure 13. Structure du SGI-1776. ____ *15*

Figure 14. Structure du TP-3654. ____ *16*

Figure 15. Structure de l'AZD1208. ____ *16*

Figure 16. Structure du LGH447. ____ *17*

Figure 17. Structure du INCB053914. ____ *17*

Figure 18. Structure du SEL24-B489. ____ *18*

Figure 19. Structure du GDC-0339. ____ *18*

Figure 20. Hit 1 et Lead 2. ____ *20*

Figure 21. Illustration des interactions entre le chef de file 2 et la kinase Pim-1. Les liaisons hydrogènes sont indiquées par des lignes jaunes (PDB ID : 3A99). ____ *22*

Figure 22. Illustration du possible mode de liaison du composé 2 au sein du site ATP de la kinase HsPim-1. Les liaisons hydrogènes sont indiquées par des lignes jaunes (PDB ID : 3A99). ____ *22*

Figure 23. Comparaison du R-crizotinib acyclique et du lorlatinib macrocyclique vis-à-vis de leur sélectivité respective sur le kinome humain, d'après J. A. Amrhein et al., J. Med. Chem, 2021. ____ *25*

Figure 24. Comparaison de l'activité sur les kinases Pim1/2 d'un inhibiteur acyclique et de son analogue cyclique, d'après V. J. Cee et al., ACS Med. Chem. letters, 2016. ____ *27*

Figure 25. Scaffold ayant permis l'élaboration des différents macrocycles. ____ *28*

Figure 26. Macrocyclisation à partir du chef de file 2. ____ *29*

Figure 27. Modèle d'étude général de l'approche 1. ____ *29*

Figure 28. Macrocycles cibles sélectionnés pour la synthèse dans le cadre de l'approche 1. ____ *30*

Figure 29. Les quatre graines utilisées pour la conception de macrocycles par FBDD. ____ *31*

Figure 30. Distributions des descripteurs moléculaires calculés sur les 205 macrocycles obtenus dans Pim-1, Thèse de Gautier Peyrat, Conception d'inhibiteurs de protéines kinases à partir de méthodes in silico basées sur les fragments, 2021. ____ *34*

Figure 31. Macrocycles sélectionnés pour la synthèse dans le cadre de l'approche 2. 35

Figure 32. Noyau quinoxaline. 36

Figure 33. Les différentes voies de formation du noyau quinoxaline. Figure issue de G. Yashwantrao et al., Org. Chem. Front., 2021. 37

Figure 34. Proportion des différents types de fermeture possibles. D'après J. A. Amrhein et al., J. Med. Chem, 2021. 43

Figure 35. Synthons intermédiaires utilisés pour la synthèse des macrocycles cibles de cette thèse. 48

Figure 36. Macrocycles pharmacomodulés à partir du chef de file 2 dans le cadre de l'approche 1. 56

Figure 37. Sous-produit résultant d'un couplage de Glaser. 61

Figure 38. Macrocycles envisagés possédant un lien aminé. 73

Figure 39. Intermédiaire secondaire obtenu après double attaque du (3-aminophényl)carbamate de tert-butyle. 79

Figure 40. Pharmacomodulations envisagées pour la série phénolique. 88

Figure 41. Macrocycles de l'approche 2 sélectionnés. 97

Figure 42. Bilan des 10 macrocycles obtenus durant ces travaux de thèse. 112

Figure 43. Principe de la méthode ADP-Glo™, d'après Promega Corporation 114

Figure 44. Macrocycle 23. 116

Figure 45. Schéma général des macrocycles de la série possédant un lien aminé. 117

Figure 46. Schéma général des macrocycles de l'approche 2. 120

Figure 47. Figure générale des 3 macrocycles les plus prometteurs. 121

Figure 48. Macrocycle 23 de l'approche 1. 125

Figure 49. Représentation de l'inhibiteur de référence PIM447 (en gris) et du macrocycle 23 (en jaune) dans le site actif de Pim-1 (PBD ID : 3A99). 126

Figure 50. Macrocycle 62 de l'approche 2. 127

Figure 51. Superposition de la meilleure pose obtenue pour le macrocycle 62 (en orange) avec le ligand de référence 79O (en gris) dans la structure de Pim-1 (PDB.ID 4ALU). 127

Figure 52. Représentation de l'inhibiteur 79O (gris, en haut) et du macrocycle 62 (orange, en bas) dans le site actif de Pim-1 représenté en cartoons (à gauche) et en surface colorée par hydrophobicité (à droite, en bleu hydrophile, en orange hydrophobe). 128

Figure 53. Bilan des 4 macrocycles présentant les meilleures activités sur Pim-1 et Pim-2 et les meilleurs profils de sélectivité. 130

Figure 54. Modification de la fonction acide carboxylique par d'autres groupements. 132

Figure 55. Pharmacomodulations envisagées à partir d'un nouveau noyau (imidazo[1,2-b]pyridazine), connu dans la littérature pour avoir une activité sur Pim1/2. 132

Figure 56. Exemple d'un des 23 macrocycles obtenus par le logiciel F2D. 134

Figure 57. Le dessin ORTEP (Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot) du 3-chloro-8-iodoquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle (13) avec des ellipsoïdes thermiques à un niveau de 30 %. A

Figure 58. Le dessin ORTEP (Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot) du macrocycle le plus réduit de la série phényle (36c) B

Figure 59. Alignement de séquences d'acides aminés 2D de Pim1 humain (PDB ID : P11309), Pim2 (PDB ID : Q9P1W9), DYRK1A (PDB ID : Q13627) et GSK3β (PDB ID : P49841), à l'aide d'Uniprot (https://www.uniprot.org). Les acides aminés du site de liaison sont indiqués. C

Liste des schémas

Schéma 1. Formes mésomères du noyau quinoxaline, issue de G. Yashwantrao et al., Org. Chem. Front., 2021. 36

Schéma 2. Obtention du noyau quinoxaline polysubstitué par condensation selon la méthode de R. Mahesh et al., Chin. Chem. Lett., 2011. 38

Schéma 3. Mécanisme réactionnel de formation du noyau quinoxaline par réaction de condensation. 38

Schéma 4. Cyclisation-oxydation d'une o-phénylènediamine avec un dérivé d'a-bromocétone. 39

Schéma 5. Exemple de formation du noyau quinoxaline selon la méthode décrite par Takano et al. 39

Schéma 6. Schéma général de la réaction de Schmidt. 40

Schéma 7. Mécanisme proposé de formation du noyau quinoxaline par la réaction de Schmidt. 40

Schéma 8. Mécanisme de formation du noyau quinoxaline par réaction de condensation oxydante. 41

Schéma 9. Exemple de déshydrogénation oxydante, figure issue de G. Yashwantrao et al., Org. Chem. Front., 2021. 42

Schéma 10. Fermeture de cycle par réaction de métathèse. 44

Schéma 11. Fermeture de cycle par métathèse. 45

Schéma 12. Fermeture de cycle par substitution nucléophile aromatique. D'après U. Lücking et al., ChemMedChem, 2007. 46

Schéma 13. Exemple de couplage pallado-catalysé : couplage de Sonogashira. 46

Schéma 14. Exemple de fermeture de cycle par couplage de Sonogashira, D. K. Mohapatra et al., Eur. J. Org. Chem, 2008. 47

Schéma 15. Schéma rétrosynthétique de formation du noyau quinoxaline. 49

Schéma 16. Obtention du composé 3 par réaction d'addition-élimination selon les travaux de Takano et al. 50

Schéma 17. Cyclisation et désoxygénation. 51

Schéma 18. Formation des dihydroquinoxalines de départ. 52

Schéma 19. Halogénation de la position 5 du noyau 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline. 53

Schéma 20. Chloration des dihydroquinoxalines précédentes. 54

Schéma 21. Mécanisme de chloration de la position 3. 55

Schéma 22. Schéma rétrosynthétique des synthèses envisagées pour obtenir le macrocycle possédant un lien amidique. 57

Schéma 23. Synthèse du N-(3-nitrophényl)pent-4-ynamide. 59

Schéma 24. Obtention du composé 16a par couplage de Sonogashira. 59

Schéma 25. Couplage de Sonogashira sur le composé 11. 62

Schéma 26. Réduction du composé 16a. 62

Schéma 27. Synthèse du composé 17. 63

Schéma 28. Formation du composé 18. 64

Schéma 29. Chloration du composé 18. 64

Schéma 30. Déprotection au TFA pour obtenir le composé 19. 65

Schéma 31. Fonctionnalisation de la position 3 du noyau quinoxaline 11. 66

Schéma 32. Réaction de fermeture de cycle par couplage de Sonogashira. 68

Schéma 33. Réaction d'amination sur la quinoxaline 12 iodée en position 5. 70

Schéma 34. Réaction de fermeture de cycle par couplage de Sonogashira sur la quinoxaline iodée 22. 70

Schéma 35. Saponification du macrocycle intermédiaire 21a. 71

Schéma 36. Bilan de synthèse du macrocycle 23 possédant un lien amidique. 72

Schéma 37. Schémas rétrosynthétiques envisagés pour obtenir les macrocycles de la série phényle de l'approche 1 possédant un lien aminé. 74

Schéma 38. Protection de la 3-iodoaniline. 75

Schéma 39. Réaction de Ullmann sur le (3-iodophényl)carbamate de tert-butyle. 76

Schéma 40. Mécanisme catalytique du couplage de Buchwald-Hartwig, d'après Hartwig, J. F et al., Org. React. 2019. 76

Schéma 41. Essai de réaction de couplage de Buchwald-Hartwig pour la préparation du synthon acétylénique de départ. 77

Schéma 42. Tosylation du pent-4-yn-1-ol. 77

Schéma 43. Substitution nucléophile sur l'intermédiaire 26 par le (3-aminophényl)carbamate de tert-butyle. 78

Schéma 44. Déprotection du composé 26 par hydrolyse acide. 79

Schéma 45. Fonctionnalisation de la position 3 du noyau quinoxaline 12. 80

Schéma 46. Substitution nucléophile aromatique en position 3 de la quinoxaline 12. 81

Schéma 47. Fonctionnalisation de la position 5 de la quinoxaline 29 via un couplage de Sonogashira. 82

Schéma 48. Tosylation du composé 30. 83

Schéma 49. Déprotection du composé 31. 84

Schéma 50. Macrocyclisation du composé 32 84

Schéma 51. Saponification du macrocycle 33. 85

Schéma 52. Réduction du macrocycle 33 par réaction d'hydrogénation en flux continu. 86

Schéma 53. Saponification des macrocycles 35a-c. 87

Schéma 54. Schéma de rétrosynthèse des nouveaux macrocycles phénoliques envisagés. 88

Schéma 55. Monoprotection du 3,5-diaminophénol. 89

Schéma 56. SN_{ar} sur la position 3 du noyau quinoxaline 12. 90

Schéma 57. Protection de la fonction phénol du composé 38. 90

Schéma 58. Fonctionnalisation du composé 39 en position 5 via un couplage de Sonogashira. 91

Schéma 59. Tosylation de la fonction alcool du composé 40. 92

Schéma 60. Déprotection de la fonction amine par hydrolyse acide de l'intermédiaire 41. 92

Schéma 61. Macrocyclisation du composé 42. 93

Schéma 62. Déprotection du composé 43 en présence de TBAF. 93

Schéma 63. Saponification du macrocycle 44. 94

Schéma 64. Réduction de la triple liaison du macrocycle 44. 95

Schéma 65. Saponification du macrocycle 46. 95

Schéma 66. Bilan de synthèse des macrocycles possédant un lien aminé. 96

Schéma 67. Schéma rétrosynthétique des 2 voies de synthèse envisagées pour l'obtention du macrocycle simplifié de l'approche 2. 98

Schéma 68. Schéma rétrosynthétique de la voie 1 à partir de la quinoxaline 11. 99

Schéma 69. Mono-protection de la pentane-1,5-diamine. 99

Schéma 70. Fonctionnalisation de la quinoxaline 11 en position 3 par SN_{ar}. 100

Schéma 71. Fonctionnalisation de la quinoxaline 11 en position 3 par couplage de Ullmann. 101

Schéma 72. Déprotection de la fonction amine du composé 49. 101

Schéma 73. Fermeture de cycle par couplage de Buchwald-Hartwig. 102

Schéma 74. Schéma de rétrosynthèse de la voie 2 permettant l'obtention du macrocycle simplifié de l'approche 2. 102

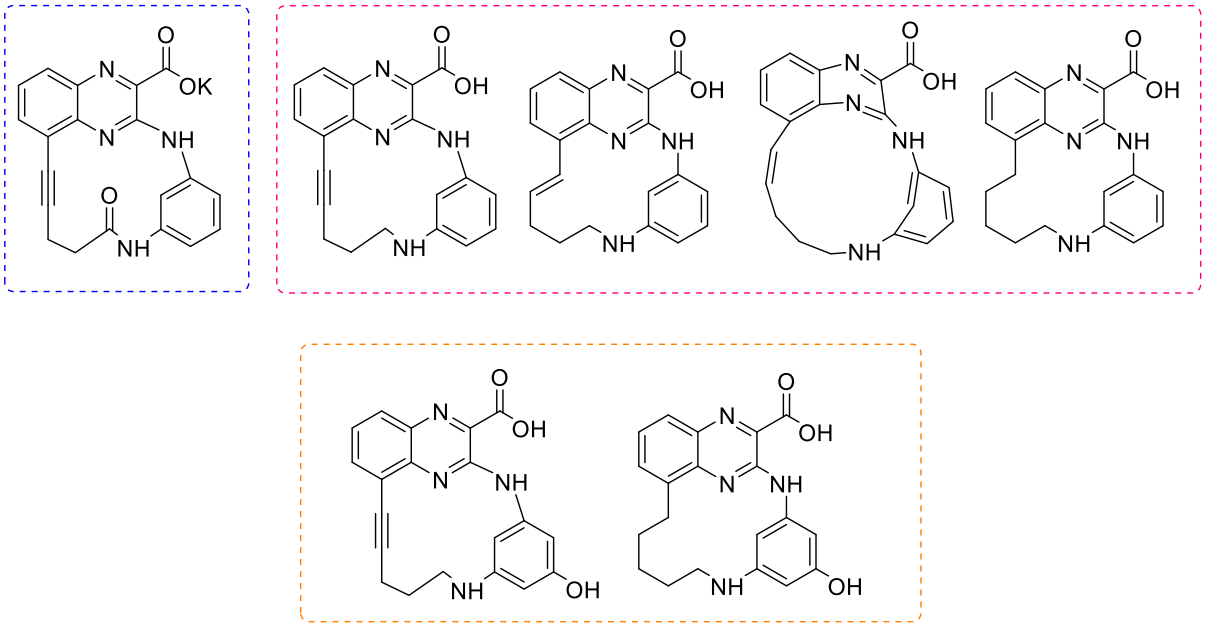
Schéma 75. Fonctionnalisation de la position 3 du noyau quinoxaline par couplage de Ullmann. 103

Schéma 76. Fonctionnalisation de la position 3 de la quinoxaline 14 par SN_{ar}. 103
Schéma 77. Réaction de tosylation de la fonction alcool du composé 51. 104
Schéma 78. Réduction du groupement nitro du composé 52. 105
Schéma 79. Fermeture de cycle par substitution nucléophile. 105
Schéma 80. Saponification permettant l'obtention du macrocycle 55. 107
Schéma 81. Schéma de synthèse du macrocycle 60. 109
Schéma 82. N-méthylation du composé 59. 110
Schéma 83. Saponification du composé 61. 111
Schéma 84. Schéma rétrosynthétique envisagé pour les deux nouveaux macrocycles I et II. 133
Schéma 85. Schéma rétrosynthétique envisageable pour obtenir le nouveau macrocycle sélectionné parmi les 23 macrocycles obtenus par le logiciel F2D. 134

Liste des tableaux

Tableau 1. Valeurs seuils des descripteurs physico-chimiques attendues dans la RO5, la régle de Veber et dans les filtres "PKI-like". 33
Tableau 2. Optimisation de la réaction d'addition-élimination. 50
Tableau 3. Schéma général d'obtention des différentes dihydroquinoxalines substituées en position 5 ou 8. 52
Tableau 4. Obtention des quinoxalines 11 à 14. 54
Tableau 5. Différentes conditions de couplage de Sonogashira permettant la fonctionnalisation de la position 5 de l'intermédiaire 4. 60
Tableau 6. Fonctionnalisation de la position 3 via une réaction d'amination. 66
Tableau 7. Optimisation des conditions de fermeture de cycle. 68
Tableau 8. Optimisation des conditions de macrocyclisation à partir de la quinoxaline 22 iodée en position 5. 70
Tableau 9. Optimisation des conditions de formation du synthon 25. 78
Tableau 10. Optimisation de la SN_{ar} en position 3 de la quinoxaline 12. 81
Tableau 11. Optimisation des conditions de fermeture de cycle permettant l'obtention du macrocycle 54. 106
Tableau 12. Optimisation des conditions de méthylation du macrocycle 59. 110
Tableau 13. Résultats in vitro du macrocycle 23 comparativement au chef de file 2 et la référence SGI-1776. 116
Tableau 14. CI_{50} sur Pim-1 et Pim-2 des macrocycles de la série possédant un lien aminé. 117
Tableau 15. Résultats in vitro des activités des macrocycles les plus actifs sur un panel de kinases comparativement au composé chef de file 2 et au SGI-1776. 119
Tableau 16. Résultats in vitro des activités des macrocycles de l'approche 2 sur Pim-1 et Pim-2, ainsi que sur un panel de kinases comparativement au composé chef de file 2 et au SGI-1776. 120
Tableau 17. Résultats cellulaires 121
Tableau 18. Bilan des synthèses ayant conduit aux 10 différents macrocycles. 129

Macrocycles de l'approche 1



Macrocycles de l'approche 2

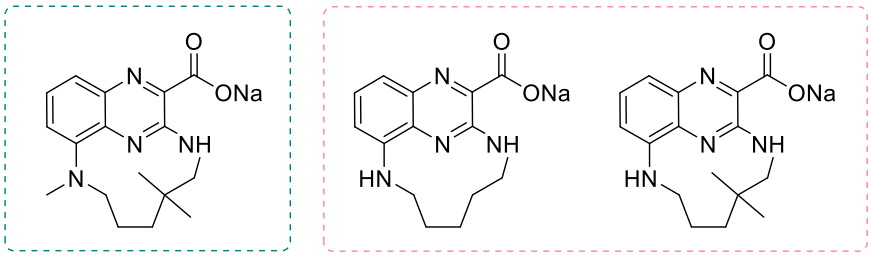


Figure 1. Bilan des différents macrocycles synthétisés.

AVANT PROPOS

Les enjeux de santé publique actuels poussent les chercheurs au développement de nouvelles molécules actives et sélectives des cibles souhaitées. C'est en 2001 que les protéines kinases deviennent des cibles thérapeutiques intéressantes grâce à l'autorisation de mise sur le marché de l'imatinib, premier inhibiteur de tyrosines kinases, agissant en tant qu'anticancéreux *via* l'inhibition de la tyrosine kinase BCR-ABL. Le problème majeur du développement d'inhibiteurs de kinases repose sur la forte homologie structurale présente entre les 518 membres des kinases humaines. Les inhibiteurs développés présentent alors soit un manque d'efficacité, soit un grand manque de sélectivité, entraînant alors de fortes toxicités et l'arrêt de leur développement. De plus, des phénomènes de résistance ont été observés. Il y a donc un triple objectif lorsque l'on souhaite développer de nouveaux inhibiteurs de kinases : élaborer de nouvelles molécules actives (1), sélectives (2) et palliant les différents phénomènes de résistances observés (3). Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés aux leucémies myéloïdes aiguës (LMA). Le nombre de nouveaux cas de leucémie myéloïde aiguë en France métropolitaine était de 3 428 en 2018 et cette pathologie représente un enjeu de santé publique important.

Les travaux sur les kinases Pim ont depuis quelques années montré l'intérêt de ces kinases en tant que nouvelles cibles thérapeutiques. En effet, les kinases Pim sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires importantes et sont surexprimées dans le cas des cancers hématopoïétiques. De nombreux inhibiteurs de ces kinases ont vu le jour depuis ces dernières années. Néanmoins, bien que certains soient toujours en phase de tests, d'autres ont vu leur développement arrêté du fait de leur toxicité ou d'un manque d'efficacité. Les travaux de cette thèse visent alors à développer de nouvelles molécules à la fois actives et sélectives de ces kinases Pim.

La macrocyclisation montre un grand intérêt dans le domaine pharmaceutique. En effet, de nombreuses études montrent que la macrocyclisation d'inhibiteurs non cycliques entraîne une diminution du degré de liberté de ces molécules et donc augmente l'affinité et la sélectivité de celles-ci vis-à-vis des cibles visées. Par ailleurs, en plus de permettre une meilleure sélectivité, la macrocyclisation entraîne parfois une amélioration des paramètres ADME, notamment de la perméabilité membranaire, ce qui peut améliorer l'activité cellulaire.

Les travaux de cette thèse de doctorat ont été financés par le Labex SynOrg (50 %) et par la région centre-Val de Loire (50 %). Le but était de développer, à partir d'études *in silico* préliminaires, de nouveaux inhibiteurs macrocycles spécifiques des kinases Pim-1 et Pim-2,

présentant une activité anti-leucémique prometteuse. Ce manuscrit se divise en cinq grandes parties avec dans un 1er temps une introduction du sujet, suivie de la présentation des objectifs de la thèse puis des études chimiques et biologiques. Enfin, les études *in silico* ainsi que les conclusions et perspectives seront présentées. Au fil de ce manuscrit, la synthèse de 10 macrocycles originaux, conçus à partir des données des études *in silico*, va être présentée. L'étude biologique montrera, quant à elle, l'activité de ces macrocycles sur les kinases Pim-1/2 ainsi que sur un panel d'autres kinases de mammifères. L'activité sur cellules leucémiques humaines (MV4-11) des macrocycles les plus prometteurs sera par la suite présentée. Ce travail aura permis de montrer que l'augmentation de la contrainte stérique permet de maintenir un bon niveau d'activité sur les kinases Pim-1/2 tout en améliorant le profil de sélectivité. Néanmoins, l'activité cellulaire sur lignée leucémique n'a pas pu être améliorée durant ces trois années et reste l'une des perspectives principales de ce projet. Ce travail a été concrétisé en collaboration avec différentes équipes de recherche, présentés dans la Figure 2 :



Figure 2. Organigramme des collaborations.

INTRODUCTION

I. Les kinases Pim

A. Généralités sur les kinases

Les cellules sont en constantes interactions avec leur environnement. C'est par l'intermédiaire de stimuli qu'elles sont capables de répondre et de s'adapter aux autres cellules et à leur environnement. Cette réponse se fait par la transduction de signaux intracellulaires par l'intermédiaire de cascades d'activation de protéines intracellulaires parmi lesquelles les protéines kinases jouent un rôle primodial[1] (Figure 3).

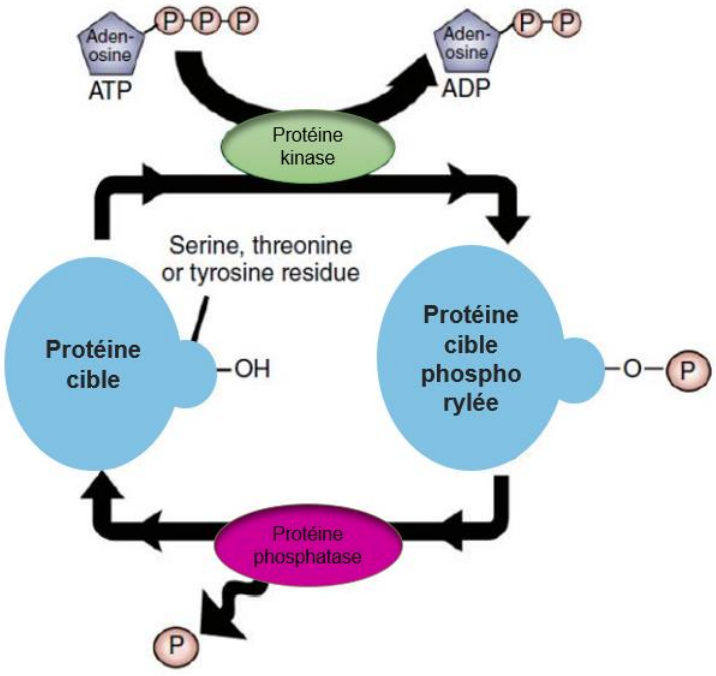


Figure 3. Activation d'une protéine kinase, d'après H. Patterson *et al.*, *Clinical and Experimental Immunology*, 2013.

Les phospho-transférases représentent un groupe d'enzymes dont font partie les kinases et dont le rôle est de phosphoryler un substrat cible (ex : protéines, lipide, sucre,...). L'action

catalytique des protéines kinases se caractérise par une phosphorylation, c'est-à-dire par l'ajout d'un groupement phosphate provenant de l'adénosine-5'-triphosphate (ATP), sur une fonction hydroxyle présente sur la chaîne latérale de différents résidus comme les sérines, les thréonines ou encore les tyrosines[2] (Figure 3).

Ces protéines kinases vont jouer un rôle très important au sein de la cellule. En effet, la phosphorylation des protéines cibles va réguler leur activité ce qui va avoir une incidence sur de nombreux processus cellulaires comme, par exemple, le cycle cellulaire, le métabolisme, la transcription, l'apoptose ou la différentiation. Elles vont notamment jouer un rôle crucial dans la communication intracellulaire, impliquée dans l'homéostasie, par exemple, ou encore dans le fonctionnement du système immunitaire.[3]

B. Les kinases Pim

Les kinases Pim (*Proviral Integration site for Moloney murine leukemia virus kinases*) sont une famille de sérine/thréonine kinases qui phosphorylent les protéines sur certains résidus de sérine ou de thréonine[4]. Cette famille de kinase est composée de trois isoformes différentes qui sont nommées Pim-1, Pim-2 et Pim-3. Ces kinases ont une faible durée de vie et sont constitutivement actives[5] du fait d'un manque de domaine de régulation. Elles n'ont donc pas besoin d'être phosphorylées pour être activées. Leur régulation va donc dépendre de leur stabilisation protéique, ainsi que de leur expression[6,7].

Dans les années 1980, il a été découvert une petite région chromosomique correspondant au locus de Pim dans des lymphomes murins. Cette région chromosomique est régulièrement associée à des insertions provirales qui entraînent l'activation transcriptionnelle du gène *Pim-1*. *Pim-1* est le locus le plus fréquemment activé par le rétrovirus de la leucémie murine de Moloney[8]. Les deux autres isoformes n'ont été découvertes que plus tardivement. Le gène *Pim-1* est localisé sur le chromosome 6[7], le gène *Pim-2* sur le chromosome X et le gène *Pim-3* est situé sur le chromosome 22[8].

Les gènes *Pim* donnent lieu à plusieurs protéines de tailles différentes. En effet, ces gènes peuvent être transcrits *via* différents sites d'initiation et ainsi générer plusieurs isoformes.

Deux isoformes existent pour Pim-1 et trois pour Pim-2. Seule Pim-3 ne présente qu'un seul site d'initiation générant ainsi une seule isoforme (Figure 4).

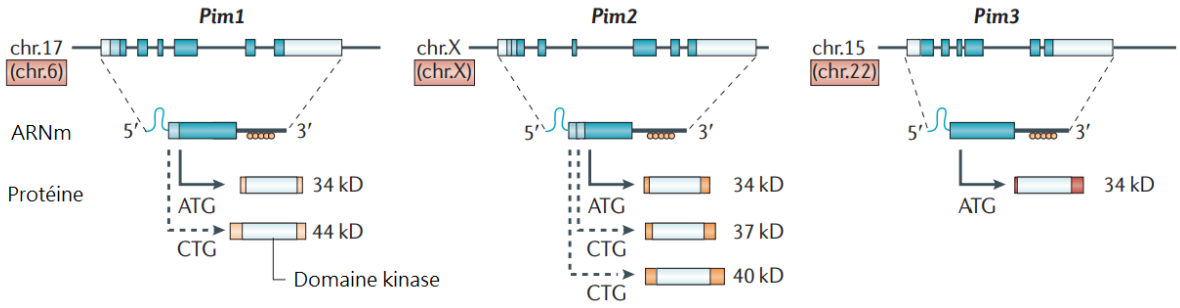


Figure 4. Localisation et site d'initiation des gènes *Pim* ainsi que les différentes isoformes de kinase Pim, d'après M. C. Nawijn *et al.*, *Nature Reviews*, 2011.

Ces protéines sont exprimées dans différentes cellules, mais avec un taux d'expression qui varie en fonction de la cellule et de l'isoforme. Les kinases Pim présentent une forte homologie. En effet, les trois isoformes partagent une homologie allant de 60 à 70 %. Cette homologie structurale fait qu'elles présentent des activités comparables et peuvent entraîner des phénomènes de compensation expliquant l'intérêt en thérapeutique de développer des inhibiteurs pan-Pim, c'est-à-dire capable d'inhiber les 3 isoformes[5].

Les gènes *Pim* sont des gènes de réponse primaire dont la transcription est facilement activée par des stimuli extérieurs comme les facteurs de croissance. L'expression des kinases Pim est en relation avec les signaux JAK (*Janus kinase*) / STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcrption*). Le système JAK-STAT est un système de transduction de signaux. Un récepteur transmembranaire est présent à la surface de la cellule et permet la fixation de stimuli extérieurs comme les cytokines. Les cytokines sont des protéines ou glycoprotéines solubles qui jouent le rôle de signaux permettant aux cellules de communiquer et d'agir en fonction d'un stimulus extérieur. Ce récepteur transmembranaire est lié à une enzyme JAK. Lorsque les cytokines se lient aux récepteurs transmembranaires, ils changent de conformation ce qui entraîne l'activation de l'enzyme JAK. Cette activation provoque la phosphorylation de la protéine STAT qui s'homodimérise et est transloquée et retenue dans le noyau. L'homodimère agira comme facteur de transcription des gènes *Pim* grâce à sa fixation sur le promoteur du gène *Pim* (Figure 5). L'activation du récepteur est transitoire. Quand plus aucun signal n'arrive au récepteur, celui-ci s'internalise et est ensuite dégradé par le lysosome et le protéosome[9].

L'activité des kinases Pim est dépendante et proportionnelle à la stabilité de l'ARNm[7]. Une fois produites, les kinases Pim ont une action rétroactive sur la voie JAK/STAT *via* l'activation de la voie SOCS (*Suppressor Of Cytokine Signaling*) ce qui permet donc une régulation de la voie d'activation JAK/STAT[10].

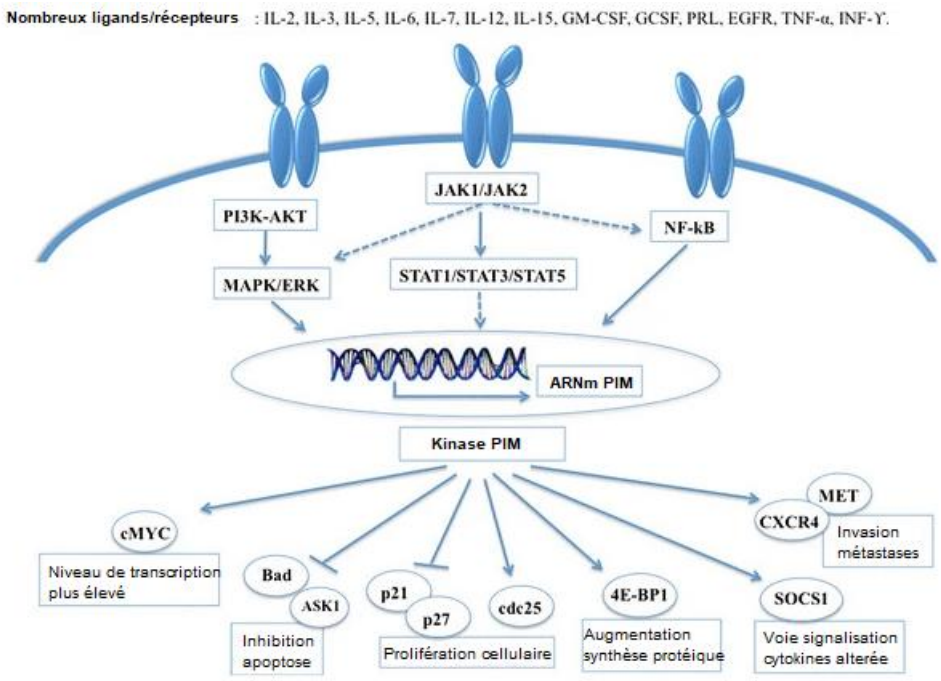


Figure 5. Voie d'expression des kinases Pim, d'après P.Mondello *et al.*, *Journal of Hematology and Oncology*, 2014.

C. Les kinases Pim en cancérologie

Des études ont montré une surexpression des kinases Pim dans certains cancers dans lesquels elles agissent comme facteurs de survie oncogénique. En effet, une surexpression de Pim-1 et Pim-2 est retrouvée dans les cancers hématopoïétiques alors qu'une surexpression de Pim-3 est, quant à elle, surtout retrouvée dans les cancers solides.

1. Exemples de mécanismes induisant la surexpression des kinases Pim

La surexpression des kinases Pim est une conséquence directe de différents dérèglements provenant de mutations en amont. En effet, dans le cas des cancers hématopoïétiques, on

peut citer le récepteur à tyrosine kinase FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*). FLT3 est un récepteur transmembranaire dont l'activation est régulée par différents ligands qui, une fois liés, vont permettre son homo-dimérisation. Cette homo-dimérisation a pour conséquence une autophosphorylation, elle-même à l'origine de cascades d'activation de différentes voies cellulaires comme la voie JAK/STAT énoncée précédemment, à l'origine de la transcription des gènes *Pim*. La mutation la plus fréquente de ce récepteur a pour conséquence une duplication interne en tandem (ITD). Ce nouveau récepteur FLT3-ITD est actif de façon constitutive et sera ainsi continuellement phosphorylé sans nécessiter de liaison aux ligands spécifiques (Figure 6). Cette mutation entraîne donc une surexpression des kinases Pim suite à l'activation constitutive des voies de signalisation médiées par FLT3-ITD[11]. Cette mutation est fréquente dans les leucémies myéloïdes aiguës (LMA) et est un marqueur de mauvais pronostic en cancérologie[12].

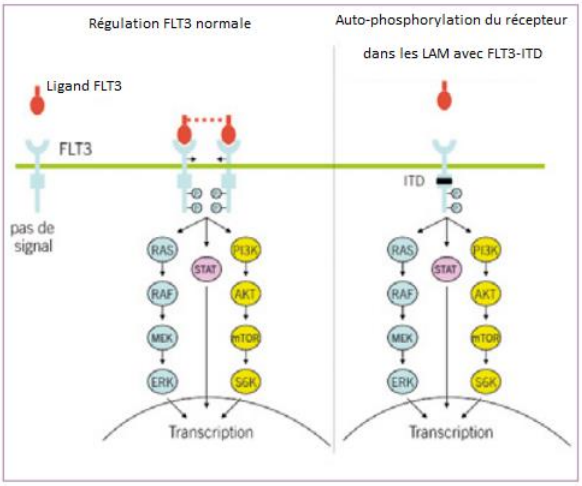


Figure 6. Duplication interne en tandem du récepteur FLT3, d'après J. P. Marie, *Horizons Hémato*, 2013.

La mutation de ce récepteur FLT3-ITD n'est cependant pas la seule anomalie à l'origine de la surexpression des kinases Pim. On peut citer par exemple le réarrangement chromosomique conduisant à la protéine de fusion BCR-ABL, retrouvée chez environ 95 % des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC). Cette oncoprotéine possède une activité kinase dérégulée, à l'origine de l'activation de multiples voies de signalisation responsables de la leucémogenèse, associée à la surexpression de Pim-1[13,14].

2. Conséquences de la surexpression des kinases Pim au sein des cellules cancéreuses

Les kinases Pim régulent à elles trois un certain nombre de phénomènes biologiques rendant alors leur surexpression préjudiciable, expliquant ainsi leur intérêt en tant que cibles thérapeutiques (Figure 7).

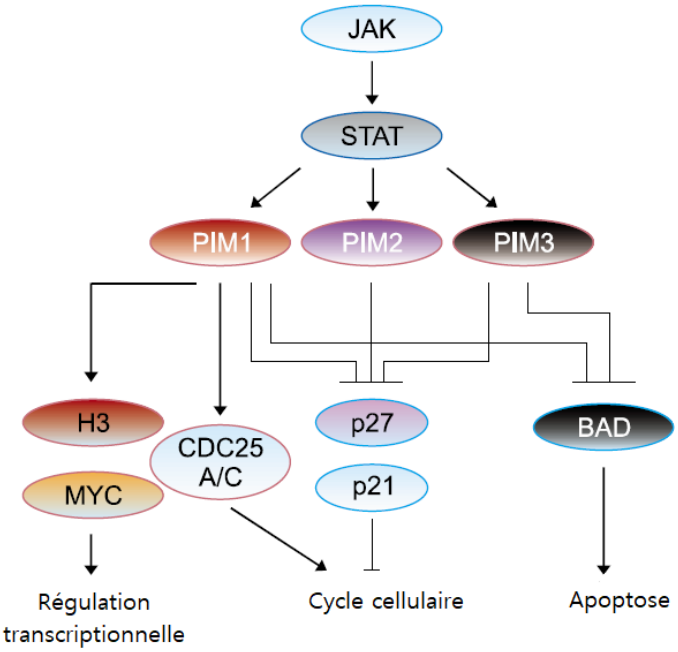


Figure 7. Actions cellulaires des kinases Pim, d'après X. Zhang *et al.*, *Journal of Cancer Prevention*, 2018.

2.1 Pim-1

Pim-1 est une kinase fortement exprimée dans les cellules hématopoïétiques[10]. Elle est impliquée, *via* différents substrats, dans le cycle cellulaire, la régulation transcriptionnelle ou encore l'apoptose (Figure 7).

Le cycle cellulaire est constitué de 4 phases (G1, S, G2 et M) qui sont régulées par un certain nombre de substrats responsables du bon déroulement de celui-ci. Par phosphorylation, les

kinases Pim-1 sont capables d'activer ou d'inhiber ces substrats. Parmi ces substrats, on peut mentionner :

- **Les CDC25** qui sont des phosphatases impliquées dans le cycle cellulaire. En effet, elles participent à l'activation des CDKs (*Cyclin-Dépendent Kinases*) qui permettent pour les CDC25A de passer de la phase G1 à la phase S. Pour ce qui est des CDC25C, l'action cumulée avec les protéines kinases C-TAK1 permet la régulation du passage de la phase G2 à M. La phosphorylation de C-TAK1 par Pim-1 empêche l'inhibition de CDC25C et permet donc la progression du cycle de la phase G2 à M[7,15].
- **Les P21 et P27** sont des protéines impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire. En effet, $P21^{cip1/waf1}$ inhibe la progression du cycle cellulaire mais sa phosphorylation par Pim-1 inhibe son action et permet ainsi la progression de celui-ci. $P27^{kip1}$ permet, quant à elle, d'arrêter le cycle cellulaire en phase G1, mais sa phosphorylation par Pim-1 entraîne son exclusion et sa dégradation[15].

La phosphorylation de ces différents substrats par Pim-1 favorise donc la progression du cycle cellulaire (Figure 8).

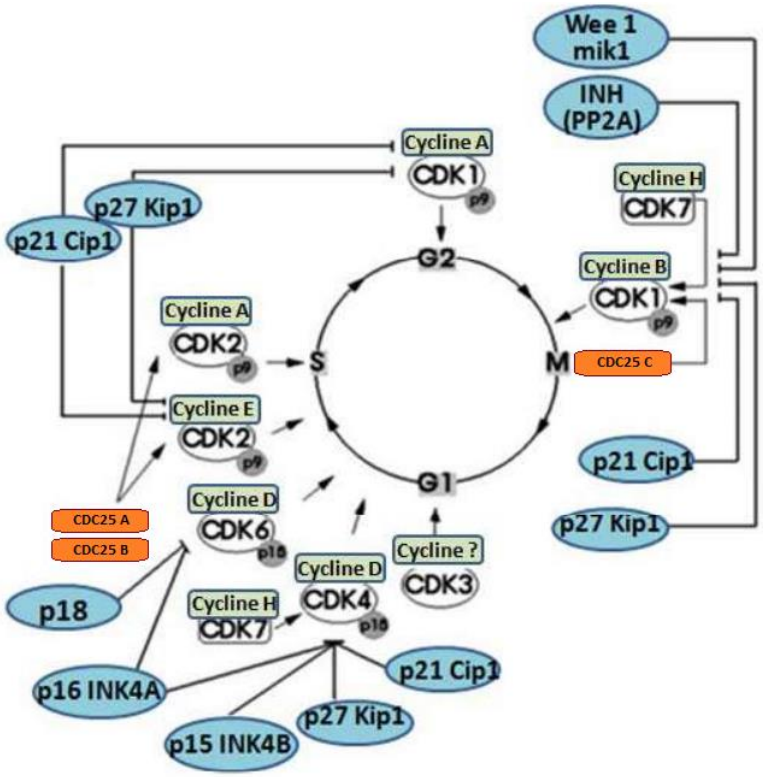


Figure 8. Cycle cellulaire, d'après S. C. Yahouédéhou *et al.*, JSSN, 2012.

Au-delà du cycle cellulaire, les kinases Pim ont aussi un impact sur la survie cellulaire du fait de leur action sur les protéines pro-apoptotiques BAD, qui font partie de la famille des Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) impliquées dans la mort cellulaire. Pim-1 va en effet pouvoir phosphoryler la protéine BAD, entraînant alors son inactivation et favorisant la survie cellulaire[15].

2.2 Pim-2

Pim-2 est plus fortement exprimée dans les cellules du cerveau ou lymphoïdes[5]. Des études ont montré que bien qu'il y ait une forte homologie de structure entre Pim-1 et Pim-2, celles-ci ont une activité différente bien que travaillant en parallèle. En effet, comme expliqué précédemment, Pim-1 a une action sur des substrats impliqués dans la régulation et la progression du cycle cellulaire alors que Pim-2 agirait surtout au niveau de la survie cellulaire en empêchant le signal apoptotique par la phosphorylation de différentes protéines régulatrices de l'apoptose[16].

2.3 Pim-3

Les kinases Pim-3 ont elles aussi une forte homologie aves les deux autres isoformes de Pim et sont également impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et la survie cellulaire. Néanmoins, contrairement à Pim-2 dont la forte abondance est retrouvée dans les cancers hématologiques comme les leucémies, Pim-3 est surtout surexprimée dans les cancers solides comme le cancer colorectal ou le cancer de la prostate[15,17].

3. Kinases Pim et chimiorésistance

Les trois points précédents ont montré l'implication des trois isoformes de Pim dans le cycle cellulaire et la survie. Néanmoins, des études ont aussi montré que la kinase Pim-1 jouait également un rôle dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques utilisés en clinique, réduisant ainsi leur l'efficacité.

En effet, Pim-1 peut interagir avec les *ATP-binding cassette* (ABC). Ce sont des protéines de transport transmembranaires qui permettent l'import/export unidirectionnel de substrats, majoritairement hydrophobes, hors de la cellule. Cette famille contient notamment la

glycoprotéine P (Pgp, *p-glycoprotein*, également appelée ABCB1 ou MDR1 (*multidrug resistance protein 1*)), le transporteur ABCG2 et la protéine BCRP (*breast cancer resistance protein*). La kinase Pim-1 est capable de phosphoryler ces transporteurs, augmentant ainsi leur stabilité et permettant d'accroitre leur multimérisation et leur expression membranaire, renforçant ainsi les mécanismes d'efflux des principes actifs liés à ces transporteurs[18,19].

L'ensemble des point précédents montre que les kinases Pim représentent des cibles d'intérêt en thérapeutique du fait de leur implication dans de nombreux processus cellulaires important, impliqués dans la cancérogenèse ainsi que dans la survenue de résistances aux chimiothérapies. Le développement d'inhibiteurs de ces kinases aura alors un intérêt double. En effet, leur utilisation comme agent thérapeutique en association au sein de protocoles de chimiothérapie permettra d'une part, de restaurer la chimio-sensibilité des cellules cancéreuses aux agents thérapeutiques utilisés en clinique à l'heure actuelle, mais aussi de diminuer l'impact de la surexpression des kinases Pim sur les processus biologiques qu'elles régulent et qui sont impliqués dans la cancérogenèse (Figure 9).

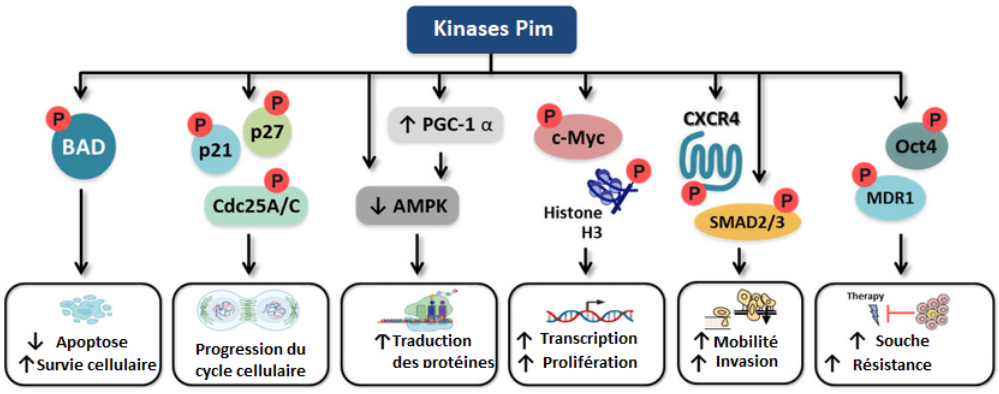


Figure 9. Impact des kinases Pim sur différents processus biologiques, J. R. Julson *et al.*, *Cancers*, 2022.

D. Structure des kinases Pim

Actuellement, seules les kinases Pim-1 et Pim-2 ont été cristallisées et seront détaillées dans les paragraphes ci-dessous.

1. Structure de Pim-1

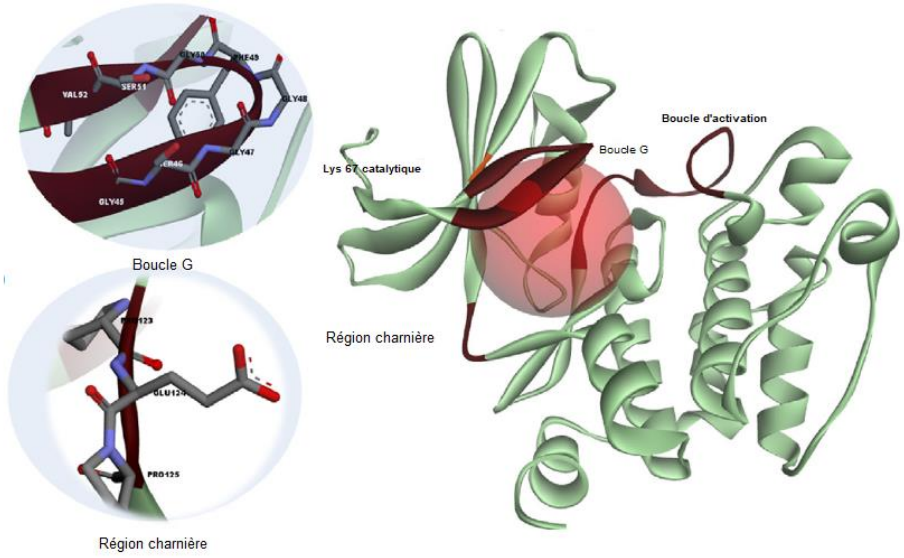


Figure 10. Structure de Pim-1, d'après S. Alnabulsi *et al.*, *Drug Discovery Today*, 2020.

Les analyses cristallographiques de Pim-1 montrent qu'elle est constituée de deux lobes comportant deux domaines terminaux. Un domaine carboxy-terminal (C-terminal, résidus 128-305) formé d'hélice α, et un domaine amino-terminal (N-terminal, résidus 33-121) composé principalement de feuillets β. Ces deux domaines sont reliés entre eux par une région charnière, appelée la région « *Hinge* » (résidus 121-126). La poche catalytique (résidus 29-131), site de fixation de l'ATP, se situe entre les deux lobes et est délimitée par la région charnière, la boucle G (résidus 44-52) riche en glycines et la boucle A (résidus 186-210) dite boucle d'activation (Figure 10)[20,21,22].

2. Caractéristiques des kinases Pim par rapport aux autres kinases :

La région charnière des kinases Pim possède des caractéristiques structurales que l'on ne retrouve pas dans les autres kinases. En effet, contrairement aux autres kinases qui sont capables de réaliser deux liaisons hydrogènes avec l'ATP, les kinases Pim ne peuvent en réaliser qu'une seule.

En effet, elles possèdent un résidu Proline, (en position 123, au sein de Pim-1) ne possédant pas de site donneur de liaisons hydrogène, qui empêche ainsi l'élaboration d'une liaison hydrogène avec le noyau adénine de l'ATP (Figure 11). Il n'existe donc plus qu'une seule liaison hydrogène entre le résidu glutamate de la région charnière (Glu121, au sein de Pim-1) et la fonction NH_2 de l'adénine de l'ATP. Cette particularité se retrouve au niveau des sites catalytiques des 3 isoformes de Pim.

Par ailleurs, les chaînes latérales des résidus prolines de la « *Hinge* » ainsi que d'autres acides aminés environnants (Ala65, Arg122, Leu44 et Leu174 au sein de Pim-1) forment une poche hydrophobe dans l'environnement de la région charnière, contrairement à ce que l'on peut observer au sein des autres kinases humaines[23].

Ces différences peuvent alors être exploitées afin de concevoir des inhibiteurs sélectifs de ces kinases.

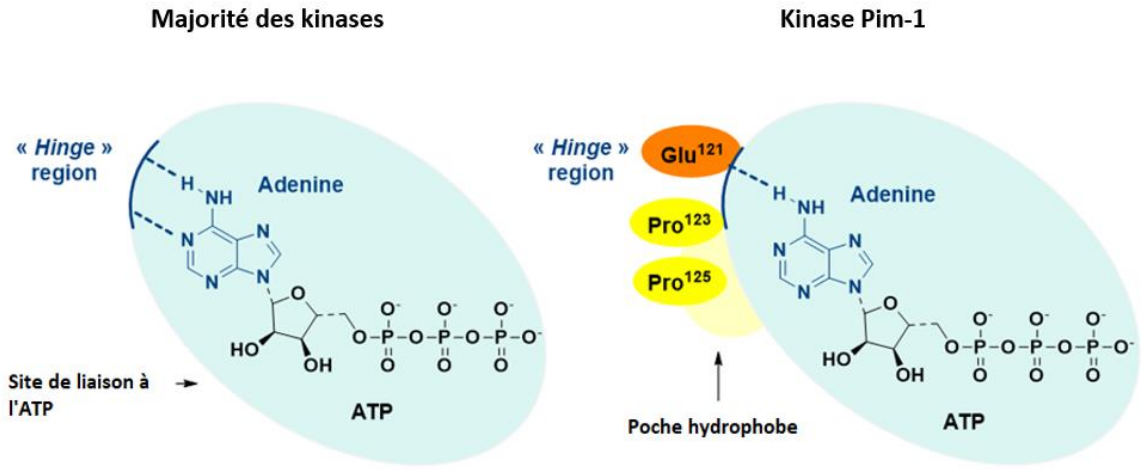


Figure 11. Spécificité de liaison de la kinase Pim-1 humaine à l'adénine de l'ATP par rapport à la majorité des autres kinases.

3. Structure de Pim-2

Comme énoncé précédemment, la structure de Pim-2 est très similaire à la kinase Pim-1, surtout au niveau de la région charnière (site de liaison à l'ATP). Les travaux de Bullock. A.

N montrent que les légères différences trouvées au niveau de la structure cristallographique ont surtout un impact sur la stabilité de la kinase (Figure 12)[24].

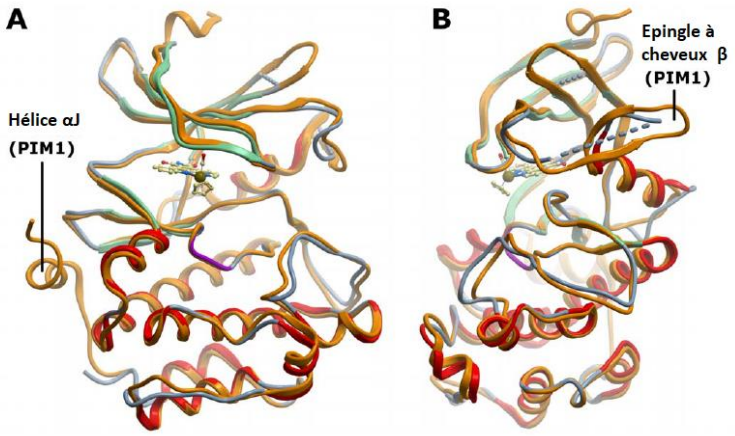


Figure 12. Comparaison de structure entre *Hs*Pim-1 (en orange) et *Hs*Pim-2 (Rouge pour l'hélice alpha et Vert pour feuillet béta), d'après A. N. Bullock *et al.*, *PlosOne*, 2009.

E. Inhibiteurs de Pim en cours de développement

Les particularités de structure des kinases Pim, leur forte homologie de structure, leur action à la fois combinée et compensatoire et leur rôle dans la régulation de voies de signalisation d'intérêt en cancérologie ainsi que dans les chimiorésistances, font de ces kinases des cibles thérapeutiques originales dans le cadre du développement de nouveaux composés anti-cancéreux. Par ailleurs, ces kinases Pim semblent jouer un rôle limité au sein des cellules saines puisque des souris knock-out pour les trois isoformes de Pim présentent peu de modifications phénotypiques (une diminution de la masse corporelle et des réponses modifiées aux facteurs de croissances hématopoïétiques ont été observées). De ce fait, de nombreux inhibiteurs de ces kinases sont actuellement en cours de développement. On retrouve principalement des inhibiteurs compétitifs de l'ATP, c'est-à-dire qui vont se fixer au niveau du site de fixation de l'ATP de ces kinases. Parmi ces inhibiteurs, il faut distinguer les inhibiteurs ATP-mimétiques, qui vont mimer l'interaction de l'adénine de l'ATP avec le résidu glutamate de la région charnière (Glu121 au sein de Pim-1), mais aussi les inhibiteurs non-mimétiques de l'ATP, qui présentent un mode de fixation atypique, caractérisé par l'absence d'interaction avec les acides aminés de la région charnière (le Glu121 pour Pim 1)[25].

A l'heure actuelle, un certain nombre d'inhibiteurs sont recensés et ont confirmé leur activité *in vitro* sur lignées cellulaires et également *in vivo* sur différents modèles de xénogreffes tumorales. Pour certains, des essais cliniques sont en cours. Quelques exemples des inhibiteurs les plus avancés dans leur développement vont être présentés dans les paragraphes suivants.

1. Imidazo[1,2-*b*]pyridazines

Le SGI-1776 (Figure 13) (*N*-((1-méthylpipéridin-4-yl)méthyl)-3-(3-(trifluorométhoxy)phényl)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-amine) est le premier inhibiteur pan-Pim recensé. Il agit comme inhibiteur compétitif de l'ATP. Il fait partie du groupe des inhibiteurs non-mimétiques. Il présente des CI_{50} (concentrations inhibitrices 50) de 7 nM, 363 nM et 69 nM pour Pim-1, Pim-2 et Pim-3, respectivement[15]. SGI-1776 agit en empêchant la croissance des lignées cellulaires leucémiques[26]. Le développement de ce composé a été arrêté du fait de la survenue d'une cardiotoxicité lors d'essais cliniques de phase I, liée à une inhibition des canaux hERG (*human Ether-à-go-go-Related Gene*) (NCT01239108).

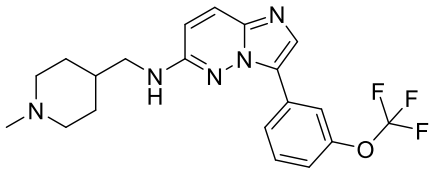


Figure 13. Structure du SGI-1776.

Le TP-3654 (SGI-9481) (Figure 14) (2-((1R,4R)-4-((3-(3-(trifluorométhyl)phényl)imidazo[1,2-*b*]pyridazin-6-yl)amino)cyclohexyl)propan-2-ol) est un inhibiteur non-mimétique de l'ATP actuellement en essai clinique de phase I et dérivé du SGI-1776. Il a été développé dans le but d'avoir une aussi bonne, voire meilleure activité que celle du SGI-1776 mais sans l'activité sur le canal potassique hERG, responsable de la toxicité cardiaque de ce dernier. L'étude a permis de montrer que cet inhibiteur avait une bonne affinité de liaison (Ki) pour Pim-1, Pim-2 et Pim-3 (Ki de 5 nM, 239 nM et 42 nM sur Pim-1, Pim-2 et Pim-3, respectivement) et un bon profil de sélectivité sur un panel d'autres kinases. De plus, il ne semble pas montrer d'activité sur le canal potassique hERG contrairement au SGI-1776[27]. Il a été testé dans un essai clinique de phase I dans des tumeurs solides avancées (NCT03715504). Il va également être

testé dans un essai clinique de phase I/II chez des patients atteints de myélofibrose, un syndrome myéloprolifératif (NCT04176198).

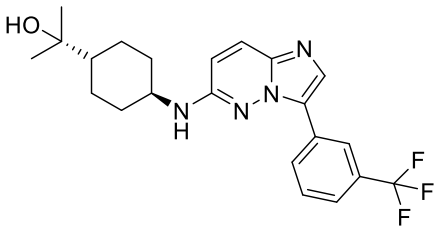


Figure 14. Structure du TP-3654.

2. Thiazolidine-2,4-dione

L'AZD1208 (Figure 15) ((5Z)-5-[[2-[(3R)-3-amino-1-pipéridinyl][1,1'-biphényl]-3-yl]méthylène]-2,4-thiazolidinedione) est un inhibiteur non-mimétique de l'ATP, pan-Pim, présentant une activité inhibitrice supérieure à celle du SGI-1776, avec des CI_{50} de 0,4 nM, 5,0 nM et 1,9 nM pour Pim-1, Pim-2 et Pim-3, respectivement[28], et un bon profil de sélectivité[5]. Son développement a cependant été arrêté du fait d'un manque d'efficacité lors d'essais cliniques[29].

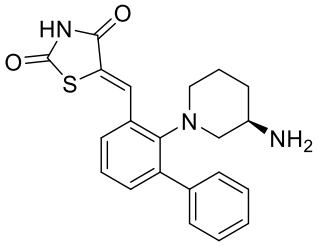


Figure 15. Structure de l'AZD1208.

3. 5-Fluoropicolinamides

Le LGH447 (PIM447) (Figure 16) *N*-(4-((1R,3S,5S)-3-amino-5-méthylcyclohexyl)pyridin-3-yl)-6-(2,6-difluorophényl)-5-fluoropicolinamide est un inhibiteur non-mimétique de l'ATP, sélectif pan-Pim ayant une CI_{50} de 95 nM, 522 nM et 369 nM sur Pim-1, Pim-2 et Pim-3, respectivement. LGH447 permet une diminution de la prolifération cellulaire grâce à son

impact sur la progression du cycle cellulaire. Il a été testé au cours de différents essais cliniques de phase I, Ib ou Ib/II, [30,31] notamment chez des patients atteints de myélome multiple (NCT02144038).

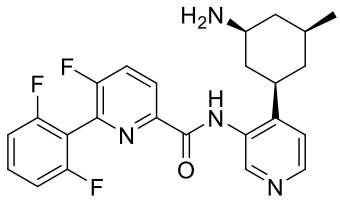


Figure 16. Structure du LGH447.

L'INCB053914 (Figure 17) *N*-((R)-4-((3R,4R,5S)-3-amino-4-hydroxy-5-méthylpipéridin-1-yl)-7-hydroxy-6,7-dihydro-5*H*-cyclopenta[*b*]pyridin-3-yl)-6-(2,6-difluorophényl)-5-fluoropicolinamide est un inhibiteur non-mimétique de l'ATP, dérivé du PIM447. Il présente une bonne activité inhibitrice, avec des CI_{50} de 0,24 nM, 30 nM et 0,12 nM pour Pim-1, Pim-2 et Pim-3, respectivement, et est sélectif vis-à-vis d'un panel d'autres kinases (> 50). Il permet l'inhibition d'un certain nombre de substrats impliqués dans le développement de cancers, comme par exemple l'inhibition de la phosphorylation de la protéine BAD impliquée dans la survie cellulaire dans le cas des LMA[32]. Il a été testé en essai clinique de phase Ib ou II, seul ou en association chez des patients atteints d'hémopathies malignes avancées (NCT02587598)[33].

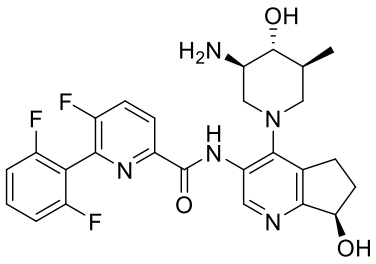


Figure 17. Structure du INCB053914.

4. Benzo[*d*]imidazole

Le SEL24-B489 (Figure 18) (5,6-dibromo-4-nitro-2-(pipéridin-4-yl)-1-(propan-2-yl)-1*H*-1,3-benzodiazole) est un inhibiteur double à la fois de FLT3-ITD (*FMS-like tyrosine kinase-*

3 internal tandem duplication) et des kinases Pim. Les études ont montré une bonne activité inhibitrice de ce composé sur les trois isoformes de Pim (Kd (constante de dissociation) de 2 nM, 2 nM et 3 nM sur Pim-1, Pim-2 et Pim-3, respectivement)[34]. Il est actuellement en essai clinique de phase clinique I/II chez des patients atteints de LMA (NCT03008187).

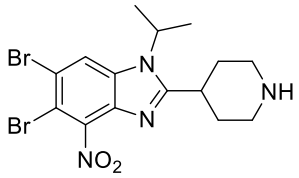


Figure 18. Structure du SEL24-B489.

5. Diaminopyrazole

Le GDC-0339 (Figure 19) 5-amino-*N*-(5-((4R,5R)-4-amino-5-fluoroazépan-1-yl)-1-méthyl-1*H*-pyrazol-4-yl)-2-(2,6-difluorophényl)thiazole-4-carboxamide est un inhibiteur mimétique de l'ATP avec une activité dans les myélomes multiples. Il présente une bonne activité sur les trois isoformes de Pim, avec des constantes d'inhibition (Ki) de 0,03 nM, 0,1 nM et 0,02 nM pour Pim-1, Pim-2 et Pim-3, respectivement[35].

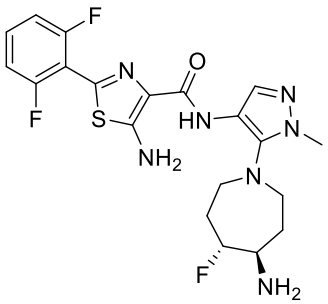


Figure 19. Structure du GDC-0339.

Parmi les nombreux inhibiteurs de Pim développés, les inhibiteurs non-mimétiques de l'ATP, dont le comportement augmente leur spécificité vis-à-vis des kinases Pim, se sont révélés être les plus efficaces et sont les inhibiteurs privilégiés dans la conception de nouveaux composés à visées thérapeutiques dans le domaine de l'oncologie.

OBJECTIFS

I. Contexte de la recherche

A. Kinases Pim et Leucémies

Les parties précédentes ont permis de démontrer l'importance des kinases Pim et de leur surexpression en cancérologie. Durant ces travaux de thèse, nous allons nous intéresser plus particulièrement à la surexpression des kinases Pim dans le cadre des leucémies myéloïdes aiguës (LMA).

La LMA est une maladie du sang qui est liée à la multiplication incontrôlée de blastes anormaux envahissant la moelle osseuse. Celle-ci ne peut alors plus fonctionner correctement et, notamment, assumer la production des cellules sanguines normales. Les blastes diffusent alors dans le sang de façon massive et induisent une insuffisance médullaire (neutropénie fébrile, syndrome anémique, syndrome hémorragique). Les symptômes peuvent inclure fatigue, infections ou saignements.

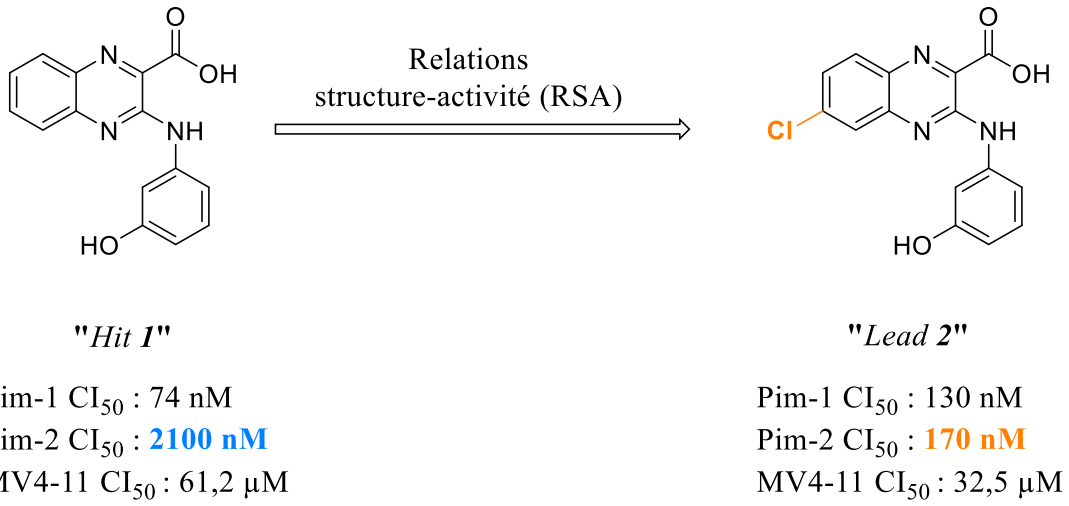
Cette maladie a une incidence de l'ordre de 2,5/100 000 et augmente avec l'âge. L'âge médian est de 62 ans.

Les traitements comprennent de la chimiothérapie ou parfois une greffe de cellules souches de moelle osseuse à l'origine de nombreux effets indésirables. Ces dernières années, des thérapies ciblées ont également vu le jour, permettant une prise en charge sur mesure pouvant améliorer la survie des patients.

Dans ce contexte, comme vu précédemment, une surexpression des kinases Pim-1 et Pim-2 a été observée dans les LMA, faisant de ces deux isoformes des cibles d'intérêt pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans ces hémopathies.

B. Travaux antérieurs

Des travaux préliminaires effectués au sein du laboratoire IMT du GICC de Tours ont consisté en la réalisation d'un criblage de 30 composés de la chimiothèque du GICC sur un panel de 14 kinases de mammifères, incluant les kinases Pim-1 humaine (*Homo sapiens (Hs)Pim-1*). Les résultats ont permis d'identifier une nouvelle molécule « *Hit* » : l'acide quinoxaline-2-carboxylique **1**. Cette molécule est capable d'inhiber, *in vitro*, l'activité enzymatique de *Hs*Pim-1 à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (CI_{50} de 74 nM) mais posséde une activité plus modérée à l'égard des *Hs*Pim-2 (CI_{50} de 2100 nM) (Figure 20).



"*Hit* ***1***"

Pim-1 CI_{50} : 74 nM
Pim-2 CI_{50} : **2100 nM**
MV4-11 CI_{50} : 61,2 µM

"*Lead* ***2***"

Pim-1 CI_{50} : 130 nM
Pim-2 CI_{50} : **170 nM**
MV4-11 CI_{50} : 32,5 µM

Figure 20. Hit 1 et Lead 2.

Les programmes de recherche de l'équipe IMT étant portés sur le développement de nouvelles thérapies ciblées pour le traitement de différentes hémopathies malignes, et considérant le potentiel des kinases Pim-1 et Pim-2 comme cibles thérapeutiques dans les leucémies[10], les travaux de recherche ont été orientés vers le développement d'inhibiteurs doubles des kinases Pim-1 et Pim-2. Une étude de pharmacomodulation a donc été réalisée autour du modèle structural du composé **1** afin d'optimiser cette molécule et, notamment, son niveau d'activité sur Pim-2. Ces travaux ont été réalisés au cours de la thèse de doctorat de Bruno Oyallon, de 2016 à 2019 au sein du laboratoire IMT. Ils ont permis la synthèse de 46 nouveaux analogues dont 4 composés inhibant les kinases *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2 *in vitro* avec des CI_{50} de l'ordre du

submicromolaire[30,36]. La molécule chef de file **2** (« *Lead **2*** ») a ainsi été identifiée. Elle possède une activité améliorée sur *Hs*Pim-2 (CI_{50} de 170 nM), avec une CI_{50} environ 12 fois inférieure à celle observée avec le composé Hit **1** (Figure 20), mais 3 fois supérieure à celle de la molécule de référence LGH447 (CI_{50} de 0,52 µM sur *Hs*Pim-2). Ce composé conserve, par ailleurs, un bon niveau d'activité sur *Hs*Pim-1 avec le même niveau d'activité que le LGH447 (CI_{50} de 0,10 µM sur *Hs*Pim-1) sur cette isoforme. Cependant, le profil de sélectivité de cet inhibiteur pourrait être amélioré car il présente une inhibition résiduelle sur les kinases DYRK1A et GSK3β humaines à de faibles concentrations micromolaires[30,36]. Par ailleurs, l'activité du *lead **2*** sur la lignée cellulaire MV4-11 de leucémie myéloïde aiguë humaine, surexprimant les kinases Pim-1 et Pim-2, s'est avérée inférieure à celle observée avec le LGH447 (CI_{50} de 0,13 µM sur MV4-11) (Figure 20). Les travaux préliminaires ont également permis d'établir des relations structure-activité (RSA) et de démontrer le rôle crucial de l'acide carboxylique en position 2 pour l'observation d'une activité inhibitrice à l'égard des kinases Pim, confirmant ainsi les études de modélisation moléculaire réalisées sur ce composé.

Des études de *docking* (arrimage) (Figure 22) ont ainsi été réalisées par le Dr. C. Logé (IICIMED-UR1155, Nantes) sur le composé chef de file **2** au sein du site ATP de *Hs*Pim-1 (PDB ID 3A99) en utilisant le programme GOLD (GOLD version 4.0, CDCC, Cambridge). Ces travaux ont permis de montrer que le composé **2** établissait un pont salin clé entre la fonction carboxylate en position 2 du noyau quinoxaline et la fonction amine protonée de la chaîne latérale du résidu Lys67 catalytique. Cette fonction carboxylate effectue aussi une liaison hydrogène avec le groupement NH du résidu Asp186 (acide aspartique 186), acide aminé impliqué dans les interactions avec les groupements phosphates de l'ATP. Par ailleurs, ce composé réalise une liaison hydrogène entre sa fonction hydroxyle (au niveau du cycle phénolique) et le carbonyle du résidu Asn172 (Asparagine 172) (Figure 21).

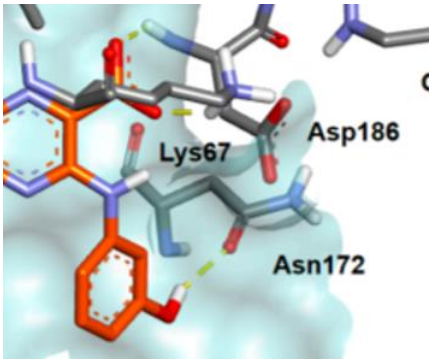


Figure 21. Illustration des interactions entre le chef de file 2 et la kinase Pim-1. Les liaisons hydrogènes sont indiquées par des lignes jaunes (PDB ID : 3A99).

Enfin, ces études ont permis de mettre en évidence que le chlore en position 6 du composé **2** était orienté vers la poche hydrophobe, dans l'environnement de la région charnière, formée par les résidus Leu 44 (résidu de la P-loop), Ala 65, Arg122, Val 126 et Leu174, conduisant ainsi à augmenter les interactions de van der Waals à ce niveau.

Ces travaux suggèrent donc que le composé **2** pourrait se comporter comme un inhibiteur compétitif de l'ATP, avec un mode de fixation non-mimétique de l'ATP.

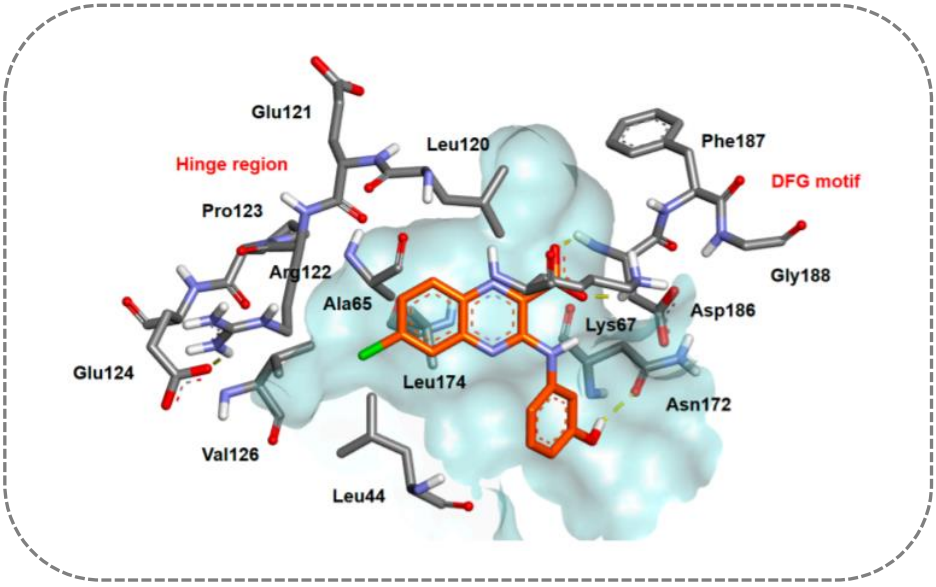


Figure 22. Illustration du possible mode de liaison du composé 2 au sein du site ATP de la kinase *Hs*Pim-1. Les liaisons hydrogènes sont indiquées par des lignes jaunes (PDB ID : 3A99).

II. Objectifs de la thèse

L'objectif de ce projet de thèse est de développer des inhibiteurs doubles des kinases Pim-1 et Pim-2, présentant un profil de sélectivité amélioré à l'égard d'un panel de potentielles kinases *off-target* ainsi qu'une meilleure activité cellulaire.

Afin d'optimiser ces deux paramètres (sélectivité et activité cellulaire), nous avons envisagé d'utiliser la technique de macrocyclisation en partant du modèle structural du composé chef de file **2**. L'intérêt de cette stratégie en chimie médicinale sera présenté dans le chapitre ci-dessous.

A. Intérêt des macrocycles en pharmacochimie

Les macrocycles sont des molécules cycliques généralement caractérisées par un enchaînement de chaînons carbonés (12 ou plus en général) entrecoupés d'au moins trois hétéroatomes[37]. Les structures macrocycliques sont retrouvées dans de nombreux produits naturels comme par exemple l'hémoglobine, la vitamine B12 ou encore la chlorophylle. Le premier macrocycle synthétique a été produit en 1886 par A. Baeyer et consiste en la condensation du pyrrole et de l'acétone en présence d'acide chlorhydrique[38].

Les différentes études réalisées sur les dérivés macrocycliques montrent le grand intérêt de ces structures vis-à-vis de leurs analogues acycliques. En effet, la macrocyclisation permet un degré de liberté réduit, diminuant ainsi l'entropie de la molécule et donc le nombre de conformations possibles. La pré-organisation des atomes permet à ceux-ci de pouvoir interagir plus fortement et sélectivement avec leur cible. Ce n'est que récemment que les macrocycles, en tant que nouveaux candidats médicament, ont émergé. En effet, leur nouveauté et leur difficulté de synthèse représentent un challenge[39]. De plus, le développement de nouvelles molécules thérapeutiques s'efforce de respecter les règles de Lipinski qui ne sont pas toujours respectées avec les macrocycles[40]. Néanmoins, à l'heure actuelle, plusieurs molécules macrocycliques sont tout de même utilisées en thérapeutique. On peut citer par exemple le temsirolimus (TORISEL®) qui est un composé hémisynthétique obtenu par estérification du sirolimus (ou rapamycine) et qui agit comme anticancéreux, en inhibant la kinase mTor (*mammalian target of Rapamycin*). On peut aussi citer l'éribuline (HALAVEN®), une cétone macrocyclique synthétique, analogue simplifié de l'halichondrine B (composé naturel), qui est agent tubulo-affin, utilisé comme

anticancéreux ou le lorlatinib (LORVIQUA®) qui est le 1er inhibiteur de tyrosine kinase macrocyclique dirigé contre les kinases ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) et utilisé dans les cancers bronchiques non à petites cellules ALK+[41].

1. Amélioration de l'activité sur la cible

Par rapport à une molécule non macrocyclique, la macrocyclisation entraîne une diminution de liberté conformationnelle due à la réduction de liberté de rotation des atomes. Les outils *in silico* actuels peuvent donc s'appuyer sur le faible nombre de conformations possibles pour développer une molécule cyclique dont la conformation va permettre la parfaite interaction entre la molécule et sa cible. En effet, contrairement aux molécules plus flexibles (acycliques) qui peuvent avoir différentes conformations, la macrocyclisation diminue ce degré de liberté tout en gardant un degré de flexibilité suffisant pour diminuer le coût entropique et favoriser les interactions avec la cible. Ces deux paramètres sont contrôlés par la taille du macrocycle. Si le chaînon n'est pas suffisamment grand, le degré de liberté sera trop faible pour que la molécule se place dans une conformation favorable, elle perdra alors de son efficacité. Cependant, s'il est trop grand, son entropie et le nombre de conformations possibles seront trop importants et l'efficacité en sera également impactée[37]. Si l'on prend l'exemple des travaux des Z. F. Tao *et al.*, portant sur le développement d'inhibiteurs de Chk1(*Checkpoint kinase 1*, elle coordonne la réponse aux dommages sur l'ADN, et la réponse aux points de contrôle du cycle cellulaire), leurs études mettent en évidence l'impact du nombre de maillons du chaînon carboné sur l'activité inhibitrice du macrocycle. En effet, à partir de 14 maillons, plus la taille du chaînon augmente, moins l'activité inhibitrice est importante du fait de l'augmentation du degré de liberté occasionnée par l'addition de liaisons rotatives[42].

2. Amélioration de la sélectivité

Bien que dans certains cas l'activité des composés ne soit pas grandement impactée par la macrocyclisation, elle permet néanmoins d'augmenter drastiquement la sélectivité des candidats médicaments vis-à-vis de potentielles autres cibles délétères. Cette sélectivité représente un enjeu majeur dans l'élaboration de nouvelles molécules thérapeutiques, notamment, dans le développement d'inhibiteurs de kinases.

En effet, si l'on prend l'exemple des kinases, du fait de leurs fortes homologies structurales, notamment au niveau de leur site de fixation de l'ATP, qui, rappelons-le, est très souvent ciblé par les inhibiteurs de kinases, un bon profil de sélectivité est indispensable pour ne pas aussi agir sur des cibles *off-target*. Les travaux de J. A. Amrhein et son équipe permettent de mettre en évidence l'intérêt de la macrocyclisation pour l'augmentation de la sélectivité. En effet, leur étude permet de montrer que les molécules macrocycliques comme le lorlatinib, présenté précédemment, sont bien plus sélectives vis-à-vis de l'ensemble des autres kinases que leur analogues acyclique (R-crizotinib) comme le montre leurs différences de profil d'inhibition du kinome représenté dans la Figure 23. Cela montre encore le grand intérêt de la synthèse de molécules macrocycliques dans le but d'identifier de nouveaux candidats médicaments (Figure 23)[41].

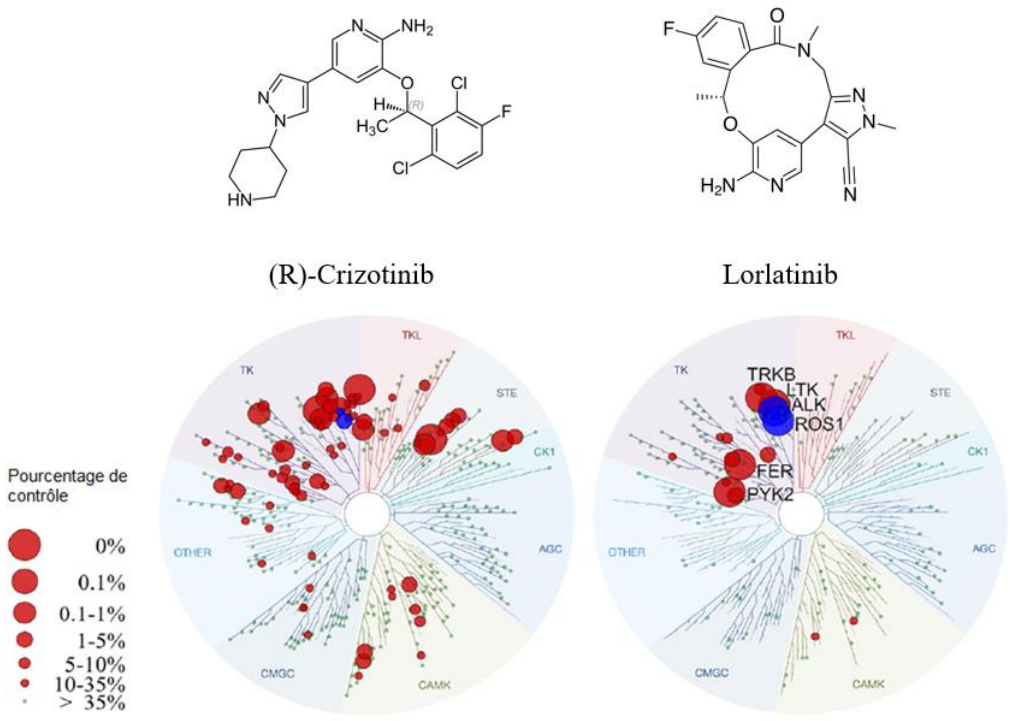


Figure 23. Comparaison du R-crizotinib acyclique et du lorlatinib macrocyclique vis-à-vis de leur sélectivité respective sur le kinome humain, d'après J. A. Amrhein *et al.*, *J. Med. Chem*, 2021.

3. Modulation de la perméabilité

La perméabilité a une grande importance vis-à-vis de l'efficacité d'un composé. En effet, la majorité d'entre eux agissent sur des cibles intracellulaires et ont donc besoin de traverser les membranes pour être actifs[43]. Les molécules actives peuvent traverser les membranes cellulaires de façon active (*via* des transporteurs nécessitant de l'énergie) ou passive (pas diffusion, portée par un gradient de concentration). Cette perméabilité peut être améliorée *via* la modification d'un certain nombre de paramètres comme par exemple, la conformation de la molécule, sa basicité ou encore la modification d'un seul atome de la molécule.

Certaines études ont montré qu'en plus d'une amélioration de l'efficacité et de la sélectivité, la macrocyclisation permettait, *via* la diminution du degré de liberté, d'augmenter la perméabilité membranaire. En effet, plus une molécule possède un faible degré de liberté, plus la perméabilité cellulaire serait bonne.

Il est cependant à noter que les propriétés physicochimiques et métaboliques sont des paramètres qui vont être très impactés par la taille du macrocycle[37]. Les travaux de Zapf *et al.* montrent effectivement que la taille du cycle, sa fonctionnalisation ou encore le niveau de contrainte stérique ont non seulement un impact sur l'activité d'une molécule mais aussi sur sa solubilité et sa perméabilité. La fonctionnalisation du cycle permet elle aussi une amélioration non négligeable de ces deux paramètres en fonction des groupements introduits[37].

4. Originalité structurale

En plus de permettre une amélioration de l'activité sur la cible, de la sélectivité vis-à-vis d'un panel d'autres kinases ou une modulation des propriétés ADMET, la macrocyclisation permet d'apporter une originalité structurale importante dans le domaine de la chimie médicinale. Le développement de nouveaux candidats médicaments basés sur la macrocyclisation permet l'ouverture vers une diversité structurale plus large, ce qui est intéressant en terme de propriété intellectuelle.

5. Quelques exemples d'inhibiteurs macrocycliques pan-Pim

Des travaux ont été réalisés par V. J. Cee et son équipe sur la synthèse de nouveaux macrocycles inhibiteurs des kinases Pim, synthétisés à partir d'un analogue acyclique possédant une bonne activité inhibitrice sur Pim-1 et Pim-2. Les auteurs expliquent que l'amélioration de l'activité sur Pim-1 et Pim-2 observée sur les analogues macrocycliques, est due à la stabilisation de la conformation de la molécule, apportée par la macrocyclisation, et à l'apport de nouvelles interactions avec le site actif de la kinase comme les interactions de van der Waals engendrées par le nouveau lien (Figure 24)[44].

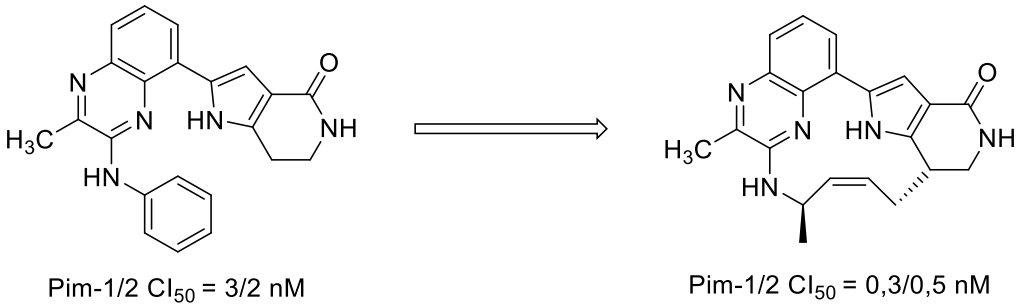


Figure 24. Comparaison de l'activité sur les kinases Pim1/2 d'un inhibiteur acyclique et de son analogue cyclique, d'après V. J. Cee *et al.*, ACS *Med. Chem. letters*, 2016.

D'autres équipes comme J. Xu *et al.*[45] ou encore S. M Gonzales *et al.*[46] ont récemment publié des articles montrant l'importance de la macrocyclisation dans le cadre du développement d'inhibiteurs de kinases Pim. Pour l'instant, à notre connaissance, aucun des inhibiteurs macrocycliques présentés dans cette partie n'a été testé dans le cadre d'essais cliniques. Ces exemples permettent de bien mettre en avant les avantages décrits précédemment et d'appuyer le challenge pharmaceutique vis-à-vis de la synthèse de nouveaux potentiels candidats médicaments.

B. Pharmacomodulations envisagées

Les inhibiteurs acycliques des kinases Pim-1 et Pim-2 développés précédemment au sein du laboratoire, présentaient une très bonne activité sur les kinases Pim-1 et Pim-2 mais

manquaient de sélectivité et d'activité sur lignées cellulaires leucémiques. Le chapitre ci-dessus a permis de montrer que la macrocyclisation permettait d'augmenter la sélectivité et d'améliorer les propriétés ADMET des macrocycles par rapport à leurs analogues acycliques. Cette stratégie a donc été appliquée afin d'optimiser les inhibiteurs développés par B. Oyallon.

Pour l'élaboration des macrocycles cibles de cette thèse, deux approches ont été développées en partant à chaque fois du modèle structural du composé chef de file **2**. Ces deux approches ont été guidées par des études *in silico* en partant de l'acide quinoxaline-2-carboxylique, *scaffold* du composé **2** (Figure 25).

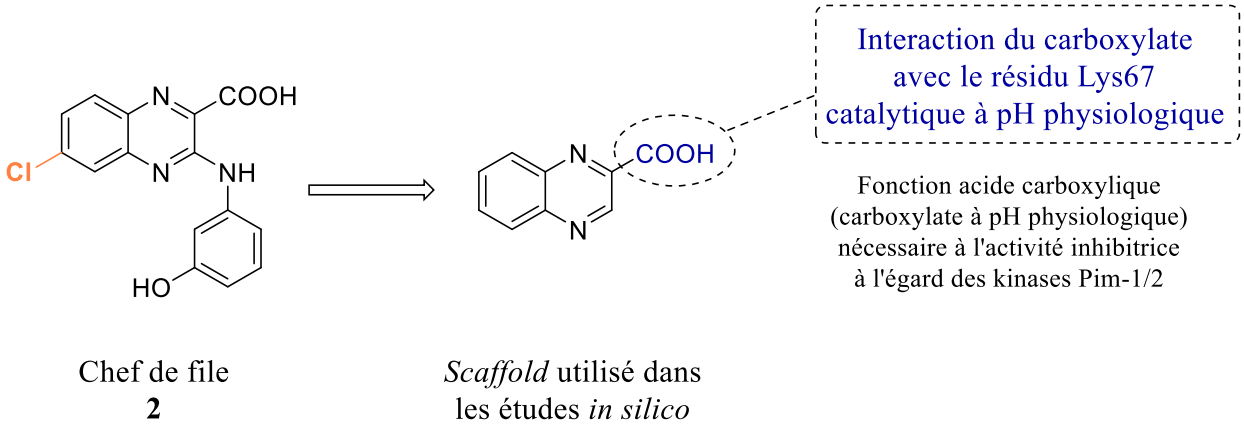
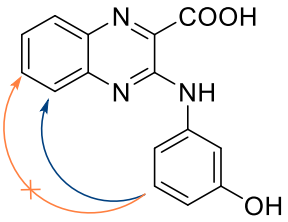


Figure 25. *Scaffold* ayant permis l'élaboration des différents macrocycles.

1. Approche 1 : conception guidée par le docking

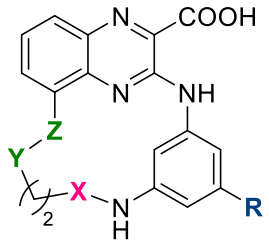
Pour concevoir ces macrocycles, nous sommes partis de la structure du composé **2** et avons envisagé une fermeture de cycle entre le noyau phényle en position méta et les positions 5 ou 6 du noyau quinoxaline, le but étant de bloquer la structure de l'inhibiteur dans une conformation active en se basant sur les études *in silico* réalisées au cours des travaux préliminaires et présentées précédemment (Figure 26).



Macrocyclisation du
chef de file **2**

Figure 26. Macrocyclisation à partir du chef de file 2.

Différents types de liens chimiques de type amidique ou aminé ont été envisagés afin de réaliser cette macrocyclisation. Leur choix a été effectué en fonction de différents critères et notamment en tenant compte de la faisabilité chimique et du LogP des macrocycles obtenus. Par ailleurs, nous avons fait varier la longueur du lien afin de déterminer sa taille idéale en fonction des données du docking. Enfin, concernant la pharmacomodulation sur le noyau aniline, nous avons envisagé d'étudier l'impact de la fonction phénol, présente sur le composé chef de file **2**, au sein de ces séries macrocycliques. Ainsi, le modèle d'étude général présenté ci-dessous a été établi (Figure 27).



R : H, OH
X : C=O, CH_2
Y-Z : C≡C, CH=CH, CH_2-CH_2

Figure 27. Modèle d'étude général de l'approche 1.

Les composés cibles ont ensuite été dockés au sein du site ATP de la kinase Pim-1 humaine (PDB ID 3A99 et 4ALU) par le Dr. C. Logé (IICIMED-UR1155, Nantes) afin de sélectionner les macrocycles les plus intéressants.

Ces études ont montré que les macrocycles qui se positionnaient le mieux au sein du site ATP de la kinase Pim-1 humaine étaient ceux possédant 14 chaînons (C14) avec un lien

réalisant la fermeture de cycle en position 5 du noyau quinoxaline. Les macrocycles présentés dans la Figure 28 ont ainsi été sélectionnés pour être synthétisés dans le cadre du travail de pharmacomodulation de l'approche 1.

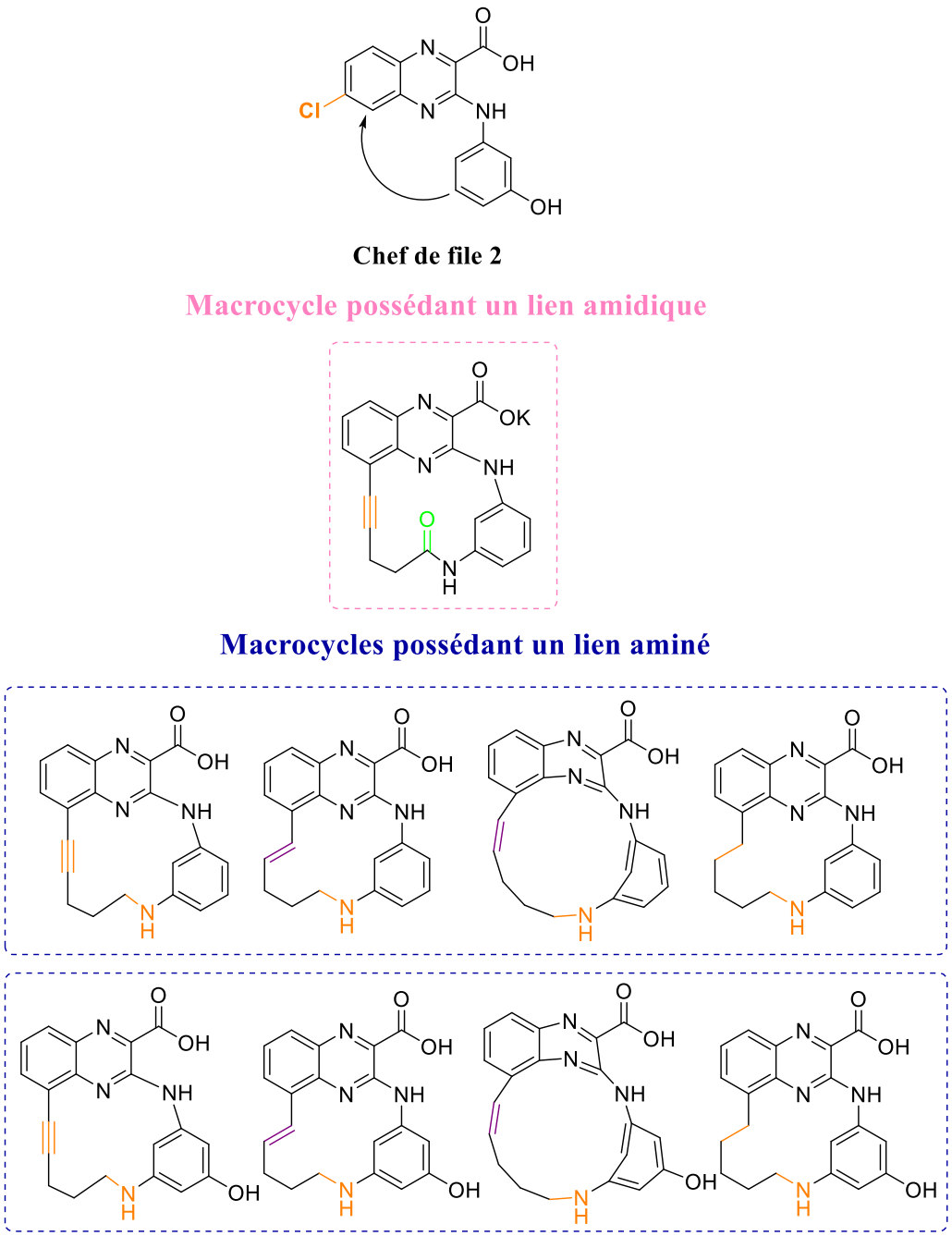


Figure 28. Macrocycles cibles sélectionnés pour la synthèse dans le cadre de l'approche 1.

2. Approche 2 : conception par criblage de fragments (*Fragment-based drug design (FBDD)*)

Les travaux de l'approche 2 ont été effectués au sein du laboratoire Bioinformatique Structurale et Chémoinformatique (SB&C) de l'UMR 7311 ICOA (Institut de Chimie Organique et Analytique), au cours de la thèse de doctorat de Gautier Peyrat de 2019 à 2021. Au cours de cette thèse, un logiciel basé sur les fragments pour la conception d'inhibiteurs de protéines kinases nommé Frags2Drugs a été développé. Ce logiciel permet la création d'inhibiteurs de protéines kinases à partir de fragments issus des données expérimentales. Ces travaux ont fait l'objet d'une collaboration active, entre les laboratoires IMT et SB&C, qui a bénéficié de deux financements du Labex SynOrg, pour le financement de cette thèse et pour celle de Gautier Peyrat. L'objectif du logiciel Frags2Drugs est d'aider les chimistes médicinaux à prioriser les molécules inhibitrices à synthétiser. Pour cela, des fragments initiaux d'intérêt dont les chimistes médicinaux maîtrisent la synthèse, appelés échafaudages, sont utilisés comme point de départ pour un agrandissement (ou « *growing* ») par ajout successifs de fragments. Ces échafaudages ou fragments initiaux sont également appelés « graines ».

Pour la conception des macrocycles de ce projet, 4 graines (*seeds*) (Figure 29) ont été utilisées contenant le squelette acide quinoxaline-2-carboxylique et choisies en fonction des données des RSA et du *docking* issus de travaux préliminaires.

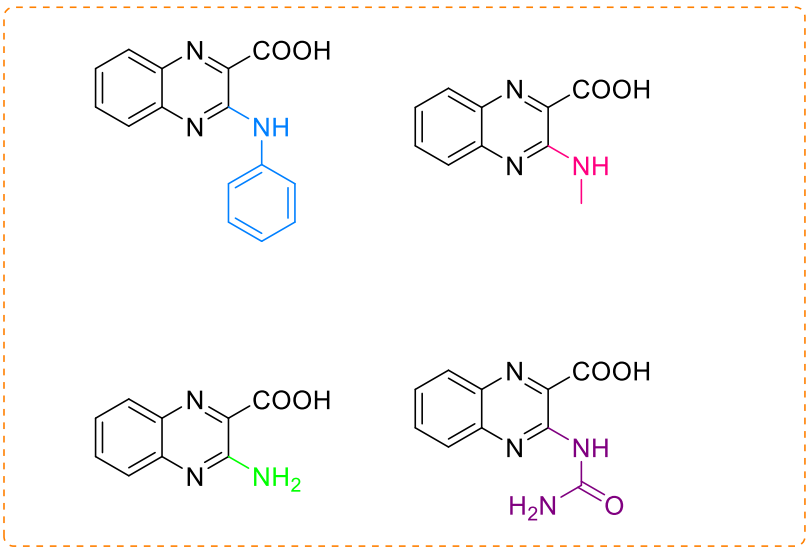


Figure 29. Les quatre graines utilisées pour la conception de macrocycles par FBDD.

Ces graines ont été dockées au sein du site actif de la kinase Pim-1 (PDB ID 3A99), c'est-à-dire qu'elles ont été positionnées, arrimées, dans le site actif de la protéine. Les 4 conformations respectant la proximité entre l'acide carboxylique de la graine et la lysine catalytique (Lys67) et possédant les niveaux d'énergie les plus faibles (déterminés par des fonctions de scores) ont été sélectionnées pour la poursuite de l'agrandissement par ajout de fragments. Ces 4 poses ont donc constitué les graines initiales de ce travail.

L'objectif était alors d'ajouter de nouveaux atomes, groupements fonctionnels ou d'autres fragments à la graine initiale de manière à augmenter le nombre d'interactions que le ligand forme avec sa cible. Pour cela, il a fallu identifier des vecteurs d'agrandissement indiquant une direction vers laquelle grandir à partir d'une position de la graine. Dans notre cas, la position 3 du noyau quinoxaline de la graine a été sélectionnée, en se basant sur les RSA et les études *in silico* réalisées au cours des travaux préliminaires. En effet, elles démontrent qu'une fois que l'acide quinoxaline-2-carboxylique est correctement positionné dans le site actif de la kinase Pim-1, en établissant une liaison avec la lysine catalytique 67, il existe un espace suffisant au niveau du site actif de la kinase pour effectuer un agrandissement en position 3. Le logiciel a ensuite été modifié pour obtenir uniquement des macrocycles lors de l'agrandissement. Pour ce travail, et contrairement à la méthode utilisée pour concevoir des molécules acycliques, nous n'avons pas procédé par différentes étapes d'ajout d'un fragment puis de sélection, les macrocycles ont été obtenus directement.

Ainsi F2D a pu identifier 205 macrocycles contenant de 11 à 15 maillons. Parmi ces molécules, 176 étaient composées de 3 fragments et 29 de 4 fragments. Ces macrocycles ont ensuite été filtrés selon les valeurs de leurs descripteurs moléculaires.

Les filtres utilisés ont été les filtres « *PKI-like* » issus de la PKIDB (*Protéine Kinase Inhibition Database*). Les paramètres de ces filtres s'inspirent de la règle des cinq (*Rule of five* (RO5)) de Lipinski qui permet d'évaluer la probabilité qu'une molécule, administrée par voie orale, ait une bonne biodisponibilité[47]. Elle s'appuie sur les descripteurs suivants :

- La masse molaire exprimée en g/mol (*MW*).
- Le nombre de groupements donneurs de liaisons hydrogènes (*hydrogen bond donnors*, HBD).
- Le nombre de groupements accepteurs de liaisons hydrogènes (*hydrogen bond acceptors*, HBA).

- Le coefficient de partage octanol/eau, calculé *in silico* (cLogP).

Depuis leur parution au début des années 2000, les règles de Lipinski ont été agrémentées de paramètres supplémentaires, notamment par Veber[48], tels que :

- Le nombre de liaisons rotables (*Number of Rotable Bonds*, NRB).
- La surface topologique (*Topological Polair Air Surface*, TPSA), en angström² (Å²).

Les filtres « *PKI-like* » comportent deux paramètres supplémentaires :

- Le nombre de noyaux aromatiques (*Number of Aromatic Rings*, NAR).
- Le nombre d'atomes chiraux (*Number of Chiral Atoms*, NCA).

Les valeurs seuils de ces paramètres sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau 1).

Tableau 1. Valeurs seuils des descripteurs physico-chimiques attendues dans la RO5, la régle de Veber et dans les filtres "*PKI-like*".

Descripteurs	**RO5 et Veber**	***PKI-like***
MW (g/mol)	≤ 500	314-613
HBD	≤ 5	0-4
HBA	≤ 10	3-10
cLogP	≤ 5	0,7-6,3
NRB	≤ 10	1-11
TPSA (Å²)	≤ 140	55-138
NAR	Non concerné	1-5
NCA	Non concerné	0-2

La Figure 30 montre la distribution des descripteurs moléculaires calculés pour les 205 molécules macrocycliques obtenues dans Pim-1[49]. Comme pour la règle RO5, 2 violations sur 8 des règles du filtre « *PKI-like* » ont été autorisées.

Il faut noter qu'aucun des macrocycles obtenus ne contient de sous-structures PAINS (*Pan Assay INterference compounds*), c'est-à-dire capables d'induire des liaisons non spécifiques, covalentes, des réactions d'oxydo-réduction, de l'auto-fluorescence ou des

dégradations. Les macrocycles ont ensuite été sélectionnés selon leur score de faisabilité de synthèse (SA, *Synthetic Accessibilité Score*). Pour prendre en compte la complexité plus élevée de la synthèse des macrocycles, le seuil du score SA a été modifié. Les molécules ayant un score < 5 ont ainsi été conservées (au lieu d'un score SA < 4 sur les projets faisant intervenir des molécules non macrocycliques). Ainsi, après application de cette contrainte, à partir des 205 macrocycles identifiés précédemment, 61 ont été sectionnés, possédant un score SA < 5.

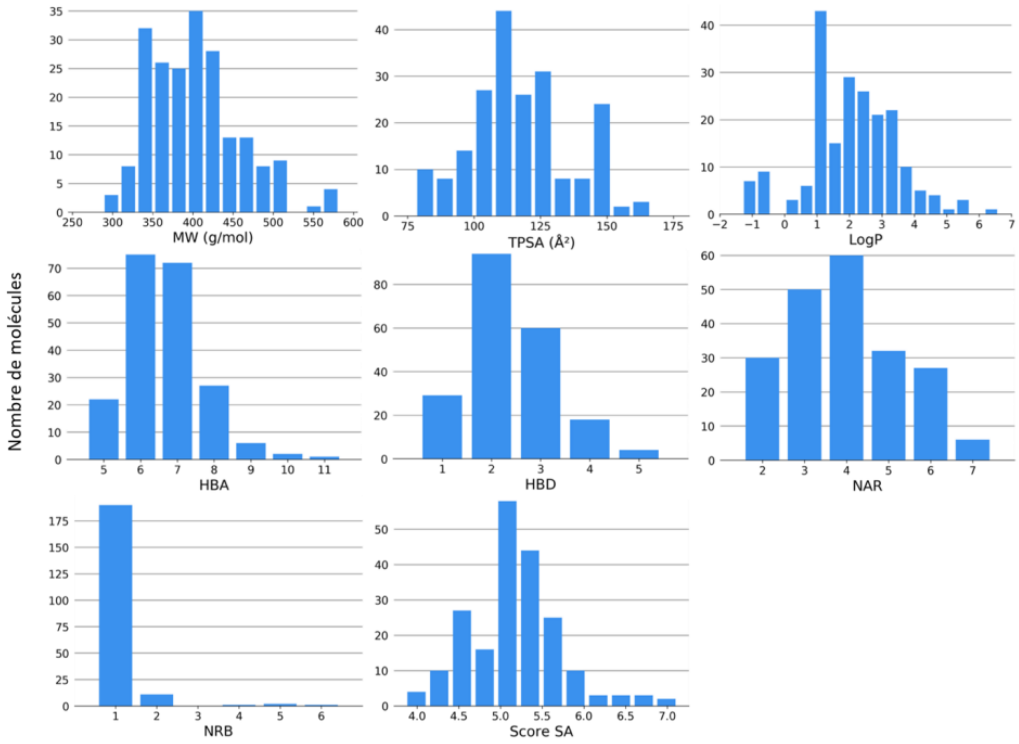
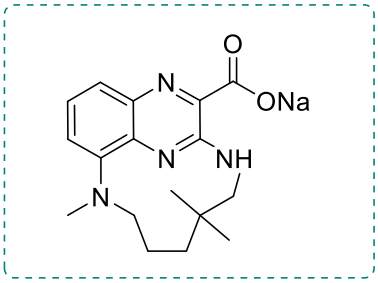


Figure 30. Distributions des descripteurs moléculaires calculés sur les 205 macrocycles obtenus dans Pim-1, Thèse de Gautier Peyrat, Conception d'inhibiteurs de protéines kinases à partir de méthodes *in silico* basées sur les fragments, 2021.

Enfin, les poses prédites par simulation de docking pour les 61 molécules ont été comparées à leurs positions 3D venant de l'assemblage des fragments du logiciel Frags2Drugs. Ainsi, 24 macrocycles ont été finalement sélectionnés possédant un RMSD (*Root Mean Square Deviation*, écart quadratique moyen) < 3,5 Å. Après étude des différents macrocycles proposés, nous avons décidé de concentrer nos efforts sur celui qui nous semblait le plus simple à synthétiser. Néanmoins, les réactifs de départ commerciaux nécessaires à sa synthèse ayant un coût

élevé, nous avons pris l'initiative de mettre au point la synthèse sur des analogues simplifiés dans un premier temps (Figure 31).

Macrocycle cible sélectionné obtenu par la logiciel Frags2Drugs



Macrocycles simplifiés

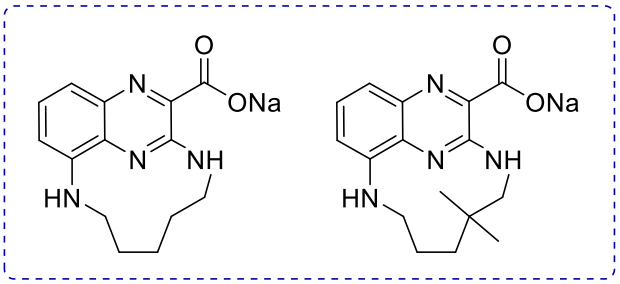


Figure 31. Macrocycles sélectionnés pour la synthèse dans le cadre de l'approche 2.

C. Conclusion

Les deux études *in silico* réalisées pour chacune des deux approches ont ainsi permis d'élaborer 12 macrocycles différents. Ces molécules ont comme points communs un noyau quinoxaline et la fonction acide carboxylique en position 2 (fonction carboxylate à pH physiologique), permettant la formation d'interactions cruciales au sein des kinases Pim, importante pour l'activité inhibitrice de ces composés.

ETUDE CHIMIQUE

I. Aperçu bibliographique

A. Formation du noyau quinoxaline

Les quinoxalines sont des molécules qui ont fait l'objet de nombreuses études du fait de leurs différentes propriétés biologiques. En effet, les molécules dérivées des quinoxalines possèdent des activités antimicrobiennes, antibactériennes, antivirales ou encore antitumorales. Ces diverses propriétés confèrent à ces molécules un intérêt particulier dans la recherche de nouveaux médicaments. (Figure 32)[50].

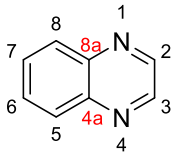


Figure 32. Noyau quinoxaline.

Les quinoxalines sont des molécules aromatiques ayant des propriétés semblables à celles des pyrazines, possédant deux azotes en position 1 et 4. L'ensemble des formes mésomères du Schéma 1 montre que les positions 2, 4, 5, 7 et 8a sont déficientes en électrons[51].

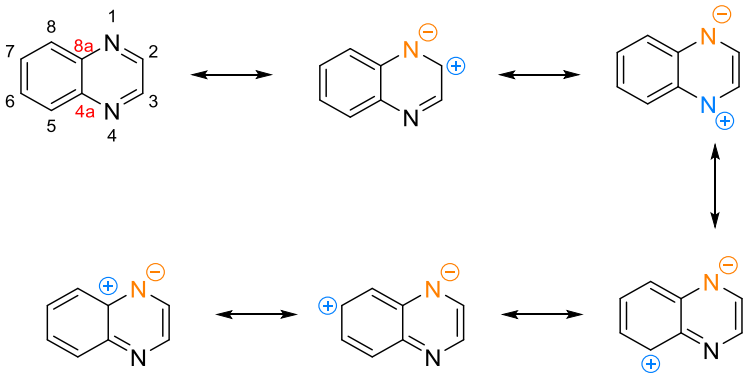


Schéma 1. Formes mésomères du noyau quinoxaline, issue de G. Yashwantrao *et al.*, *Org. Chem. Front.*, 2021.

La synthèse de ce noyau peut se faire de différentes manières (Figure 33) selon 4 grandes catégories de réactions chimiques :

- Les réactions de condensation (Figure 33. Méthodes B, E, F, G).
- La réaction de Schmidt (Figure 33. Méthode C).
- La condensation oxydante (Figure 33. Méthode D).
- La deshydrogénation oxydante (Figure 33. Méthode A).

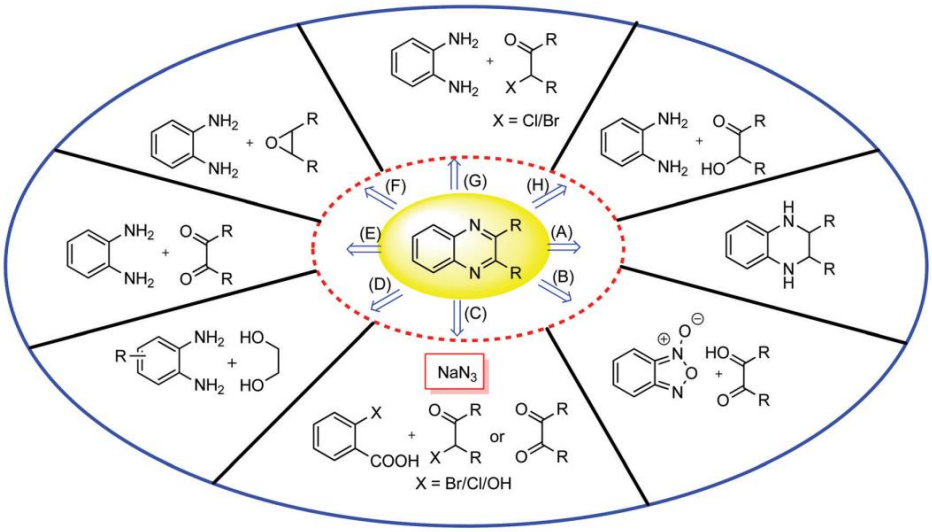


Figure 33. Les différentes voies de formation du noyau quinoxaline. Figure issue de G. Yashwantrao et *al.*, *Org. Chem. Front.*, 2021.

1. Les réactions de condensation

La synthèse du noyau quinoxaline peut être réalisée par condensation entre un dérivé d'*o*-phénylènediamine et un composé dicarbonylé, catalysée par un acide de Lewis ou de Brønsted (Schéma 2)[52] (Figure 33. Méthode E). La formation de ce noyau a alors lieu selon une double addition-élimination suivant le mécanisme décrit dans le Schéma 3.

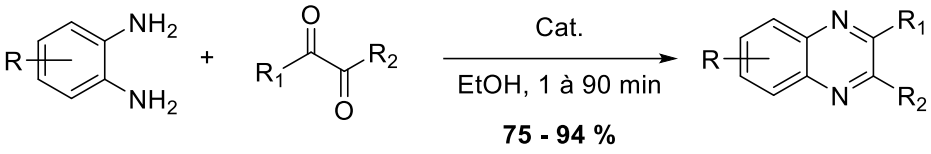


Schéma 2. Obtention du noyau quinoxaline polysubstitué par condensation selon la méthode de R. Mahesh *et al.*, *Chin. Chem. Lett.*, 2011.

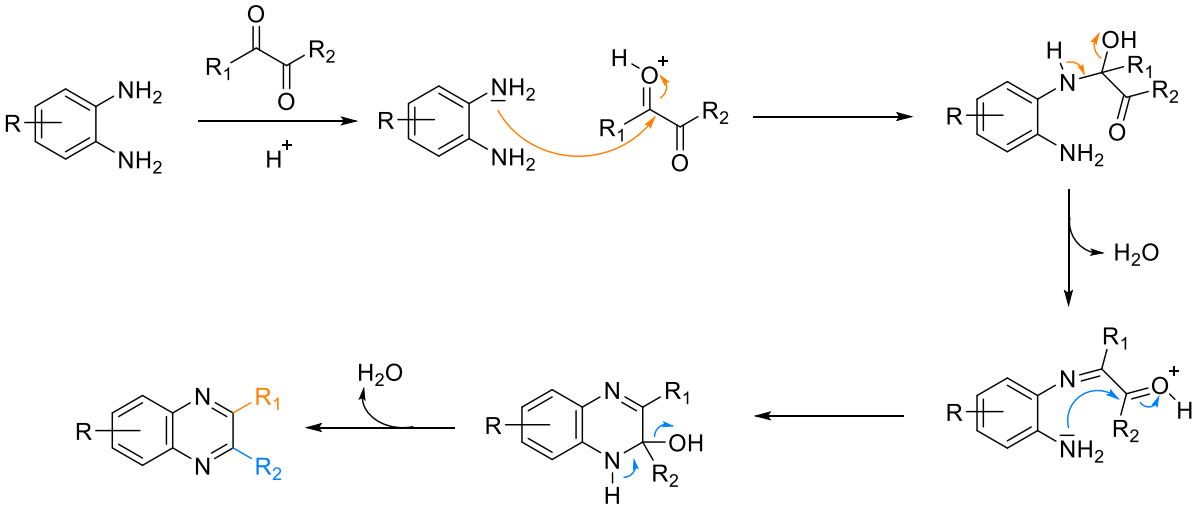


Schéma 3. Mécanisme réactionnel de formation du noyau quinoxaline par réaction de condensation.

Elle peut également se faire en faisant réagir sur des dérivés d'*o*-phénylènediamine des halogénocétones (Figure 33. Méthode G). Les travaux de B. Das *et al.*[53] mettent ainsi en avant cette réaction avec des 1,2-diamines aliphatiques, alicycliques et aromatiques sur lesquelles réagissent des α-bromocétones en présence d'acide perchlorique supporté par de la silice ($HClO_4.SiO_2$) qui sert de catalyseur (vert et réutilisable), à température ambiante, selon un mécanisme proposé de cyclisation-oxydation. Cette réaction sur la phénylènediamine permet l'obtention de dérivés de quinoxaline substitués en position 2 (Schéma 4)[54].

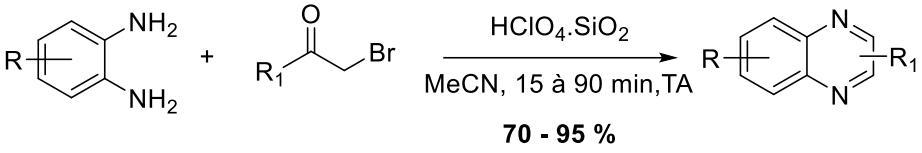


Schéma 4. Cyclisation-oxydation d'une *o*-phénylènediamine avec un dérivé d'*α*-bromocétone.

Les travaux de Takano *et al.*[55] décrivent, quant à eux, la synthèse du noyau quinoxaline à partir d'un dérivé de chlorure d'acyle et d'un dérivé aminé-nitré, par attaque de l'amine sur le carbonyle du chlorure d'acyle, cyclisation intramoléculaire avec formation d'un intermédiaire non stable *N*-oxyde suivie d'une désoxygénation (Schéma 5).

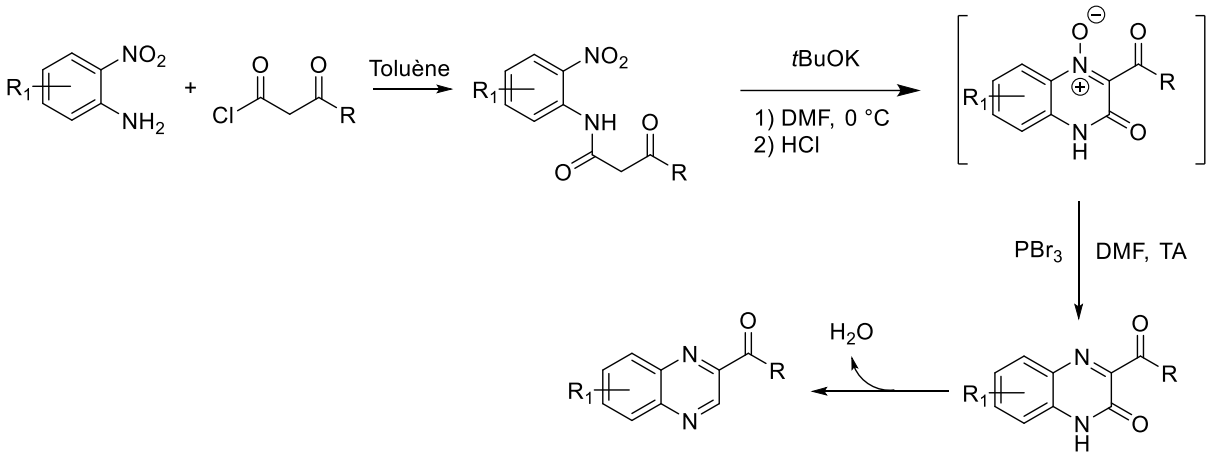


Schéma 5. Exemple de formation du noyau quinoxaline selon la méthode décrite par Takano *et al.*

2. La réaction de Schmidt

La réaction se fait à partir d'un précurseur différent de l'*o*-phénylènediamine. En effet, dans cette réaction, le réactif de départ est un acide benzoïque halogéné en *ortho* (Figure 33. Méthode C). Il s'agit d'une réaction multicomposants monotope en présence d'azoture de sodium et d'un acide ou d'un catalyseur de cuivre (Cu (II))[56] (Schéma 6).

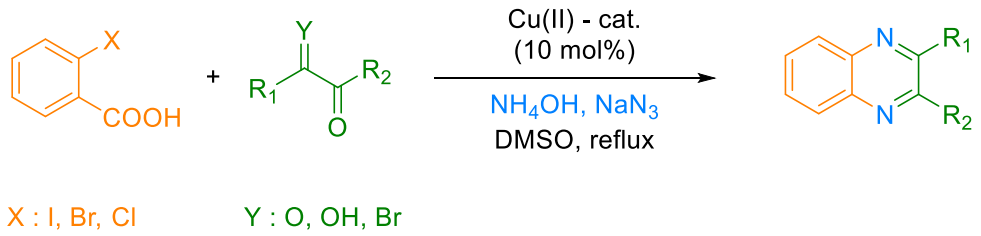


Schéma 6. Schéma général de la réaction de Schmidt.

Traditionnellement, la réaction de Schmidt est une réaction qui permet la transformation d'un acide carboxylique en amine primaire en présence d'azoture de sodium et d'acide. Cependant, les travaux de B. Saha *et al.* décrivent la formation du noyau quinoxaline selon la réaction de Schmidt se faisant en présence d'azoture de sodium et d'un catalyseur de cuivre. Les 5 premières étapes permettent la formation de l'*o*-phénylenediamine selon la réaction de Schmidt, puis le noyau quinoxaline est formé par réaction de condensation par exemple avec une *vic*-dicétone substituée permettant l'obtention de quinoxalines substituées en positions 2 et 3 (Schéma 7)[56].

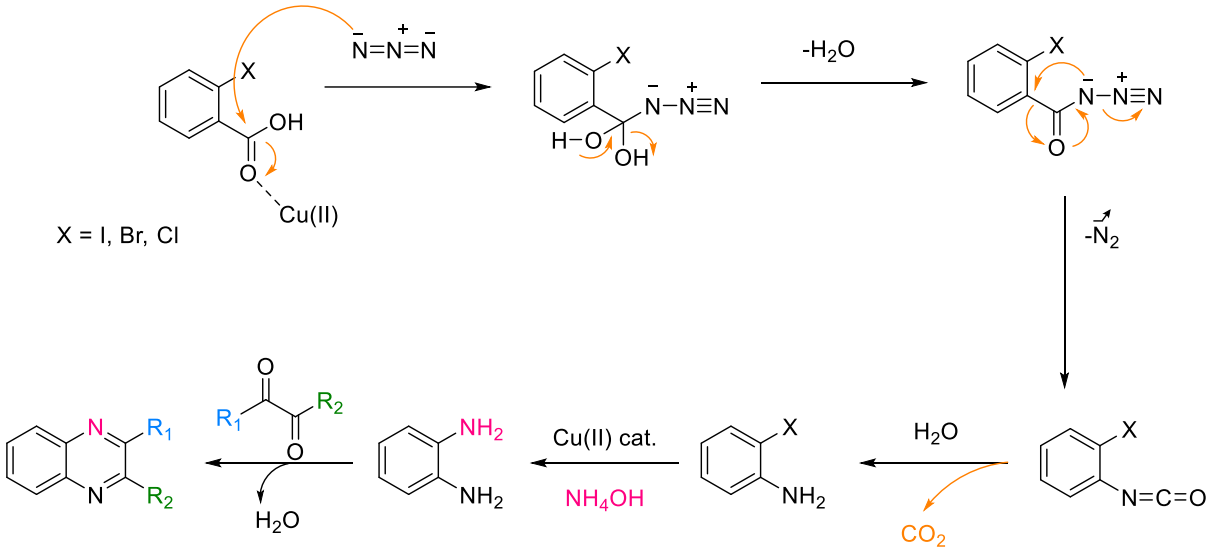


Schéma 7. Mécanisme proposé de formation du noyau quinoxaline par la réaction de Schmidt.

3. La condensation oxydante

Les travaux de M.J. Climent et de son équipe montrent que la synthèse du noyau quinoxaline peut se faire *via* l'utilisation d'un 1,2 diol disubstitué comme réactif de départ qui va être oxydé en 1,2-dicétone en présence de dioxygène (Figure 33. Méthode D). Cette réaction nécessite l'utilisation d'un catalyseur qui peut être composé de nanoparticules d'or ou de césium par exemple. Une fois le réactif de départ oxydé, celui-ci est condensé avec l'*o*-phénylènediamine donnant ainsi le noyau quinoxaline substitué en positions 2 et 3 (Schéma 8)[57].

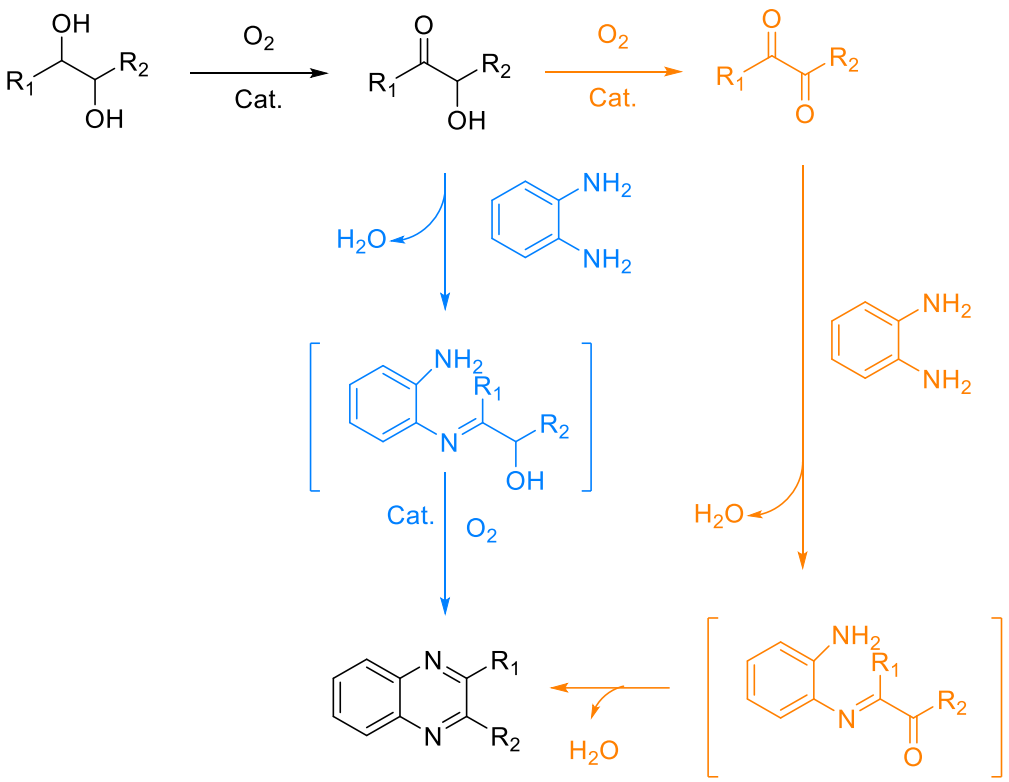


Schéma 8. Mécanisme de formation du noyau quinoxaline par réaction de condensation oxydante.

4. La déshydrogénation oxydante

Cette méthode consiste en la déshydrogénation de la tétrahydroquinoxaline pour former le noyau quinoxaline. La formation de la tétrahydroquinoxaline se fait à partir de l'*o*-phénylènediamine et du 1,2-dichloroéthane en présence de chlorure de tétrabutylammonium (TBACl)[58]. Une fois le noyau formé, une déshydrogénation oxydante a lieu grâce à l'utilisation de métaux de transition comme le cuivre ou le cobalt par exemple en présence de dioxygène (Schéma 9)[51].

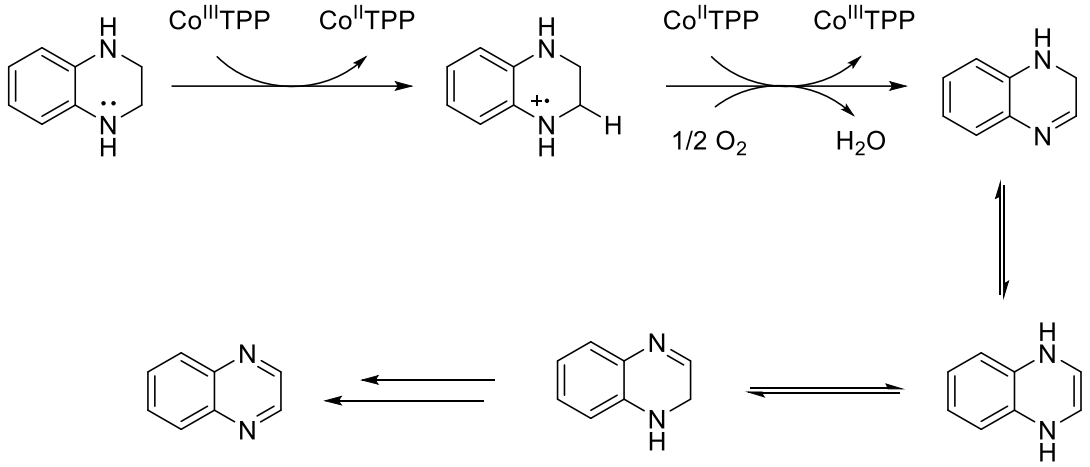


Schéma 9. Exemple de déshydrogénation oxydante, figure issue de G. Yashwantrao *et al.*, *Org. Chem. Front.*, 2021.

B. Fermeture de cycle par macrocyclisation

Malgré le grand intérêt que présentent les macrocycles en termes notamment d'amélioration de l'activité et de la sélectivité, leur synthèse reste un défi chimique. Depuis quelques années, de nombreuses études se sont attardées sur leur élaboration et ont pu montrer que différentes réactions chimiques pouvaient être utilisées afin de réaliser une macrocyclisation intramoléculaire (Figure 34).

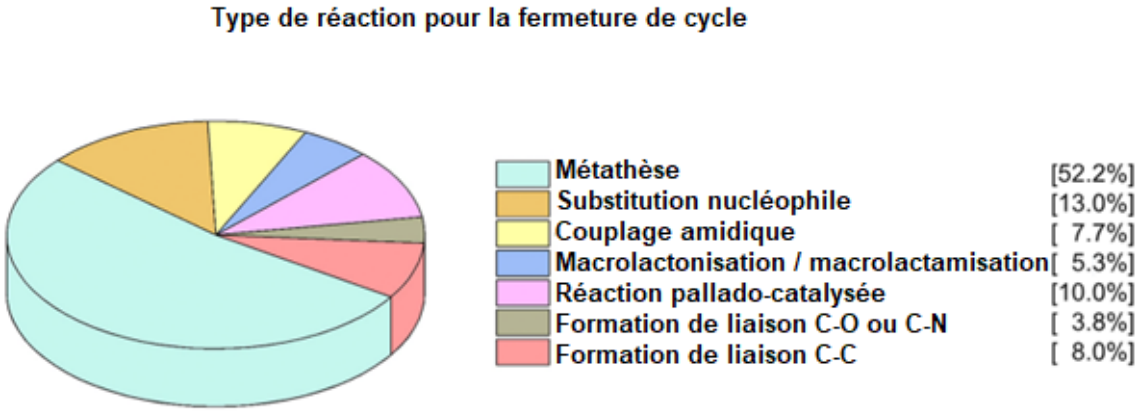


Figure 34. Proportion des différents types de fermeture possibles. D'après J. A. Amrhein *et al.*, *J. Med. Chem*, 2021.

Parmi les réactions possibles, la fermeture de cycle par métathèse (entre deux alcènes terminaux) est la plus courante et représente plus de 50 % des réactions de macrocyclisation, suivie par la fermeture par substitution nucléophile représentant 13 % d'entre elles. Les couplages pallado-catalysés représentent, quant à eux, 10 % des réactions de fermeture. Parmi ces couplages, la fermeture de cycle par couplage de Heck est la plus fréquemment observée, suivie par les couplages de Suzuki et de Buchwald-Hartwig[41].

Le plus gros défi lors d'une fermeture de cycle est lié au fait qu'elle fait intervenir deux groupements terminaux qui doivent se trouver dans une conformation favorable de manière à favoriser la fermeture intramoléculaire au détriment d'une dimérisation, c'est-à-dire la réaction entre deux molécules entraînant la formation d'un dimère. Pour favoriser la fermeture intramoléculaire, il existe deux possibilités. Les réactions peuvent ainsi se faire en conditions diluées, de manière à favoriser les réactions intramoléculaires plutôt qu'intermoléculaires, ou encore *via* l'utilisation de substrats pouvant induire une conformation préférentielle favorisant la fermeture intramoléculaire.

Nous nous attarderons plus particulièrement sur l'étude bibliographique des trois principales réactions de fermeture dans le chapitre suivant.

1. Fermeture par réaction de métathèse

La réaction de métathèse comme fermeture de cycle consiste en la réaction entre deux alcènes terminaux catalysés par un métal de transition (généralement un catalyseur au ruthénium comme le catalyseur de Grubbs de 1ère ou 2nde génération) selon le schéma général suivant (Schéma 10). L'un des avantages de cette fermeture de cycle est la grande variété de fonctionnalisations possibles mais son gros désavantage est le faible contrôle entre les deux isomères Z et E pouvant être obtenus après la fermeture[41].

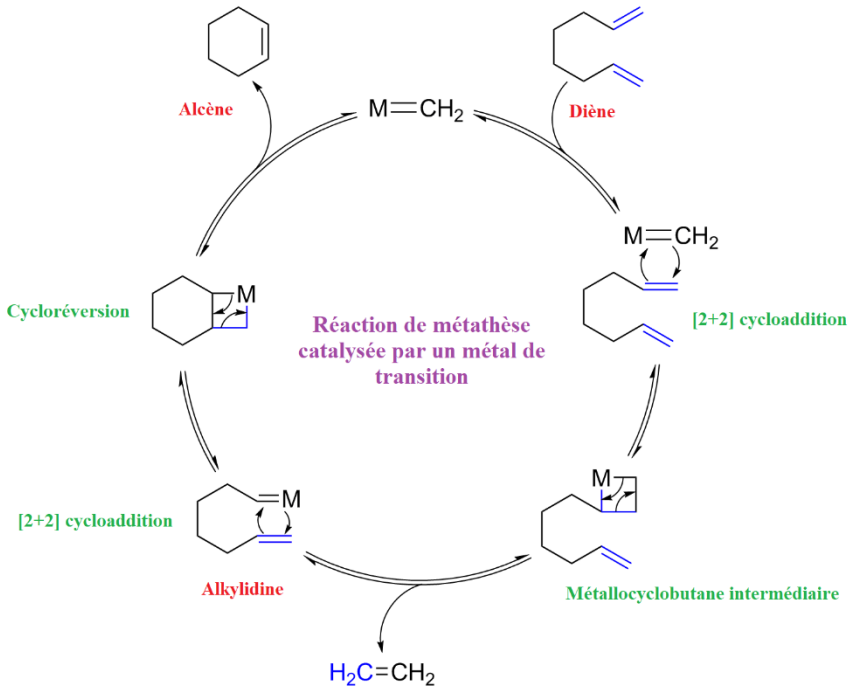


Schéma 10. Fermeture de cycle par réaction de métathèse.

L'équipe de V. J. Cee a ainsi décrit une fermeture de cycle par métathèse comme le montre le Schéma 11. Dans le cas de leur synthèse, un bon rendement de réaction est obtenu. Néanmoins, le réactif de départ possédant un carbone asymétrique en position 9, 4 produits différents sont obtenus après métathèse : (S)-E : 19 %, (S)-Z : 7 %, (R)-E : 16 % et (R)-Z : 10 %[44].

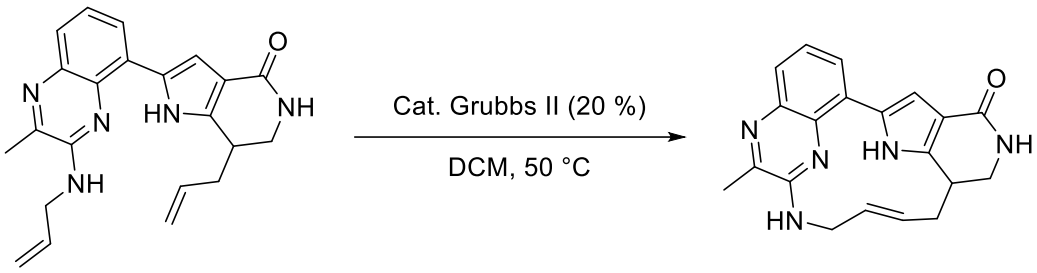


Schéma 11. Fermeture de cycle par métathèse.

2. Fermeture par réaction de substitution nucléophile

La réaction de substitution nucléophile consiste en la réaction entre un groupement nucléophile (souvent un azote ou un oxygène) sur un nucléofuge (souvent *via* l'introduction d'un bon groupement partant). Les substitutions nucléophiles peuvent être monomoléculaire (S_N1) ou bimoléculaire (S_N2). Les substitutions nucléophiles d'ordre 1 se déroulent en deux étapes avec une 1ère étape de rupture hétérolytique de la liaison entre le carbone et le nucléofuge et formation d'un carbocation puis une deuxième étape d'addition du nucléophile. Elles concernent les molécules de départ encombrées. Les substitutions nucléophiles d'ordre 2 se déroulent en une seule étape avec attaque du nucléophile du côté opposé au nucléofuge et élimination de celui-ci. Cette attaque entraîne une inversion de configuration de Walden si le carbone de départ est un carbone asymétrique. Elles concernent les molécules de départ peu encombrées. Ce type de réaction permet de former de grands cycles mais le rendement de fermeture sera très dépendant de la taille du chaînon. De plus, cette réaction entraîne régulièrement un jeu de protection/déprotection du fait d'une plus grosse concurrence entre les différents groupements présents sur les molécules[41]. U. Lücking *et al*., par exemple, utilisent une réaction de substitution nucléophile pour obtenir des inhibiteurs macrocycliques de CDK (*Cyclin dependent Kinase*) et VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*) avec une activité antiproliférative (Schéma 12)[59].

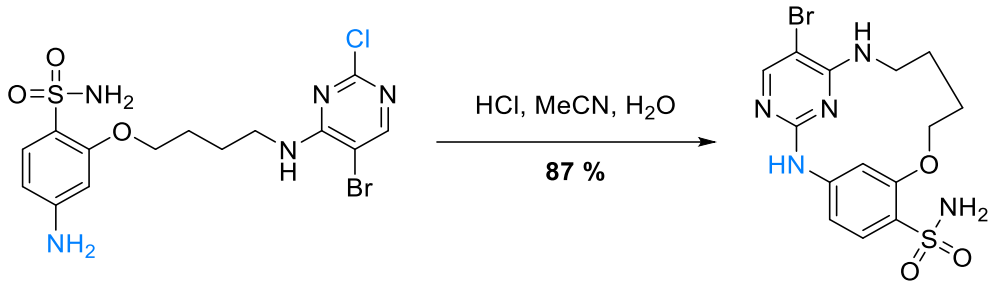


Schéma 12. Fermeture de cycle par substitution nucléophile aromatique. D'après U. Lücking *et al.*, *Chem-MedChem*, 2007.

3. Fermeture de cycle par réaction pallado-catalysée

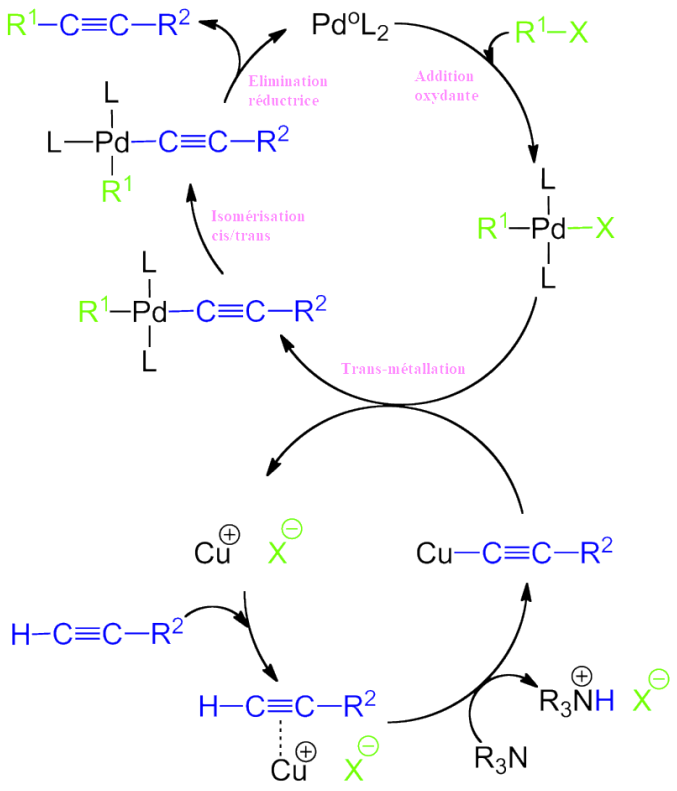


Schéma 13. Exemple de couplage pallado-catalysé : couplage de Sonogashira.

Les réactions pallado-catalysées sont des réactions couramment utilisées en chimie, du fait de leur capacité à entraîner à la fois la formation de liaisons carbone-carbone mais aussi la formation de liaisons carbone-oxygène ou carbone-azote[41]. Elles reposent sur la réaction entre

deux substrats et sont catalysées par un réactif au palladium. L'un des défauts majeurs de cette catalyse est qu'elle reste assez sensible, notamment à l'air, et n'est pas compatible avec toutes les fonctions chimiques.

Lors de nos travaux, nous avons surtout utilisé un couplage de Sonogashira qui consiste en la formation d'une nouvelle triple liaison par réaction entre un alcyne terminal et un dérivé d'halogénure d'aryle, catalysée par un complexe de palladium et un sel de cuivre (I), utilisé comme co-catalyseur selon le schéma précédent (Schéma 13).

Les couplages de Sonogashira sont moins utilisés comme outils de fermeture de cycle car ils nécessitent généralement un anneau macrocyclique d'au moins 15 chaînons[60]. L'équipe de D. K. Mohapatra et *al.*[61], par exemple, a développé la synthèse du sulfate de penarolide A1 qui est un inhibiteur d'α-glucosidase. Cette synthèse passe par une réaction de fermeture de cycle *via* un couplage de Sonogashira comme le montre le Schéma 14 ci-dessous.

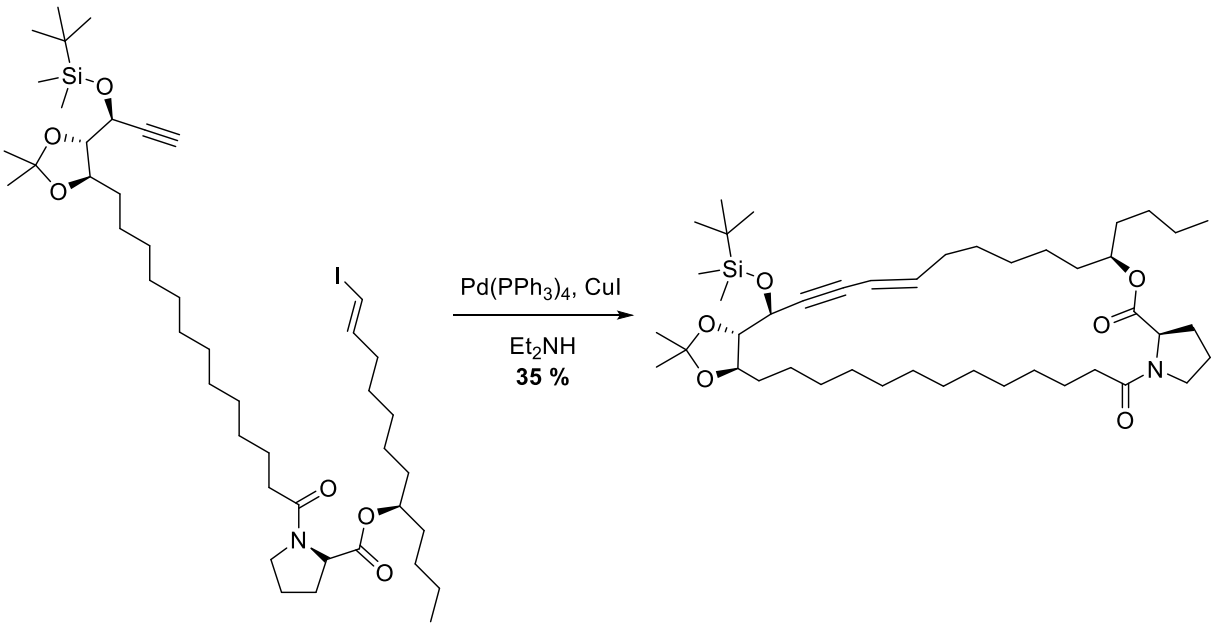


Schéma 14. Exemple de fermeture de cycle par couplage de Sonogashira, D. K. Mohapatra *et al.*, *Eur. J. Org. Chem*, 2008.

II. Travaux réalisés

Les macrocycles de cette thèse ont été obtenus à partir de synthons intermédiaires communs de type 3-chloroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle, comme le montre la Figure 35.

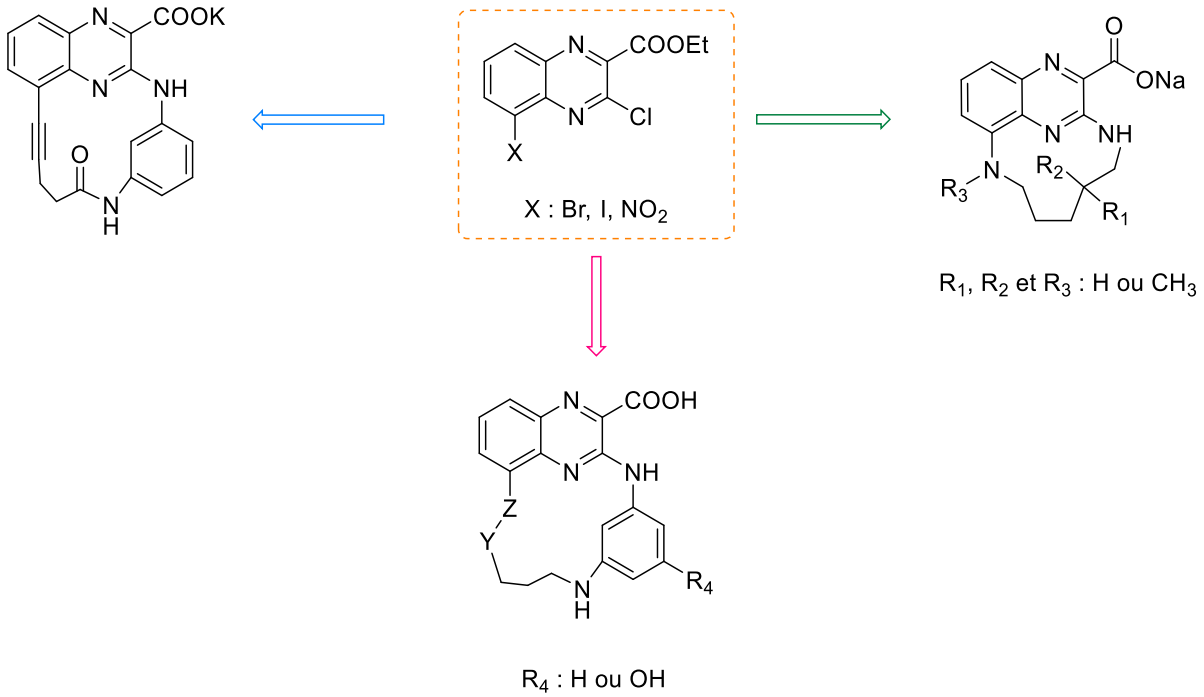
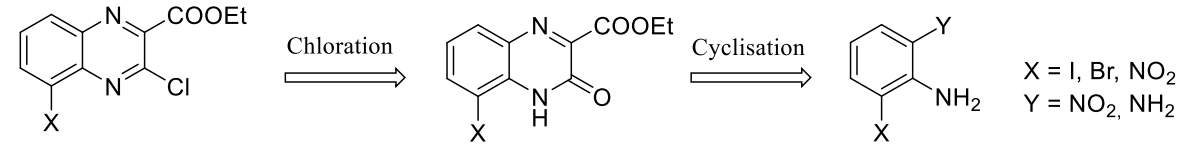


Figure 35. Synthons intermédiaires utilisés pour la synthèse des macrocycles cibles de cette thèse.

A. Accès aux synthons intermédiaires

Plusieurs voies d'accès à ces synthons intermédiaires ont été explorées au cours de cette thèse afin d'obtenir les meilleurs rendements possibles en essayant d'utiliser les produits commerciaux les moins onéreux, dans le but d'accéder à des quantités suffisantes de synthons et ainsi pouvoir aborder la suite des synthèses comportant de nombreuses étapes.

La stratégie d'accès au noyau quinoxaline a consisté en l'obtention des 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylates d'éthyle diversement substitués en position 5 par un groupement iodé, bromé ou nitro. Ces intermédiaires ont permis d'obtenir les synthons quinoxalines désirés après une étape de chloration en position 3 (Schéma 15).



Noyau quinoxaline chloré en position 3 et substitué en position 5

3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle substitué en position 5

Schéma 15. Schéma rétrosynthétique de formation du noyau quinoxaline.

1. Accès au noyau 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle

1.1 A partir de la 2-bromo-6-nitroaniline par réaction de condensation

Comme évoqué dans l'aperçu bibliographique précédent sur les différentes possibilités de formation du noyau quinoxaline, la réaction la plus couramment utilisée est la réaction de condensation (double addition-élimination) entre un dérivé d'*o*-phénylènediamine et un composé dicarbonylé. Néanmoins, l'obtention du noyau quinoxaline avec nos intermédiaires de départ par cette méthode entraîne la formation de deux isomères de position, c'est-à-dire un mélange des synthons 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylates d'éthyle substitués en position 5 ou 8. Nous avons donc, dans un 1er temps, utilisé la méthode de Takano *et al.*[55], précédemment décrite, permettant d'envisager une autre stratégie de synthèse s'affranchissant du problème d'isomérie de position en utilisant deux produits de départ commerciaux : un dérivé de chlorure d'acyle et la 2-bromo-6-nitroaniline (Schéma 16). En effet, l'attaque nucléophile de l'amine en position 2 sur le carbonyle de la fonction chlorure d'acyle permet d'obtenir sélectivement le 3-((2'-bromo-6'-nitrophényl)amino)-3-oxopropanoate d'éthyle **3** (Schéma 16) qui permettra d'obtenir *in fine* la 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline souhaitée, bromée en position 5.

Différentes conditions ont été testées (Tableau 2) afin d'optimiser le rendement de cette réaction. Les premières conditions utilisées ont été celles de Takano *et al.*[55] utilisant 1

équivalent (éq) de 2-bromo-6-nitroaniline (*i*) et 1,1 équivalents de 3-chloro-3-oxopropanoate d'éthyle (*ii*) dans du *N,N*-diméthylformamide (DMF) avec 1,1 équivalents de triéthylamine (piégeant le HCl libéré) à température ambiante. L'addition s'est dans un premier temps faite à 0 °C pour contrôler l'exothermicité de la réaction et, après 30 minutes, la solution a été agitée 24 h à température ambiante. Ces conditions ne nous ont cependant pas permis d'obtenir plus de 21 % de rendement (Tableau 2, entrée 1). Nous avons alors modifié les paramètres en faisant varier dans un 1er temps le nombre d'équivalents de (*ii*) (Tableau 2, entrée 2) ce qui nous a permis d'améliorer notre rendement de 21 à 52 %. Nous avons alors essayé d'augmenter le nombre d'équivalents de triéthylamine seule mais cela n'a pas modifié significativement notre rendement (Tableau 2, entrée 3). Nous avons alors augmenté le nombre d'équivalents de (*ii*) et de triéthylamine pour obtenir le composé **3** avec un rendement de 74 % (Tableau 2, entrée 4).

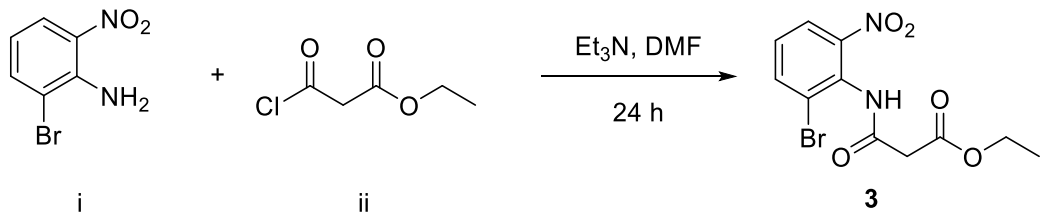


Schéma 16. Obtention du composé 3 par réaction d'addition-élimination selon les travaux de Takano *et al.*

Tableau 2. Optimisation de la réaction d'addition-élimination.

Entrée	*i (éq)*	*ii (éq)*	*Et_3N (éq)*	*Température*	*Rendement (%)*
1	1	1,1	1,1	0 °C / TA	21
2	1	2	1,1	0 °C / TA	52
3	1	1,1	2	0 °C / TA	28
4	**1**	**2**	**2**	**0 °C / TA**	**74**

L'étape suivante a consisté en la réalisation d'une cyclisation intramoléculaire suivant les conditions décrites par Takano *et al.*. La 1ère réaction a consisté à utiliser du *tert*-butylate de potassium dans le DMF à 0 °C afin d'obtenir après traitement par une solution de HCl (1M) la formation d'un dérivé *N*-oxyde. Cet intermédiaire, peu stable, a directement été mis en réaction

avec du tribromure de phosphore (PBr_3) dans le DMF à température ambiante permettant l'obtention de la dihydroquinoxaline **4** avec un rendement global sur deux étapes de 13 % (Schéma 17).

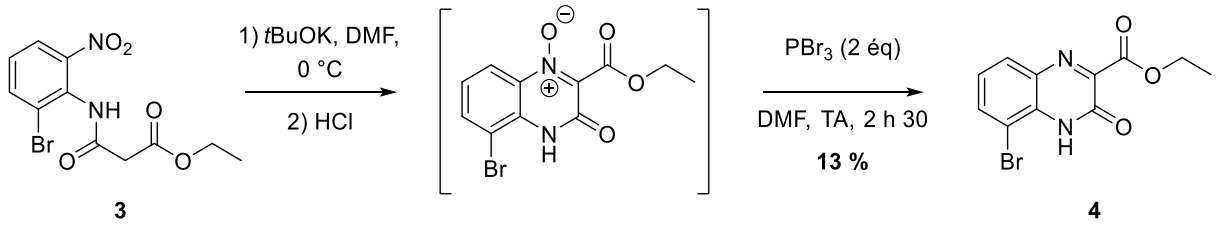


Schéma 17. Cyclisation et désoxygénation.

Le faible rendement de ces deux dernières étapes s'explique par le fait que la réaction de formation du dérivé *N*-oxyde n'est pas complète. Par ailleurs, du fait du manque de stabilité de cet intermédiaire, il n'a pas pu être isolé et l'étape de désoxygénation par du PBr_3 a donc été lancée sans étape de purification préalable. Enfin, cette dernière étape a entraîné la formation d'un mélange du composé **4** et de son dérivé saponifié. Le rendement global sur les trois étapes n'a ainsi été que de 10 %. Ce rendement est trop faible pour pouvoir envisager ce protocole de façon généralisée pour réaliser la synthèse des macrocycles de cette thèse. Cependant, il a tout de même permis d'obtenir sélectivement le 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle bromé en position 5 et d'avoir toutes les caractérisations RMN nécessaires pour la différenciation des deux isomères de position que l'on obtient par réaction de condensation.

1.2 A partir d'une *o*-phénylènediamine par réaction de condensation

Une autre voie d'accès consistant en une réaction de condensation par addition-élimination a donc été envisagée afin d'accéder aux 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle substituées en position 5 avec de meilleurs rendements. Ainsi les *o*-phénylènediamines commerciales substituées de façon adéquate en position 3 ont été mises en réaction avec le 2-oxomalonate de diéthyle en présence d'acide citrique en quantité catalytique dans de l'éthanol (EtOH) à 50 °C, en adaptant le protocole décrit par Mahesh *et al.*[52] (Schéma 18). Cette

cyclisation donne un très bon rendement sur *l'o*-phénylènediamine non substituée en position 3, permettant d'obtenir le composé **10** avec un rendement de 79 % (Tableau 3, entrée 7).

Néanmoins, dans le cas des *o*- phénylènediamines substituées en position 3, cette condensation entraîne la formation de deux isomères de position. Un isomère halogéné en position 5 (celui qui nous intéresse) (composés **4**, **6** et **8,** Tableau 3**,** entrée 1, 3, 5) et un isomère halogéné en position 8 (composés **5**, **7** et **9,** Tableau 3, entrée 2, 4, 6), en proportions très différentes. En effet, l'isomère en position 5 se forme avec un rendement de 20 à 34 % alors que l'isomère en position 8 se forme avec un rendement supérieur (48 à 70 %) (Tableau 3). De très nombreux essais d'optimisation du rendement de l'isomère en position 5 d'intérêt ont été réalisés. Néanmoins, pour des raisons de concision, ils ne seront pas détaillés de façon approfondie dans cette partie.

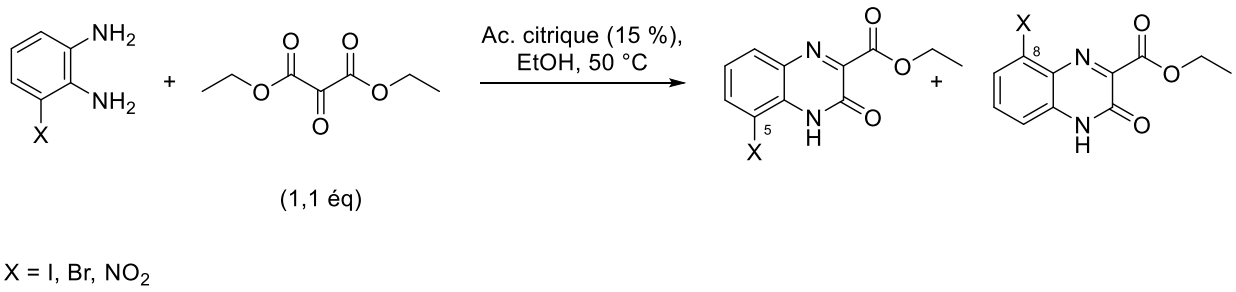


Schéma 18. Formation des dihydroquinoxalines de départ.

Tableau 3. Schéma général d'obtention des différentes dihydroquinoxalines substituées en position 5 ou 8.

Entrée	**Composés**	**X**	**Temps (h)**	**Rendement (%)**
1	**4**	5-Br	2	19
2	**5**	8-Br	2	70
3	**6**	5-I	4	20
4	**7**	8-I	4	70
5	**8**	5-NO_2	20	34
6	**9**	8-NO_2	20	48
7	**10**	H	10 min	79

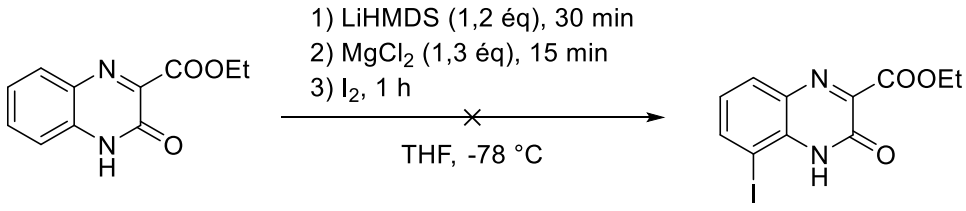
La détermination des isomères de position **4** et **5** en série bromée a été réalisée en comparant leurs spectres RMN du ^{1}H avec celui du composé **4** obtenu précédemment à partir de la 2-bromo-6-nitroaniline.

Pour les composés **6** et **7**, la différentiation entre les isomères a pu être réalisée par analyse cristallographique par diffraction des rayons X (DRX) (cf. Annexe 1) après l'étape suivante de chloration de la position 3.

En ce qui concerne les composés **8** et **9**, leur détermination s'est faite par comparaison avec les spectres RMN ^{1}H et ^{13}C de produits déjà synthétisés au sein du laboratoire.

1.3 Par halogénation du noyau 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle

Les deux premières stratégies n'ayant pas permis d'obtenir les dihydroquinoxalines d'intérêt avec des rendements supérieurs à 34 %, nous avons essayé de réaliser une halogénation directement sur le noyau dihydroquinoxaline **10** selon le protocole décrit par J. Nafe *et al.*[62] en faisant réagir le composé **10** avec du diiode en présence de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium (LiHMDS) et de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) à -78 °C pendant 1 h (Schéma 19).



10 **6**

Schéma 19. Halogénation de la position 5 du noyau 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline.

Les travaux de J. Nafe *et al.*[62] ont en effet mis en évidence que les dérivés lithiés comme le LiHMDS permettent la métallation sélective de la 2,3-dichloroquinoxaline. Après métallation par le lithium, l'introduction de $MgCl_2$ entraîne une trans-métallation entre le lithium et le magnésium. L'introduction du magnésium permet ensuite une réaction de Grignard avec un

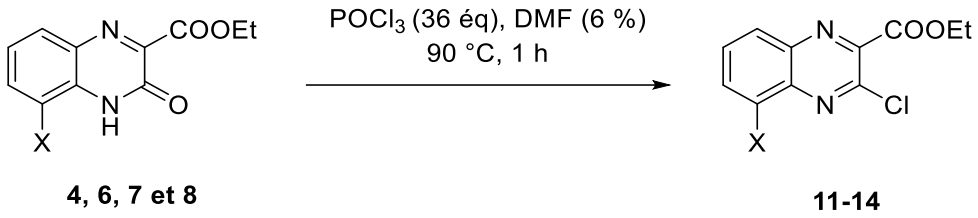
électrophile, ici le diiode. Malheureusement, ce protocole ne nous a pas permis d'obtenir le dérivé iodé **6** désiré.

1.4 Bilan

Parmi les trois stratégies précédentes, c'est la réaction de condensation à partir d'une *o*-phénylènediamine qui a permis d'obtenir le noyau quinoxaline substitué en position 5 avec le meilleur rendement global (20 % - 34 %) (Tableau 3).

2. Accès aux 3-chloroquinoxaline-2-carboxylates d'éthyle

La réaction suivante a été réalisée selon les conditions décrites par Mahesh *et al*[52]. et reprises au cours de la thèse de Bruno Oyallon[30]. Ainsi, les intermédiaires **4, 6, 7** et **8** ont été mis en réaction avec l'oxychlorure de phosphore ($POCl_3$) à 90 °C en présence d'une quantité catalytique de DMF (Schéma 20). Les quinoxalines **11** à **14** ont ainsi été obtenues avec des rendements de 89 à 97 % (Tableau 4).



4, 6, 7 et 8 **11-14**

Schéma 20. Chloration des dihydroquinoxalines précédentes.

Tableau 4. Obtention des quinoxalines 11 à 14.

Entrée	**Composés**	**X**	**Rendement (%)**
1	**11**	5-Br	97
2	**12**	5-I	97
3	**13**	8-I	89
4	**14**	5-NO_2	97

Cette réaction de chloration a lieu selon le mécanisme catalytique générant l'intermédiaire de Vilsmeier-Haack. En effet, le DMF (*N*,*N*-diméthylformamide) est introduit en proportion catalytique et concourt à l'obtention de la quinoxaline chlorée grâce à l'oxychlorure de phosphore. Un ensemble d'échanges électroniques intramoléculaire à lieu entre les trois réactifs introduits selon le mécanisme ci-après (Schéma 21).

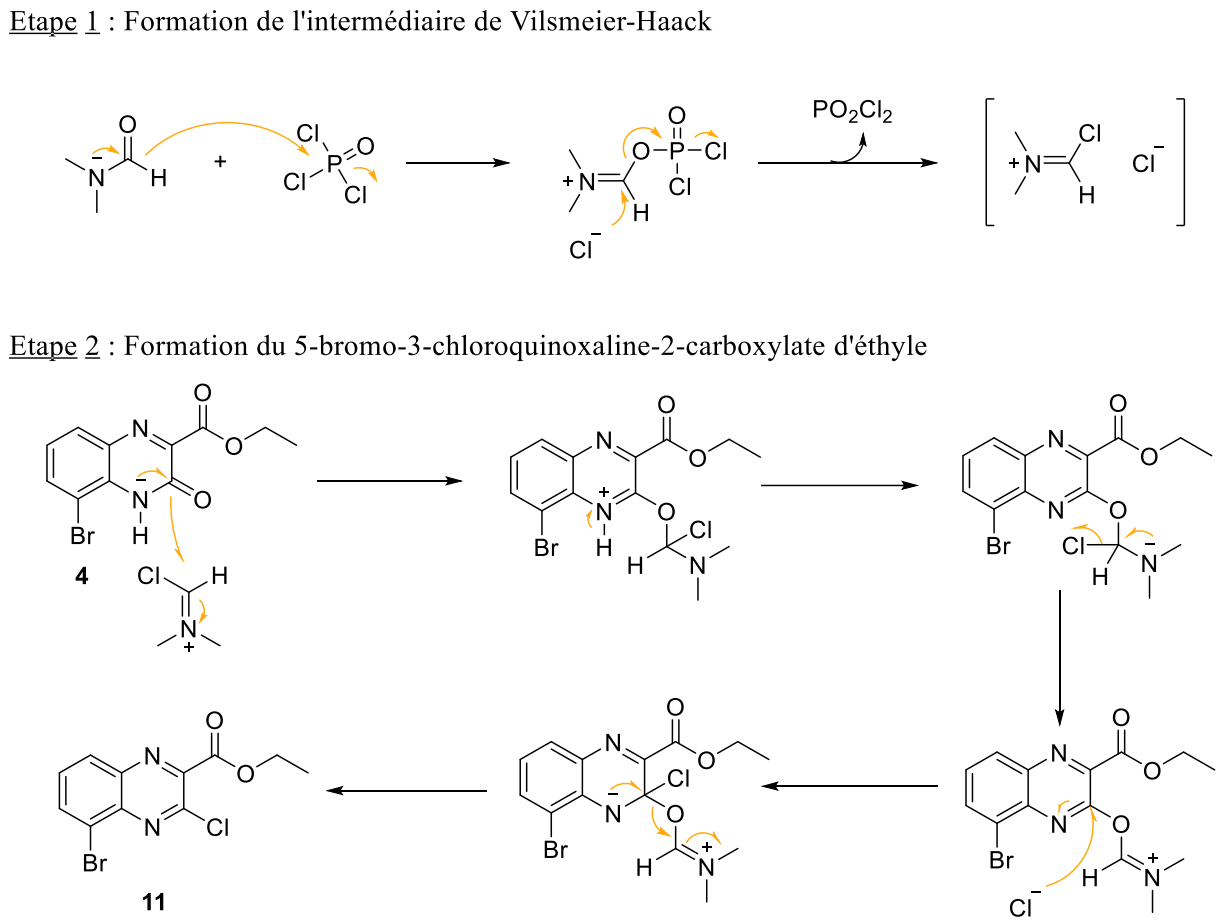


Schéma 21. Mécanisme de chloration de la position 3.

Les quinoxalines **11** à **14** ont été envoyées au Pr. Jean GUILLON de l'université de Bordeaux (INSERM U1212 / UMR CNRS 5320 - Laboratoire ARNA et UMR 5255- ISM) pour réaliser des analyses cristallographiques par DRX après étape de cristallogenèse. Seule la quinoxaline **13** a pu donner des cristaux exploitables, ce qui nous a permis de pouvoir nous assurer de la bonne position de l'iode au sein des quinoxalines iodées (cf. Annexe 1 – Analyse cristallographique du composé **13**).

B. Approche 1

Comme expliqué précédemment, la première stratégie de macrocyclisation a été de réaliser des pharmacomodulations en nous basant sur le chef de file **2** obtenu par Bruno Oyallon au cours de sa thèse. Pour rappel, les macrocycles cibles déterminés par cette approche sont présentés dans la Figure 36.

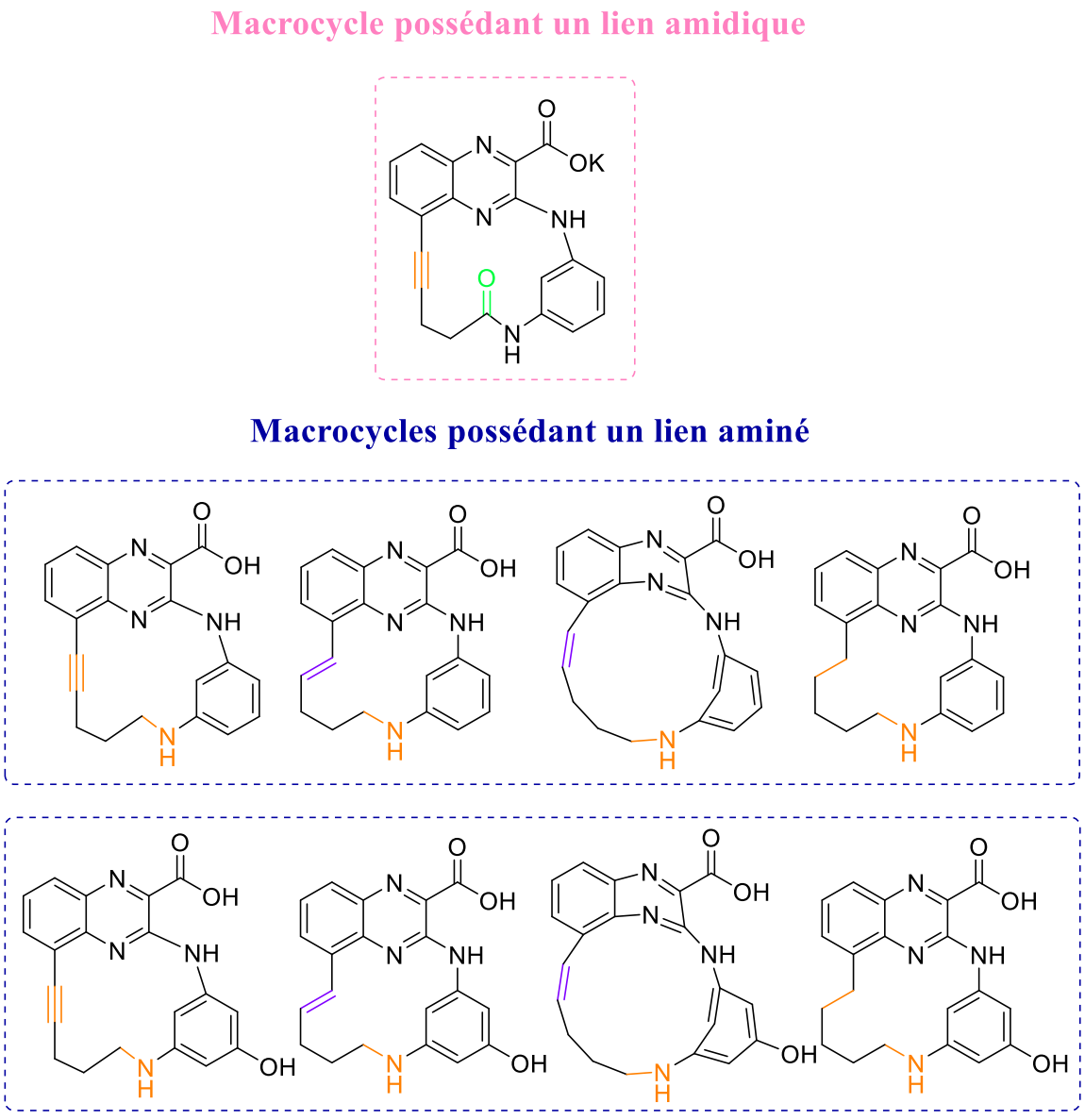


Figure 36. Macrocycles pharmacomodulés à partir du chef de file 2 dans le cadre de l'approche 1.

Ils peuvent être divisés en deux grandes catégories qui définiront également leur approche synthétique : les macrocycles possédant un lien amidique et ceux ayant un lien aminé.

1. Macrocycle possédant un lien amidique

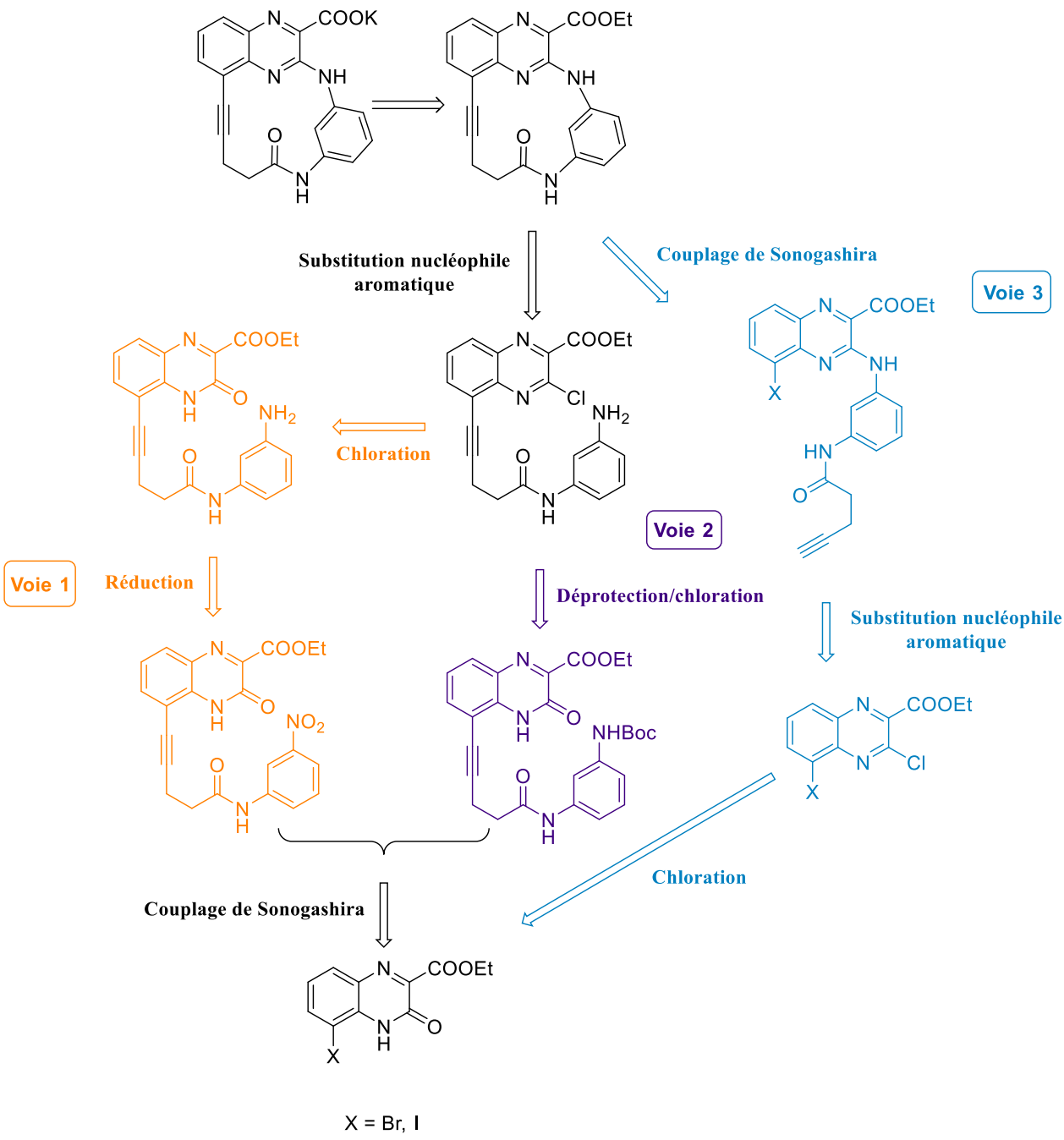


Schéma 22. Schéma rétrosynthétique des synthèses envisagées pour obtenir le macrocycle possédant un lien amidique.

La synthèse du macrocycle possédant un lien amidique a été envisagée selon trois voies de synthèse différentes faisant appel à deux voies de fermeture de cycle différentes (Schéma 22).

- Les deux premières voies envisagées font appel à une fermeture de cycle *via* une réaction de SN_{ar} en position 3 du noyau quinoxaline.
- La 3ème, quant à elle, fait appel à une réaction de fermeture de cycle par couplage pallado-catalysé selon une réaction de couplage de Sonogashira en position 5 du noyau quinoxaline.

La fermeture par SN_{ar} nous semblait la fermeture la plus simple à mettre en œuvre, nous nous sommes donc dans un 1er temps intéressé sur cette voie de fermeture.

Une fermeture de cycle centrale par couplage peptidique avait été envisagée mais seules les deux premières étapes ayant abouti, elle ne sera pas mentionnée dans ce manuscrit.

1.1 Voie 1 : fermeture de cycle par substitution nucléophile aromatique en utilisant un synthon de départ nitré

a. Etape 1 : Obtention du synthon de départ nitré par couplage peptidique

La 1ère voie de synthèse envisagée fait appel à une première étape de couplage de Sonogashira en position 5 de la 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline **4** (Schéma 22, voie 1). Cette réaction de couplage pallado-catalysée repose sur la réaction entre le composé **4** possédant un brome en position 5 et un synthon préparé par couplage peptidique entre l'acide 4-pentynoïque et la 3-nitroaniline, commercialement accessibles. Cette réaction a été réalisée, en utilisant les conditions de couplage classiquement utilisées au laboratoire[63], consistant à faire réagir les deux composés commerciaux avec l'hexafluorophosphate de *N*,*N*-diméthylméthaniminium (HATU) et de la 2,6-lutidine dans du DMF à température ambiante pendant 16 h. Ce couplage a permis d'obtenir le *N*-(3'-nitrophényl)pent-4-ynamide **15** (synthon de départ nitré souhaité) avec un rendement de 78 % (Schéma 23).

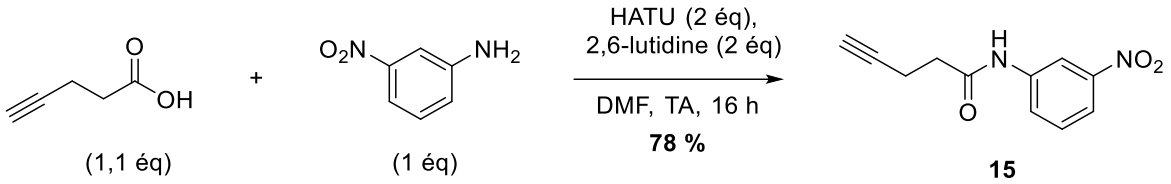


Schéma 23. Synthèse du *N*-(3-nitrophényl)pent-4-ynamide.

b. Etape 2 : Couplage de Sonogashira

Une fois le synthon **15** obtenu, l'étape suivante a consisté en un couplage de Sonogashira[64] entre la dihydroquinoxaline **4** et ce nouveau composé **15** (Schéma 24). Un certain nombre de conditions ont été testées de manière à obtenir le meilleur rendement possible (Tableau 5).

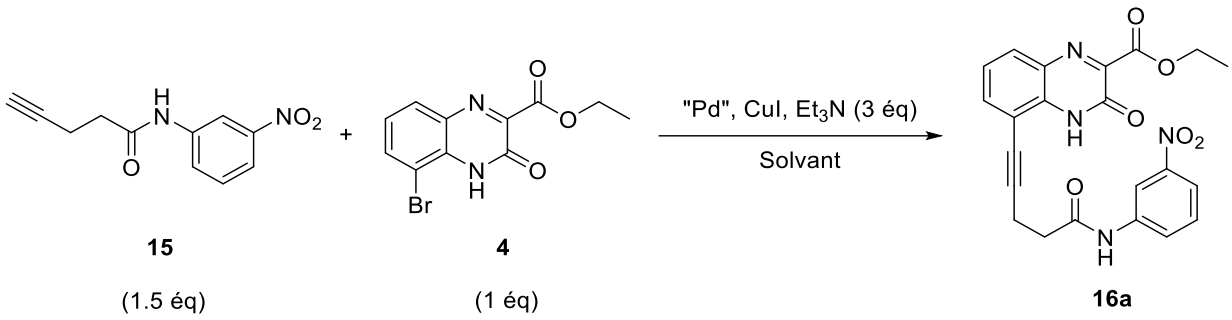


Schéma 24. Obtention du composé 16a par couplage de Sonogashira.

Tableau 5. Différentes conditions de couplage de Sonogashira permettant la fonctionnalisation de la position 5 de l'intermédiaire 4.

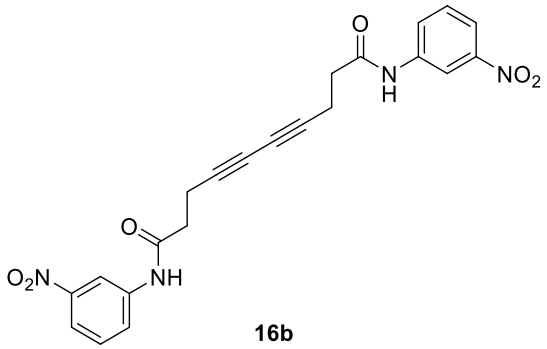
Entrée	« Pd »	« Pd » et CuI (%)	PPh_3	Solvant	T °C	Tps	Rdt (%)
1	$Pd(PPh_3)_4$	2	2 mol%	THF	80	2 j	/
2	**$Pd(PPh_3)_2Cl_2$**	**2**	**/**	**THF**	**80**	**24 h**	**22**
3	$Pd(PPh_3)_2Cl_2$	2	/	THF	65	24 h	/
4	$Pd(PPh_3)_2Cl_2$	20	/	THF	80	24 h	/
5	$Pd(PPh_3)_2Cl_2$	2	/	DMF	80	16 h	/
6	Pd_2dba_3	2	/	THF	80	24 h	/
7	$Pd(PPh_3)_2Cl_2$	2	/	THF	25	24 h	/
8	$Pd(PPh_3)_2Cl_2$	2	/	THF	65	10 min (MW)	/
9	$Pd(PPh_3)_2Cl_2$	2	/	THF	110	4 h	/
10	$Pd(PPh_3)_2Cl_2$	2	/	THF	0	4 h	/

Les premières conditions utilisées sont celles décrites par T. Nakamura et son équipe consistant à mettre en réaction 1 équivalent du composé **4**, 1,5 équivalents du composé **15** et 3 équivalents de triéthylamine en présence de 2 mol% de tétrakis(triphénylphosphine)palladium (0), 2 mol% de triphénylphosphine et 2 mol% de CuI dans du tétrahydrofurane (THF) à 80 °C pendant deux jours (Tableau 5, entrée 1). Ces conditions ne nous ont cependant pas permis d'obtenir le composé souhaité.

Nous avons alors fait varier les conditions opératoires en modifiant, dans un premier temps, le catalyseur au palladium utilisé. L'utilisation du chlorure de bis(triphénylphosphine)palladium (II) ($Pd(PPh_3)_2Cl_2$) dans les mêmes conditions, pendant 24 h, a permis d'obtenir le composé **16a** avec un rendement de 22 % (Tableau 5, entrée 2). Cependant, l'utilisation de ce même catalyseur mais à 65 °C n'entraîne aucune réaction (Tableau 5, entrée 3). L'utilisation du tris(dibenzylidèneacétone)dipalladium(0) comme catalyseur (Tableau 5, entrée 6) à 80 °C ne permet pas non plus d'obtenir le composé souhaité. Nous avons également modifié les quantités de catalyseur utilisées (20 % de $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, et de CuI) (Tableau 5, entrée 4), afin de favoriser l'addition oxydante. Néanmoins, seule une dégradation a été constatée.

Le solvant utilisé a été modifié mais l'utilisation de DMF (Tableau 5, entrée 5), n'a pas permis d'obtenir le produit désiré.

L'analyse des sous-produits obtenus après les différentes réactions de couplage de Sonogashira, montre la présence d'un sous-produit majoritaire **16b**, provenant d'une sous réaction appelée réaction de Glaser (Figure 37). Le couplage de Glaser consiste en une réaction entre deux alcènes terminaux faisant intervenir des sels de cuivre et une base en présence de dioxygène. La littérature montre que ces couplages sont assez fréquents même en présence d'une petite quantité d'O_2.



16b

Figure 37. Sous-produit résultant d'un couplage de Glaser.

L'hypothèse a été émise que si le sous-produit se faisait majoritairement, cela sous-entendait que le couplage conduisant à sa formation était bien plus rapide et favorable que le couplage de Sonogashira dans nos conditions expérimentales. Une réaction à froid (0 °C) a alors été lancée (Tableau 5, entrée 10) pour ralentir cette sous-réaction et permettre que le couplage de Sonogashira se fasse avant que le dimère ne se forme. Néanmoins, seul le dimère s'est formé. L'idée a alors été d'additionner goutte à goutte le synthon **15** de manière à reproduire des conditions de dilution et ainsi empêcher la dimérisation. Cependant, cela n'a permis aucune amélioration du rendement. *A contrario*, la réaction a été chauffée à 110 °C dans l'espoir d'accélérer suffisamment le couplage de Sonogashira pour obtenir un meilleur rendement mais là encore, seul le dimère s'est formé (Tableau 5, entrée 10).

L'hypothèse a aussi été émise que ce faible rendement pouvait être dû à la non-aromaticité de la dihydroquinoxaline **4**. Ce couplage a donc été réalisé sur la quinoxaline **11**. Le

couplage a été lancé en utilisant les conditions les plus favorables observées précédemment (Tableau 5, entrée 2). Malgré la compétition entre la position 3 et 5 du noyau quinoxaline du fait de la présence du chlore et du brome, respectivement, sur la molécule, nous espérions tout de même que la réaction se ferait majoritairement sur le brome, plus favorable au couplage pallado-catalysé par rapport au chlore. Néanmoins, cela n'a pas permis d'obtenir le produit souhaité, une majorité de produits de dégradation a été observée (Schéma 25).

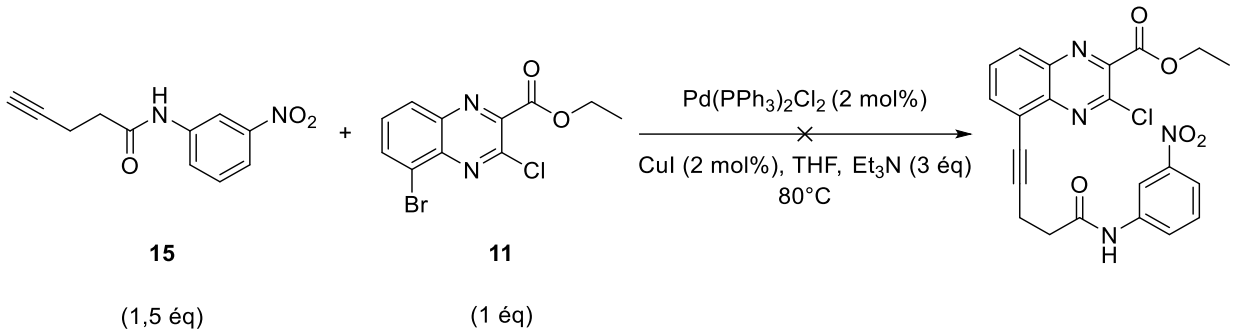


Schéma 25. Couplage de Sonogashira sur le composé 11.

c. Etape 3 : Réduction du groupement nitro

L'étape suivante a donc été lancée sur l'intermédiaire **16a** et a consisté en la réduction du groupement nitro. Deux approches ont été envisagées à ce stade. Une réduction non sélective du groupement nitro et de la triple liaison en utilisant du Pd sur charbon sous flux de dihydrogène[65] et une réduction chimique sélective du groupement nitro[66], utilisant du chlorure d'étain ($SnCl_2$) dans de l'éthanol au reflux pendant 1 h 30 (Schéma 26). Les deux réductions ont été mises en œuvre mais elles ont toutes deux entraîné une dégradation de la molécule avec rupture de la liaison amidique.

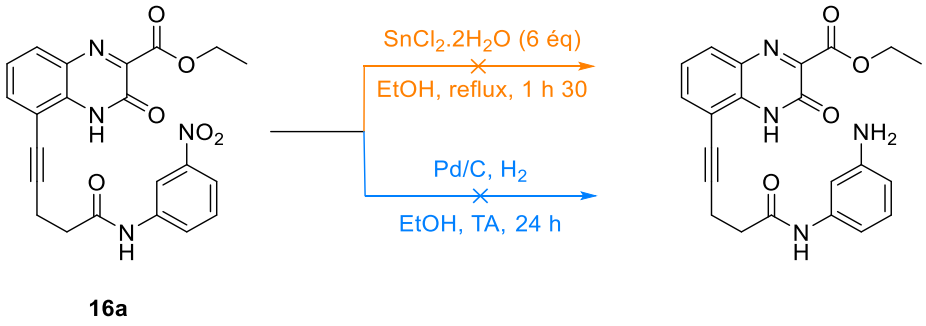


Schéma 26. Réduction du composé 16a.

1.2 Voie 2 : fermeture de cycle par substitution nucléophile aromatique en utilisant un synthon de départ possédant une amine protégée

La réduction du dérivé nitré **16a** précédent n'étant pas possible, une seconde voie de synthèse ne nécessitant pas de réduction a été mise au point (Schéma 22, voie 2).

a. Etape 1 : Obtention du composé **17**

Pour cette nouvelle voie de synthèse, un nouveau synthon a été synthétisé en s'appuyant sur le couplage peptidique entre deux composés commerciaux : l'acide 4-pentynoïque et le (3-aminophényle)carbamate de *tert*-butyle. Pour cette synthèse, nous avons utilisé les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour l'obtention du composé **15,** consistant à utiliser de l'HATU et de la 2,6-lutidine dans du DMF à TA pendant 24 h, ce qui a permis d'obtenir le dérivé souhaité **17** avec un rendement de 82 % (Schéma 27).

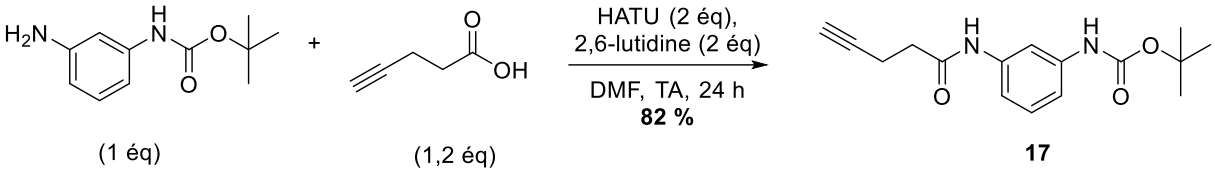


Schéma 27. Synthèse du composé 17.

b. Etape 2 : Fonctionnalisation de la position 5 par un couplage de Sonogashira

La fonctionnalisation du composé **4** en position 5 s'est faite *via* un couplage de Sonogashira en utilisant les meilleures conditions opératoires mises au point précédemment (Tableau 5, entrée 2). Ces conditions ont permis l'obtention du composé **18** avec un rendement de 16 % (Schéma 28). Les autres sous-produits obtenus correspondent à des produits de dégradations.

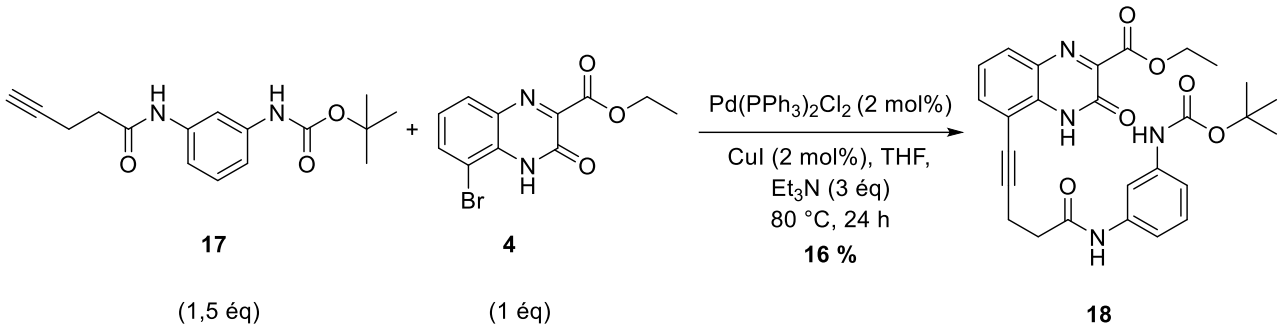


Schéma 28. Formation du composé 18.

c. Etape 3 : Chloration de la position 3 du noyau quinoxaline

L'étape suivante a consisté en une chloration de la position 3 du noyau quinoxaline selon le Schéma 29, de manière à pouvoir, après déprotection de l'aniline, réaliser la fermeture de cycle par SN_{ar}. La chloration du composé **18** a ainsi été réalisée dans les conditions utilisées précédemment et décrites par Mahesh *et al.*[52], dans l'oxychlorure de phosphore, en présence d'une quantité catalytique de DMF, au reflux pendant 1 h (Schéma 20). Néanmoins, cette réaction a entraîné une dégradation totale de la molécule empêchant donc l'utilisation de la stratégie de la voie 2.

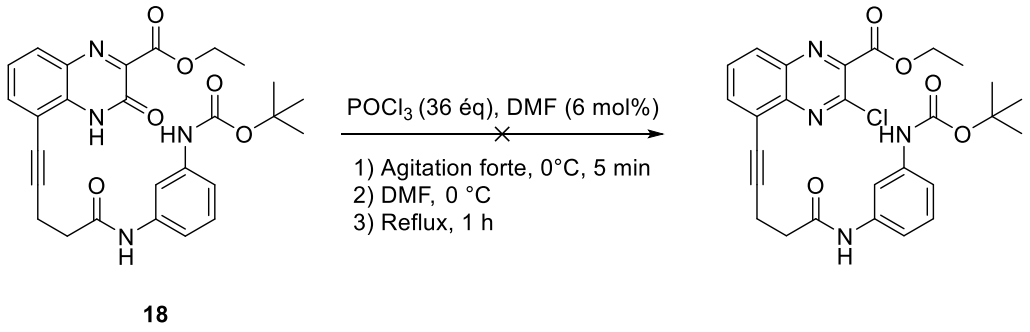


Schéma 29. Chloration du composé 18.

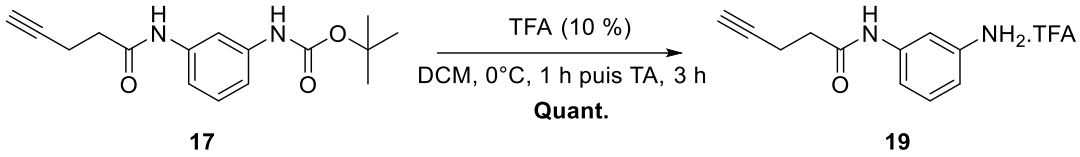
1.3 Voie 3 : Fermeture de cycle par couplage de Sonogashira

a. A partir de la quinoxaline bromée en position 5 (**11**)

Aucune des deux voies précédentes n'ayant permis l'obtention du macrocycle possédant un lien amidique, une troisième voie faisant appel à une fermeture de cycle *via* un couplage pallado-catalysé de Sonogashira a été envisagée (voie 3, Schéma 22).

(i) Déprotection du composé **17**

Le synthon **17** décrit dans la voie 2 a tout d'abord été déprotégé par hydrolyse acide du carbamate donnant ainsi l'intermédiaire **19** selon le schéma suivant (Schéma 30).



17 **19**

Schéma 30. Déprotection au TFA pour obtenir le composé 19.

La déprotection de la fonction amine du composé **17** a été réalisée selon des conditions classiques au moyen d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA)[67] à 10 % dans le dichlorométhane (DCM) à 0 °C pendant 1 h puis à température ambiante pendant 3 h, permettant l'obtention du dérivé **19** avec un rendement quantitatif (Schéma 30). Il est à noter qu'au-delà de 10 % de TFA, une dégradation de la molécule est constatée avec rupture de la liaison amidique. Cette observation a permis de confirmer la fragilité de la liaison amidique en conditions acides, déjà mise en évidence dans les voies précédentes. En effet, des dégradations avaient notamment été observées lors de la tentative de réduction du groupement NO_2 en utilisant des conditions chimiques acides ($SnCl_2$) et lors de la tentative de chloration utilisant du $POCl_3$.

(ii) Fonctionnalisation de la position 3 de la quinoxaline **11**

Une fois le synthon **19** obtenu, l'étape suivante a consisté en une fonctionnalisation de la position 3 de la quinoxaline **11** *via* l'attaque nucléophile aromatique (SN_{ar}) de l'aniline du composé **19** sur le chlore en position 3 du noyau quinoxaline (Schéma 31).

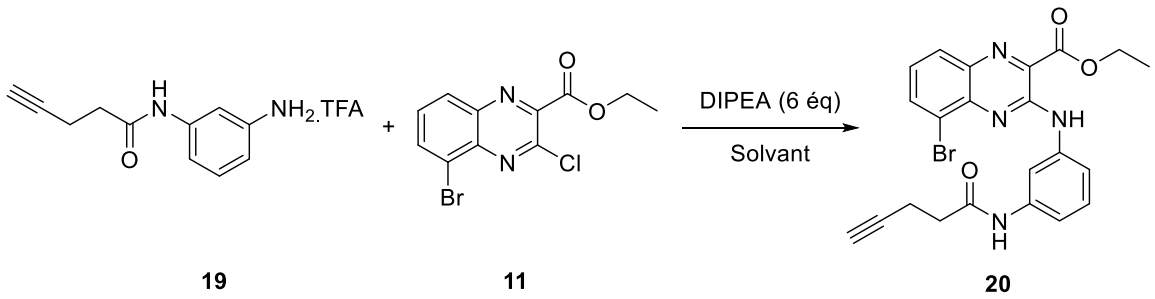


Schéma 31. Fonctionnalisation de la position 3 du noyau quinoxaline 11.

Tableau 6. Fonctionnalisation de la position 3 *via* une réaction d'amination.

Entrée	**19 (eq)**	**Solvant**	**T°**	**Temps**	**Rdt (%)**
1	1,5	EtOH	Reflux	5 j	11
2	1,5	THF	Reflux	48 h	25
3	2	THF	Reflux	48 h	37
4	2	THF	150 °C (MW)	2 h	10
5	**4**	**THF**	**Reflux**	**3 j**	**58**

Pour cela, différentes conditions ont été envisagées. L'ensemble des réactions a été réalisé en milieu basique en utilisant de la *N*,*N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) en quantité suffisante (6 équivalents) pour piéger le TFA présent dans le synthon **19** avant la réaction et l'acide chlorhydrique libéré après la SN_{ar}, de manière à ne pas se retrouver dans un milieu acide susceptible de dégrader la molécule obtenue. Ainsi, l'addition de DIPEA s'est faite jusqu'à obtention d'un pH 14.

Nous avons dans un 1er temps utilisé les conditions classiques d'amination par SN_{ar} utilisées par B. Oyallon[36], en faisant réagir 1,5 équivalents du composé **19** avec 1 équivalent de la quinoxaline **11** dans de l'éthanol au reflux pendant 5 j, ce qui a permis d'obtenir le composé souhaité **20** avec un faible rendement de 11 % (Tableau 6, entrée 1) .

Plusieurs essais ont ensuite été réalisés afin d'optimiser le rendement de cette réaction. Le remplacement de l'éthanol pour du tétrahydrofurane (THF), a ainsi permis l'obtention en 48 h du dérivé **20** avec un rendement de 25 % (Tableau 6, entrée 2).

L'ensemble de ces réactions n'ayant entraîné l'apparition d'aucun sous-produit, le nombre d'équivalents du synthon **19** a alors été augmenté à 2 équivalents dans un premier temps, puis à 4 équivalents (Tableau 6, entrées 3 et 5) de manière à entraîner plus de conversion. L'addition de 2 équivalents de la molécule **19** a permis de passer d'un rendement de 25 % à 37 % (Tableau 6, entrée 3). Cette réaction nécessitant 2 jours de réaction, nous avons essayé ces conditions en utilisant une technologie de chauffage par irradiation au micro-ondes (MW) de manière à réduire le temps de réaction. Cependant, en chauffant ainsi à 150 °C pendant 2 h, nous n'avons obtenu qu'un rendement de 10 % (Tableau 6, entrée 4). L'augmentation du nombre d'équivalents du synthon **19** permettant une amélioration du rendement, 4 équivalents ont été additionnés ce qui a permis d'obtenir l'intermédiaire **20** en 3 j avec un rendement de 58 % (Tableau 6, entrée 5). Cependant, au-delà de 4 équivalents de synthon **19**, une réaction parasite intervient avec attaque de l'aniline sur l'ester en position 2 donnant ainsi une nouvelle liaison amidique en position 2.

(iii) Fermeture de cycle par couplage de Sonogashira intramoléculaire

L'étape suivante a consisté en une réaction de macrocyclisation *via* le couplage de Sonogashira (Schéma 32).

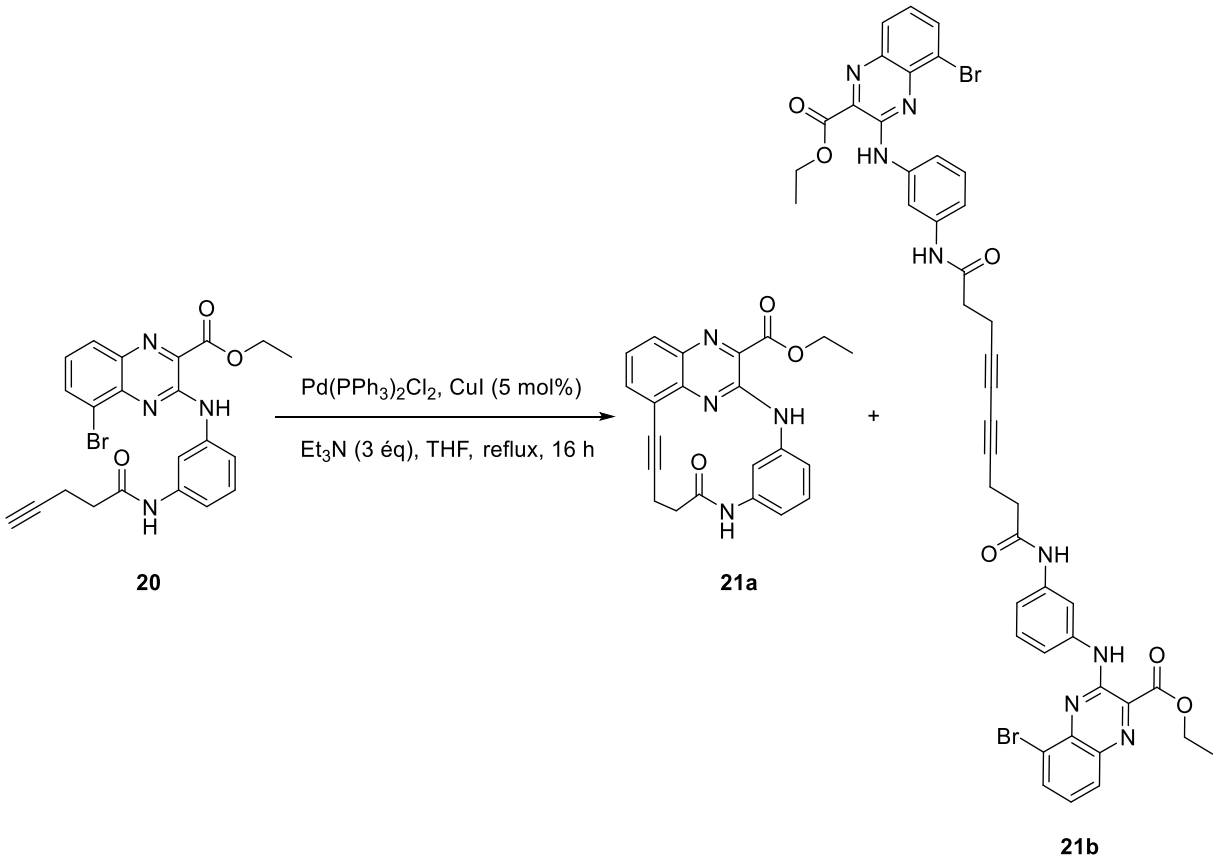


Schéma 32. Réaction de fermeture de cycle par couplage de Sonogashira.

Tableau 7. Optimisation des conditions de fermeture de cycle.

Entrée	**$Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (mol%)**	**[20] ($g.L^{-1}$)**	**Rdt (%) 21a + 21b**
1	65	0,75	/
2	65	10	/
3	10	**10**	**2**

De la même manière que A. Hussain et son équipe[68], nous avons, dans un 1er temps, réalisé la réaction de Sonogashira en utilisant 5 mol% de CuI et du $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (100 % massique) en présence de triéthylamine dans du THF au reflux pendant 16 h.

Nous avons tout d'abord travaillé dans les conditions les plus diluées possibles, en fonction du solvant utilisé, (0,75 $g.L^{-1}$) de manière à favoriser la macrocyclisation, puis en

conditions non diluées (10 $g.L^{-1}$) (Tableau 7, entrées 1 et 2). Aucune de ces conditions n'a permis d'obtenir le macrocycle souhaité et une dégradation totale du composé **20** a été observée. Nous avons alors réalisé la fermeture de cycle en utilisant seulement 10 mol% de $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ dans les mêmes conditions (Tableau 7, entrée 3), ce qui nous a permis d'isoler le macrocycle **21a** avec un rendement néanmoins très faible de 2 %.

L'analyse d'un des sous-produits obtenus après utilisation des conditions de l'entrée 3 du Tableau 7 montre la formation d'un dimère, le composé **21b**, obtenu avec un rendement de 10 %.

b. A partir de la quinoxaline iodée en position 5 (**12**)

La 3-bromophénylènediamine de départ étant beaucoup moins onéreuse que la 3-iodo-phenylènediamine, la 3ème voie de synthèse avait tout d'abord été testée sur la quinoxaline **11** bromée en position 5. Néanmoins, les réactions de couplages pallado-catalysés sont connues pour donner de meilleurs rendements sur des dérivés iodés que sur des dérivés bromés. Toutes les réactions précédentes ont alors été réalisées à partir de la quinoxaline **12** iodée en position 5 dans un second temps, afin d'améliorer le rendement global de la voie 3 avec pour objectif notamment d'optimiser le rendement de l'étape de macrocyclisation.

(i) Fonctionnalisation de la position 3 de la quinoxaline **12**

La SN_{ar} entre la quinoxaline **12** et le synthon **19** a été réalisée en se basant sur les conditions optimisées précédemment avec la quinoxaline bromée **11** (Schéma 33). Cependant, le dérivé iodé s'est avéré plus sensible à la réaction secondaire possible entre l'aniline du synthon **19** et l'ester en position 2 de la quinoxaline **12**. En effet, au-delà de 3 équivalents du synthon **19**, une attaque secondaire est obtenue sur l'ester. Ainsi, seulement 3 équivalents du composé **19** ont été utilisés permettant, en présence de DIPEA (16 équivalents) dans du THF au reflux pendant 2 jours, d'accéder au dérivé **22** avec un rendement de 43 % (Schéma 33).

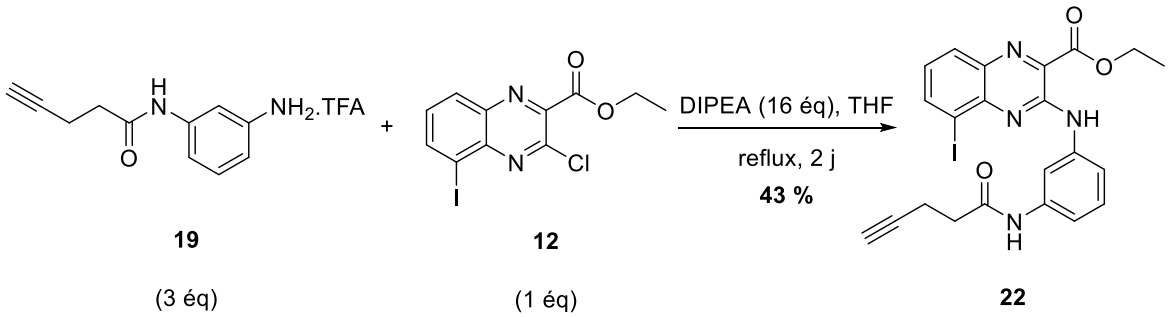


Schéma 33. Réaction d'amination sur la quinoxaline 12 iodée en position 5.

(ii) Fermeture de cycle par couplage de Sonogashira intramoléculaire

Pour réaliser le couplage de Sonogashira intramoléculaire sur la quinoxaline **22**, nous avons utilisé les conditions optimisées précédemment avec la quinoxaline bromée **20** (Schéma 34).

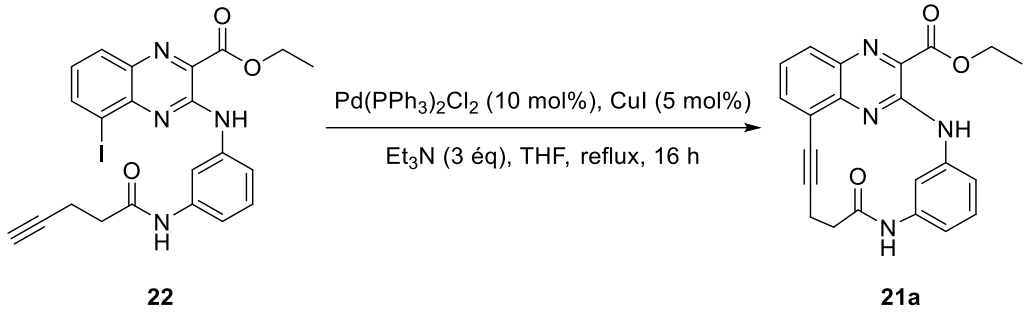


Schéma 34. Réaction de fermeture de cycle par couplage de Sonogashira sur la quinoxaline iodée 22.

Tableau 8. Optimisation des conditions de macrocyclisation à partir de la quinoxaline 22 iodée en position 5.

Entrée	**[22] g.L^{-1}**	**Rdt**
1	6,7	8 %
2	0,67	8 %

Contrairement au dérivé bromé, la fermeture de cycle par couplage de Sonogashira sur l'iode en position 5 n'a pas donné le dimère isolé précédemment. Nous avons ainsi isolé le macrocycle **21a** avec un rendement de 8 % (Tableau 8, entrée 1), qui est supérieur à celui

observé précédemment, mais qui reste faible. L'ensemble des autres sous-produits obtenus correspondent à des produits de dégradation.

Cette réaction a également été réalisée en conditions diluées, utilisées généralement pour éviter la dimérisation et ainsi favoriser la fermeture de cycle intramoléculaire. Cela n'a cependant pas permis d'optimiser cette réaction de fermeture de cycle (Tableau 8, entrée 2).

(iii) Saponification de l'ester de l'intermédiaire **21a**

La dernière étape de cette synthèse a reposé sur la saponification du macrocycle intermédiaire **21a**. Pour cette étape, 1 équivalent de carbonate de potassium (K_2CO_3) a été mis en réaction avec le composé **21a** dans un mélange méthanol/eau (80/20), puis la solution a été agitée à température ambiante pendant 1 h permettant d'obtenir le macrocycle désiré **23** sous la forme d'un sel potassique avec un rendement de 97 % (Schéma 35). En effet, le macrocycle étant très sensible aux conditions acides, aucun traitement acide n'a été entrepris pour obtenir le macrocycle souhaité sous sa forme d'acide carboxylique.

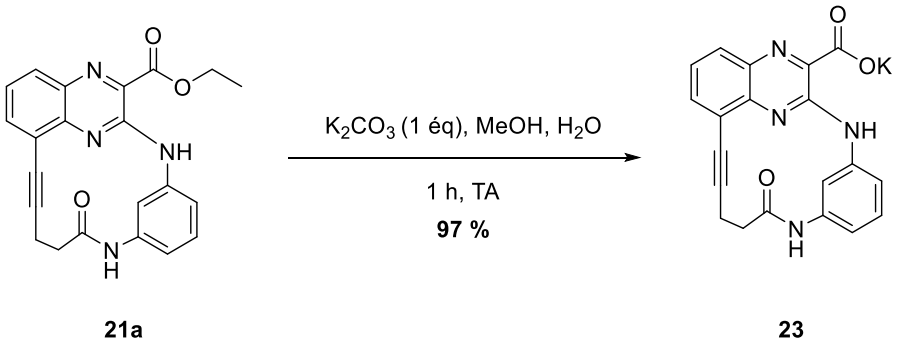


Schéma 35. Saponification du macrocycle intermédiaire 21a.

Le rendement global d'obtention du macrocycle **23** sur 5 étapes n'est que de 0,6 %. Du fait de la fragilité du macrocycle **23** observée, notamment en conditions acides et du faible rendement global observé, l'ensemble des pharmacomodulations que nous avions envisagées (réduction de la triple liaison et de la liaison amidique) n'ont pas pu être obtenues. Le macrocycle **23** est actuellement en cours de cristallogenèse afin de confirmer sa structure par analyse cristallographique par DRX au sein de l'IMS (UMR 5255).

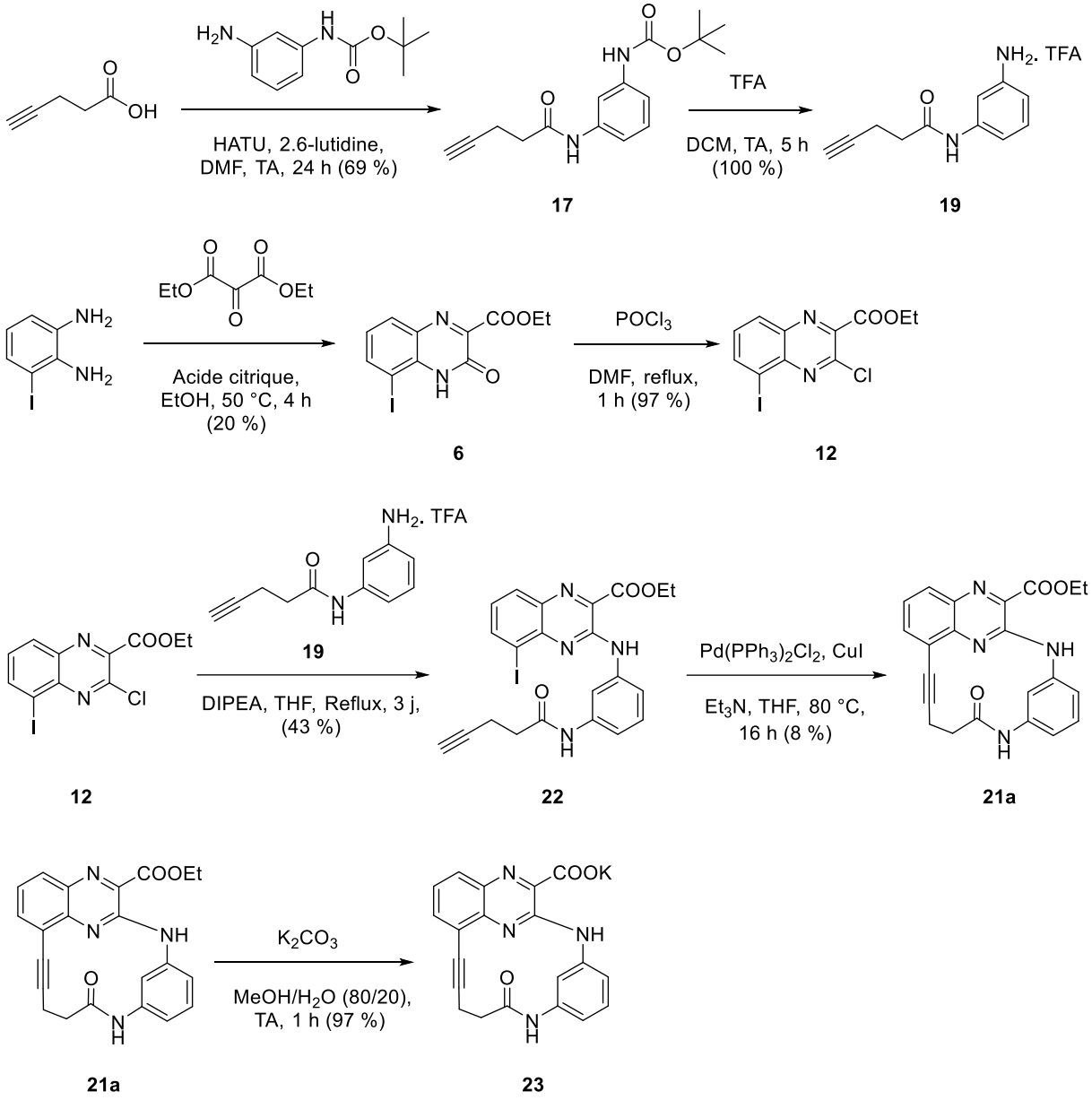


Schéma 36. Bilan de synthèse du macrocycle 23 possédant un lien amidique.

2. Macrocycles possédant un lien aminé

2.1 Série phényle

Le lien amidique du macrocycle précédent étant très sensible en milieu acide, les macrocycles de la série suivante ont donc été imaginés en utilisant un lien aminé, afin d'essayer de réduire cette fragilité. La liaison alcynique a, quant à elle, été conservée laissant la possibilité d'une réduction pour obtenir les dérivés alcènes et alcane correspondants (Figure 38).

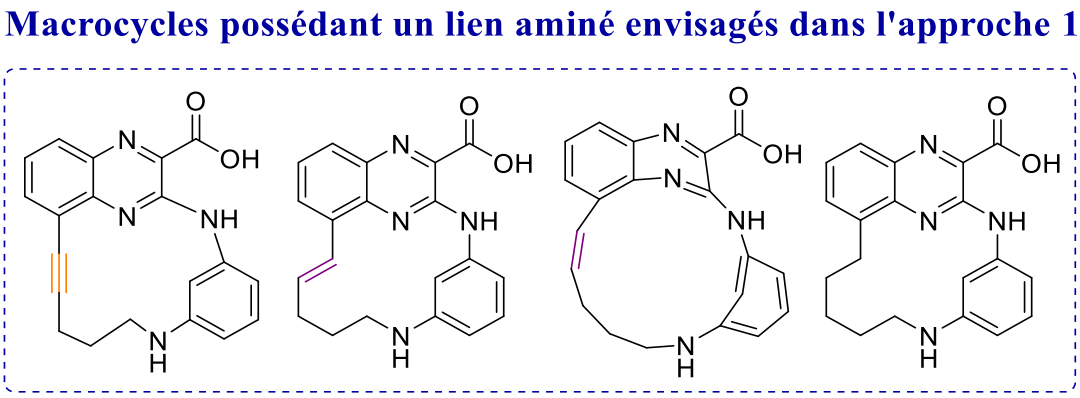


Figure 38. Macrocycles envisagés possédant un lien aminé.

Deux voies de synthèse différentes ont été élaborées pour accéder aux macrocycles cibles dont les voies de rétrosynthèse sont présentées dans le Schéma 37.

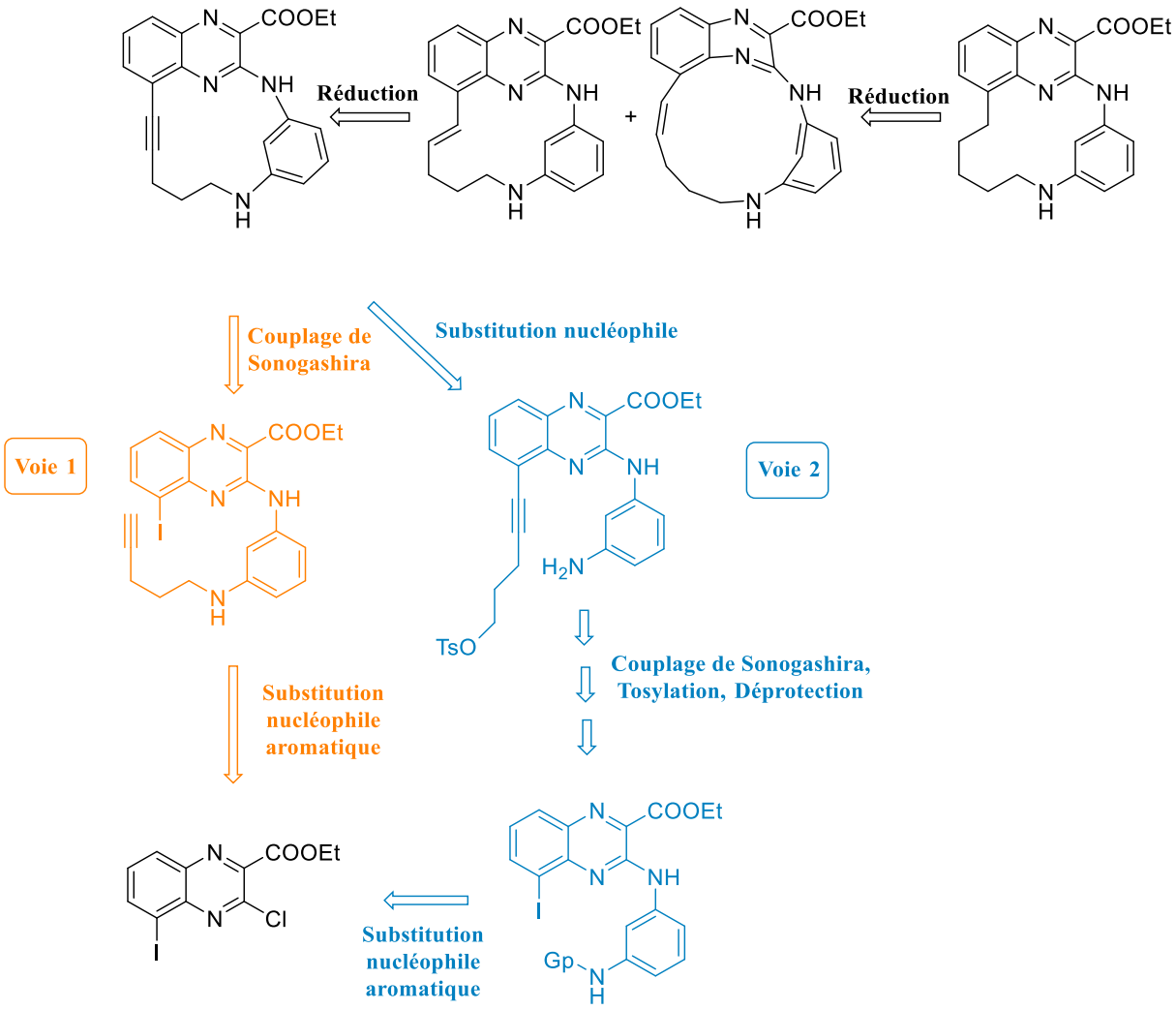


Schéma 37. Schémas rétrosynthétiques envisagés pour obtenir les macrocycles de la série phényle de l'approche 1 possédant un lien aminé.

a. Voie 1 : Fermeture de cycle par couplage de Sonogashira

Dans un 1er temps, la 1ère voie de synthèse a été imaginée selon le même protocole que celui permettant d'obtenir le macrocycle **23**, faisant intervenir une fermeture de cycle par couplage de Sonogashira (Voie 1, Schéma 37).

(i) Préparation du synthon acétylénique de départ **25**

Cette voie de synthèse a reposé dans un premier temps sur la préparation d'un synthon acétylénique de départ. Sa mise en œuvre a été envisagée selon deux types de couplage différents. En première intention, un couplage de Ullmann a été envisagé. Les couplages de Ullmann permettent le couplage entre deux halogénures d'aryle pour créer une nouvelle liaison carbone-carbone. Néanmoins, les travaux de A. Shafir *et al*.[69] montrent que ce couplage peut aussi être utilisé pour réaliser le couplage entre un halogénure d'aryle et une amine libre. Cette réaction est catalysée par du cuivre en présence de différents ligands, comme la proline, de manière à former une nouvelle liaison carbone-azote.

Pour mettre en œuvre ce couplage, il a tout d'abord fallu protéger la fonction amine de la 3-iodoaniline commerciale, afin d'éviter toute compétition entre le dérivé d'aniline et l'amine libre de la pent-4-yn-1-amine, autre réactif commercial qui sera engagé dans le couplage. La protection a eu lieu selon le protocole de B. Viswanadham et A. S. Mahomed[70] en additionnant la 3-iodoaniline et le dicarbonate de di-*tert*-butyle (Boc_2O) sans solvant et en chauffant à 80 °C pendant 1 h. Cela nous a permis d'obtenir le (3-iodophényl)carbamate de *tert*-butyle **24** avec un rendement quantitatif (Schéma 38).

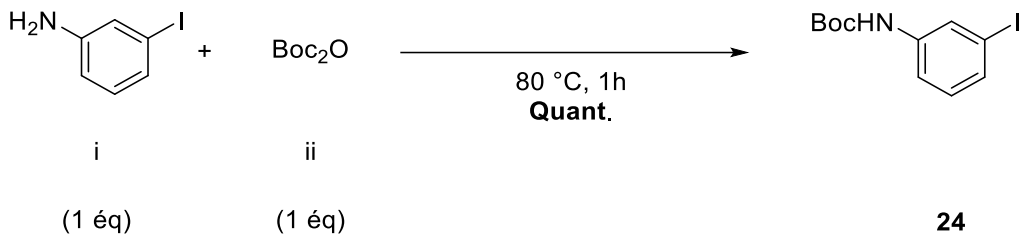


Schéma 38. Protection de la 3-iodoaniline.

Le (3-iodophényl)carbamate de *tert*-butyle **24** a ensuite été mis en réaction avec la pent-4-yn-1-amine commerciale selon les conditions décrites par A. Shafir *et al*.[69], en présence de K_2CO_3, de CuI et de L-proline dans du DMSO à 90 °C pendant 24 h (Schéma 39). Cependant, aucune réaction n'a eu lieu.

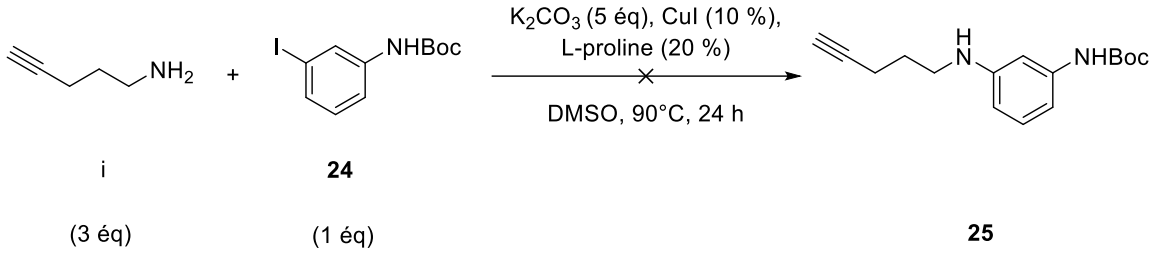


Schéma 39. Réaction de Ullmann sur le (3-iodophényl)carbamate de *tert*-butyle.

Le couplage de Ullmann n'ayant pas permis l'obtention du produit souhaité, un couplage de Buchwald-Hartwig[71] a été envisagé pour obtenir le dérivé acétylénique souhaité **25**. Les réactions de Buchwald-Hartwig permettent la formation d'une nouvelle liaison carbone-azote entre un halogénure d'aryle et une amine *via* l'utilisation d'un catalyseur au palladium et d'une base selon le Schéma 40.

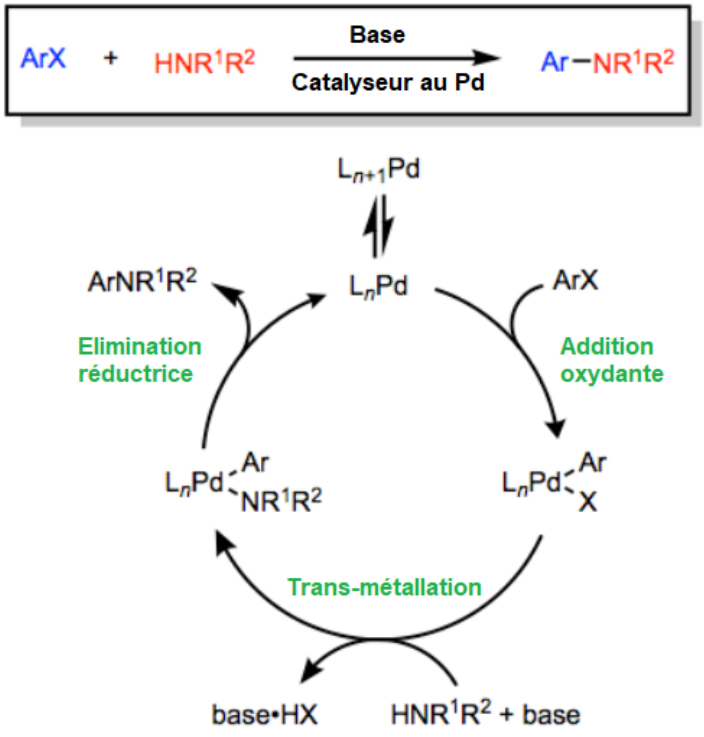


Schéma 40. Mécanisme catalytique du couplage de Buchwald-Hartwig, d'après Hartwig, J. F *et al.*, *Org. React.* 2019.

Ce couplage a été effectué sur la 3-iodoaniline protégée **24** selon des conditions classiques en utilisant du précatalyseur G1 Xphos, de la triéthylamine dans du THF au reflux pendant 16 h sous argon. La réaction n'a cependant donné aucun résultat (Schéma 41).

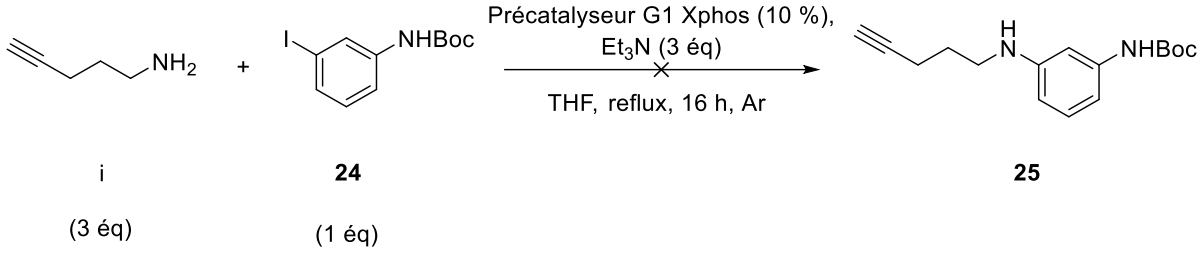


Schéma 41. Essai de réaction de couplage de Buchwald-Hartwig pour la préparation du synthon acétylénique de départ.

Le synthon **25** n'ayant pas pu être obtenu par les différents couplages précédents, une autre voie de synthèse a été explorée, à partir d'un autre dérivé commercial, le pent-4-yn-1-ol, pour obtenir le synthon **25** par substitution nucléophile. Pour cela, le pent-4-yn-1-ol a été tosylé en présence chlorure de 4-toluènesulfonyle, de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) et de triéthylamine dans du dichlorométhane à 30 °C pendant 4 h, donnant ainsi le 4'-méthylbenzènesulfonate de pent-4-yn-1-yle **26** de façon quantitative (Schéma 42)[72].

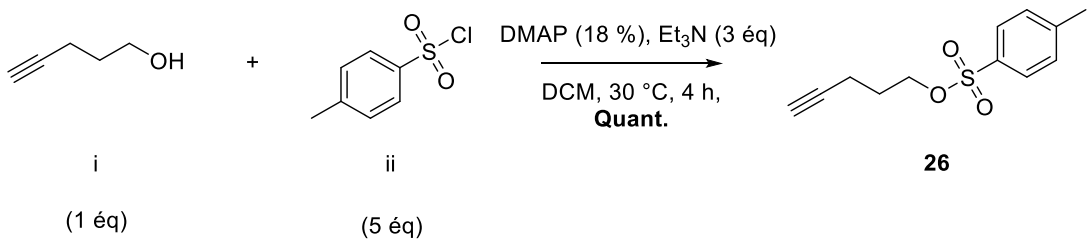


Schéma 42. Tosylation du pent-4-yn-1-ol.

L'étape suivante a consisté en la réalisation d'une attaque nucléophile de l'amine du (3-aminophényl)carbamate de *tert*-butyle commercial sur le composé **26** en présence d'une base pour piéger l'acide *para*-toluène sulfonique libéré (Schéma 43) .

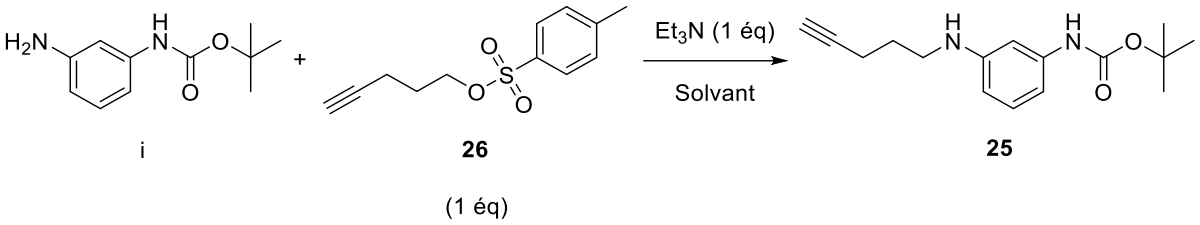


Schéma 43. Substitution nucléophile sur l'intermédiaire 26 par le (3-aminophényl)carbamate de *tert*-butyle.

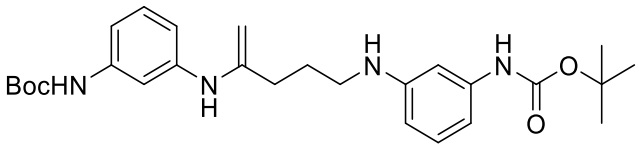
Tableau 9. Optimisation des conditions de formation du synthon 25.

Entrée	**i (éq)**	**Solvant**	**T°**	**Temps**	**Rdt (%)**
1	1	EtOH	50 °C	3 j	20
2	1	EtOH	Reflux	24 h	21
3	**1**	**EtOH**	**80 °C (MW)**	**3 h**	**30**
4	1	EtOH	100 °C (MW)	3 h	28
5	2	EtOH	Reflux	16 h	/
6	1	THF	50 °C	16 h	10

Différentes conditions ont été utilisées pour obtenir le meilleur rendement possible (Tableau 9). Dans un 1er temps, l'attaque nucléophile a été réalisée en utilisant 1 équivalent de chacun des deux réactifs, en présence d'1 équivalent de triéthylamine dans l'éthanol à 50 °C pendant 3 j ce qui a permis d'isoler le synthon **25** avec un rendement de 20 % (Tableau 9, entrée 1).

Nous avons alors essayé d'optimiser nos conditions en augmentant la température de réaction, en se plaçant au reflux, ce qui a entraîné en 24 h l'obtention du synthon **25** avec un rendement de 21 % (Tableau 9, entrée 2). L'augmentation de la température n'a pas abouti à une amélioration significative du rendement mais a tout de même permis de diminuer le temps de réaction. Cette même réaction a ensuite été effectuée en utilisant un chauffage par irradiation micro-ondes (MW) à 80 °C ou 100 °C pendant 3 h, permettant l'obtention du composé **25** avec des rendements de 30 % et 28 %, respectivement (Tableau 9, entrées 3 et 4). Il faut noter qu'à partir de 100 °C, une dégradation du synthon tosylé a été observée.

Nous avons ensuite modifié le nombre d'équivalents de l'amine commerciale (Tableau 9, entrée 5). Cependant, l'addition de 2 équivalents de ce composé a entraîné l'attaque secondaire d'une deuxième molécule de (3-aminophényl)carbamate de *tert*-butyle sur la triple liaison du synthon **25** formé aboutissant à un intermédiaire secondaire (composé **27,** dont la structure est indiquée ci-dessous, Figure 39).



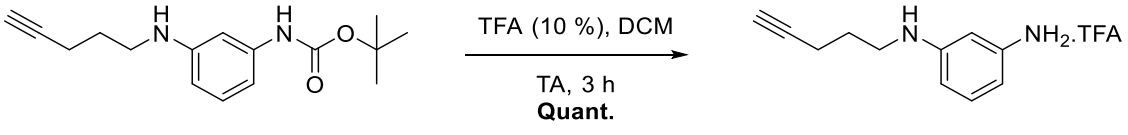
27

Figure 39. Intermédiaire secondaire obtenu après double attaque du (3-aminophényl)carbamate *de tert*-butyle.

Enfin, le changement de solvant pour du THF à 50 °C n'a pas permis d'obtenir un meilleur rendement (Tableau 9, entrée 6).

La difficulté de ce protocole a notamment résidé dans le fait que la séparation des composés a été difficile car les rapports frontaux (R_f) du réactif, du produit et du sous-produit sont très proches.

Le synthon **26** a ensuite été déprotégé par hydrolyse acide du carbamate selon le schéma suivant (Schéma 44). La déprotection de la fonction amine du composé **26** a été réalisée selon des conditions classiques au moyen d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) à 10 % dans le dichlorométhane (DCM) à température ambiante pendant 3 h, permettant l'obtention du dérivé **28** avec un rendement quantitatif.



25 **28**

Schéma 44. Déprotection du composé 26 par hydrolyse acide.

La fonctionnalisation de la position 3 de la quinoxaline iodée **12** a été réalisée *via* une SN_{ar} entre la quinoxaline **12** et le synthon **28** en se basant sur les conditions optimisées précédemment lors de la voie 3 permettant l'obtention du composé **22** avec la quinoxaline iodée **12**. Ainsi, 1 équivalent du composé **12** a été introduit avec 3 équivalents du synthon **28** en présence de 3 équivalents de DIPEA dans du THF au reflux pendant 24 h (Schéma 45). Contrairement aux réactions de SN_{ar} précédentes, une dégradation complète des réactifs de départ a pu être observée.

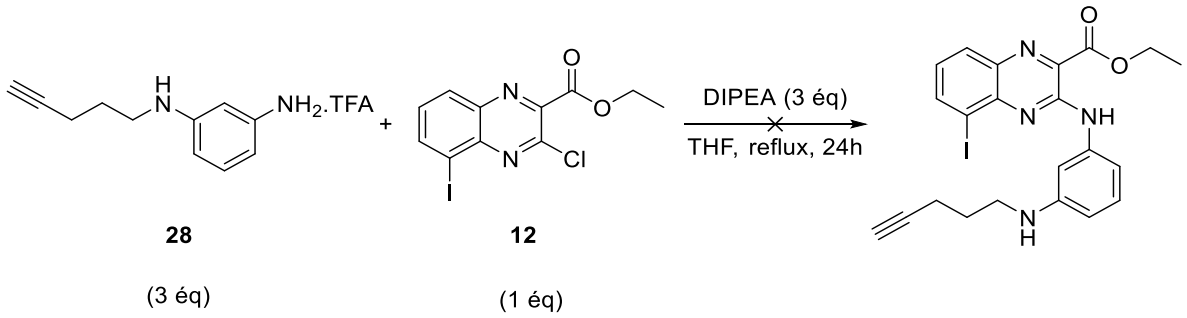


Schéma 45. Fonctionnalisation de la position 3 du noyau quinoxaline 12.

Le faible rendement global observé lors de la formation du macrocycle **23** obtenu *via* une fermeture de cycle par couplage de Sonogashira et les difficultés rencontrées lors de l'optimisation précédente nous ont poussés à envisager une nouvelle voie de synthèse, se basant sur une fermeture de cycle par substitution nucléophile.

b. Voie 2 : Fermeture de cycle par substitution nucléophile

Une nouvelle voie avec une fermeture « centrale » par substitution nucléophile a ainsi été imaginée (Voie 2, Schéma 37).

(i) Fonctionnalisation de la position 3 de la quinoxaline **12**

La 1ère étape a consisté en la fonctionnalisation de la quinoxaline **12** en position 3 selon une réaction de SN_{ar} en position 3 avec le (3-aminophényl)carbamate de *tert*-butyle commercial (Schéma 46). Différentes conditions ont été envisagées de façon à optimiser le rendement de cette réaction.

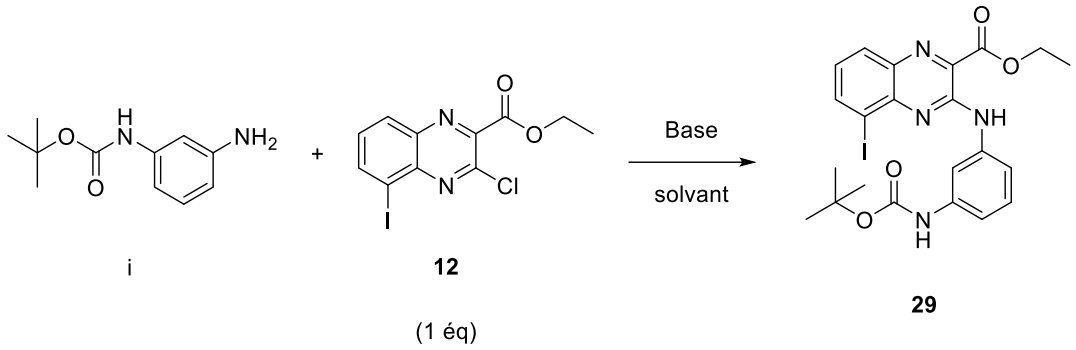


Schéma 46. Substitution nucléophile aromatique en position 3 de la quinoxaline 12.

Tableau 10. Optimisation de la SN_{ar} en position 3 de la quinoxaline 12.

Entrée	i (éq)	Solvant	Base	T°	Temps	Rdt (%)
1	1	EtOH	/	Reflux	3 j	10
2	1	EtOH	/	125 °C (MW)	2 h	/
3	1,5	EtOH	/	125 °C (MW)	2 h	20
4	1	THF	/	125 °C (MW)	2 h	10
5	1,5	THF	DIPEA	125 °C (MW)	2 h	20
6	**1**	**THF**	**DIPEA**	**Reflux**	**3 j**	**60**

Dans un 1er temps, nous avons utilisé le protocole décrit par B. Oyallon *et al.* [30] consistant à réaliser cette amination au reflux dans l'éthanol, ce qui a permis d'obtenir le dérivé désiré **29** avec un rendement de 10 % (Tableau 10, entrée 1). Afin d'optimiser le rendement et de diminuer le temps de réaction, des essais ont été réalisés en utilisant un chauffage par irradiation micro-ondes (MW) à 125 °C pendant 2 h en faisant varier le solvant ou le nombre d'équivalents d'amine de départ (Tableau 10, entrées 2, 3 et 4). Le meilleur rendement de 20 % a été obtenu dans l'éthanol en utilisant 1,5 équivalents d'amine de départ. Néanmoins, un sous-produit est apparu correspondant au dérivé déprotégé du composé **29**. Cela pourrait s'expliquer par la libération de HCl pendant la SN_{ar}. Il faut noter qu'avec le THF, aucun sous-produit n'a été identifié.

Nous avons alors augmenté le nombre d'équivalents de l'amine de départ (1,5 équivalents) et utilisé une base (la DIPEA). Ainsi, en chauffant par irradiation micro-ondes à 125 °C dans le THF pendant 2 h le composé **29** a été obtenu avec un rendement de 20 % (Tableau 10, entrée 5). Si aucun sous-produit déprotégé n'a été observé, une autre sous-réaction est néanmoins apparue. En effet, une attaque secondaire de l'amine sur l'ester en position 2 a été observée empêchant alors l'utilisation de plus d'1 équivalent d'amine de départ.

Dans un dernier essai, nous avons alors utilisé 1 équivalent d'amine de départ en présence de DIPEA, au reflux du THF pendant 3 jours, permettant l'obtention du composé souhaité **29** avec un rendement significativement amélioré de 60 % (Tableau 10, entrée 6).

(ii) Fonctionnalisation de la position 5 de la quinoxaline **29**

Une fois le composé **29** obtenu, l'étape de fonctionnalisation de la position 5 du noyau quinoxaline *via* un couplage de Sonogashira a été mise en œuvre à partir du 4-pentyn-1-ol commercial. Ce couplage a été réalisé en utilisant les conditions optimisées précédemment pour l'obtention du macrocycle **23** en présence de 10 % de $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, de 5 % de CuI et de 3 équivalents de triéthylamine dans le THF au reflux[73]. Le composé **30** a ainsi été obtenu avec un très bon rendement de 90 % (Schéma 47).

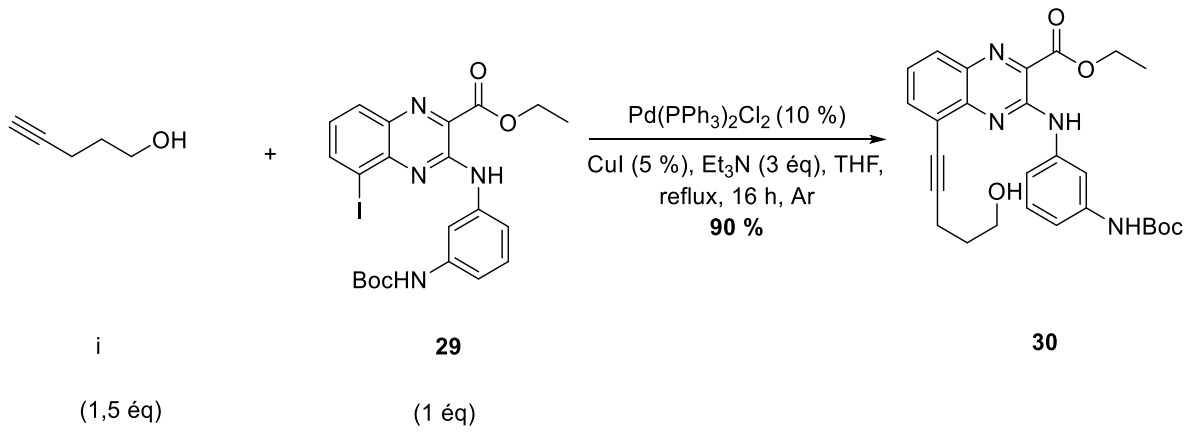
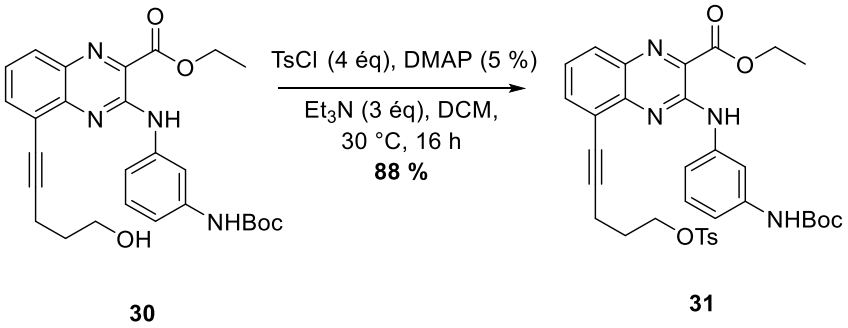


Schéma 47. Fonctionnalisation de la position 5 de la quinoxaline 29 *via* un couplage de Sonogashira.

(iii) Tosylation du composé **30**

L'étape suivante a reposé sur la formation d'un bon groupement partant à partir de la fonction alcool du composé **30**, afin de faciliter ensuite la substitution nucléophile (SN) intramoléculaire permettant d'effectuer la macrocyclisation. Pour cela, une tosylation de la fonction alcool du composé **30** a été réalisée en utilisant du chlorure de 4-toluènesulfonyle, en présence de 5 % de DMAP, de 3 équivalents de triéthylamine dans du DCM à 30 °C pendant 16 h, ce qui a permis d'obtenir l'intermédiaire **31** avec un rendement de 88 % (Schéma 48).



30 **31**

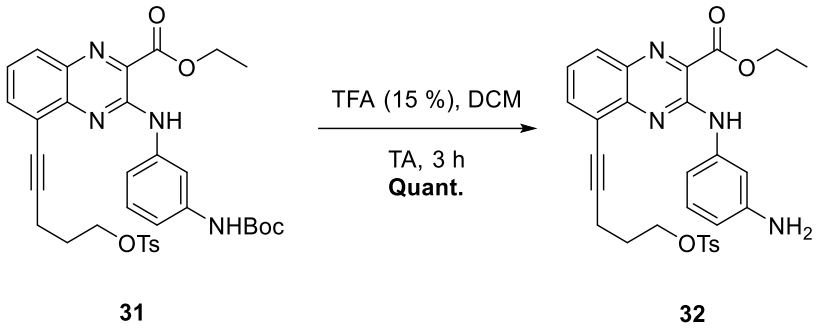
Schéma 48. Tosylation du composé 30.

(iv) Fermeture de cycle par substitution nucléophile intramoléculaire pour l'obtention du macrocycle 33

- <u>Déprotection de la fonction amine du composé **31**</u>

Avant de réaliser l'étape de substitution nucléophile intramoléculaire, une étape de déprotection de la fonction amine (protégée par un groupement Boc) a été nécessaire.

Cette déprotection a été effectuée par hydrolyse acide du carbamate en présence 15 % de TFA dans une solution de DCM à température ambiante pendant 3 h, permettant l'obtention quantitative du composé **32** (Schéma 49).

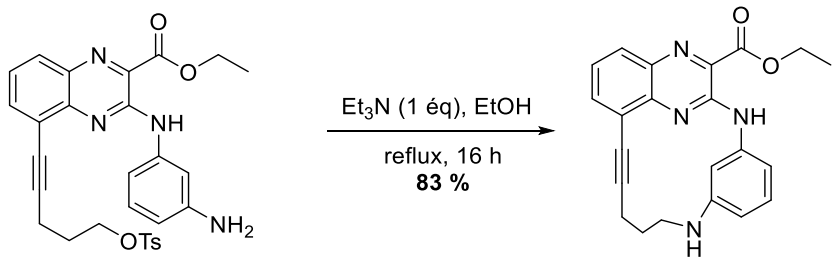


31 **32**

Schéma 49. Déprotection du composé 31.

- Réaction de fermeture de cycle par substitution nucléophile intramoléculaire

Comme décrit précédemment, afin d'éviter l'obtention d'un dimère par réaction intermoléculaire plutôt qu'intramoléculaire, le composé **32** a été dilué dans de l'EtOH à une concentration de 10^{-3} mol.L^{-1}. La solution a ensuite été agitée au reflux de l'éthanol pendant 16 h en présence d'1 équivalent de Et_3N afin de piéger l'acide paratoluène sulfonique libéré, permettant d'isoler le macrocycle **33** avec un rendement très satisfaisant de 83 % (Schéma 50).



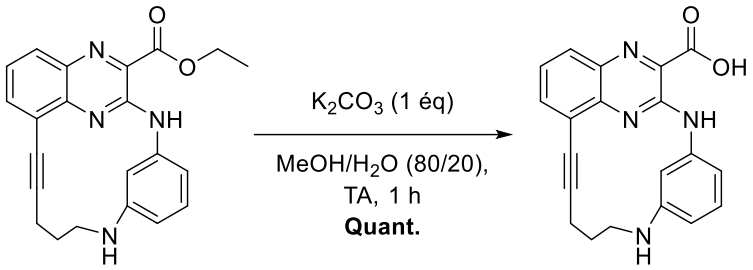
32 **33**

Schéma 50. Macrocyclisation du composé 32

(v) Saponification de l'ester du macrocycle **33** pour l'obtention du macrocycle cible 34

Une fois le macrocycle **33** obtenu, une dernière étape de saponification a été mise en œuvre, en présence d'1 équivalent de carbonate de potassium (K_2CO_3) dans une solution aqueuse de méthanol à 80 % à température ambiante pendant 1 h. Le macrocycle **33** a ainsi été

obtenu sous sa forme d'acide carboxylique, après traitement acide, de façon quantitative (Schéma 51).



33 **34**

Schéma 51. Saponification du macrocycle 33.

Le rendement global obtenu pour le macrocycle **34** en 8 étapes est de 8 %. Ce rendement est 13 fois supérieur au rendement global obtenu en 5 étapes pour le macrocycle **23** précédent (0,6 %). Cela souligne l'intérêt de cette nouvelle voie de synthèse avec une fermeture de cycle centrale par SN.

(vi) Pharmacomodulations à partir du macrocycle **34**

- <u>Réduction de la triple liaison du macrocycle **34**</u>

Le macrocycle **34** ne montrant pas de fragilité en milieu acide, une réduction de la triple liaison a été envisagée pour obtenir les macrocycles cibles **35a**, **35b**, **35c** (Schéma 52).

La réduction d'un alcyne sur Pd/C sous flux d'hydrogène est connue pour entraîner l'obtention de l'alcane correspondant[74]. En revanche, la réduction d'un alcyne en alcène nécessite généralement l'utilisation de catalyseurs spécifiques afin de s'arrêter au stade alcène. Ainsi, le catalyseur de Lindlar peut être utilisé. Ce catalyseur hétérogène est constitué de palladium déposé sur un support (ex. carbonate de calcium) et empoisonné, désactivé de façon à obtenir une réduction en alcène stéréosélective selon une addition syn, avec obtention de l'isomère Z (ou cis). Il est également possible d'obtenir un composé éthylénique de stéréochimie E (ou anti) en effectuant la réduction de la triple liaison par un métal alcalin (ex. sodium) dans l'ammoniaque liquide.

Nous avons ainsi voulu, dans un 1er temps, réduire la triple liaison de façon complète. Cette réduction a été réalisée avec un hydrogénateur (ThalesNano, H-cube®), qui libère du di-hydrogène par électrolyse de l'eau, sur une cartouche de Pd/C (10 %) sur laquelle passe notre composé. Le macrocycle **33** a donc été solubilisé dans un mélange d'acétone et d'acétate d'éthyle (EtOAc) (90/10) et soumis à une réaction d'hydrogénation en flux continu (Thales-Nano, H-cube®, 1 mL.min^{-1}, température ambiante, 3 bar, avec 10 % de Pd/C). Le mélange obtenu a été purifié par HPLC semi-préparative, ce qui a permis l'obtention de trois composés différents, qui, après analyse par RMN et HRMS, se sont avérés être le dérivé éthylénique de stéréochimie E (**35a**), celui de stéréochimie Z (**35b**) et le composé complétement réduit (**35c**), obtenus avec des rendements de 20 %, 10 % et 56 %, respectivement (Schéma 52).

Cette même réaction a été réalisée en utilisant une cartouche de Lindlar de manière à obtenir uniquement le dérivé éthylénique de stéréochimie Z avec un meilleur rendement. Néan-moins, l'utilisation du catalyseur empoisonné n'a pas permis de stopper la réduction au stade d'alcène. Cela peut s'expliquer par le fait que le H-Cube ne permet pas de contrôler précisément la pression. Une pression trop forte à certains moments du passage du composé sur la cartouche pourrait expliquer ces résultats.

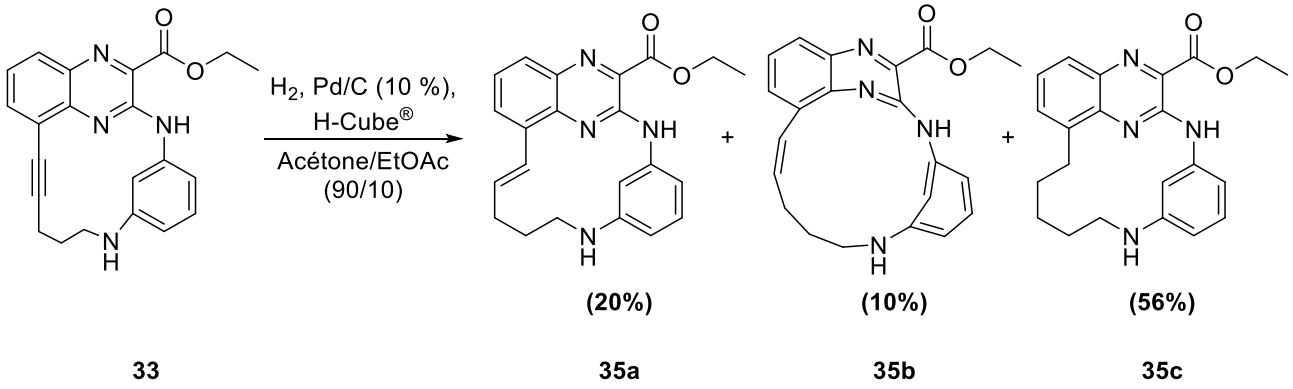


Schéma 52. Réduction du macrocycle 33 par réaction d'hydrogénation en flux continu.

- Saponification de l'ester des macrocycles 35a-c pour l'obtention des macrocycles cibles 36a-c

La saponification des macrocycles **35a-c** en présence d'1 équivalent de soude (NaOH) dans un mélange de DMSO et d'eau (80/20), à température ambiante, pendant 15 min, a permis d'obtenir les macrocycles cibles **36a**, **36b** et **36c** de façon quantitative. (Schéma 53).

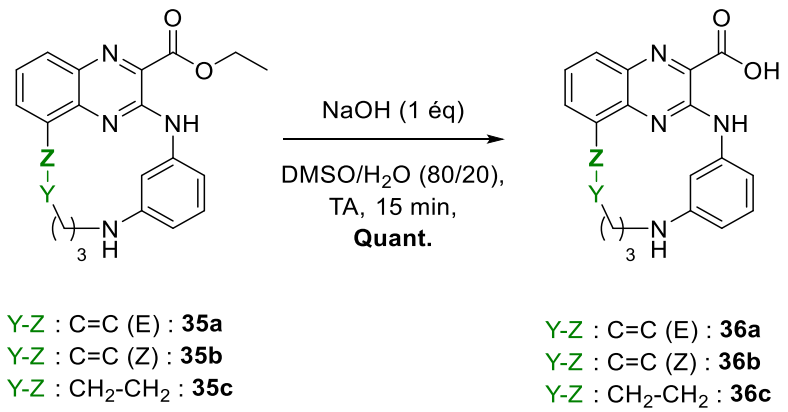


Schéma 53. Saponification des macrocycles 35a-c.

Les rendements globaux des trois nouveaux macrocycles **36a**, **36b** et **36c** sur 9 étapes sont de 2 %, 1 % et 5 %, respectivement. Ces trois macrocycles originaux ont été envoyés à Bordeaux, au sein de l'ISM (UMR 5255), pour réaliser des analyses cristallographiques par DRX après étape de cristallogenèse. Pour l'instant, seul le macrocycle **36c** a permis d'obtenir des cristaux exploitables, qui, après analyse, ont confirmé la structure de ce macrocycle à l'état solide (cf. Annexe 2. Structure cristallographique du macrocycle **36c**). Les spectres RMN du ^{13}C des macrocycles **35b**, **36a** et **36b** n'ayant pas pu être exploités correctement du fait des trop petites quantités de produits obtenues, les molécules sont en cours de resynthèse afin d'avoir des analyses complètes avant publication.

2.2 Série phénolique

Le chef de file **2** possédant un groupement phénol en position 3 du noyau quinoxaline, nous avons envisagé de pharmacomoduler la série macrocyclique précédente en remplaçant le groupement phényl par un groupement phénol (Figure 40) de manière à optimiser l'activité sur les kinases Pim-1 et Pim-2 en instaurant de potentielles interactions supplémentaires.

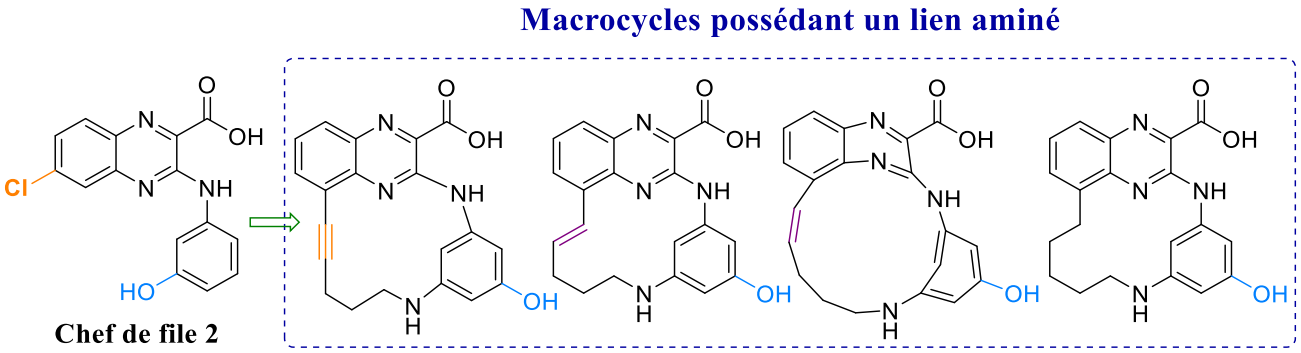


Figure 40. Pharmacomodulations envisagées pour la série phénolique.

Etant donné le bon rendement de la stratégie de synthèse précédente, cette voie a été reprise et adaptée pour la synthèse des analogues macrocycliques en série phénolique, en partant du 3,5-diaminophénol commercial comme réactif de départ (Schéma 54).

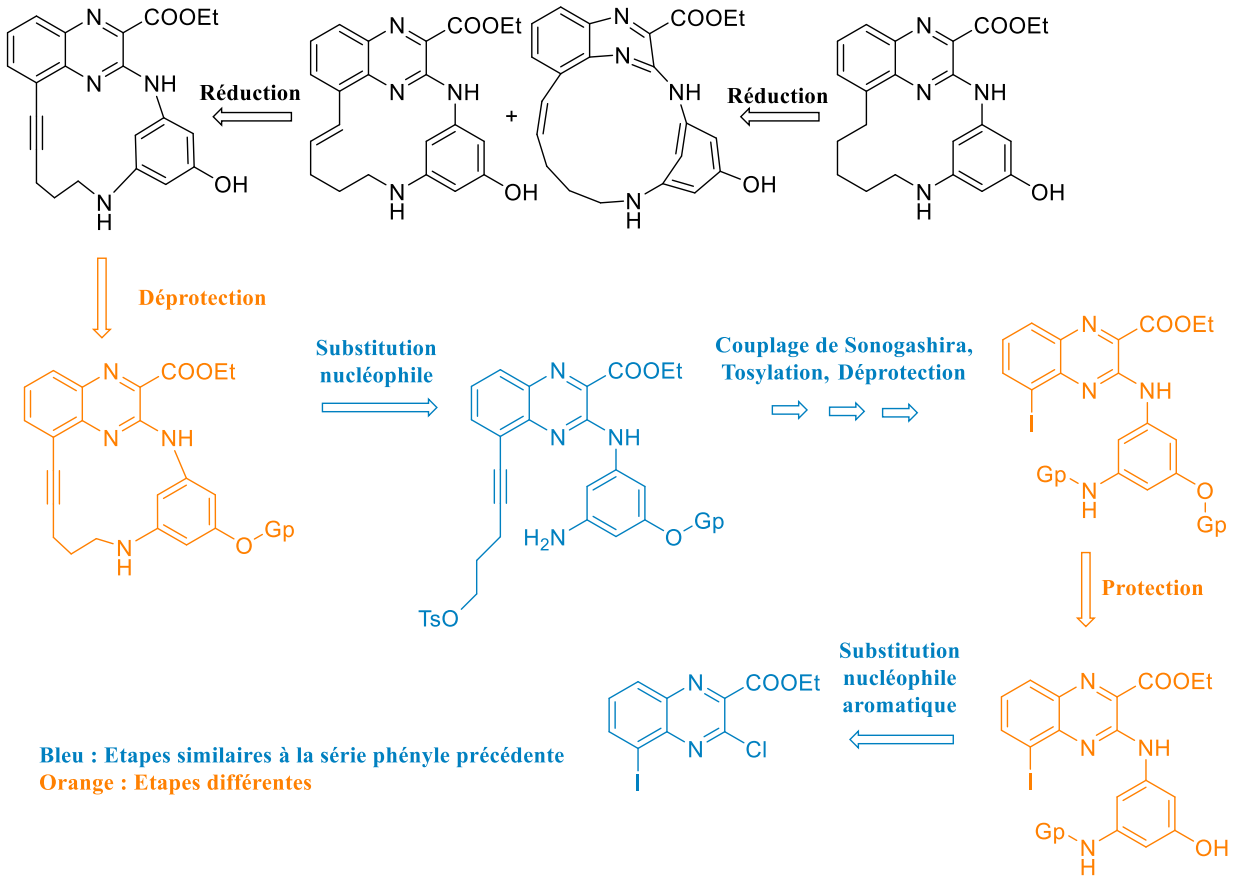


Schéma 54. Schéma de rétrosynthèse des nouveaux macrocycles phénoliques envisagés.

(i) Fonctionnalisation de la quinoxaline **12** en position 3 par substitution nucléophile aromatique

- Monoprotection du 3,5-diaminophénol

La fonctionnalisation de la quinoxaline **12** en position 3 a tout d'abord nécessité la mono protection du 3,5-diaminophénol commercial. Cette phénylènediamine commerciale a été protégée de façon sélective sur l'une des deux fonctions amine selon le protocole de Jahani *et al.*[75], en utilisant du chlorure de guanidinium (Gu.Cl) comme catalyseur organique qui permet de diminuer le réactivité de l'une des deux amines en se complexant avec celle-ci. Pour la mise en œuvre de cette réaction, le 3,5-diaminophénol a été mis en réaction avec du dicarbonate de di-*tert*-butyle et du chlorure de guanidinium (15 mol%) à 0 °C pendant 1 h, puis à 60 °C pendant 1 h pour obtenir le (3-amino-5-hydroxyphényl)carbamate de *tert*-butyle **37** avec un rendement de 56 % (Schéma 55).

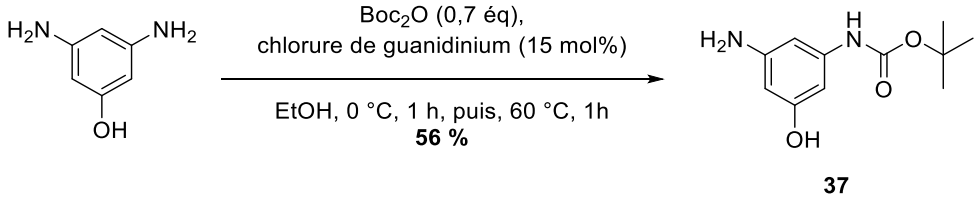


Schéma 55. Monoprotection du 3,5-diaminophénol.

- Fonctionnalisation de la quinoxaline **12** en position 3 par substitution nucléophile aromatique

La fonctionnalisation de la position 3 de la quinoxaline **12** a ensuite été réalisée *via* une SN_{ar} du chlore en position 3 du noyau quinoxaline par l'amine libre du composé **37**. Cette réaction a été effectuée selon le même protocole que les SN_{ar} de la série précédente, en utilisant 1 équivalent de chaque réactif en présence de DIPEA au reflux du THF pendant 3 jours, ce qui a permis d'obtenir l'intermédiaire **38** avec un rendement de 60 % (Schéma 56).

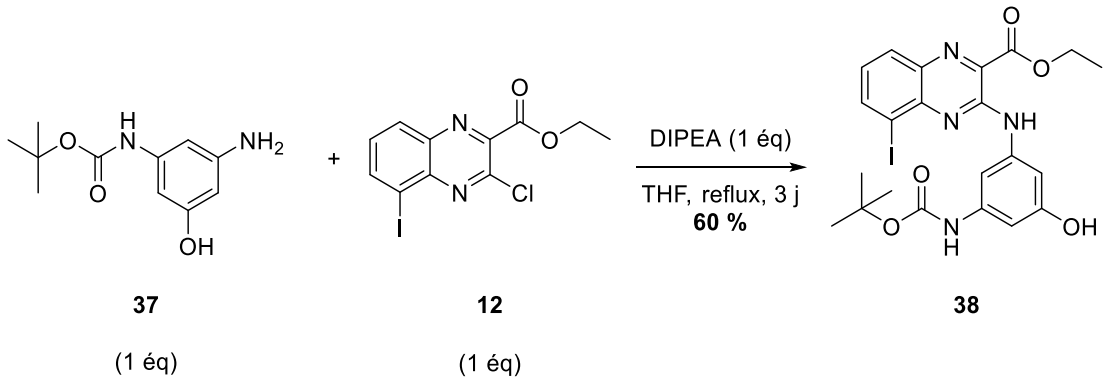


Schéma 56. SN_{ar} sur la position 3 du noyau quinoxaline 12.

(ii) Protection du groupement hydroxyle

Pour cette série, la fonction hydroxyle du composé **38** a dû être protégée afin d'éviter une réaction de compétition lors de l'étape ultérieure de tosylation.

Le phénol a donc été protégé dans des conditions classiques, en présence de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMSCl), de triéthylamine et de DMAP (5 %) dans le DCM à température ambiante pendant 24 h[76], permettant d'isoler le composé **39** avec un rendement de 81 % (Schéma 57).

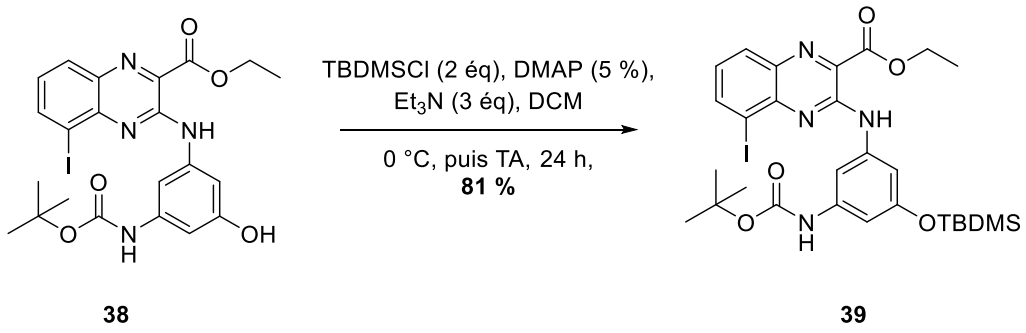


Schéma 57. Protection de la fonction phénol du composé 38.

(iii) Fonctionnalisation de la position 5 de la quinoxaline **39** par couplage de Sonogashira

La fonctionnalisation de la position 5 du noyau quinoxaline du composé **39** par le 4-pentyn-1-ol a été réalisée selon le même protocole que pour la série précédente, *via* un couplage de Sonogashira en présence de 10 % de $Pd(PPh_3)_2Cl_2$, de 5 % de CuI et de 3 équivalents d'Et_3N au reflux du THF pendant 16 h. Le composé **40** a ainsi été obtenu avec un rendement de 81 % (Schéma 58).

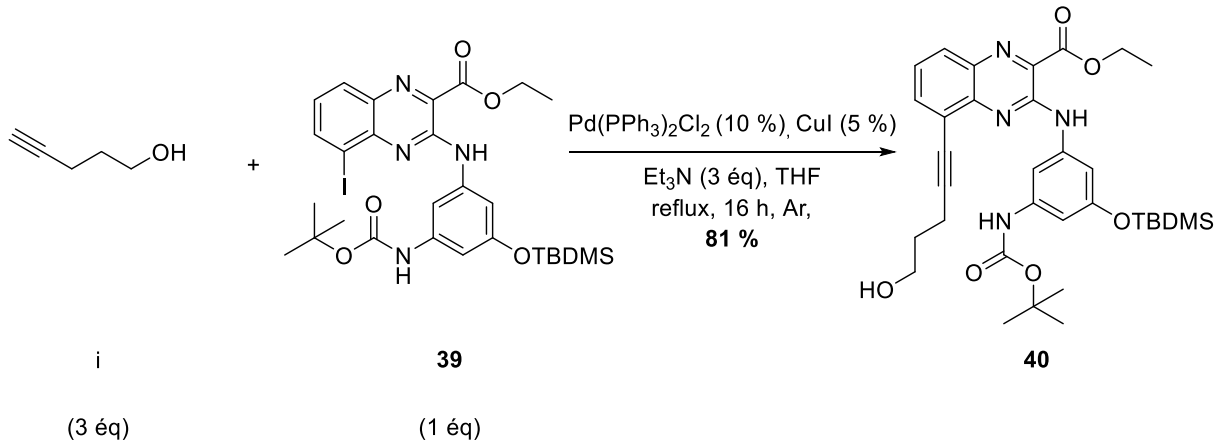


Schéma 58. Fonctionnalisation du composé 39 en position 5 *via* un couplage de Sonogashira.

(iv) Tosylation et déprotection

- <u>Tosylation de la fonction alcool du composé **40**</u>

Le composé **40** a ensuite été engagé dans une réaction de tosylation dans des conditions précédemment décrites en présence de chlorure de 4-toluènesulfonyle, de 5 % de DMAP et de 3 équivalents de Et_3N dans du DCM à température ambiante pendant 16 h afin d'obtenir le dérivé **41** souhaité avec un rendement de 86 % (Schéma 59).

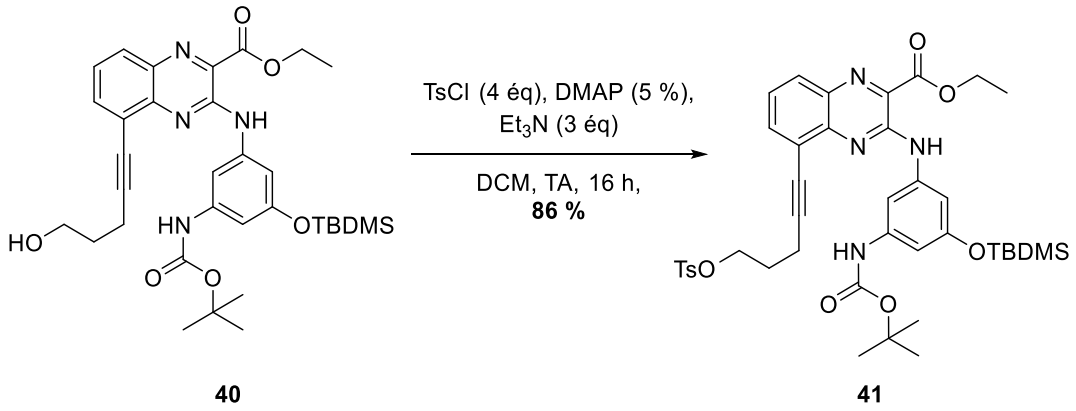


Schéma 59. Tosylation de la fonction alcool du composé 40.

- Déprotection de la fonction amine de l'intermédiaire **41**

Une réaction de déprotection du dérivé d'aniline **41** par hydrolyse acide du carbamate libérant ainsi la fonction amine nucléophile nécessaire à l'étape suivante de SN a ensuite été mise en œuvre dans des conditions classiques, en utilisant 15 % de TFA dans du DCM à température ambiante pendant 3 h, pour donner le composé **42** avec un rendement de 87 % (Schéma 60).

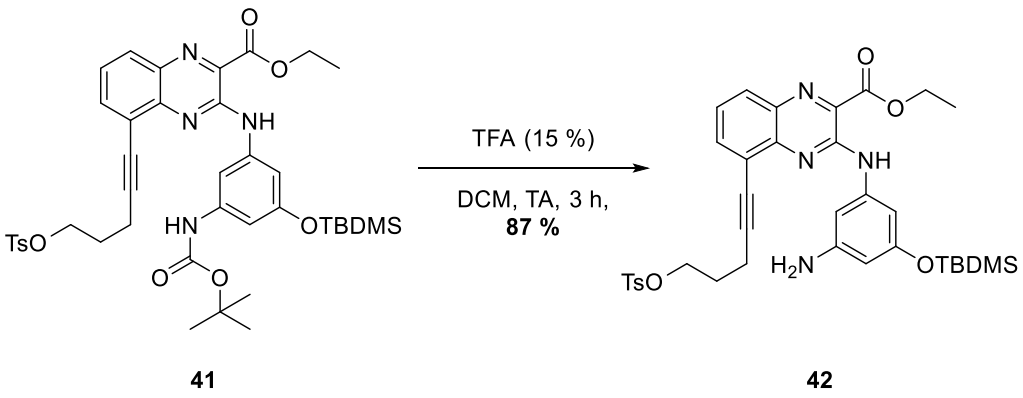


Schéma 60. Déprotection de la fonction amine par hydrolyse acide de l'intermédiaire 41.

(v) Macrocyclisation par réaction de substitution nucléophile et obtention du macrocycle cible **45**

- Fermeture de cycle par SN intramoléculaire

La fermeture de cycle a ensuite été réalisée selon les conditions décrites précédemment. Ainsi, le composé **42** a été dilué dans de l'EtOH à une concentration de 10^{-3} mol.L^{-1} en présence d'Et_3N, au reflux pendant 16 h, donnant ainsi le macrocycle **43** avec un rendement de 84 % (Schéma 61).

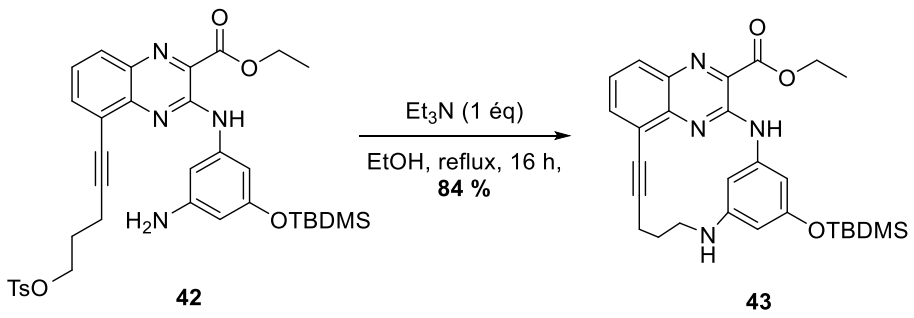


Schéma 61. Macrocyclisation du composé 42.

- Déprotection du composé **43**

La fonction phénol du macrocycle **43** a ensuite été déprotégée avec du fluorure de tétra-*n*-butylammonium (TBAF)[77] dans du THF à température ambiante pendant 1 h. Le macrocycle **44** a ainsi été obtenu avec un rendement de 68 % (Schéma 62). Cette perte de rendement s'explique par le fait qu'une partie de l'ester en position 2 du composé **44** se saponifie dans ces conditions.

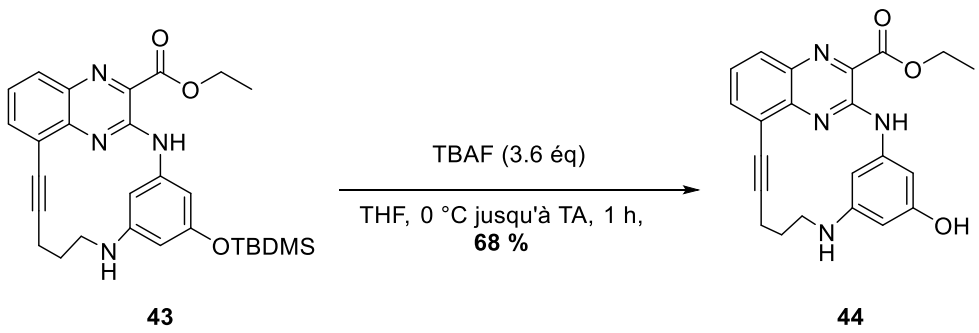
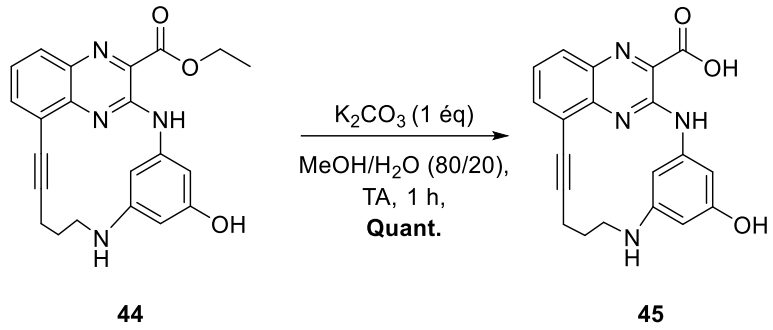


Schéma 62. Déprotection du composé 43 en présence de TBAF.

- Saponification de l'ester du macrocycle **44**

La dernière étape a consisté en la saponification de l'ester en position 2 du composé **44** qui a été réalisée en présence d'un équivalent de K_2CO_3 dans une solution aqueuse de méthanol à 80 % à température ambiante pendant 1 h pour obtenir le macrocycle souhaité **45** avec un rendement quantitatif (Schéma 63).



44 **45**

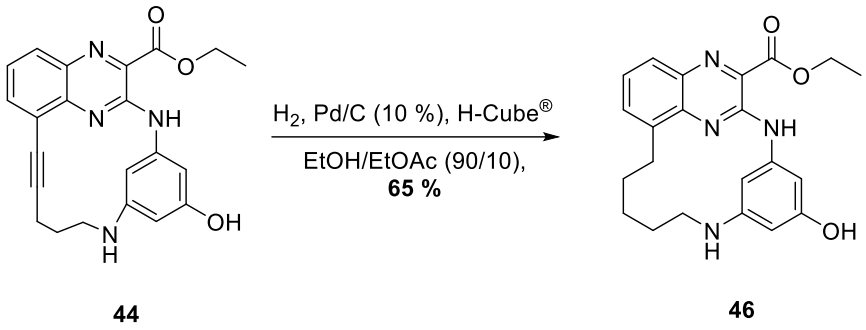
Schéma 63. Saponification du macrocycle 44.

Le rendement global d'obtention du macrocycle **45** est de 3 % sur 10 étapes de synthèse.

(vi) Réduction du macrocycle **44** et obtention du macrocycle cible **47**

- Réduction de la triple liaison du macrocycle **44**

De la même manière que pour la série précédente, le macrocycle **44** a été mis en solution dans un mélange d'éthanol et d'acétate d'éthyle (90/10) puis réduit par une hydrogénation en flux continu en utilisant un H-Cube® (ThalesNano, 1 mL.min^{-1}, température ambiante, 3 bar) sur une cartouche de Pd/C (10 %). Dans cette série, la réduction sur Pd/C a donné uniquement le produit de réduction complète de la triple liaison, le macrocycle **46**, avec un rendement de 65 % (Schéma 64).

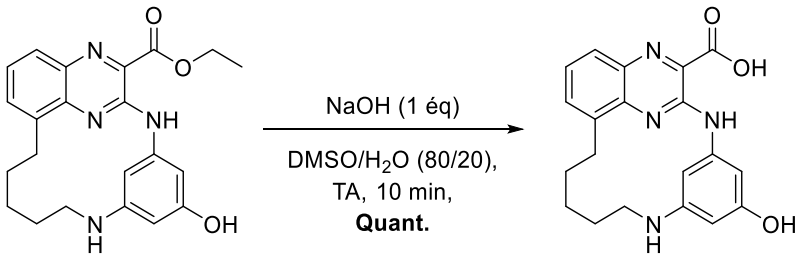


44 **46**

Schéma 64. Réduction de la triple liaison du macrocycle 44.

- Saponification du macrocycle **46**

Le macrocycle **46** a ensuite été saponifié en présence d'1 équivalent de NaOH dans un mélange de DMSO et d'eau (80/20) à température ambiante pendant 10 min pour obtenir le macrocycle cible **47** attendu, de façon quantitative (Schéma 65).



46 **47**

Schéma 65. Saponification du macrocycle 46.

Le rendement global d'obtention de ce macrocycle est de 2 % sur 11 étapes de synthèse. L'objectif de départ était de pouvoir pharmacomoduler la triple liaison pour obtenir 3 macrocycles différents. Néanmoins, nous n'avons pas eu le temps d'optimiser les conditions pour obtenir les deux analogues alcéniques Z et E souhaités comme dans la série précédente. Les macrocycles **45** et **47** sont actuellement en cours de cristallogenèse afin de confirmer leur structure par analyse cristallographique par DRX. Les spectres RMN du ^{13}C des macrocycles **45** et **47** n'ayant pas pu être exploités correctement, les molécules sont en cours de resynthèse afin d'avoir des analyses complètes avant publication.

(vii) Bilan de synthèse des macrocycles possédant un lien aminé

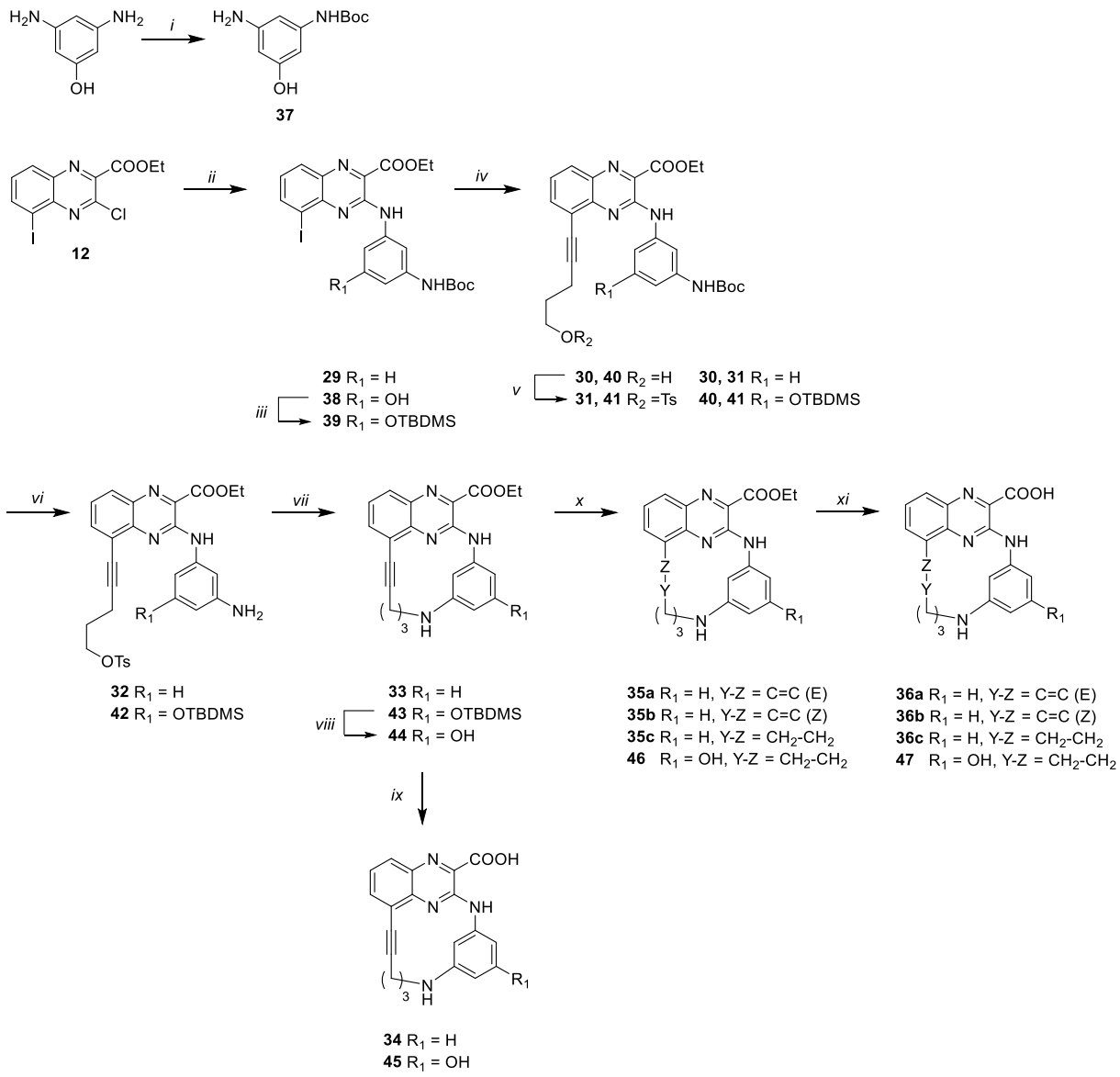


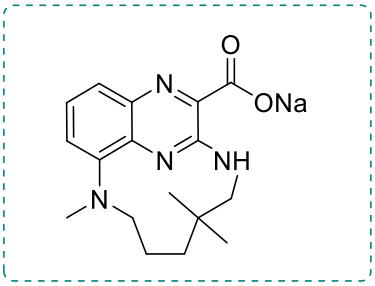
Schéma 66. Bilan de synthèse des macrocycles possédant un lien aminé.

Conditions de réactions: (i) Boc_2O (0,7 éq), Gu.Cl (15 mol%), EtoH, 0 °C – 1 h, 60 °C – 1h, 56 %, (ii) (3-aminophényle)carbamate de *tert*-butyle (1 éq), (3-aminophenol) carbamate de *tert*-butyle (1 éq), THF, DIPEA (1 éq), reflux, 3 j, 60 %; (iii) TBDMSCl (2 éq), DMAP (5 %), Et_3N (3 éq), DCM, TA, 24 h, 81 % ; (iv) pent-4-yn-1-ol (1,5 éq-3 éq), $Pd(PPh_3)_3Cl_2$ (10 %), CuI (5 %), Et_3N (3 éq), THF, reflux, 16 h, 90-81 %; (v) TsCl (4 éq), DMAP (5 %), Et_3N (3 éq), DCM, 30 °C-TA, 16 h, 88 -86 %; (vi) TFA (15 %), DCM, TA, 3 h, 87-Quant.; (vii) Et_3N (1 éq), EtOH, reflux, 16 h, 83-84 %; (viii) TBAF (3,6 éq), THF, TA, 1 h, 68 %; (ix) K_2CO_3 (1 éq), MeOH/H_2O (80/20), TA, 1 h, Quant.; (x) H_2, Pd/C (10 %), H-Cube®, Acétone/EtOAC (90/10), 20-56 %; (xi) NaOH (1 éq), DMSO/H_2O (80/20), TA, 10-15 min, Quant.

C. Approche 2

Comme énoncé dans les objectifs de l'approche 2, nous avons tout d'abord mis au point la voie de synthèse sur un macrocycle analogue simplifié du macrocycle cible (Figure 41 et Schéma 67). En effet, les coûts des produits de départ pour accéder au macrocycle cible étaient trop élevés pour envisager de les utiliser pour le développement du schéma de synthèse.

Macrocycle cible sélectionné obtenu par la logiciel Frags2Drugs



Macrocycles simplifiés

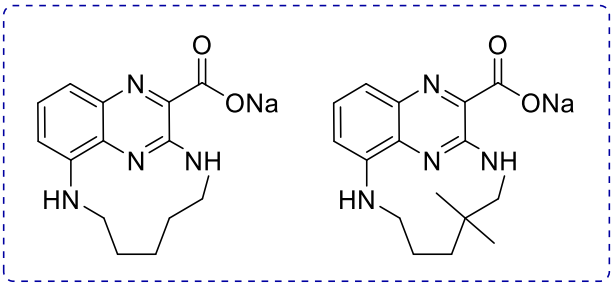


Figure 41. Macrocycles de l'approche 2 sélectionnés.

1. Synthèse du macrocycle simplifié de l'approche 2

L'obtention du macrocycle simplifié a été envisagée selon 2 voies d'accès différentes (Schéma 67), à partir de deux synthons de départ différents qui sont respectivement, les

quinoxalines **11** et **14**. L'une des principales différences entre ces deux voies réside dans la fermeture de cycle qui a été imaginée soit par réaction de couplage soit par substitution nucléophile.

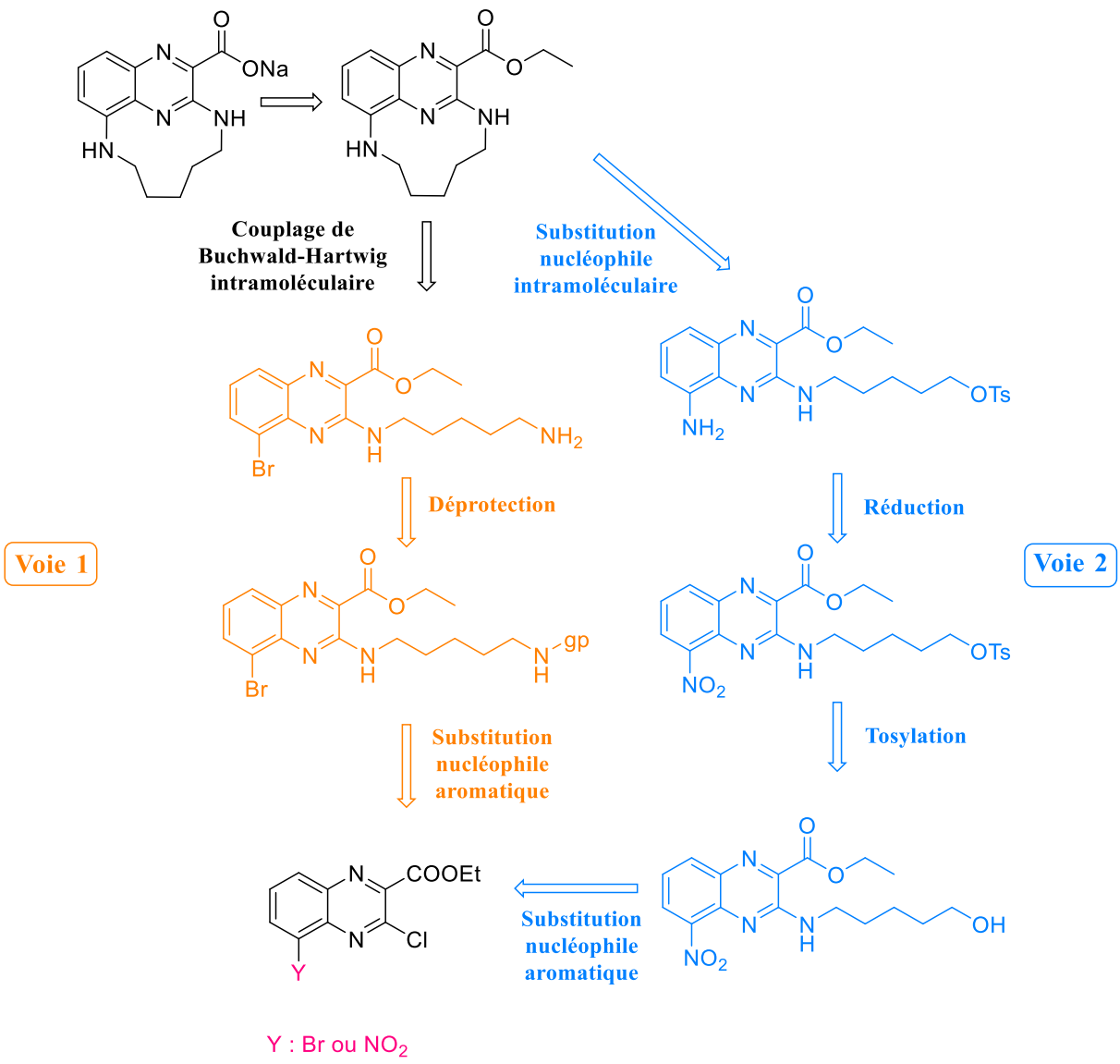


Schéma 67. Schéma rétrosynthétique des 2 voies de synthèse envisagées pour l'obtention du macrocycle simplifié de l'approche 2.

1.1 Voie 1 : Obtention du macrocycle à partir du 5-bromo-3-chloro-quinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 11

La 1ère voie de synthèse (voie 1, Schéma 68) s'appuie sur une fermeture de cycle par couplage de Buchwald, en partant de la quinoxaline **11** comme intermédiaire de départ.

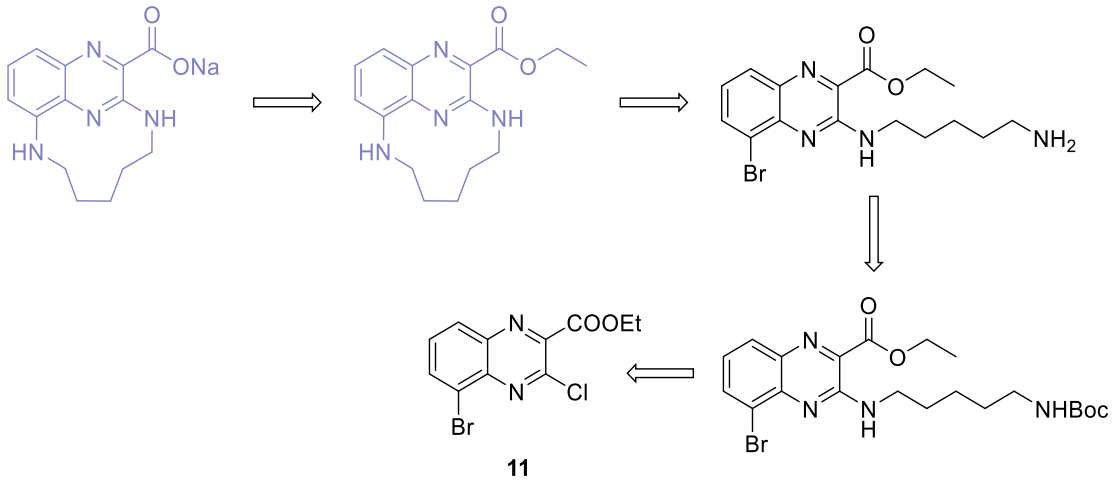


Schéma 68. Schéma rétrosynthétique de la voie 1 à partir de la quinoxaline 11.

a. Préparation du synthon de départ 48

Pour réaliser cette voie de synthèse, le synthon de départ **48** a dû être préparé à partir de la pentane-1,5-diamine commerciale. La protection de l'une des deux fonctions amines a été réalisée en présence de Boc_2O dans du chloroforme à température ambiante pendant 24 h selon le protocole de Li. B *et al*[78]. Le synthon **48** a ainsi été obtenu avec un rendement de 87 % (Schéma 69).

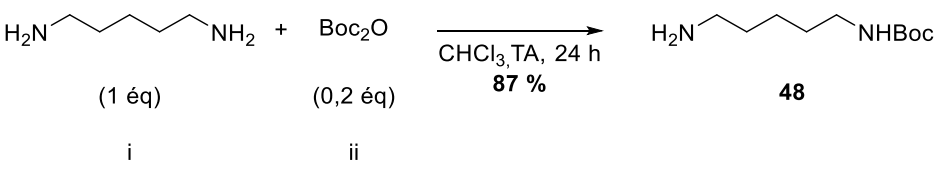


Schéma 69. Mono-protection de la pentane-1,5-diamine.

b. Fonctionnalisation de la position 3 de la quinoxaline **11** par SN_{ar}

Une fois le synthon **48** obtenu, la fonctionnalisation de la quinoxaline **11** en position 3 a été envisagée de deux manières différentes :

- Par SN_{ar} entre l'amine libre du synthon **48** et le chlore en position 3 du noyau quinoxaline.
- Par couplage de Ullmann en présence de cuivre.

Les deux types de réaction ont été mises en œuvre.

- <u>Fonctionnalisation par SN_{ar}</u>

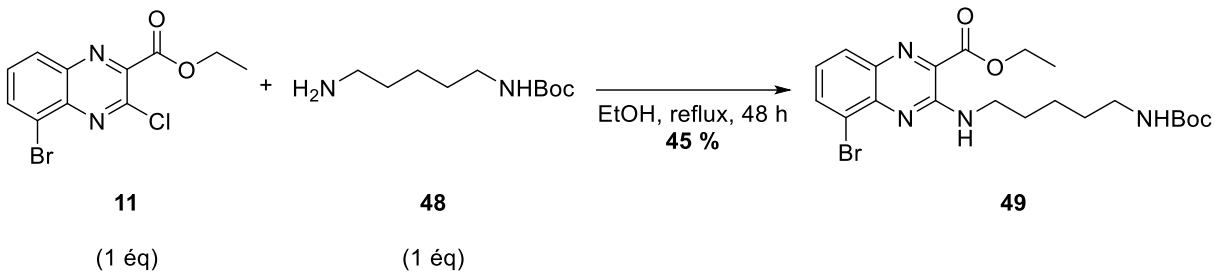


Schéma 70. Fonctionnalisation de la quinoxaline 11 en position 3 par SN_{ar}.

Nous avons tout d'abord essayé de fonctionnaliser la position 3 de la quinoxaline **11** par réaction de SN_{ar} en utilisant, dans un 1er temps, les conditions opératoires précédemment mises au point pour cette réaction par B. Oyallon *et al*.. Pour cela, 1 équivalent de chaque réactif a été mis au reflux de l'éthanol pendant 48 h, ce qui nous a permis d'obtenir le composé **49** avec un rendement de 45 % (Schéma 70).

- <u>Fonctionnalisation par couplage de Ullmann</u>

En parallèle, nous avons essayé d'obtenir le composé **49** par couplage de Ullmann en mettant 1 équivalent de la quinoxaline **11** et 1,5 équivalents du synthon **48** en présence de carbonate de césium (1,25 équivalents), de 10 % de CuI au reflux du THF pendant 6h, ce qui a permis d'isoler le composé **49** avec un rendement de 88 % (Schéma 71). Il faut noter qu'au-

delà de 6 h de réaction, une diminution de rendement est observée (50 % au bout de 16 h) du fait de l'apparition d'un sous-produit correspondant au dérivé saponifié du composé **49**.

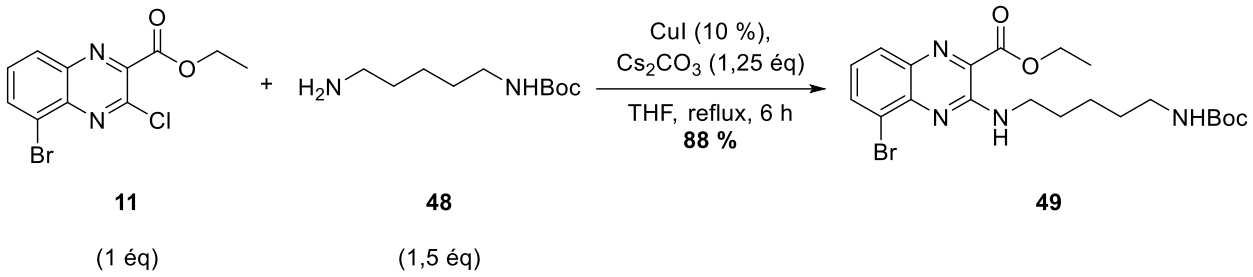


Schéma 71. Fonctionnalisation de la quinoxaline 11 en position 3 par couplage de Ullmann.

c. Macrocyclisation par réaction de couplage de Buchwald-Hartwig

- <u>Déprotection de la fonction amine du composé **49**</u>

Le composé **49** a tout d'abord été déprotégé par l'hydrolyse acide du carbamate en utilisant 30 % de TFA, dans le DCM, à température ambiante pendant 3 h, permettant l'accès au composé **50**, de façon quantitative, sous la forme d'un sel de TFA (Schéma 72).

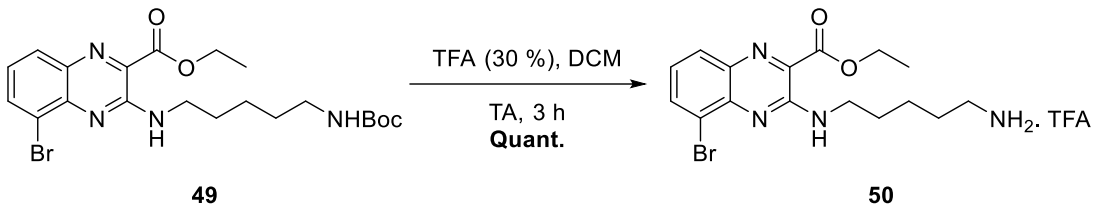


Schéma 72. Déprotection de la fonction amine du composé 49.

- <u>Fermeture de cycle par couplage de Buchwald-Hartwig</u>

L'étape de fermeture de cycle a été envisagée *via* l'utilisation d'un couplage de Buchwald-Hartwig (Schéma 73).

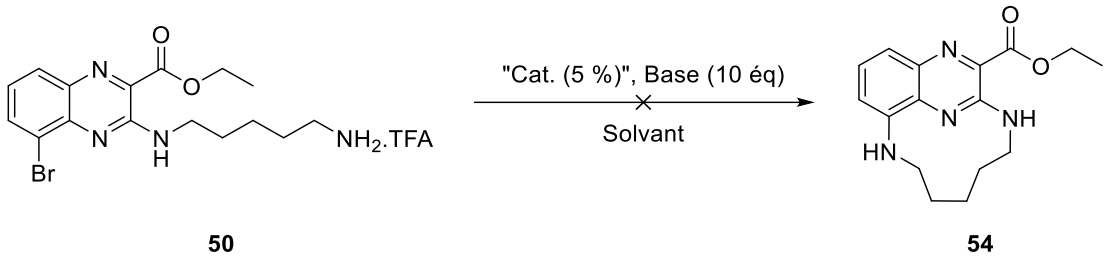


Schéma 73. Fermeture de cycle par couplage de Buchwald-Hartwig.

Différents essais ont été réalisés en utilisant différentes bases (tBuONa, Et_3N), différents catalyseurs (Xphos, Brettphos, Xantphos) et différents solvants (Dioxane, THF, DCM), en chauffant au reflux ou par irradiation micro-ondes. Cependant, aucun de ces essais n'a permis d'aboutir au macrocycle souhaité. La voie 2 de synthèse a donc été envisagée dans un second temps.

1.2 Voie 2 : macrocyclisation à partir du 3-chloro-5-nitroquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle 14

Une nouvelle approche (voie 2) a alors été envisagée faisant intervenir une fermeture de cycle par réaction de SN_{ar} intramoléculaire engageant une fonction amine en position 5 du noyau quinoxaline (Schéma 74). Cette voie de synthèse a été élaborée en partant de la quinoxaline **14** nitrée en position 5.

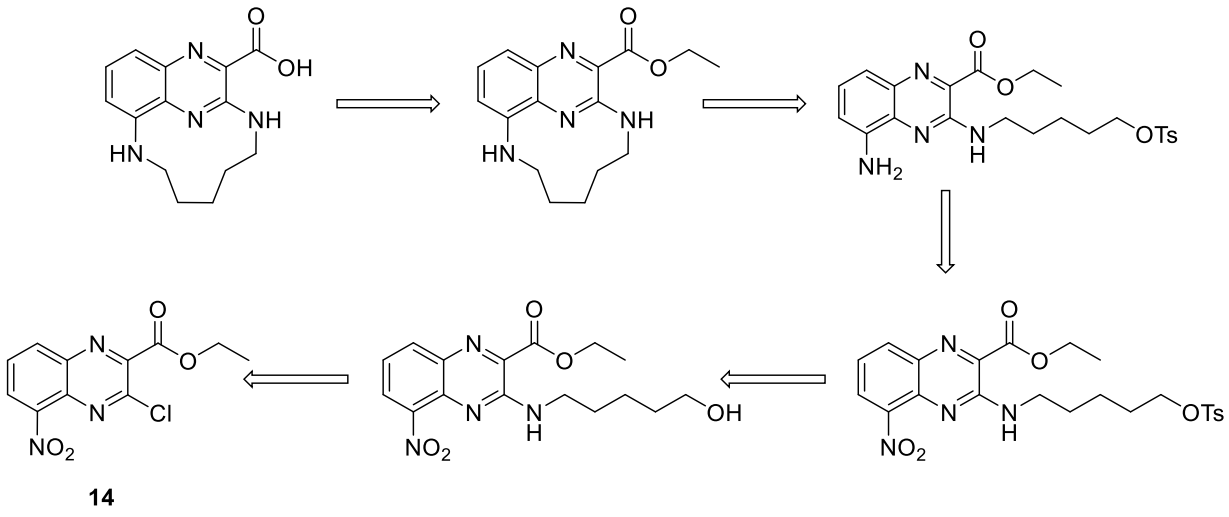


Schéma 74. Schéma de rétrosynthèse de la voie 2 permettant l'obtention du macrocycle simplifié de l'approche 2.

a. Fonctionnalisation de la position 3 de la quinoxaline **14**

De la même manière que précédemment, nous avons envisagé une SN_{ar}, ou un couplage de Ullmann.

- Fonctionnalisation par couplage de Ullmann

Dans un 1er temps, cette fonctionnalisation a été lancée *via* un couplage de Ullmann en utilisant les mêmes conditions que précédemment (carbonate de césium, CuI) au reflux du THF pendant 1 h, permettant d'obtenir le composé **51** avec un rendement de 45 % (Schéma 75).

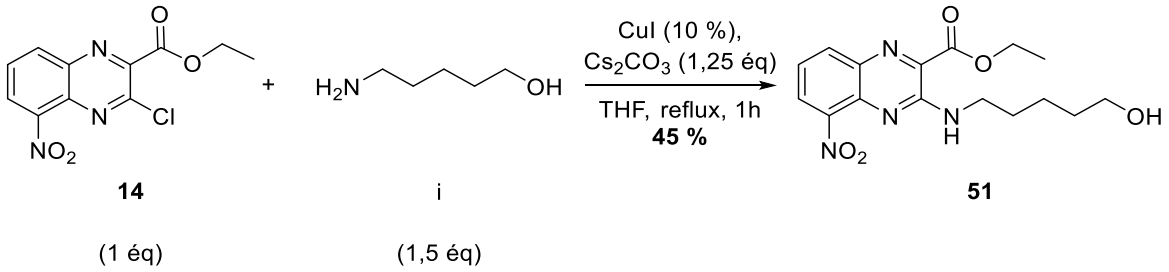


Schéma 75. Fonctionnalisation de la position 3 du noyau quinoxaline par couplage de Ullmann.

- Fonctionnalisation par SN_{ar}

En parallèle, la fonctionnalisation de la position 3 du composé **14** a été effectuée selon une réaction de SN_{ar} en utilisant le 5-aminopentan-1-ol commercial, au reflux de l'éthanol pendant 3 jours, comme décrit précédemment (B. Oyallon *et al.*), permettant l'obtention du dérivé **51** avec un rendement de 68 % (Schéma 76).

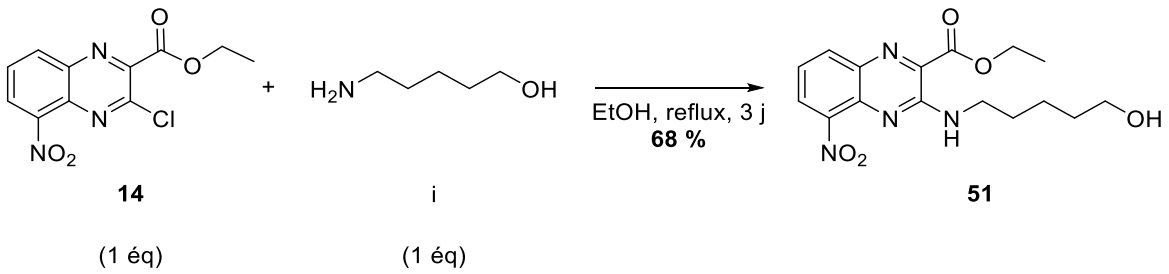


Schéma 76. Fonctionnalisation de la position 3 de la quinoxaline 14 par SN_{ar}.

Cette méthode de fonctionnalisation donnant de meilleurs résultats, elle sera utilisée pour la synthèse du macrocycle cible de l'approche 2.

b. Macrocyclisation par réaction de SN_{ar}

- Tosylation de la fonction alcool du composé **51**

De la même manière que pour les macrocyclisations des séries de l'approche 1, la fermeture par substitution nucléophile a nécessité la formation d'un bon groupement partant (groupement tosyle) pour pouvoir être mise en œuvre. Pour cela, les conditions classiques précédemment décrites ont été appliquées en utilisant du chlorure de 4-toluènesylfonyle (6 équivalents), du DMAP et de la triéthylamine (3 équivalents) dans du DCM à 30 °C pendant 5 h, permettant d'obtenir le composé tosylé **52** avec un rendement de 97 % (Schéma 77).

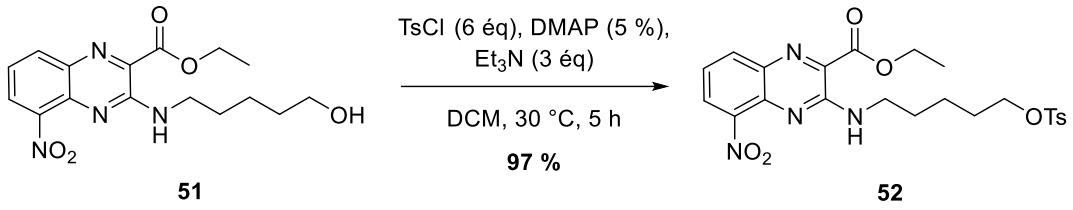


Schéma 77. Réaction de tosylation de la fonction alcool du composé 51.

- Réduction du groupement nitro du composé **52**

L'étape suivante a consisté en la réduction du groupement NO_2 du composé **52** pour obtenir l'analogue aminé, nécessaire à la macrocyclisation. Ainsi, la quinoxaline nitrée **52** a été mise en solution dans un mélange d'éthanol et d'acétate d'éthyle (90/10)[79], puis réduite par hydrogénation sous flux d'hydrogène sur du Pd/C (10 %), à température ambiante et à pression atmosphérique pendant 20 h. Le dérivé aminé **53** a ainsi été obtenu avec un rendement de 99 % (Schéma 78).

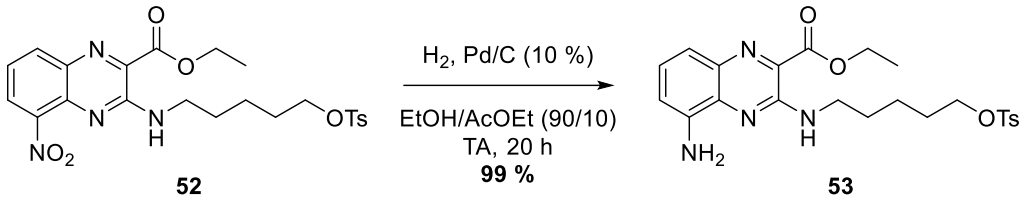


Schéma 78. Réduction du groupement nitro du composé 52.

- Fermeture de cycle par SN intramoléculaire

Le composé **53** étant peu stable, il a ensuite été directement engagé dans la réaction de fermeture de cycle. Cette réaction s'est faite par attaque nucléophile de la fonction amine en position 5 du noyau quinoxaline sur le CH_2 portant le groupement tosyle (site électrophile) de la chaine aliphatique en position 3 (Schéma 79). Différentes conditions ont été utilisées pour optimiser le rendement de fermeture. Toutes les expériences ont été réalisées en conditions diluées (composé **53** à une concentration de $6{,}4.10^{-4}$ mol.L^{-1}).

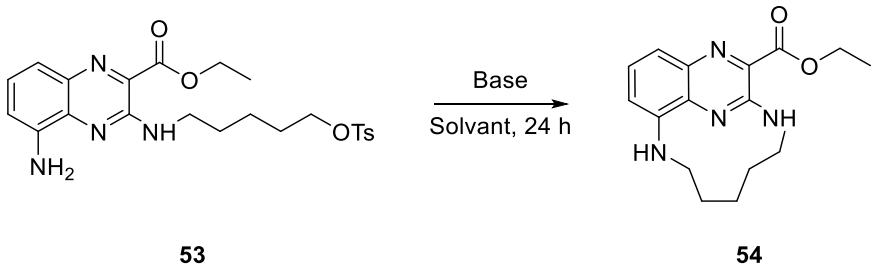


Schéma 79. Fermeture de cycle par substitution nucléophile.

Tableau 11. Optimisation des conditions de fermeture de cycle permettant l'obtention du macrocycle 54.

Entrée	Base (1 éq)	T°	Solvant	Temps	Rdt (%)
1	Et_3N	Reflux	EtOH	24 h	Dégradation
2	/	Reflux	EtOH	24 h	Dégradation
3	**/**	**78**	**EtOH**	**24 h**	**10**
4	**Et_3N**	**78**	**EtOH**	**24 h**	**10**
5	Et_3N	40	EtOH	24 h	0
6	/	40	EtOH	24 h	0
7	/	40	DMSO	24 h	0
8	/	78	DMSO	24 h	0

Nous avons tout d'abord repris le protocole de SN_{ar} précédemment décrit consistant à mettre le composé **53** en présence d'Et_3N (piégeant l'acide paratoluènesulfonique libéré) au reflux de l'éthanol pendant 24 h. Dans ces conditions, une dégradation totale du réactif de départ a été observée. Cette même réaction a été réalisée sans Et_3N entraînant là encore une dégradation du composé **53** (Tableau 11, entrées 1 et 2).

Le reflux de l'éthanol entrainant une dégradation, nous avons alors essayé de réaliser la macrocyclisation à 78 °C, juste en dessous de la température d'ébullition. Après 24 h d'agitation le macrocycle **54** désiré a ainsi été obtenu avec un rendement de 10 % (Tableau 11, entrée 3).

Cette réaction a de nouveau été effectuée mais en présence d'1 équivalent de Et_3N. Néanmoins, aucune amélioration de rendement n'a été obtenue (Tableau 11, entrée 4).

La diminution de la température en dessous du point d'ébullition de l'éthanol ayant permis d'obtenir 10 % du macrocycle souhaité, nous avons essayé de faire réagir le composé **53** dans de l'éthanol à 40 °C en présence ou en absence de Et_3N pendant 24 h. Aucune dégradation n'a été observée mais aucune réaction n'a eu lieu (Tableau 11, entrées 5 et 6).

Nous avons également changé le solvant en utilisant du DMSO à 40 °C et à 78 °C, mais aucune des deux réactions n'a permis d'obtenir le composé souhaité (Tableau 11, entrées 7 et 8).

- Saponification de l'ester du composé **54**

La dernière étape permettant l'obtention du macrocycle **55** souhaité a consisté en une étape de saponification en présence d'1 équivalent de NaOH dans un mélange de DMSO et d'eau (80/20) à température ambiante pendant 15 min, donnant le macrocycle **55** d'intérêt sous la forme d'un sel de sodium avec un rendement quantitatif (Schéma 80).

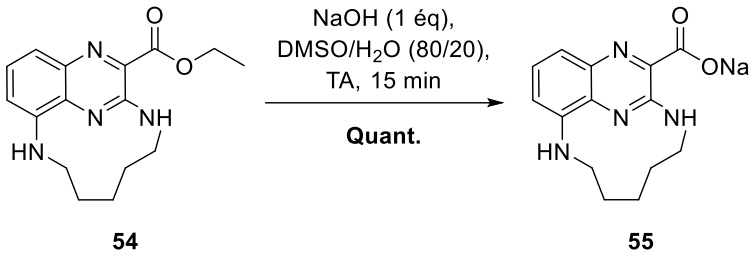


Schéma 80. Saponification permettant l'obtention du macrocycle 55.

La macrocycle **55** a ainsi été obtenu avec un rendement global de 2 % sur 7 étapes de synthèse.

L'objectif de l'approche 2 était d'obtenir le macrocycle conçu avec le logiciel Frags2Drugs développé par l'équipe SB&C d'Orléans. La mise au point de la synthèse du macrocycle précédent a donc été appliquée au macrocycle cible, dans un second temps.

2. Synthèse du macrocycle cible de l'approche 2 et de son analogue simplifié non *N*-méthylé

Le macrocycle simplifié **60** et le macrocycle cible **62** de l'approche 2 ont été préparés en suivant le même schéma de synthèse que celui ayant permis l'élaboration du macrocycle simplifié **55**.

2.1 Synthèse du macrocycle simplifié non *N*-méthylé 60

Le macrocycle **60** a été obtenu en suivant le Schéma 81 ci-dessous.

La quinoxaline **14** a été soumise à une réaction de substitution nucléophile en position 3 par le 5-amino-4,4-diméthylpentan-1-ol commercial au reflux de l'éthanol pendant 2 jours permettant d'isoler la quinoxaline **56** avec un rendement de 79 %.

La fonction alcool du composé **56** a ensuite été tosylée selon les mêmes conditions que précédemment (TsCl, DMAP, Et_3N) dans le DCM à TA pendant 6 h pour obtenir l'intermédiaire **57** avec un rendement de 88 %.

L'étape de réduction du groupement NO_2 du composé **57** a été réalisée selon une réaction d'hydrogénation en flux continu (H-Cube®, ThalesNano, 1 $mL.min^{-1}$, température ambiante, 3 bar) sur une cartouche de Pd/C (10 %) dans un mélange d'éthanol et d'acétate d'éthyle (90/10), donnant l'analogue aminé **58** avec un rendement de 64 %. Il est à noter que la réduction sous flux d'hydrogène à pression atmosphérique, utilisée pour la synthèse du macrocycle simplifié **55**, n'a pas permis de réduire plus de 30 % du composé **57**.

Comme précédemment, le composé réduit **58** a directement été engagé dans la réaction de macrocyclisation. Cette fermeture de cycle a été effectuée en conditions diluées (composé **58** à une concentration de $5{,}0.10^{-4}$ mol. L^{-1}) au reflux de l'éthanol et de l'acétate d'éthyle (90/10) pendant 24 h. Le macrocycle **59** a ainsi été obtenu avec un rendement de 31 %.

Pour obtenir le macrocycle simplifié non *N*-méthylé, une étape de saponification a été réalisée directement sur le composé **59** selon les mêmes conditions que celles décrites lors de la synthèse du macrocycle simplifié **55** (NaOH, dans un mélange DMSO/H_2O (80/20) à température ambiante) permettant l'obtention du macrocycle **60** de façon quantitative.

Le rendement global de réaction du macrocycle **60** sur 7 étapes de synthèse est de 5 %. Le spectre RMN du ^{13}C du macrocycle **60** n'ayant pas pu être exploité correctement du fait des trop petites quantités de produits obtenues, la molécule est en cours de resynthèse afin d'avoir des analyses complètes.

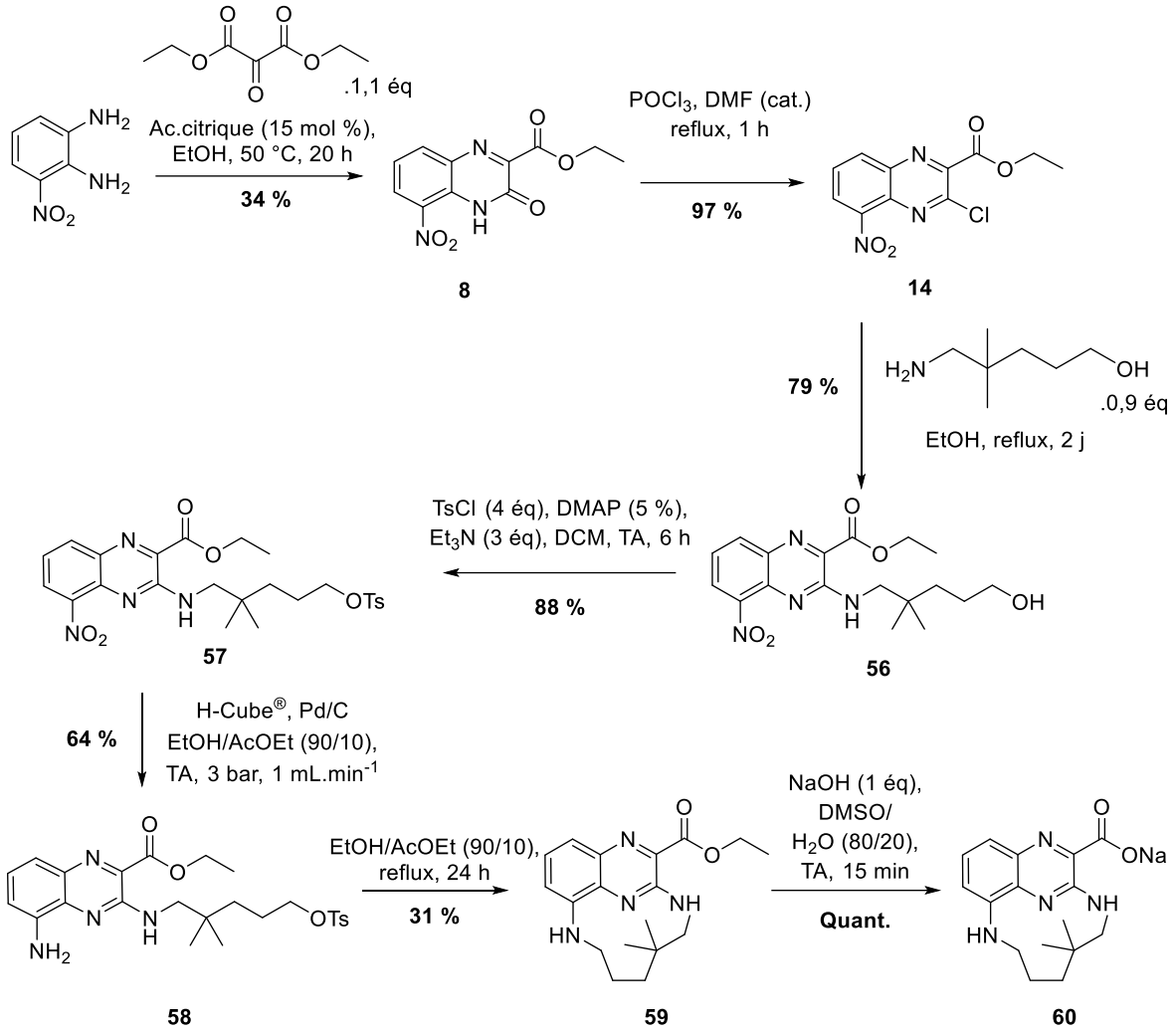


Schéma 81. Schéma de synthèse du macrocycle 60.

2.2 Synthèse du macrocycle cible 62

- <u>Méthylation du NH en position 5 du noyau quinoxaline du macrocycle **59**</u>

Pour accéder au macrocycle cible, le macrocycle **59** a tout d'abord été méthylé sur l'amine secondaire en position 5 du noyau quinoxaline (Schéma 82).

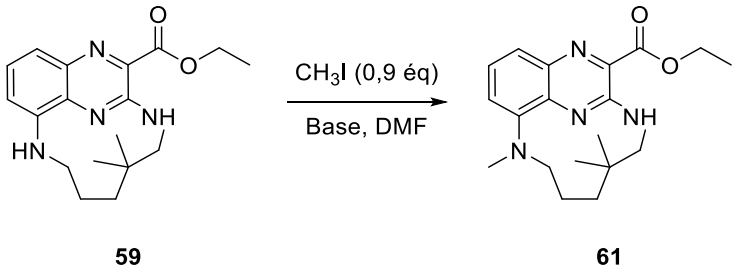


Schéma 82. *N*-méthylation du composé 59.

Tableau 12. Optimisation des conditions de méthylation du macrocycle 59.

Entrée	**Base (1 éq)**	**T°**	**Temps**	**Rdt (%)**
1	NaH	TA	1 h	/
2	/	TA	24 h	10
3	**/**	**40 °C**	**5 j**	**63**

Dans un 1er temps, nous avons utilisé le protocole mis au point par D.S. Pilch et son équipe[80]. Le macrocycle **59** a ainsi été mis en réaction avec de l'iodométhane (CH_3I, 0,9 équivalent) et de l'hydrure de sodium (NaH, 1 équivalent) dans du DMF à température ambiante pendant 1 h. Néanmoins, l'utilisation de NaH a entraîné une saponification complète du macrocycle **59** (Tableau 12, entrée 1)

La réaction a donc été réalisée sans NaH dans les mêmes conditions permettant d'obtenir le macrocycle méthylé **61** avec un rendement de 10 % (Tableau 12, entrée 2).

Afin d'améliorer le rendement de la réaction, celle-ci a été chauffée à 40 °C, dans les mêmes conditions opératoires pendant 5 j, permettant d'isoler le macrocycle **61** avec un rendement de 63 % (Tableau 12, entrée 3).

- Saponification et obtention du macrocycle cible **62**

La dernière étape a consisté en la saponification du composé **61** et s'est déroulée selon le même protocole que précédemment (NaOH, DMSO/eau (80/20), TA, 15 min), permettant l'obtention du macrocycle **62** de façon quantitative (Schéma 83).

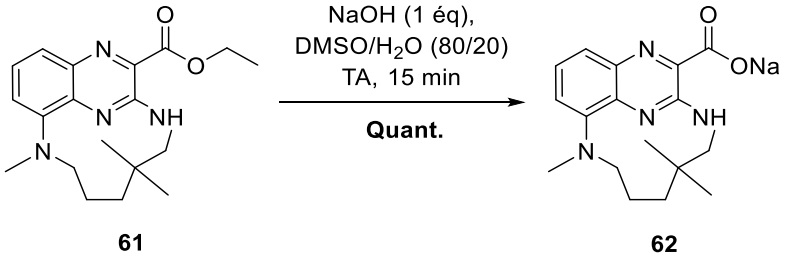


Schéma 83. Saponification du composé 61.

Le rendement global de réaction du macrocycle **62** sur 8 étapes de synthèse est de 3 %. Le macrocycle **62** est actuellement en cours de cristallogenèse afin de confirmer sa structure par cristallographie au sein de l'ISM.

D. Conclusion

Ces travaux ont donc permis l'élaboration de 10 nouveaux macrocycles selon différentes voies de synthèse. Les nouveaux composés ont ensuite été testés *in vitro,* dans un premier temps au sein de la plateforme Kissf de Roscoff sur un panel de kinases comprenant *Hs*Pim-1 et *Hs*Pim-2, puis sur une lignée cellulaire humaine de LMA (MV4-11) au sein de l'équipe « Cellules souches hématopoïétiques normales et leucémiques » de l'université de Bordeaux. Les macrocycles les plus actifs ont également été dockés au sein du site ATP de la kinase Pim-1 au sein des équipes IICiMed et SB&C.

Bilan des macrocycles obtenus durant ces travaux de thèse

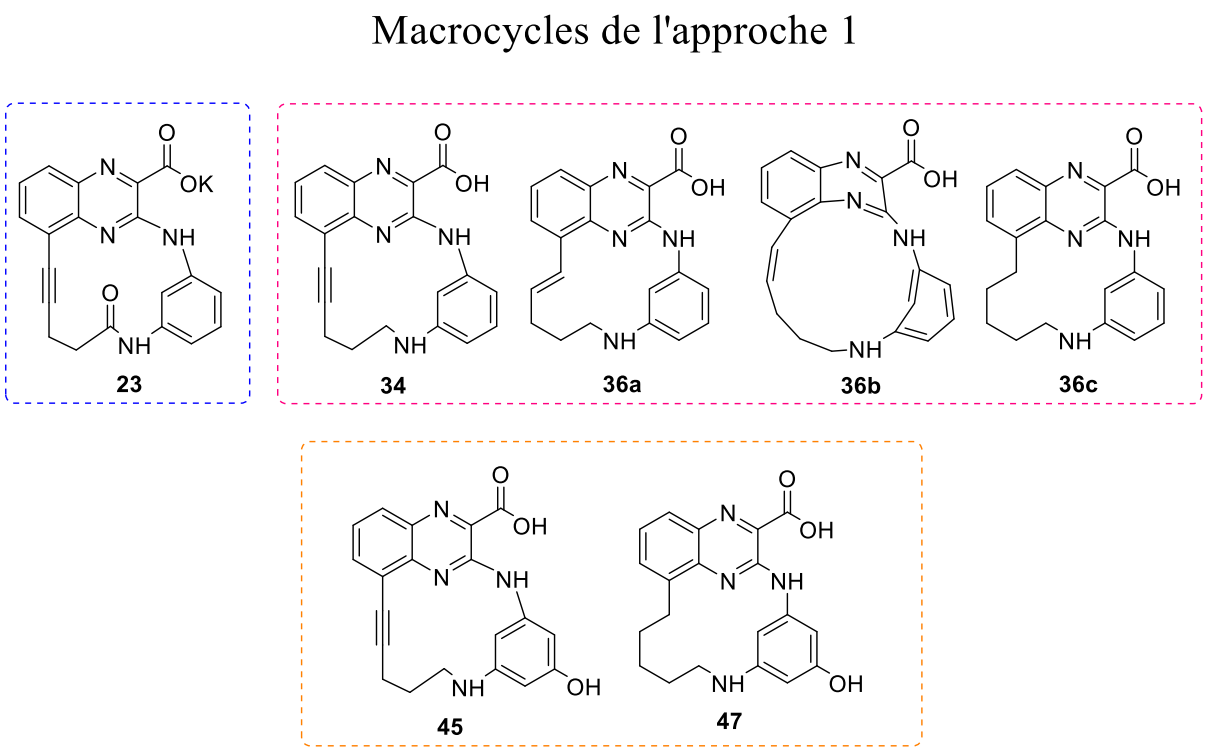


Figure 42. Bilan des 10 macrocycles obtenus durant ces travaux de thèse.

ETUDE ET RESULTATS PHARMACOLOGIQUES

I. Matériels et méthodes

A. Tests enzymatiques

Les tests enzymatiques présentés ci-contre ont été réalisés par la station biologique de Roscoff auprès de nos collaborateurs de la plateforme de criblage KISSf (*Kinase Inhibitor Specialized Screening facility,* Sorbonne Université, CNRS, FR2424).

Les 10 macrocycles obtenus ont été dans un premier temps testés sur les kinases Pim-1 et Pim-2 humaines, appartenant à la famille des CAMK (*calcium/calmodulin-dependant protein kinases*) puis sur un petit panel de 6 protéines kinases de mammifères *off-target* (DYRK1A, CDK5/p25, CDK9/CyclinT, Haspin, CK1ε et GSK3β) afin de déterminer leur profil de sélectivité.

Les activités enzymatiques ont été dosées avec 10 µM d'ATP sur des plaques contenant 384 puits en utilisant le test luminescent ADP-Glo^{TM} (Promega, Madison, WI, USA). L'ADP-Glo^{TM} est un test luminescent homogène très sensible pour détecter l'activité enzymatique[81].

Les réactions de phosphorylations enzymatiques ont été réalisées en plaques 384 puits en utilisant le kit de test ADP-Glo™ (Promega) selon les recommandations du fabricant (Figure 43). Ce test permet de détecter l'ADP par luminescence de façon rapide et homogène. Cela permet ainsi de mesurer l'activité d'une kinase en mesurant les taux d'ADP produit par l'enzyme. Les réactions ont été réalisées dans une solution tampon ADP-Glo™ (pH = 7,5 (KOH)) contenant 40 mM de Tris, du sérum d'albumine bovin à 0,1 mg/mL et 20 mM de chlorure de magnésium. La réaction de phosphorylation, réalisée dans un volume total de 5 µL, a été déclenchée par l'addition de 25 nM de kinase, en présence de 10 µM de substrat, de 10 µM d'ATP et des composés chimiques à tester à différentes concentrations (solution-mère à 20 mM dans le DMSO) (Figure 43, étape **A**). Après 30 minutes d'incubation à 30 °C, la réaction enzymatique a été stoppée par addition de 5 µL de réactif pour kinase ADP-Glo™ (Figure 43, étape **B**). Après 50 minutes d'incubation à température ambiante, 10 µL de réactif de détection pour kinase ont été ajoutés puis le milieu a été incubé 1 heure à température ambiante (Figure 43**, étape**

C). Le signal transmis a été mesuré en utilisant un luminomètre pour microplaque Envision (PerkinElmer) et exprimé en RLU (*Relative Light Unit*).

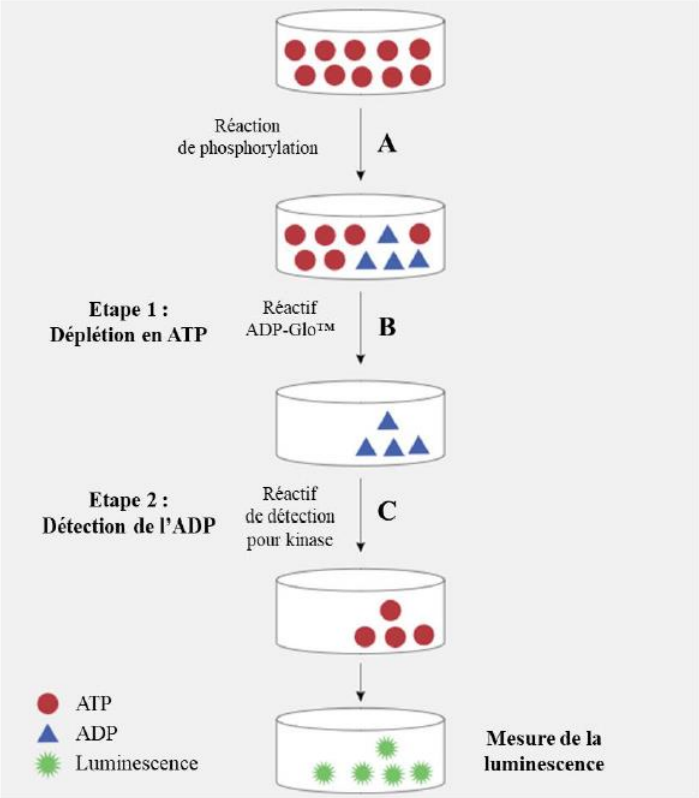


Figure 43. Principe de la méthode ADP-Glo™, d'après Promega Corporation

Tous les composés ont été testés en duplicat et à 9 dilutions. Les activités ont été exprimées en pourcentage de l'activité maximale (c'est-à-dire en l'absence d'inhibiteur). Quand une activité dose-dépendante a été observée, une régression linéaire a été réalisée, permettant de calculer les CI_{50} des composés correspondants (logiciel GraphPad Prism6). Les composés présentant une CI_{50} supérieure à 10 µM ont été considérés comme inactifs.

Au total, 10 macrocycles ont été criblés. Le composé commercial SGI-1776 a été utilisé comme référence pour les tests enzymatiques. Cet inhibiteur pan-Pim de 1ère génération possède une activité submicromolaire sur les 3 isoformes de Pim, mais a été arrêté en phase I des essais cliniques en raison d'une forte cardiotoxicité liée à une inhibition des canaux hERG.

B. Tests cellulaires

Les évaluations biologiques sur cellules ont été réalisées par nos collaborateurs du laboratoire « Cellules souches hématopoïétiques normales et leucémiques » (université de Bordeaux, INSERM, UMR1035). Ces évaluations ont été menées sur une lignée cellulaire de leucémie myéloïde aiguë : la lignée MV4-11. Cette lignée possède la mutation FLT3-ITD et surexprime les kinases Pim. En effet, il a été démontré que les kinases Pim-1 et Pim-2 sont des effecteurs clés, en aval de la signalisation induite par FLT3[11].

1. Cultures cellulaires

La lignée cellulaire leucémique MV4-11 a été cultivée dans le milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 1X Glutamax (Gibco™, *Thermo Fisher Scientific*), additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et d'antibiotiques (50 U/mL de pénicilline et 50µg/mL de streptomycine (Gibco™, *Thermo Fisher Scientific*), à 37 °C sous une atmosphère entièrement humidifiée (37 °C, 5 % de CO_2) dans un incubateur régulé en CO_2 (Jouan, Saint-Nazaire, France)[82–84]. Les différents composés ont été dissous dans du diméthylsulfoxyde (0,1 %).

2. Activité cytotoxique

Des tests de prolifération cellulaire ont été réalisés en utilisant du MTS tétrazolium (*Cell Titer96 Aqueous*, Promega) sur la lignée cellulaire leucémique humaine MV4-11[82–84]. Le test de prolifération cellulaire au MTS (Promega, France) est un système de dosage colorimétrique qui mesure la réduction d'un composant tétrazolium (MTS) en formazan produit par les mitochondries de cellules viables. Les cellules (10^5) ont été lavées deux fois dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) et étalées en quatre exemplaires dans des puits de plaque de microtitration dans 100 µL de milieu de culture avec ou sans les composés à tester à des concentrations croissantes (0, 1, 5, 10, 20 et 50 µM) pendant 1, 2 et 3 jours. Après 3 heures d'incubation à 37 °C avec 20 µL de MTS, les plaques ont été lues dans un lecteur automatique de microplaques (Imark Bio-rad) à une longueur d'onde de 490 nm. Les concentrations inhibitrices à 50 % (CI_{50}) ont été déterminées par analyse de régression linéaire.

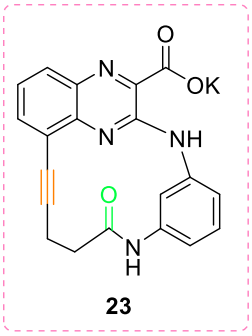
II. Résultats

A. Tests enzymatiques

Les 10 macrocycles présentés précédemment ont tout d'abord été testés sur les kinases Pim-1 et Pim-2 humaines appartenant à la famille des CAMK. Par ailleurs, étant donné que le manque de sélectivité des inhibiteurs de kinases peut être responsable d'un mauvais profil de tolérance, caractérisé par l'apparition d'effets indésirables sérieux chez le patient[85], les composés ont, dans un second temps, été évalués sur un panel de protéines kinases de mammifères potentielles *off-target* de nos inhibiteurs. Parmi les kinases de ce panel, certaines font partie de la famille des CMGC (DYRK1A, CDK5/P25, CDK9/Cyclin T, GSK3β) d'autres de la famille des CK1 (*Casein Kinases 1*) (CK1ε) ou de la famille des autres kinases (Haspin).

1. Approche 1

1.1 Macrocycle 23, possédant un lien amidique.



23

Figure 44. Macrocycle 23.

Tableau 13. Résultats *in vitro* du macrocycle 23 comparativement au chef de file 2 et la référence SGI-1776.

Composés	CI_{50} (µM) sur un panel de kinases[(a)]							
	Pim-1	Pim-2	DYRK1A	CDK5/ p25	CDK9/ CyclinT	Haspin	CK1ε	GSK3β
2	0,13	0,17	2,58	> 10	> 10	> 10	> 10	2,80
23	0,40	0,10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
SGI-1776	0,05	0,10	3,80	9,53	1,08	0,05	6,54	> 10

[a]DYRK1A : dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A, CDK : cyclin-dependent kinase, Haspin : haploid germ cell-specific nuclear protein kinase, CK1 : casein kinase 1, GSK3 : glycogen synthase kinase 3.

On constate que le macrocycle **23** présente une activité au submicromolaire sur Pim-1 et sur Pim-2 avec des CI_{50} de 400 nM et 100 nM, respectivement (Tableau 13, entrée 2). Ainsi, il présente le même niveau d'activité sur Pim-2 mais une activité légèrement diminuée sur Pim-1 en comparaison avec les activités observées pour le chef de file **2** et la molécule de référence SGI-1776.

En revanche, le profil de sélectivité du macrocycle **23** sur le panel de kinases étudié est significativement amélioré par rapport au composé chef de file **2** et au SGI-1776. En effet, alors que le composé **2** est capable d'inhiber DYRK1A et GSK3β avec des CI_{50} de l'ordre du micromolaire (CI_{50} de 2,58 et 2,80 µM, respectivement), et que le SGI-1776 inhibe de façon importante 5 des 6 kinases évaluées du panel (CI_{50} de 0,05 à 9,53 µM), le macrocycle **23** s'est avéré inactif sur les 6 kinases testées (CI_{50} > 10 µM sur chacune des 6 potentielles kinases *off-target*).

1.2 Macrocycles possédant un lien aminé

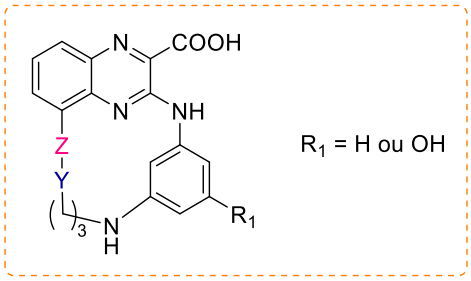


Figure 45. Schéma général des macrocycles de la série possédant un lien aminé.

Tableau 14. CI_{50} sur Pim-1 et Pim-2 des macrocycles de la série possédant un lien aminé.

Entrée	Composés	R_1	Y-Z	Pim-1 CI_{50} (µM)[1]	Pim-2 CI_{50} (µM)[1]
1	**2**			0,13	0,17
2	**34**	H	C≡C	4,60	1,94
3	**45**	OH	C≡C	5,94	0,92
4	**36a**	H	C=C (E)	0,89	0,41
5	**36b**	H	C=C (Z)	0,41	0,40
6	**36c**	H	CH_2-CH_2	0,57	0,37
7	**47**	OH	CH_2-CH_2	1,28	0,42
8	**SGI-1776**			0,05	0,10

[1] La CI_{50} sur l'activité Pim-1/2 kinase a été calculée à partir des courbes dose-réponse. Chaque concentration d'inhibiteur a été testée en double.

- Inhibition de l'activité enzymatique de Pim-1 et Pim-2

Le remplacement du lien amidique du macrocycle **23** par un lien aminé au sein du macrocycle **34** (dans lequel le carbonyle de la fonction amidique a été remplacé par un maillon CH_2) a entraîné une baisse significative de l'activité sur Pim-1 et Pim-2, avec des CI_{50} 10 à 20 fois plus élevées sur les deux isoformes (Macrocycle **34**, CI_{50} de 4,60 µM et de 1,94 µM sur Pim-1 et Pim-2, respectivement, Tableau 14, entrée 2) par rapport au macrocycle **23** (CI_{50} de 400 nM et 100 nM, sur Pim-1 et Pim-2, respectivement, Tableau 13, entrée 2).

Cependant, la réduction de la fonction alcynique, ayant permis l'obtention des analogues alcéniques (macrocycles **36a** et **36b**) et du dérivé possédant une chaîne totalement réduite (macrocycle **36c**), a permis de rétablir l'activité submicromolaire sur les deux isoformes Pim-1 et Pim-2 avec des CI_{50} allant de 370 nM à 890 nM (Tableau 14, entrées 4-6).

Enfin, dans cette série, nous avons étudié l'incidence sur l'activité anti-Pim1/2 de l'ajout d'un groupement phénolique sur le cycle benzénique (en R_1), par analogie structurale avec le chef de file **2**. Les résultats montrent que l'ajout de ce groupement n'améliore pas l'activité sur Pim-1. Ainsi, les macrocycles **45** et **47** présentent des CI_{50} sur Pim-1 légèrement supérieures (CI_{50} de 5,94 µM et 1,28 µM, respectivement, Tableau 14, entrées 3 et 7) par rapport à leurs analogues non substitués en R_1 (macrocycles **34** avec une CI_{50} de 4,60 µM et **36c** avec une CI_{50} de 0,57 µM, respectivement). En revanche, concernant l'activité sur Pim-2, l'insertion de la fonction phénol en R_1 permet soit de conserver une activité de l'ordre du submicromolaire (composé **47**, CI_{50} de 420 nM sur Pim-2, Tableau 14, entrée 7) comparable à celle observée avec le macrocycle **36c** non substitué en R_1 (qui possède une CI_{50} de 370 nM sur cette isoforme), soit d'améliorer légèrement le profil d'inhibition (composé **45**, CI_{50} de 0,92 µM) par rapport à l'analogue non substitué (composé **34**, CI_{50} de 1,94 µM, 2 fois moins actif) (Tableau 14, entrées 2, 3, 6 et 7).

- Profil de sélectivité sur kinases de mammifères

Les macrocycles les plus prometteurs au vu de leur activité anti-Pim1/2 (macrocycles **36a**, **36b**, et **36c**) ont été testés dans un second temps sur le panel de kinases de mammifères précédemment présenté, afin d'évaluer leur profil de sélectivité.

Tableau 15. Résultats *in vitro* des activités des macrocycles les plus actifs sur un panel de kinases comparativement au composé chef de file 2 et au SGI-1776.

Entrée	Composés	R1	Y-Z	CI_{50} (µM) sur un panel de kinases[(a)]							
				Pim-1	Pim-2	DYRK1A	CDK5/p25	CDK9/ CyclinT	Haspin	CK1ε	GSK3β
1	**2**			0,13	0,17	2,58	> 10	> 10	> 10	> 10	2,80
2	**36a**	H	C=C (E)	0,89	0,41	6,07	> 10	> 10	> 10	> 10	3,23
3	**36b**	H	C=C (Z)	0,41	0,40	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
4	**36c**	H	CH_2-CH_2	0,57	0,37	7,20	> 10	> 10	> 10	> 10	3,32
5	**SGI-1776**			0,05	0,10	3,80	9,53	1,08	0,05	6,54	> 10

[(a)]DYRK1A : dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A, CDK : cyclin-dependent kinase, Haspin : haploid germ cell-specific nuclear protein kinase, CK1 : casein kinase 1, GSK3 : glycogen synthase kinase 3.

Comme observé avec la molécule chef de file **2**, les macrocycles **36a**, **36b** et **36c** conservent un profil de sélectivité intéressant à l'égard des kinases CDK5/P25, CDK9/Cyclin T, CK1 et Haspin, avec des CI_{50} supérieures à 10 µM sur chacune de ces kinases (Tableau 15, entrées 1-4). Néanmoins, de la même manière que pour le composé chef de file **2**, les macrocycles **36a** et **36c** présentent des activités résiduelles sur GSK3β avec des CI_{50} de l'ordre du micromolaire (Tableau 15, entrées 1, 2 et 4), contrairement au macrocycle **36b** et au SGI-1776 (CI_{50} > 10 µM, Tableau 15, entrées 3 et 5).

En revanche, alors que le composé **2** est capable d'inhiber DYRK1A (CI_{50} de 2,58 µM), les macrocycles les plus prometteurs de cette série sont inactifs sur cette kinase (macrocycle **36b**, CI_{50} > 10 µM) ou possèdent une activité 2 à 3 fois plus faible sur cette dernière (macrocycles **36a** et **36c**, CI_{50} de 6,07 µM et 7,20 µM, respectivement).

Au sein de cette série, le macrocycle **36b** s'avère donc être le plus intéressant en termes d'activité sur les kinases Pim-1 et Pim-2 ainsi que pour son profil de sélectivité significativement amélioré par rapport au chef de file **2** et au SGI-1776. En effet, il s'est avéré inactif sur les 6 kinases *off-target* du panel évalué. Ces résultats confirment, comme précédemment, l'intérêt de la macrocyclisation pour l'optimisation du profil de sélectivité des inhibiteurs.

2. Approche 2

Les pharmacomodulations réalisées selon l'approche 2 par conception *in silico* réalisée par le logiciel Frags2Drugs, ont permis la synthèse de 3 macrocycles originaux : le macrocycle

cible de cette approche (composé **62**) et deux macrocycles simplifiés (composés **55** et **60**) (Figure 46 et Tableau 16).

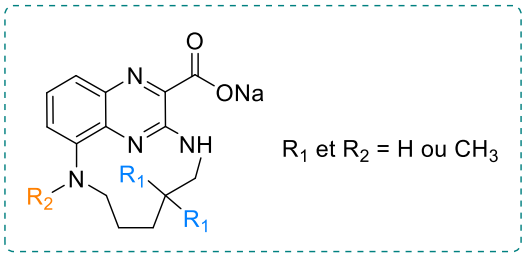


Figure 46. Schéma général des macrocycles de l'approche 2.

Tableau 16. Résultats *in vitro* des activités des macrocycles de l'approche 2 sur Pim-1 et Pim-2, ainsi que sur un panel de kinases comparativement au composé chef de file 2 et au SGI-1776.

Entrée	Composés	R1	R2	CI_{50} (µM) sur un panel de kinases[a]							
				Pim-1	Pim-2	DYRK1A	CDK5/p25	CDK9/ CyclinT	Haspin	CK1ε	GSK3β
1	**2**			0,13	0,17	2,58	> 10	> 10	> 10	> 10	2,80
2	**55**	H	H	> 10	4,80	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
3	**60**	CH_3	H	0,37	0,15	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
4	**62**	CH_3	CH_3	0,16	0,22	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
5	**SGI-1776**			0,05	0,10	3,80	9,53	1,08	0,05	6,54	> 10

[a] *DYRK1A : dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A, CDK : cyclin-dependent kinase, Haspin : haploid germ cell-specific nuclear protein kinase, CK1 : casein kinase 1, GSK3 : glycogen synthase kinase 3.*

- Inhibition de l'activité enzymatique de Pim-1 et Pim-2

Les résultats observés sur cette série montrent que le macrocycle **62,** ciblé par cette approche, s'est avéré être le macrocycle le plus actif sur les kinases Pim-1 et Pim-2 (CI_{50} de 160 nM et de 220 nM, respectivement), avec une activité similaire à celles observées avec le composé chef de file **2** et la molécule de référence SGI-1776 (Tableau 16, entrées 1, 4 et 5).

Par ailleurs, ces résultats mettent en évidence le rôle crucial des groupements méthyles en R_1 pour l'activité anti-Pim1/2 des inhibiteurs macrocycliques. En effet, la suppression de ces groupements a entraîné une perte drastique de l'activité sur les deux isoformes de Pim (Tableau 16, entrées 2, 3 et 4). Ainsi, les composés **60** et **62**, porteurs de groupements méthyles en R_1 sont actifs au submicromolaire sur Pim-1 et sur Pim-2 alors que le macrocycle **55**, non méthylé en R_1, s'avère inactif sur Pim-1 (CI_{50} > 10 µM) et 22 à 32 fois moins actif sur Pim-2 (CI_{50} de 4,80 µM).

- Profil de sélectivité sur kinases de mammifères

Enfin, les macrocycles **60** et **62** possèdent également un profil de sélectivité significativement amélioré par rapport aux composés **2** et au SGI-1776, avec des CI_{50} supérieures à 10 µM pour chacune des 6 kinases *off-target* testées du panel.

B. Tests cellulaires

Les composés les plus actifs de chaque série (macrocycles **23**, **36c** et **62,** Figure 47) ont ensuite été évalués sur une lignée cellulaire de LMA humaine (MV4-11) qui surexprime Pim-1 et Pim-2. Le macrocycle **36b** n'a malheureusement pas été obtenu en quantité suffisante pour pouvoir être évalué à ce stade. Les déterminations des CE_{50} de chacun des composés ont été réalisées au moyen d'un test au MTS précédemment décrit. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 17).

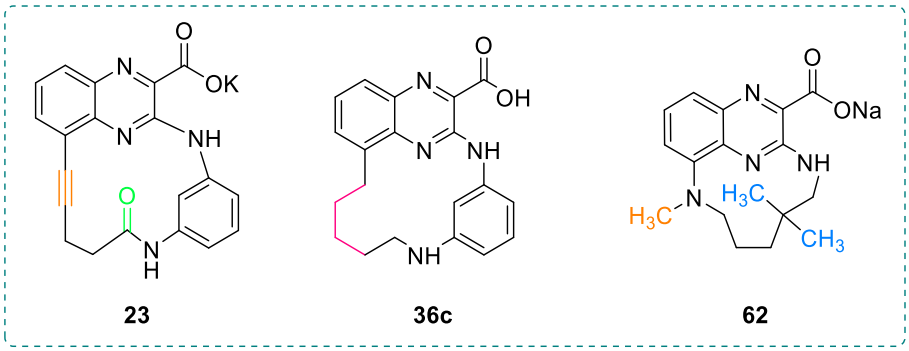


Figure 47. Figure générale des 3 macrocycles les plus prometteurs.

Tableau 17. Résultats cellulaires

		CI_{50} (µM)		**CE_{50} (µM)**
Entrée	**N°**	Pim-1	Pim-2	MV4-11
1	Chef de file **2**	0,13	0,17	35,5
2	Macrocycle **23**	0,40	0,10	> 50
3	Macrocycle **36c**	0,57	0,37	40
4	Macrocycle **62**	0,16	0,22	> 50
5	SGI-1776	0,10	0,52	0,03

Parmi les composés testés, le macrocycle **36c** présente le même niveau d'activité sur la lignée cellulaire leucémique MV4-11 (CE_{50} = 40 µM) que la molécule chef de file **2** (CE_{50} = 35,5 µM).

Cependant, les macrocycles **23** et **62**, bien que très actifs sur les kinases Pim-1 et Pim-2, ne se sont pas avérés efficaces sur cette lignée cellulaire.

C. Conclusion

Parmi les 10 macrocycles synthétisés au cours de cette thèse, 6 sont capables d'inhiber les kinases Pim-1 et Pim-2 avec des CI_{50} de l'ordre du submicromolaire. Les 4 macrocycles les plus actifs (composés **23**, **36b**, **36c** et **62**) présentent des niveaux d'activités sur les kinases Pim-1 et Pim-2 proches de ceux observés avec la molécule chef de file **2** et le composé de référence SGI-1776. Il faut noter que le macrocycle **23** a présenté l'activité la plus élevée à l'égard de la kinase Pim-2 avec une CI_{50} de 100 nM sur cette isoforme (CI_{50} identique à celle de SGI-1776). Da façon intéressante, ces 4 macrocycles possèdent un profil de sélectivité sur le panel de kinases de mammifères étudié, significativement amélioré par rapport au chef de file **2** et au SGI-1776. Les résultats semblent montrer l'intérêt de la macrocyclisation pour l'amélioration du profil de sélectivité des inhibiteurs. En ce qui concerne l'activité cellulaire, seul le macrocycle **36c** a pu démontrer une activité sur la lignée leucémique humaine (MV4-11) du même ordre de grandeur que celle observée avec le chef de file **2** (CE_{50} de 40 et 35,5 µM, respectivement). Le composé **36b** n'a, par ailleurs, pas pu être testé *in vitro* sur cellules, il devra donc être resynthétisé avant de pouvoir déterminer son activité cellulaire sur MV4-11.

ETUDES *IN SILICO*

I. Matériels et méthodes

A. Approche 1

Les études de modélisation moléculaires de cette approche ont été réalisées par le Dr. C. Loge (IICIMED - EA1155, Nantes) en utilisant le programme SYBYL-X 1.3 sur une station de travail Dell *precision* T3400.

Les structures tridimensionnelles du macrocycle **23** (sous leur forme carboxylate pour mimer les conditions physiologiques) ont été construites à partir d'une librairie de fragments standards et optimisées en utilisant le champ de force Tripos incluant les termes électrostatiques calculés à partir des charges atomiques de Gasteiger et Hückel. La méthode de Powell, disponible dans la procédure Maximin2, a été utilisée pour la minimisation de l'énergie jusqu'à atteindre une valeur de gradient inférieure à 0,001 kcal/(mol.Å).

La structure cristalline de *Hs*Pim-1 complexée à l'AMP-PNP à une résolution de 1,6 Å (référence PDB : 3A99) a été utilisée comme modèle pour les travaux de *docking*. Les molécules d'eau ont été retirées du modèle puisqu'aucune information n'est connue quant à la conservation de molécules d'eau pour cette série.

Le *docking* flexible du macrocycles **23** au sein du site ATP-catalytique de *Hs*Pim-1 a été réalisé en utilisant le programme GOLD (GOLD version 4.0, CDCC, Cambridge). Les modèles les plus stables ont été sélectionnés en fonction des meilleures conformations prédites. Enfin, les minimisations d'énergies ont été effectuées en utilisant la méthode de Powell, le champ de force Tripos et une constante diélectrique de 4,0 jusqu'à ce que la valeur de gradient atteigne 0,1 kcal/(mol.Å).

B. Approche 2

Seul le composé cible (**62**) de l'approche 2 a été redocké (amarrage moléculaire) à des fins de vérifications. Deux structures de la cible protéique, la protéine kinase Pim-1, ont été utilisées comme structures cibles pour ce docking : la structure de Pim-1 complexée à un analogue de l'ATP de PDB.ID 3A99 et la structure de Pim-1 complexée à un inhibiteur tricyclique de PDB.ID 4ALU.

1. Préparation du macrocycle **62**

Le macrocycle **62** à docker a été préparé à l'aide du logiciel GypsumDL version 1.2.0 (Ropp, P.J., Spiegel, J.O., Walker, J.L. *et al.*)[86] qui permet de convertir des molécules fournies en 2D en conformères 3D énergétiquement stables, en tenant compte des états de protonation à pH physiologique (pH=7.4). Ainsi, 10 conformères sont générés pour chaque molécule macrocyclique afin de prendre en compte différentes conformations du macrocycle lors du docking.

2. Préparation des récepteurs protéiques

Les 2 structures de Pim-1, de PDB.ID 3A99 et 4ALU, ont été téléchargées de la RCSB PDB (https://www.rcsb.org) et préparées à l'aide du module Dock Prep du logiciel Chimera version 1.16 (UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E. *J Comput Chem.* **2004** ;*25*(13):1605-12). Une analyse préliminaire des complexes a permis d'identifier la présence d'une molécule d'eau cristallographique à proximité du ligand pour chacune des deux structures. Aussi, pour chaque structure, deux préparations ont été effectuées, l'une en supprimant toutes les molécules d'eau présentes dans le fichier PDB, la seconde, en supprimant toutes les molécules d'eau autres que celle identifiée à proximité du ligand. Ensuite, pour chacune des structures résultantes, les ions ont été supprimés, les hydrogènes ont été ajoutés et les charges calculées pour tous les atomes du récepteur. Les coordonnées du ligand complexé à Pim-1, respectivement l'ANP, un dérivé de l'ATP, pour les cibles issues de la structure de PDB.ID 3A99 et le composé 79O, un inhibiteur, pour les cibles issues de la structure de

PDB.ID 4ALU, ont été extraites des cibles et conservées à part pour servir de structure de référence pour déterminer le site de fixation dans lequel réaliser le docking des composés.

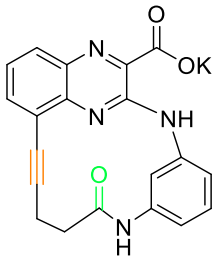
3. Docking du macrocycle **62**

Les expériences de docking sont conduites à l'aide du programme SMINA (David Ryan Koes et *al.*[87]) et de la fonction de score Vinardo (Quiroga, R., Villarreal, M.A.[88]). Le site de fixation dans lequel réaliser le docking est défini par une boîte dont les faces sont placées à 5Å minimum de n'importe quel atome du ligand de référence. Les 10 meilleures poses de docking sont conservées et classées selon le score de Vinardo.

II. Résultats

Les tests *in vitro* précédents ont montré que la macrocyclisation a permis d'obtenir 6 macrocycles conservant une activité anti-Pim-1/2 submicromolaire comparable à celle observée avec le composé chef de file **2** mais ayant aussi un profil de sélectivité amélioré vis-à-vis d'un panel d'autres kinases. Nous avons alors décidé de réaliser le *docking* des meilleurs macrocycles de chaque approche, soit le macrocycle **23** de l'approche 1 et le macrocycle **62** de l'approche 2 pour mieux comprendre leurs interactions avec la cible Pim-1.

A. Approche 1



23

Pim-1 CI_{50} : 400 nM
Pim-2 CI_{50} : 100 nM
MV4-11 CI_{50} : > 50 µM

Figure 48. Macrocycle 23 de l'approche 1.

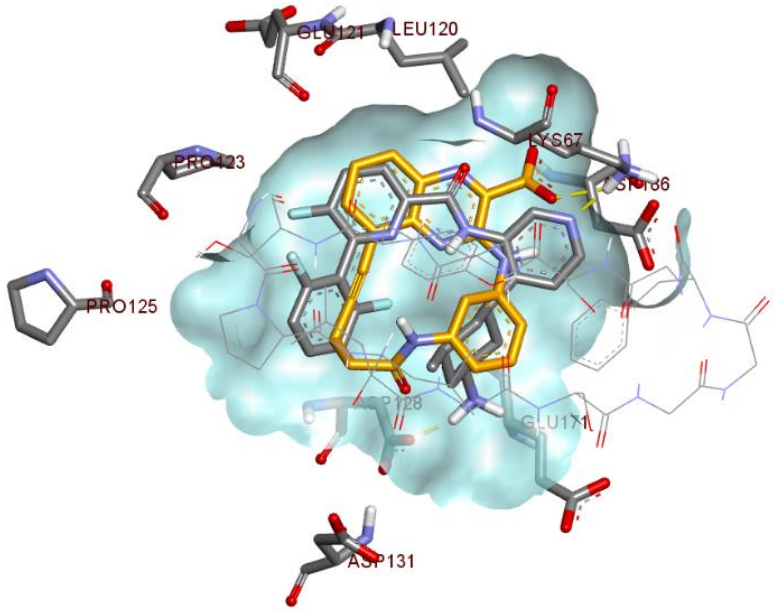


Figure 49. Représentation de l'inhibiteur de référence PIM447 (en gris) et du macrocycle 23 (en jaune) dans le site actif de Pim-1 (PBD ID : 3A99).

Le macrocycle **23** (Figure 48) est le macrocycle présentant les meilleurs résultats *in vitro* sur les kinases Pim-1 et Pim-2 de l'approche 1. L'étude *in silico* réalisée (Figure 49) montre les différentes interactions entre le macrocycle **23** et la kinase Pim-1 comparativement aux interactions que réalise le composé de référence PIM447. Le *docking* montre que l'on retrouve, comme avec le composé chef de file **2**, les interactions réalisées par le carboxylate du macrocycle **23**, en position 2 du noyau quinoxaline, avec l'Asp186 (liaison hydrogène) et la Lys67 (pont salin avec la fonction amine protonée de la chaîne latérale du résidu catalytique Lys67). Le composé **23** ne montre cependant aucune interaction supplémentaire particulière qui pourrait expliquer pourquoi ce macrocycle est le plus actif de la série de l'approche 1.

B. Approche 2

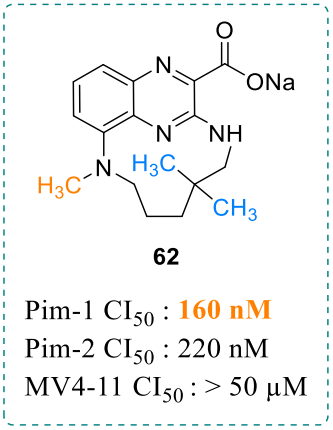


Figure 50. Macrocycle 62 de l'approche 2.

Les meilleurs résultats pour le macrocycle **62** (Figure 50) sont obtenus pour la conformation de Pim-1 issue de la structure de PDB.ID 4ALU en conservant la molécule d'eau cristallographique. Cela s'explique du fait qu'il y a une meilleure similitude de la structure cœur des macrocycles avec le composé inhibiteur 79O qu'avec l'ANP. La conformation du site est donc mieux adaptée au docking des macrocycles.

Une très bonne superposition du cœur du macrocycle **62** avec la partie tricyclique de l'inhibiteur 79O est observée. Les points pharmacophoriques principaux sont conservés et permettent de former les mêmes interactions avec le site actif de Pim-1. (Figure 51).

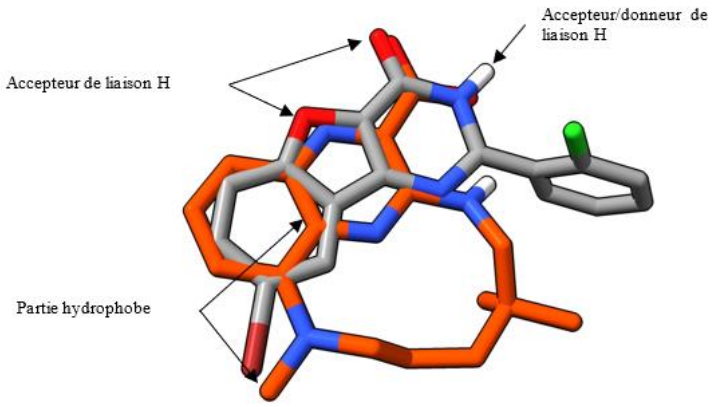


Figure 51. Superposition de la meilleure pose obtenue pour le macrocycle 62 (en orange) avec le ligand de référence 79O (en gris) dans la structure de Pim-1 (PDB.ID 4ALU).

Comme le montre la Figure 52, le macrocycle **62** (en orange) forme une liaison ionique avec la Lys67 catalytique et une liaison hydrogène avec la molécule d'eau cristallographique, de la même manière que l'inhibiteur 79O (en gris). Lors de la construction du modèle, l'hydrogène du groupement hydroxyle de la Ser49 a été orienté de sorte qu'il soit accepteur de liaison hydrogène, du fait de la présence en face du NH du ligand de référence 79O. Cette liaison hydrogène ne se forme néanmoins pas dans le modèle car le macrocycle **62** présente à cette position (position 2 du noyau quinoxaline) un groupement carboxylate (COO-), accepteur et non donneur de liaison hydrogène. Cependant, en milieu naturel, la protéine n'étant pas figée comme dans une étude de docking, le groupement hydroxyle de la Ser49 pourra adopter une conformation donneuse de liaison hydrogène pour s'adapter à la présence en face du groupement accepteur carboxylate (COO-). Il est donc probable que cette liaison hydrogène se forme, la distance entre les deux hétéroatomes (2.6Å) étant compatible avec cela (Figure 52).

Cette étude montre donc que le macrocycle **62**, développé à partir du logiciel Frags2Drugs, est capable de former les mêmes interactions dans le site actif de Pim-1 que le ligand de référence 79O et conforte les résultats *in vitro* au submicromolaire obtenus sur Pim-1 et Pim-2.

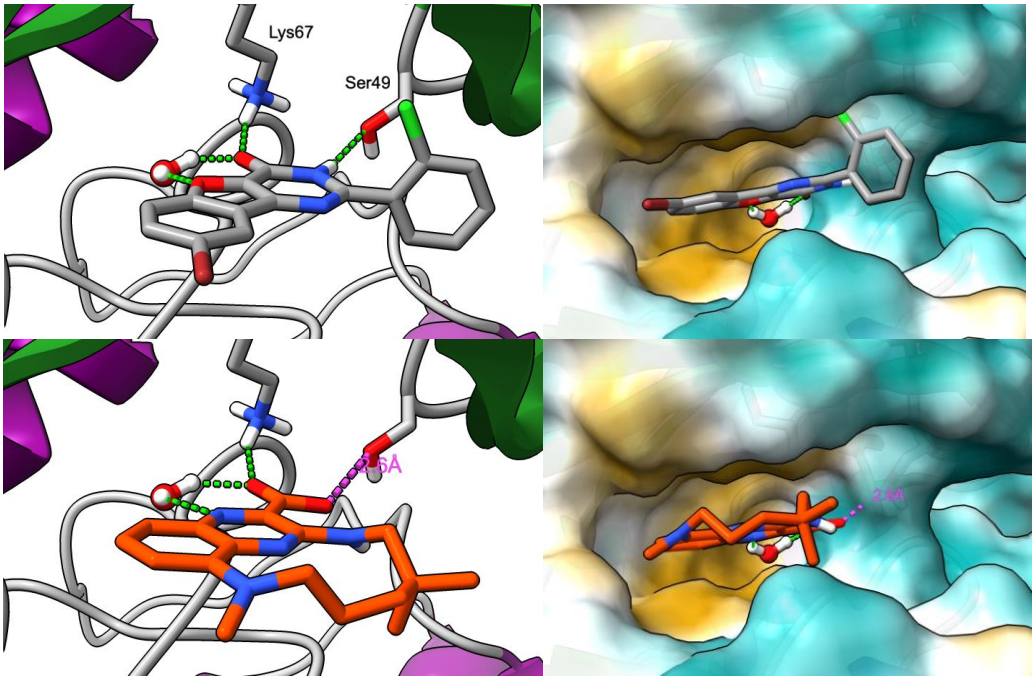


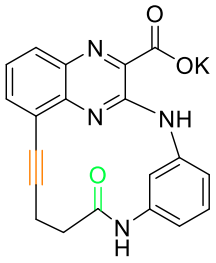
Figure 52. Représentation de l'inhibiteur 79O (gris, en haut) et du macrocycle 62 (orange, en bas) dans le site actif de Pim-1 représenté en cartoons (à gauche) et en surface colorée par hydrophobicité (à droite, en bleu hydrophile, en orange hydrophobe).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

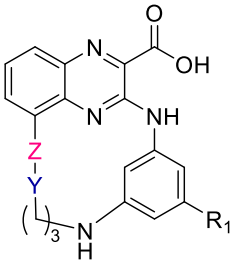
I. Conclusion

L'objectif de ce travail de thèse était l'élaboration de nouveaux macrocycles inhibiteurs des kinases Pim-1 et Pim-2 *via* deux approches différentes. L'une *via* la pharmacomodulation du chef de file **2** développé précédemment au laboratoire, et l'autre *via* un nouvel outil *in silico* développé par le laboratoire d'Orléans (Frags2Drugs). L'ensemble de nos recherches ont permis l'élaboration de 10 nouveaux macrocycles dont la fermeture de cycle a été réalisée selon deux voies différentes : une fermeture de cycle par couplage de Sonogashira ou une fermeture de cycle par substitution nucléophile (SN) intramoléculaire (Tableau 18). Les résultats montrent que la fermeture de cycle par SN permet d'obtenir des rendements globaux supérieurs à celui obtenu après fermeture de cycle par couplage de Sonogashira (de 1,5 à 13 fois supérieurs).

Tableau 18. Bilan des synthèses ayant conduit aux 10 différents macrocycles.

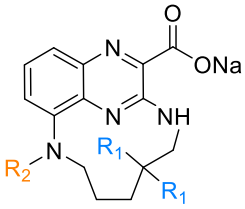


23



Z-Y = C≡C, CH=CH, CH_2-CH_2

R_1 = H (**34-36c**)
R_1 = OH (**45 et 47**)



R_1 et R_2 = H ou CH_3

59, 60, 62

Bilan

Nombre de voies explorées	3	Entre 1-2	Entre 1-2
Nombre d'étapes de synthèse	5	Entre 8-11	Entre 7-8
Voie de fermeture de cycle	Couplage de Sonogashira	SN	SN
Rdt global	0,6 %	Entre 1-8 %	Entre 2-5 %

Parmi les 10 macrocycles synthétisés, 4 d'entre eux (composés **23**, **36b**, **36c** et **62**, Figure 53) ont présenté à la fois une activité submicromolaire sur les kinases Pim-1 et Pim-2 et un profil de sélectivité amélioré vis-à-vis du composé chef de file **2** et du composé de référence SGI-1776. Notamment, les macrocycles **23**, **36b** et **62**, qui n'entraînent aucune inhibition des kinases DYRK1A et GSK3β, deux kinases qui partagent plus de 20 % d'homologie au niveau de leur alignement de séquence d'acides aminés 2D avec les kinases Pim-1 et Pim-2 (cf. Annexe 3), et ont donc des CI_{50} > 10 µM sur les 6 potentielles kinases *off-target* du panel étudié, contrairement au composé chef de file **2** (qui inhibe l'activité enzymatique des kinases DYRK1A et GSK3β à des concentrations de l'ordre du micromolaire). Ces résultats confirment bien l'intérêt de la macrocyclisation afin d'optimiser la sélectivité de ces inhibiteurs de kinases.

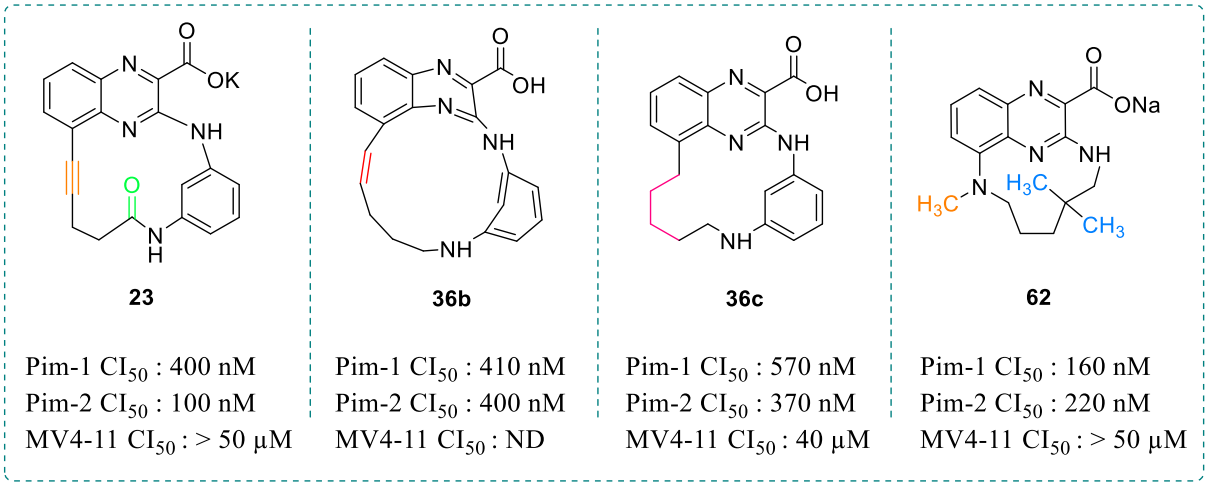


Figure 53. Bilan des 4 macrocycles présentant les meilleures activités sur Pim-1 et Pim-2 et les meilleurs profils de sélectivité.

Les deux approches ont donc conduit à l'obtention de macrocycles actifs sur Pim-1 et Pim-2 avec un profil de sélectivité amélioré par rapport à la molécule chef de file **2** dont ils sont issus.

Parmi les inhibiteurs les plus actifs, l'un provient de l'approche 1, le macrocycle **23,** et l'autre, est issu de l'approche 2, le macrocycle **62**. Cette dernière a consisté à utiliser l'outil *in silico* Frags2Drugs pour la conception de macrocycles originaux. Les résultats encourageants obtenus à l'issue des tests enzymatiques, montrent que cet outil est capable de concevoir des inhibiteurs d'intérêt de structure macrocyclique. Ces travaux ont donc permis la validation de cet outil *in silico* dans ce domaine d'application. Cependant, malgré l'application des filtres

permettant de sélectionner des inhibiteurs de kinase possédant les meilleurs paramètres de « drugabilité » possibles, l'inhibiteur **62**, conçu par Frags2Drugs s'est avéré inactif sur la lignée cellulaire leucémique humaine MV4-11.

De façon plus générale, si la macrocyclisation a permis d'optimiser la sélectivité, elle n'a pas permis d'améliorer l'activité cellulaire de nos composés.

II. Perspectives

Bien que nous ayons rempli l'un des objectifs qui était l'amélioration du profil de sélectivité tout en gardant une activité submicromolaire sur Pim-1 et Pim-2, aucun des macrocycles testés parmi les plus actifs sur Pim-1/2 (composés **23**, **36c** et **62**) n'a permis d'améliorer l'activité sur cellules MV4-11. Le composé **36b** n'a cependant pas encore été évalué sur MV4-11.

Le nouvel objectif pour la poursuite de ces travaux serait de réussir à synthétiser de nouveaux macrocycles ayant des critères de « drugabilité » améliorés et possédant ainsi une activité sur cellule nettement améliorée.

D'un point de vue chimique, plusieurs paramètres pourraient d'ores et déjà être améliorés afin d'agir sur l'activité sur cellules.

A. Approche 1

La fonction acide carboxylique a démontré son importance sur l'activité inhibitrice des composés du fait des interactions qu'elle réalise avec la Lys67 et l'Asp186. Néanmoins, que ce soit le chef de file **2** ou nos composés macrocycliques, aucun d'eux n'a montré d'activité prometteuse sur cellules MV4-11. Dans un premier temps, l'un des premiers paramètres qu'il serait intéressant de modifier serait cette fonction acide carboxylique par un nouveau groupement conservant les interactions hydrogènes et ionique avec le site actif de la kinase. En effet, la fonction acide carboxylique est connue pour provoquer une limitation du passage transmembranaire, des instabilités métaboliques ainsi que de potentiels effets secondaires. Les travaux de E. Auvert *et al*[89]. montrent que la modification de certaines fonctions par d'autres groupements sur une même position peut avoir un effet significatif sur l'activité cellulaire. La synthèse de bioisostères (Figure 54), en remplaçant la fonction acide carboxylique en position 2 par un groupement capable de conserver l'interaction ionique avec l'amine protonée la lysine 67 à pH

physiologique, mais ayant de meilleures propriétés de perméabilité (ex : groupement nitro, groupement acide hydroxamique, acide phosphonique, acide sulfonique, ou encore isoxazole)[90], permettrait d'améliorer l'activité cellulaire.

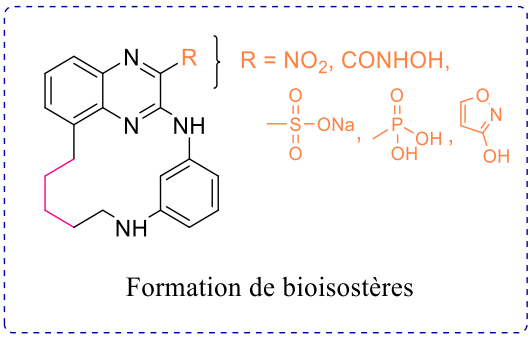


Figure 54. Modification de la fonction acide carboxylique par d'autres groupements.

Dans un 2nd temps, l'élaboration de deux nouveaux macrocycles se basant sur un nouveau noyau serait une perspective possible. En effet, la modification du noyau quinoxaline par un noyau imidazo[1,2-*b*]pyridazine, utilisé par l'inhibiteur de référence SGI-1776, tout en conservant la fonction acide carboxylique et les liens de fermeture des macrocycles que nous avons élaborés, pourrait permettre de synthétiser de nouveaux inhibiteurs macrocycliques, respectant les règles *PKI-like*, actifs sur Pim1/2, sélectifs et ayant une meilleure perméabilité membranaire (Figure 55, Schéma 84).

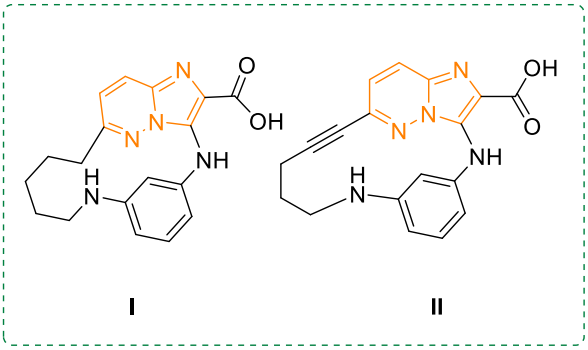


Figure 55. Pharmacomodulations envisagées à partir d'un nouveau noyau (imidazo[1,2-*b*]pyridazine), connu dans la littérature pour avoir une activité sur Pim1/2.

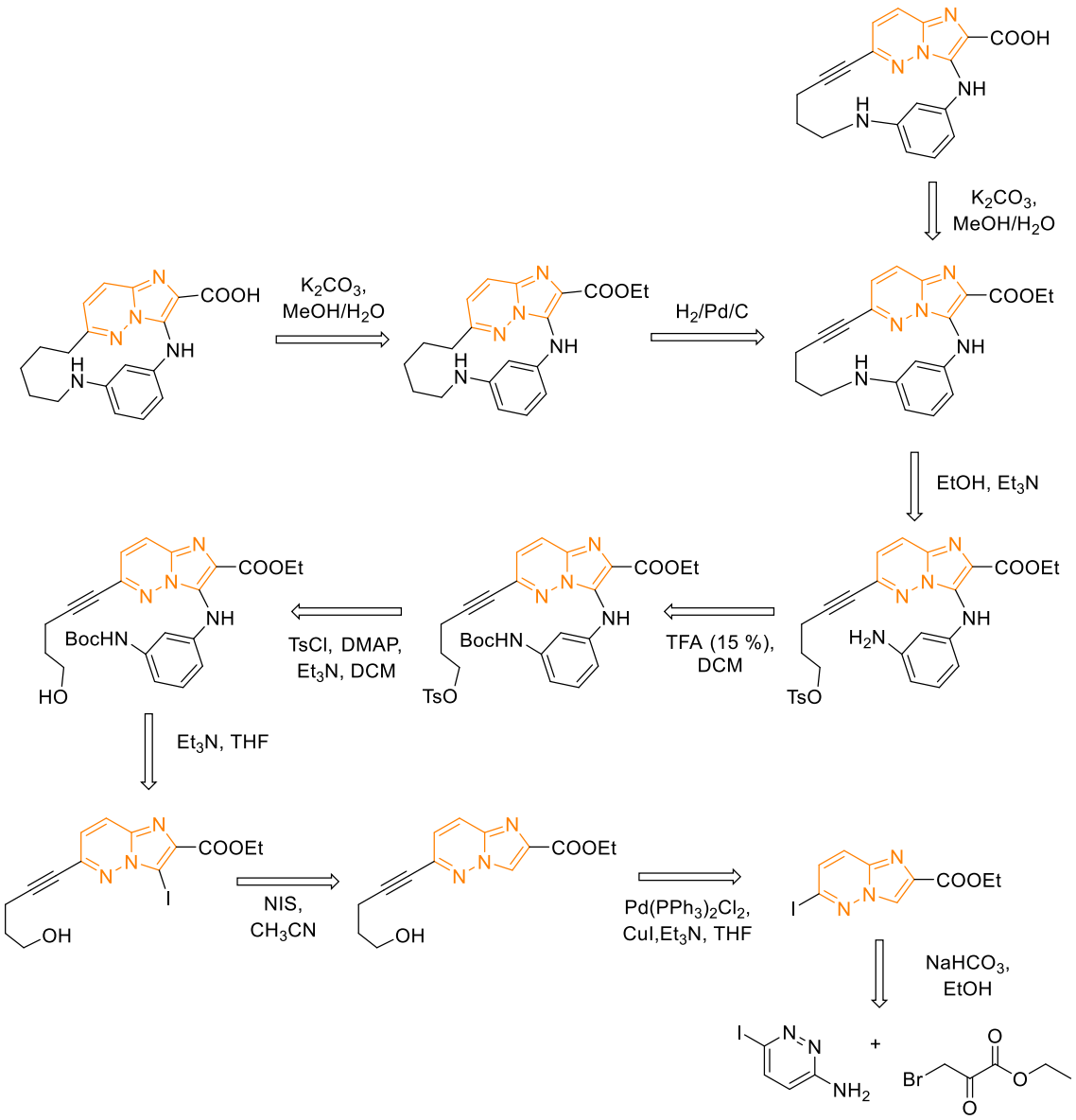


Schéma 84. Schéma rétrosynthétique envisagé pour les deux nouveaux macrocycles I et II.

B. Approche 2

Pour ce qui est de la série de l'approche 2, le logiciel Frag2Drugs avait permis l'élaboration de 24 macrocycles différents ayant une potentielle activité pan-Pim. L'idée serait de sélectionner d'autres macrocycles, parmi les 23 restants (exemple, Figure 56, Schéma 85), et de développer leur synthèse afin de les tester ensuite *in vitro*.

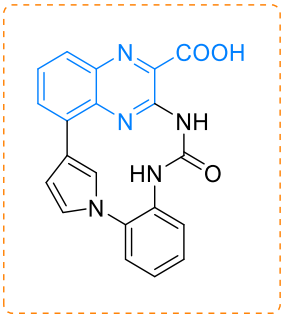


Figure 56. Exemple d'un des 23 macrocycles obtenus par le logiciel F2D.

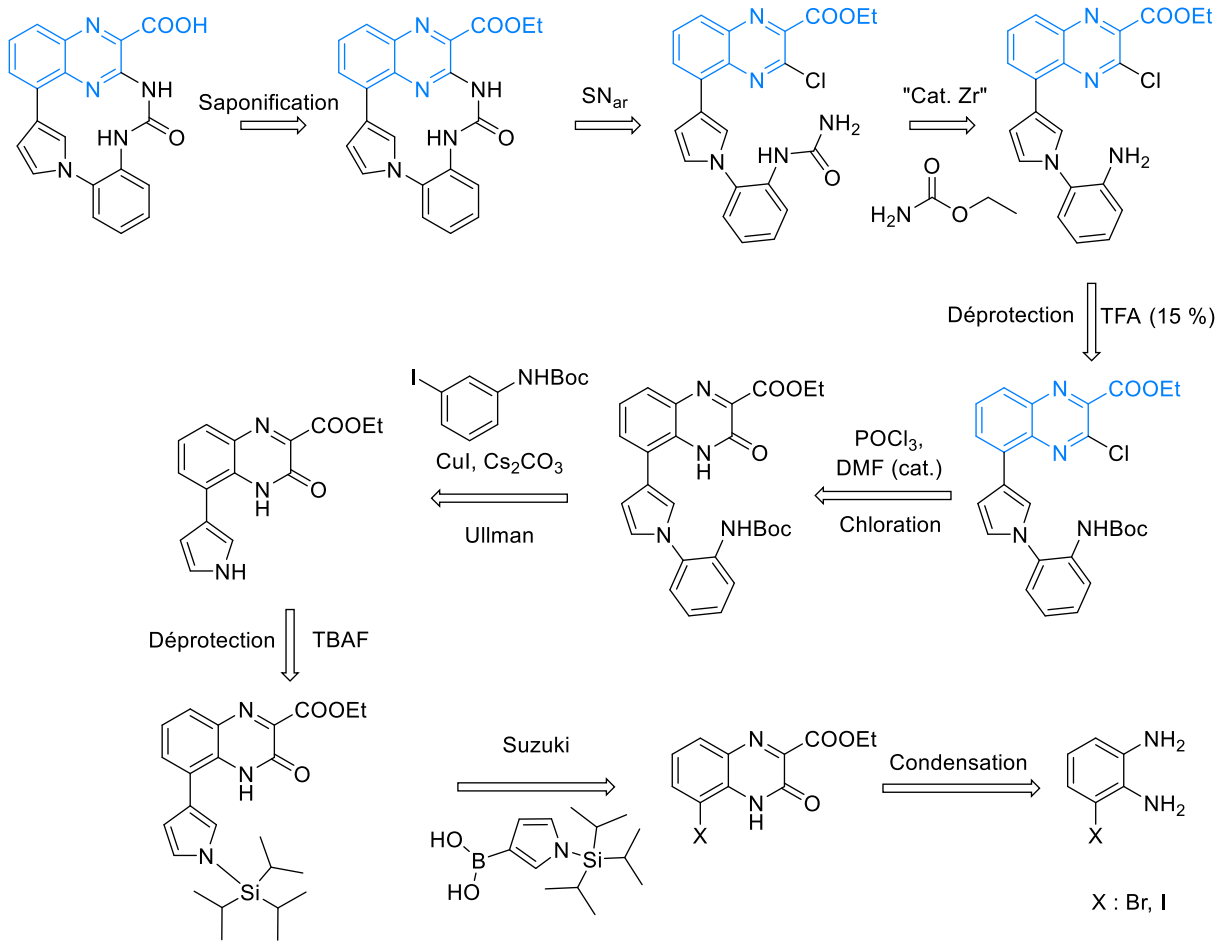


Schéma 85. Schéma rétrosynthétique envisageable pour obtenir le nouveau macrocycle sélectionné parmi les 23 macrocycles obtenus par le logiciel F2D.

C. Etude Pharmacologique

Au cours de ces travaux de thèse, seuls des tests préliminaires sur une seule lignée leucémique (MV4-11) ont été réalisés. Des tests plus poussés sur plusieurs lignées seraient nécessaires en parallèle de la nouvelle étude chimique envisagée dans les deux points précédents.

Dans un second temps, afin de comprendre pourquoi nos inhibiteurs actifs au submicromolaire sur les kinases Pim-1/2 ne sont pas actifs au niveau cellulaire sur la lignée MV4-11, il faudrait déterminer la perméabilité membranaire de nos molécules en réalisant des tests PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*), ainsi que des tests caco-2. En effet, en cas de –Log(Pe) des inhibiteurs à l'issu des tests PAMPA supérieur à 6, cela voudrait dire que nos molécules ont une faible perméabilité membranaire et cela expliquerait donc qu'elles aient une faible activité *in vitro* sur cellules MV4-11. Ces résultats nous permettraient alors d'aiguiller notre travail pharmacochimique.

Pour finir, bien que les kinases Pim soient des cibles intéressantes dans l'élaboration de nouvelles molécules à visées anti-leucémique, il est à noter que ces kinases restent des oncogènes faibles. Il s'agirait donc de réaliser des tests *in vitro* en association au sein de protocoles avec des chimiothérapies pour lesquelles des résistances ont été observées, afin de regarder leur capacité à re-chimiosensibiliser les cellules cancéreuses ciblées.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Généralité

Dans un souci de conformité avec les publications, les modes opératoires des synthèses et les caractéristiques physicochimiques des produits décrits, ont été rédigés en anglais. Les noms des molécules ont été soit attribués par le logiciel chemdraw, soit déterminé à partir des travaux de G. P. MOSS sur la nomenclature des polycycles (1999 IUPAC, *Pure Appl. Chem*, **1999**)

A. Material and Instrumentation

All solvents were anhydrous reagents from commercial sources. Unless otherwise noted, all chemicals and reagents were obtained commercially and used without purification.

1. Reaction monitoring

The reaction monitoring was carried out by thin layer chromatography (TLC) on aluminum sheets covered with silica 60 F254 (thickness 0.2 mm, Merck). The revelation was carried out under an ultraviolet (UV) lamp at 254 nm or 365 nm.

2. Hydrogenation

Hydrogenations in continuous flow were realized in a ThalesNano H-Cube® Mini Plus, using 10% Pd/C cartridges (30 × 4 mm).

3. Melting points (Mp)

Melting points (Mp) were determined on a Stuart capillary apparatus and are uncorrected.

4. High-resolution mass spectra (HRMS)

High-resolution mass spectra (HRMS) were performed in positive mode with an ESI source on a Q-TOF mass spectrometer (Bruker maXis) with an accuracy tolerance of 2 ppm, or on a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific).

5. Purity of final compounds

Purity of final compounds was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). HPLC analyses were carried out with a LaChrom Elite system [Hitachi L-2130 (pump), L-2200 (autosampler) and L-2400 (UV-detector)], with a UV detection at 254 nm at 25 °C, and a XBridge C-18 column (250 × 10 mm, 4 µm, 135 Å); elution was performed with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water (solvent A), and 0.1% TFA in acetonitrile (MeCN) (solvent B), with a gradient from 20 to 100% of B over 35 minutes with a flow rate of 1 mL.min-1; injection was realized at 1 mg/mLin DMSO (10 µL). Final compounds were obtained in a purity ≥ 95%.

6. Purification

Compounds purifications were made using :

- The ISCO Combi Flash RF 75 PSI automaton, with Redisep pre-packed columns (60 Å, 230-400 mesh, grade 9385).
- The Semi-preparative HPLC which was carried out on a Gilson PLC 2050 system [ARMEN V2 (pump), ECOM TOYDAD600 (UV-detector)], with a UV detection at 254 nm at 25 °C, and a Waters XBridge™ C-18 column (250 mm x 19 mm, 5 µm); elution (**gradient A**) was performed with 0.1% TFA in water (solvent A), and 0.1% TFA in MeCN (solvent B); with a gradient from 20 to 100% of B over 32 min and then 100% of B for 6 min at 17.1 mL/min.

7. Nuclear magnetic resonance

NMR spectra were recorded at 400 MHz (^{1}H), 101 MHz (^{13}C) on a Bruker Avance (400 MHz) spectrometer. The chemical shifts are reported in parts per million (ppm, δ) relative to residual deuterated solvent peaks. The abbreviations s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet and bs = broad signal were used throughout.

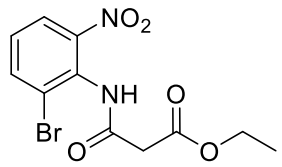
8. Microwave irradiation

Heating by microwave irradiation was carried out using an Initiator Astra device from Biotage.

II. Synthesis of the quinoxaline scaffold

A. 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline scaffold synthesis

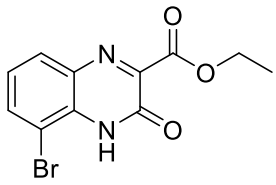
1. Ethyl 3-((2'-bromo-6'-nitrophenyl)amino)-3-oxopropanoate (**3**)



Chemical Formula: $C_{11}H_{11}BrN_2O_5$
Molecular Weight: 331,12

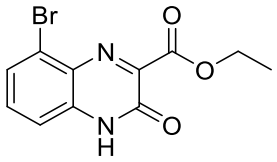
To a cold solution of 2-bromo-6-nitroaniline (1.00 g, 4.46 mmol) in DMF (10 mL) was added dropwise ethyl malonyl chloride (1.18 mL, 9.22 mmol). Then triethylamine (1.30 mL, 4.46 mmol) was added, and the resulting mixture was stirred at 0 °C for 30 min and then at room temperature for 24 h. Ice was added to the round bottom flask. A precipitate was formed. The mixture was filtered to give a brown powder. The rest of the solution was extracted with ethyl acetate, dried, filtered and evaporated giving a brown powder. The residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-40%) as eluent, to give compound **3** (1.12 g, 74%). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.45 (s, 1H), 8.08 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 7.97 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H), 7.47 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.11 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.46 (s, 2H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

2. Ethyl 5/8-bromo-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**4** and **5**)



4

Chemical Formula: $C_{11}H_9BrN_2O_3$
Molecular Weight: 297,11



5

Chemical Formula: $C_{11}H_9BrN_2O_3$
Molecular Weight: 297,11

Méthode A:

Compound **3** (66 mg, 0.2 mmol) was dissolved in a cold solution of DMF (1 mL). Potassium tert-butoxyde was added (67 mg, 0,6 mmol) and the solution was stirred at 0 °C for 20 mins. The resulting mixture was evaporated, redissolved in ethyl acetate, acidified until pH 1 with a hydrochloric acid aqueous solution (1 M), and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over MgSO4, filtered, and evaporated under reduced pressure to give an intermediate as brown powder (15.6 mg Brut). To the resulting intermediate (15.6 mg Brut) dissolved in DMF (1 mL) was added PBr_3 (17 mg, 62,8 µmol). The solution was stirred at room temperature for 2.5 h. The mixture was quenched with ice. The solution was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers dried over MgSO4, filtered, and evaporated under reduced. The resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–50%) as eluent giving compound **4** (3 mg, 32%) as a yellow solid. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*) δ 12.21 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.35 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

Method B:

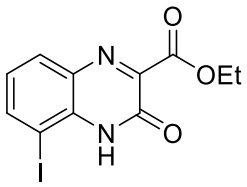
A mixture of 3-bromobenzene-1,2-diamine (411 mg, 2.2 mmol), diethyl 2-oxomalonate (370 mL, 2.4 mmol) and citric acid (64 mg, 0.33 mmol) in ethanol (15 mL) was stirred magnetically at 50 °C for 2 h. Ethanol was then evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate

gradient (0–50%) as eluent giving two isomers (compound **4** : 122 mg, 19%, compound **5** : 459 mg, 70%).

Compound **4**: ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*) δ 12.21 (s, 1H), 7.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.35 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

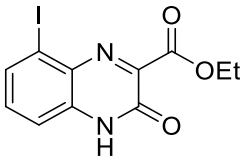
Compound **5:** 1H NMR (300 MHz, DMSO-*d6*) δ 13.07 (s, 1H), 7.69 (dd, *J* = 8.0, 1.1 Hz, 1H), 7.54 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 8.0, 1.1 Hz, 1H), 4.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

3. Ethyl 5/8-iodo-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**6** and **7**)



6

Chemical Formula: $C_{11}H_9IN_2O_3$
Molecular Weight: 344,11



7

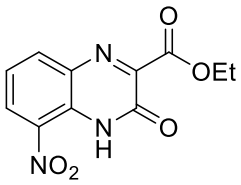
Chemical Formula: $C_{11}H_9IN_2O_3$
Molecular Weight: 344,11

A mixture of 3-iodo-1,2-phenylenediamine (1.00 g, 4.20 mmol), diethyl 2-oxomalonate (0.81 mL, 4.70 mmol) and citric acid (132 mg, 0.69 mmol) in ethanol (50 mL) was stirred magnetically at 50 °C for 3 h. Ethanol was then evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–70%) as eluent to give compound **6** (275 mg, 19%) and its 8-iodo (**7**) isomer (1.01 g, 70%) as yellow powders, (**6** : m.p. 162 °C).

Compound **6 :** ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 11.54 (s, 1H), 8.21 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 4.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

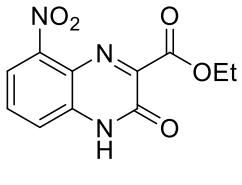
Compound **7 :** ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 12.96 (bs, 1H), 7.89 (dd, *J* = 4.4, 2.4 Hz, 1H), 7.37-7.29 (m, 2H), 4.39 (qd, *J* = 7.2, 2.0 Hz, 2H), 1.33 (td, *J* = 7.2, 2.0 Hz, 3H).

4. Ethyl 5/8-nitro-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**8** and **9**)



8

Chemical Formula: $C_{11}H_9N_3O_5$
Molecular Weight: 263,21



9

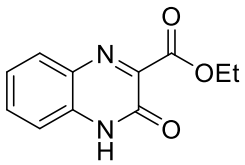
Chemical Formula: $C_{11}H_9N_3O_5$
Molecular Weight: 263,21

A mixture of 3-nitrobenzene-1,2-diamine (100 mg, 0.65 mmol), diethyl 2-oxomalonate (0.18 mL, 1.18 mmol) and citric acid (19 mg, 99 µmol) in ethanol (10 mL) was stirred magnetically at 50 °C for 20 h. Ethanol was then evaporated under reduced pressure, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–70%) as eluent to give compound **8** (58 mg, 34%) and its 8-nitro (**9**) isomer (83 mg, 48%) as yellow powders, (**8** : m.p. 117 °C).

Compound **8** : ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 12.01 (bs, 1H), 8.46 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 8.26 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.55 (dd, *J* = 8.4, 8.0 Hz, 1H), 4.40 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.33 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

Compound **9** : ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 13.27 (s, 1H), 7.85 – 7.75 (m, 2H), 7.56 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 4.38 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

5. Ethyl 3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**10**)

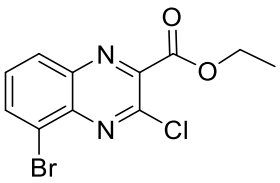


Chemical Formula: $C_{11}H_{10}N_2O_3$
Molecular Weight: 218,21

A mixture of *o*-phenylenediamine (708.3 mg, 6.55 mmol), diethyl 2-oxomalonate (1 mL, 6.55 mmol) and citric acid (41.0 mg, 0.20 mmol) in ethanol (13 mL) was stirred magnetically for 10 minutes at 50 °C. Ethanol was then evaporated under reduced pressure, and the residue was stirred with crushed ice for 5 minutes, filtered and dried under vacuum to give compound **10** (1129.6 mg, 79%) as a beige solid. m.p. 168.8 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 12.85 (bs, 1H), 7.97 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 7.64 (ddd, *J* = 8.1, 7.2, 1.2 Hz, 1H),7.48 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 7.42 (ddd, *J* = 8.1, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 4.56 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.49 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 163.4, 154.6, 148.4, 132.8, 132.2, 132.1, 130.2, 125.0, 116.5, 62.6, 14.2.

B. Chloration on position 3

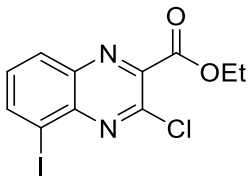
1. Ethyl 5-bromo-3-chloroquinoxaline-2-carboxylate (**11**)



Chemical Formula: $C_{11}H_8BrClN_2O_2$
Molecular Weight: 315,55

Into a dry three-neck round bottom flask was introduced compound **4** (210 mg, 0.71 mmol) in phosphorous oxychloride (2.37 mL) at ice bath temperature. The mixture was vigorously stirred magnetically at 0 °C for 5 min and *N*,*N*-dimethylformamide (few drops) was then added at 0 °C and the reaction mixture was refluxed for 1 h. After cooling at 0 °C, the resulting mixture was neutralized with a 1 M sodium hydroxide aqueous solution and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, and dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to obtain derivative **11** (214 mg, 97%) as a yellow solid. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 8.40 (dd, *J* = 7.7, 1.2 Hz, 1H), 8.25 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.91 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 4.51 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 163.4, 145.3, 144.3, 140.7, 139.8, 136.8, 132.8, 129.7, 122.2, 63.3, 14.4.

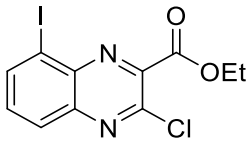
2. Ethyl 3-chloro-5-iodoquinoxaline-2-carboxylate (**12**)



Chemical Formula: $C_{11}H_8ClIN_2O_2$
Molecular Weight: 362,55

Into a dry three-neck round bottom flask was introduced compound **6** (100 mg, 0.29 mmol) in phosphorous oxychloride (0.96 mL) at ice bath temperature. The mixture was vigorously stirred magnetically at 0 °C for 5 min and DMF (42 µL) was then added at 0 °C and the reaction mixture was refluxed for 1 h. After cooling at 0 °C, the resulting mixture was neutralized with a 1 M sodium hydroxide aqueous solution and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, and dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to obtain derivative **12** (102 mg, 97%) as a yellow solid, m.p. 120 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 8.61 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 8.23 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.75 (dd, *J* = 8.4, 7.6 Hz, 1H), 4.50 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.39 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 162.9, 144.8, 143.9, 143.0, 141.7, 139.7, 133.0, 129.9, 100.7, 62.8, 13.9.

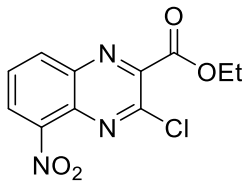
3. Ethyl 3-chloro-8-iodoquinoxaline-2-carboxylate (**13**)



Chemical Formula: $C_{11}H_8ClIN_2O_2$
Molecular Weight: 362,55

Into a dry three-neck round bottom flask was introduced compound **7** (100 mg, 0.29 mmol) in phosphorous oxychloride (0.96 mL) at ice bath temperature. The mixture was vigorously stirred magnetically at 0 °C for 5 min and DMF (42 µL) was then added at 0 °C and the reaction mixture was refluxed for 1 h. After cooling at 0 °C, the resulting mixture was neutralized with a 1 M sodium hydroxide aqueous solution and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, and dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to obtain derivative **13** (94 mg, 89%) as a yellow solid, m.p. 105 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 8.55 (dd, *J* = 8.4, 0.8 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 8.4, 0.8 Hz, 1H), 7.75 (dd, *J* = 8.4, 7.2 Hz, 1H), 4.52 (qd, *J* = 7.2, 1.6 Hz, 2H), 1.40 (td, *J* = 7.2, 1.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 163.4, 145.4, 144.1, 142.4, 142.2, 139.7, 134.8, 129.3, 102.9, 63.3, 14.4.

4. Ethyl 3-chloro-5-nitroquinoxaline-2-carboxylate (**14**)



Chemical Formula: $C_{11}H_8ClN_3O_4$
Molecular Weight: 281,65

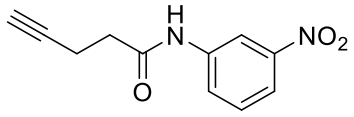
Into a dry three-neck round bottom flask was introduced compound **8** (100 mg, 0.38 mmol) in phosphorous oxychloride (1.3 mL) at ice bath temperature. The mixture was vigorously stirred magnetically at 0 °C for 5 min and *N*,*N*-dimethylformamide (15 µL) was then added at 0 °C and the reaction mixture was refluxed for 1 h. After cooling at 0 °C, the resulting mixture was neutralized with a 1 M sodium hydroxide aqueous solution and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, and dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to obtain derivative **14** (104 mg, 97%) as a yellow solid, m.p. 72 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 8.62 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 8.53 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 8.13 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 4.52 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.39 (t, J = 7.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 163.1, 146.1, 145.8, 145.7, 139.5, 134.3, 133.7, 131.2, 128.0, 63.5, 14.4.

.

III. Approach 1

A. Macrocycle 23

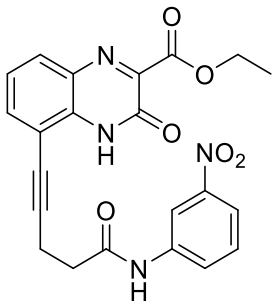
1. *N*-(3-nitrophenyl)pent-4-ynamide (**15**)



Chemical Formula: $C_{11}H_{10}N_2O_3$
Molecular Weight: 218,21

To a solution of pent-4-ynoic acid (50 mg, 0.51 mmol) in DMF (3 mL) were added HATU (349 mg, 0.92 mmol) dissolved in DMF (2 mL) and 2,6-lutidine (106 µl, 0.91 mmol) The mixture was stirred 10 mins and then, 3-nitroaniline (63 mg, 0.46 mmol) was added and the reaction was stirred at room temperature overnight. The resulting solution was purified by HPLC preparative giving compound **15** as a yellow oil (78 mg, 78%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.48 (s, 1H), 8.64 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.04-7.79 (m, 2H), 7.61 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 2.82 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.60-2.56 (m, 2H), 2.49-2.45 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 170.6, 148.4, 140.6, 130.7, 125.4, 118.2, 113.6, 83.9, 72.1, 35.71, 14.4.

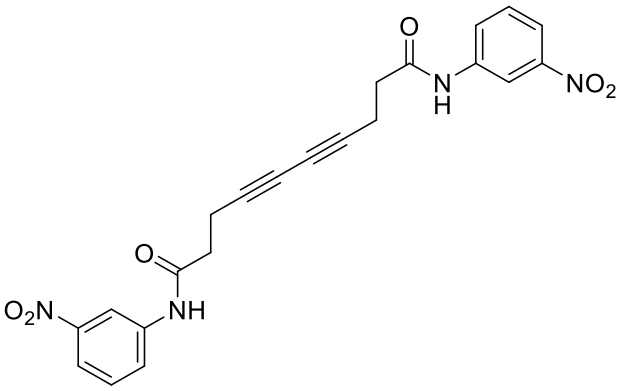
2. Ethyl 5-(5-((3-nitrophenyl)amino)-5-oxopent-1-yn-1-yl)-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**16a**)



Chemical Formula: $C_{22}H_{18}N_4O_6$
Molecular Weight: 434,41

In a sealed tube, a mixture of compound **4** (28 mg, 94 µmol), Et_3N (39 µl, 0.28 mmol) and *N*-(3-nitrophenyl)pent-4-ynamide **15** (30 mg, 0.14 mmol) in THF (0.3 mL) was stirred 15 min under argon. Then, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (1.3 mg, 1.85 µmol) and CuI (0.2 mg, 1.05 µmol) were added under argon. The solution was stirred for 24 h at 80 ° C. The solution was then filtrated on celite and washed with ethyl acetate. The organic layer was then washed with brine and ethyl acetate. The organic layer was dried over $MgSO_4$ and filtered and evaporated and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–50%) as eluent to give compound **16a** as a yellow oil (9.0 mg, 22%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.48 (s, 1H), 8.62 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.93 – 7.83 (m, 3H), 7.58 (td, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 2H), 6.94 (s, 1H), 4.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.47 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.90 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 170.6, 163.5, 152.4, 150.6, 148.0, 142.0, 140.2, 130.2, 128.0, 127.3, 126.7, 126.3, 125.9, 125.0, 124.9, 117.7, 113.2, 110.4, 62.1, 34.7, 23.5, 14.0.

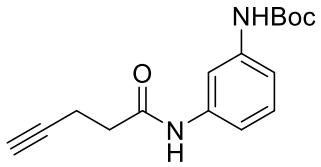
3. N^1,N^{10}-bis(3-nitrophenyl)deca-4,6-diynediamide (**16b**)



Chemical Formula: $C_{22}H_{18}N_4O_6$
Molecular Weight: 434,41

To a mixture of compound **4** (28 mg, 95 µmol) and Et_3N (52 µL, 0.37 mmol) in THF (0.7 mL) and DMSO (few drops) was added *N*-(3-nitrophenyl)pent-4-ynamide **15** (30 mg, 0.14 mmol) at 0 °C under argon. Then, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (1.3 mg, 1.85 µmol) and CuI (0.2 mg, 1.05 µmol) were added and the reaction mixture was stirred for 4 h at 0 °C under argon. The solution was then evaporated and purified by semi-preparative HPLC giving compound **16b** as a white powder (30 mg, 74%).^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.47 (s, 2H), 8.62 (t, *J* = 2.0 Hz, 2H), 7.88 (td, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 4H), 7.59 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H), 2.59 (t, *J* = 3.3 Hz, 8H).

4. *Tert*-butyl (3-(pent-4-ynamido)phenyl)carbamate (**17**)

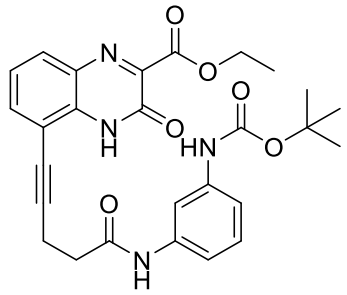


Chemical Formula: $C_{16}H_{20}N_2O_3$
Molecular Weight: 288,35

To a solution of pent-4-ynoic acid (106 mg, 1.08 mmol) in dry *N*,*N*-dimethylformamide (DMF) (3 mL), under an argon atmosphere, were added 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluoro-phosphate (HATU) (680 mg, 1.79 mmol) in solution in dry DMF (3 mL) and 2,6-lutidine (207 µL, 1.79 mmol), and the resulting mixture was stirred magnetically at room temperature for 10 minutes. *Tert*-butyl (3-aminophenyl)carbamate (188 mg, 0.90 mmol) was then added and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-60%) as eluent, to give compound **17** (214 mg, 69%) as a white powder, m.p. 130 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 9.91 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.13 (dd, *J* = 8.4, 8.8 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 2.78 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.50-2.40 (m, 4H), 1.47 (s, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 169.2, 152.7, 139.8, 139.4, 128.7, 113.3, 113.0, 109.1, 83.7, 78.9, 71.4, 35.1, 28.1 (3 × C), 14.1.

.

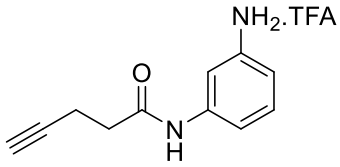
5. Ethyl 5-(5-((3-((tert-butoxycarbonyl)amino)phenyl)amino)-5-oxo-pent-1-yn-1-yl)-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**18**)



Chemical Formula: $C_{27}H_{28}N_4O_6$
Molecular Weight: 504,54

Into a sealed tube were added compound **4** (90 mg, 0.3 mmol) and Et_3N (120 µl, 0.86 mmol) in THF (6 mL) in a sealed tube. The solution was flushed with argon and $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (4 mg, 5.70 µmol) and CuI (0.6 mg, 3.15 µmol) were added under argon. Then, *tert*-butyl (3-(pent-4-ynamido)phenyl)carbamate **17** (132 mg, 0.46 mmol) in THF (2 mL) was added dropwise under argon and the reaction mixture was refluxed for 24 h. The solution was then evaporated, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-100%) as eluent to give compound **18** (25 mg, 16%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 9.94 (s, 1H), 9.31 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.58 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.11 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.02 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 4.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.44 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.82 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

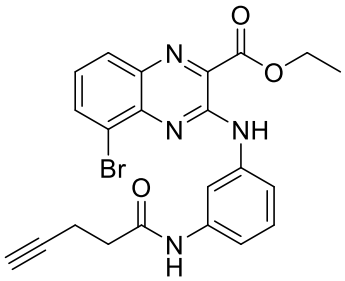
6. (Pent-4-ynamido)benzenaminium trifluoroacetic salt (**19**)



Chemical Formula: $C_{13}H_{12}F_3N_2O_2$
Molecular Weight: 285,25

To a solution of compound **17** (1.20 g, 4.16 mmol,) in dichloromethane (DCM) (40 mL) was added dropwise trifluoroacetic acid (4 mL) at 0 °C. The resulting mixture was stirred magnetically at 0 °C for 30 minutes, and then, at room temperature for 5 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using DCM with methanol (MeOH) gradient (0-15%) as eluent, to give compound **19** (1.26 g, 100%) as a brown oil. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) 10.01 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.20 (dd, *J* = 8.0, 7.6 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.25–3.00 (m, 3H), 2.79 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.55–2.40 (m, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d6) 169.8, 140.2, 134.7, 130.0, 116.7, 116.3, 112.2, 83.6, 71.5, 35.2, 14.1. ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-*d6*) δ -74.14 (s).

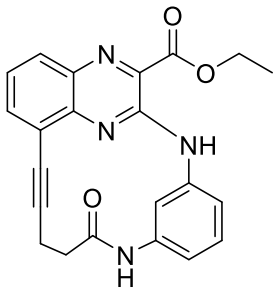
7. Ethyl 5-bromo-3-((3-(pent-4-ynamido)phenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**20**)



Chemical Formula: $C_{22}H_{19}BrN_4O_3$
Molecular Weight: 467,32

To a solution of compound **19** (90 mg, 0.30 mmol) in THF (1 mL) was added DIPEA (300 µl, 1.72 mmol). Then, compound **11** (22 mg, 70 µmol) in THF (1 mL) was added dropwise and the mixture was refluxed for 72 h. The solvent was then evaporated, and the resulting residue was purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0-100%) as eluent to give compound **20** as a yellow powder (20 mg, 61%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*)δ 10.36 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 8.41 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.17 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.97 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.54-7.45 (m, 1H), 7.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.51 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.81 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 2.55 (m, 4H), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 169.9, 165.7, 148.8, 140.1, 140.0, 139.7, 136.7, 136.1, 133.8, 129.9, 129.8, 127.1, 120.4, 115.0, 114.8, 111.1, 84.1, 72.0, 63.0, 35.7, 15.6, 14.5.

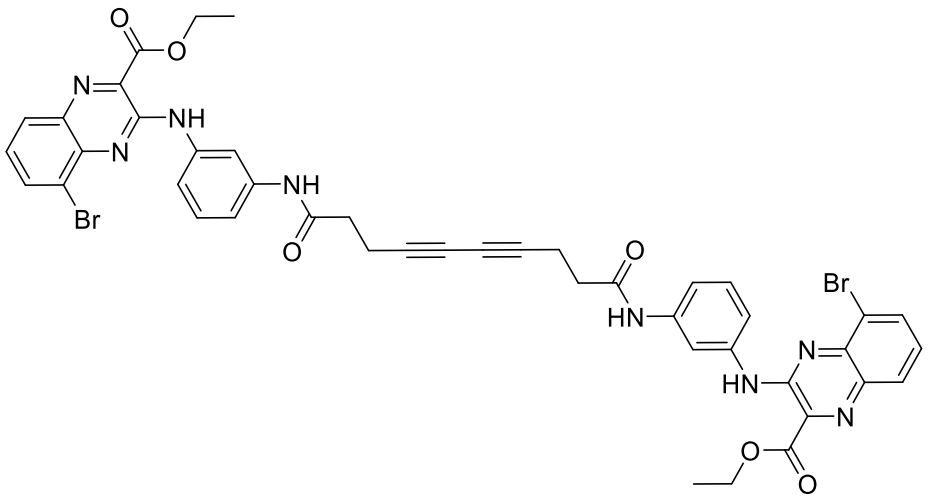
8. Ethyl 6-oxo-7,13,16,22-tetraazatetracyclo[12.6.2.1^{8,12}.0^{17,21}]tricosa-1(20),8(23),9,11,14,16,18,21-octaen-2-yne-15-carboxylate (**21a**)



Chemical Formula: $C_{22}H_{18}N_4O_3$
Molecular Weight: 386,41

Into a sealed tube were introduced bis(triphenylphosphine)palladium (II) dichloride ($PdCl_2(PPh_3)_2$) (4.0 mg, 5.70 µmol), CuI (0.3 mg, 1.58 µmol) and triethylamine (16 µL, 0.11 mmol) in dry THF (3 mL), under an argon atmosphere. Then, intermediate **20** (20 mg, 39 µmol) dissolved in 3 mL of THF, was added dropwise, and the reaction mixture was refluxed and stirred magnetically for 16 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–100%) as eluent to give the macrocycle **21a** (1.2 mg, 8%), as a yellow oil. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) 10.16 (s, 1H), 9.60 (s, 1H), 9.48 (bs, 1H), 7.97 (dd, *J* = 8.4, 0.8 Hz, 1H), 7.87 (dd, *J* = 7.2, 0.8 Hz, 1H), 7.53 (dd, *J* = 8.4, 7.2 Hz, 1H), 7.34 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.06 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 4.50 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.95 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.59 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.42 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d6) 172.7, 165.2, 147.9,142.6, 139.6, 139.3, 135.4, 135.0, 132.5, 129.3, 129.0, 126.1, 120.4, 119.0, 118.6, 116.8, 95.5, 78.6, 62.4, 29.0, 16.2, 14.0. HRMS (ESI) *m/z*: [M+H]+ calcd for $C_{22}H_{19}N_4O_3$, 387.14572; found 387.14516.

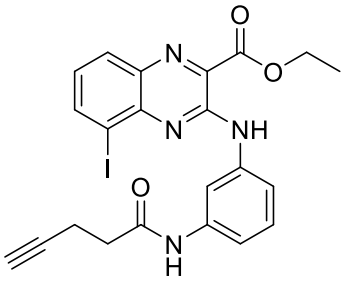
9. Diethyl 3,3'-((((deca-4,6-diynedioyl)bis(azanediyl))bis(3,1-phenylene))bis(azanediyl))bis(5-bromoquinoxaline-2-carboxylate) (**21b**)



Chemical Formula: $C_{44}H_{36}Br_2N_8O_6$
Molecular Weight: 932,63

Into a sealed tube were introduced bis(triphenylphosphine)palladium (II) dichloride ($PdCl_2(PPh_3)_2$) (3.00 mg, 4.27 µmol), CuI (0.4 mg, 2.10 µmol) and triethylamine (18 µL, 0.13 mmol) in dry THF (1 mL), under an argon atmosphere. Then, intermediate **20** (20 mg, 43 µmol) in THF (1 mL), was added dropwise, and the reaction mixture was refluxed for 16 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–100%) as eluent to give compound **21b** (4.0 mg, 10%), as a yellow oil. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.33 (s, 2H), 10.00 (s, 2H), 8.38 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 8.14 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 2H), 7.99 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 2H), 7.94 (t, *J* = 2.0 Hz, 2H), 7.52-7.42 (m, 2H), 7.35 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.49 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H), 2.60 (d, *J* = 5.2 Hz, 4H), 2.57 (d, *J* = 5.4 Hz, 4H), 1.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). HRMS (ESI) m/z: [M+Na]+ calcd for $C_{44}H_{36}Br_2N_8NaO_6$, 953.101466; found 953.101676.

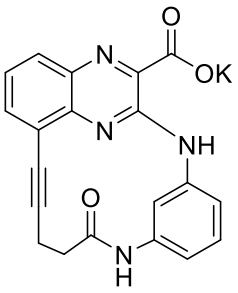
10. Ethyl 5-iodo-3-((3-(pent-4-ynamido)phenyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**22**)



Chemical Formula: $C_{22}H_{19}IN_4O_3$
Molecular Weight: 514,32

To a solution of trifluoroacetic salt **19** (160 mg, 0.53 mmol) and *N*,*N*'-diisopropylethyl-amine (DIPEA) (500 µL, 2.87 mmol) in dry THF (3 mL), under an argon atmosphere, was added dropwise compound **12** (64 mg, 0.18 mmol) dissolved in dry THF (1 mL). The resulting mixture was refluxed and stirred magnetically for 2 days. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–100%) as eluent to give intermediate **22** (37 mg, 40%) as a yellow powder, m.p. 127 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.36 (s, 1H), 9.99 (s, 1H), 8.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.38 (dd, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.41-7.32 (m, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.51 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.82 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.59-2.50 (m, 4H), 1.43 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 169.5, 165.2, 148.6, 142.3, 142.1, 139.5, 139.1, 135.5, 133.3, 130.2, 129.3, 127.6, 115.0, 114.3, 110.8, 98.5, 83.7, 71.5, 62.5, 35.2, 14.1, 14.0. HRMS (ESI) m/z: [M+H]+ calcd for $C_{22}H_{20}IN_4O_3$, 515.05746; found 515.05783.

11. Potassium 6-oxo-7,13,16,22-tetraazatetracyclo[12.6.2.1^{8,12}.0^{17,21}]tricosa-1(20),8(23),9,11,14,16,18,21-octaen-2-yne-15-carboxylate (**23**)

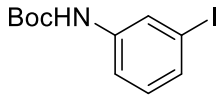


Chemical Formula: $C_{20}H_{13}KN_4O_3$
Molecular Weight: 396,45

To a solution of compound **21a** (1.0 mg, 2.59 µmol) in aqueous methanol (80%, 2 mL), was added potassium carbonate (0.36 mg, 2.6 µmol) and the reaction mixture was stirred magnetically at room temperature for 1 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the aqueous phase was washed with ethyl acetate, and evaporated under reduced pressure to yield the macrocycle **23** (1.0 mg, 97%) as a yellow powder, m.p. > 350 °C . ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 13.29 (s, 1H), 9.62 (s, 1H), 9.61 (bs, 1H), 7.86 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.38 (dd, *J* = 8.0, 7.2 Hz, 1H), 7.28 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 6.70 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 2.94 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 2.65 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H). HRMS (ESI) *m/z*: [M+2H]+ calcd for $C_{20}H_{15}N_4O_3$, 359.11442, found 359.11401.

B. Phenyl series

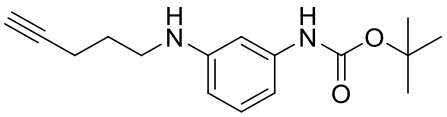
1. *tert*-butyl (3-iodophenyl)carbamate (**24**)



Chemical Formula: $C_{11}H_{14}INO_2$
Molecular Weight: 319,14

In a round bottom flask were added 3-iodoaniline (100 mg, 0.46 mmol) and Di-*tert*-butyl dicarbonate (100 mg, 0.46 mol). The resulting mixture was heated at 80 °C for 10 min and was then evaporated under reduced pressure to give compound **24** as a colorless oil (145 mg, 98%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 9.47 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.04 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 1.47 (s, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 152.6, 141.0, 130.7, 130.5, 126.1, 117.3, 94.6, 79.5, 28.1 (3 × C).

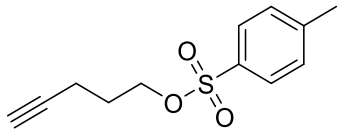
2. *tert*-butyl (3-(pent-4-yn-1-ylamino)phenyl)carbamate (**25**)



Chemical Formula: $C_{16}H_{22}N_2O_2$
Molecular Weight: 274,36

To a solution of *tert*-butyl (3-aminophenyl)carbamate (44 mg, 0.21 mmol) and triethylamine (29 µl, 0.21 mmol) in EtOH (2 mL), was added pent-4-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate **26** (50 mg, 0.50 mmol) in EtOH (0.5 mL). The resulting mixture was stirred magnetically at 80 °C through MW irradiation for 3 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–10 %) as eluent to give intermediate **25** (17 mg, 29%) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 9.00 (s, 1H), 6.90 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.54 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.01 (m, 2H), 2.78 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.25 (td, *J* = 7.1, 2.6 Hz, 2H), 1.69 (m, 2H), 1.45 (s, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 152.7, 149.3, 140.2, 128.9, 106.3, 106.2, 102.0, 84.3, 78.6, 71.4, 41.8, 28.2 (3 × C), 27.6, 15.5.

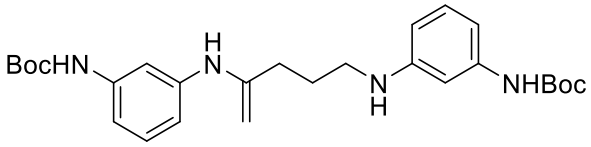
3. Pent-4-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate (**26**)



Chemical Formula: $C_{12}H_{14}O_3S$
Molecular Weight: 238,30

In a round bottom flask were added pent-4-yn-1-ol (235 mg, 2.79 mmol), triethylamine (1.20 mL, 8.61 mmol), and 4-dimethylaminopyridine (18 mg, 0.15 mmol) in anhydrous dichloromethane (10 mL) at 0 °C. After 10 minutes of stirring, tosyl chloride (2.7 g, 14 mmol) was added at 0 °C and the reaction mixture was stirred magnetically at 30 °C for 4 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–50%) as eluent to give compound **26** as a yellow oil (667 mg, 100%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 7.82-7.75 (m, 2H), 7.48 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.07 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.17 (td, *J* = 7.0, 2.7 Hz, 2H), 1.74 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 145.0, 132.3, 130.2 (2 × C), 127.6 (2 × C), 82.7, 72.0, 69.4, 27.3, 21.1, 14.0.

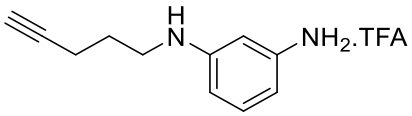
4. *tert*-butyl (3-((5-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)amino)pent-1-en-2-yl)amino)phenyl)carbamate (**27**)



Chemical Formula: $C_{27}H_{38}N_4O_4$
Molecular Weight: 482,63

To a solution of *tert*-butyl (3-aminophenyl)carbamate (88 mg, 0.42 mmol) and triethylamine (29 µl, 0.21 mmol) in EtOH (2 mL), was added pent-4-yn-1-yl 4-methylbenzenesulfonate **26** (50 mg, 0.50 mmol) dissolved in EtOH (0.5 mL). The resulting mixture was stirred magnetically at 100 °C for 16 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–10 %) as eluent to give intermediate **27** (30 mg, 30%) as a colorless oil. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 9.08 (s, 2H), 8.98 (s, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.88 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 6.67-6.51 (m, 3H), 6.16 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 1H), 5.52 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 5.43 (s, 1H), 2.99 (m, 2H), 2.35 (m, 2H), 1.90-1.79 (m, 2H), 1.78-1.58 (m, 2H), 1.45 (s, 18H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 152.7, 152.7, 149.4, 143.4, 140.2, 139.9, 131.2, 128.8, 123.7, 123.6, 115.9, 106.3, 106.0, 105.3, 102.0, 101.2, 78.7, 78.6, 60.4, 28.18 (3 × C), 28.17 (3 × C), 23.8, 19.9.

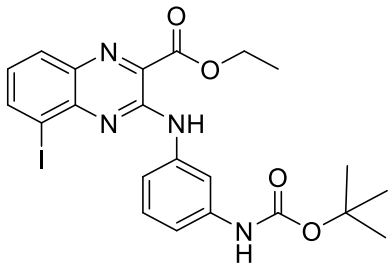
5. 2,2,2-Trifluoro-1-((3-(pent-4-yn-1-ylamino)phenyl)-l5-azaneyl)ethan-1-one (**28**)



Chemical Formula: $C_{13}H_{14}F_3N_2O$
Molecular Weight: 271,26

To a solution of compound **25** (17 mg, 62 µmol,) in dichloromethane (DCM) (4 mL) was added dropwise trifluoroacetic acid (0.4 mL) at 0 °C. The resulting mixture was stirred magnetically at room temperature for 3 h. The solvent was then removed under reduced pressure to give compound **28** (17 mg, 100%) as a red oil. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 6.75-6.64 (m, 1H), 5.82-5.75 (m, 3H), 5.19 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.68 (s, 3H), 2.99 (m, 2H), 2.78 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.24 (td, *J* = 7.1, 2.6 Hz, 2H), 1.68 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 149.7, 149.2, 129.2, 102.9, 101.3, 97.8, 84.4, 71.3, 41.8, 27.8, 15.6.

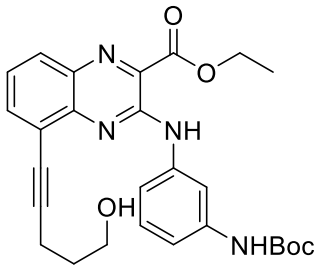
6. Ethyl 3-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)amino)-5-iodo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carboxylate (**29**)



Chemical Formula: $C_{22}H_{23}IN_4O_4$
Molecular Weight: 534,35

To a solution of *tert*-butyl (3-aminophenyl)carbamate (103 mg, 0.50 mmol) and *N*,*N*'-diisopropylethylamine (DIPEA) (81 µl, 0.47 mmol) in dry THF (3 mL), was added dropwise compound **12** (180 mg, 0.50 mmol) dissolved in dry THF (1 mL). The resulting mixture was refluxed and stirred magnetically for 3 days. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–20 %) as eluent to give intermediate **29** (160 mg, 60%) as an orange powder, m.p. 173 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.34 (s, 1H), 9.40 (s, 1H), 8.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.38 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.33 (m, 2H), 7.09 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.51 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.50 (s, 9H), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.2, 152.8, 148.7, 142.3, 142.1, 140.0, 139.1, 135.4, 133.2, 130.2, 129.2, 127.5, 114.0, 113.5, 109.4, 98.4, 79.1, 62.5, 28.2 (3 × C), 14.0. [M+H]+ calcd for $C_{22}H_{24}IN_4O_4$, 535.08367; found 535.08398.

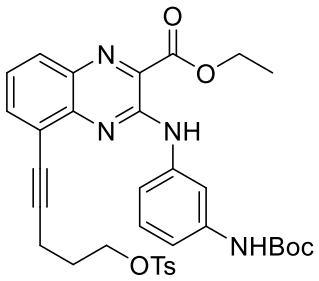
7. Ethyl 3-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)amino)-5-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)quinoxaline-2-carboxylate (**30**)



Chemical Formula: $C_{27}H_{30}N_4O_5$
Molecular Weight: 490,56

Into a sealed tube were introduced bis(triphenylphosphine)palladium (II) dichloride ($PdCl_2(PPh_3)_2$) (10 mg, 14 µmol), CuI (1.3 mg, 6.83 µmol), triethylamine (58 µl, 0.42 mmol) and compound **29** (75 mg, 0.14 mmol) in dry THF (3 mL), under an argon atmosphere. Then, pent-4-yn-1-ol (18 mg, 0.21 mmol) dissolved in 2 mL of THF was added, and the reaction mixture was refluxed and stirred magnetically for 16 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–100%) as eluent to give compound **30** as a yellow solid (62.2 mg, 93%), m.p. 166 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.26 (s, 1H), 9.38 (s, 1H), 8.59 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.94 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H), 7.86 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H), 7.60 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.50 (dd, *J* = 8.4, 7.4 Hz, 1H), 7.30 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.09 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H), 4.60 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 4.50 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.57 (m, 2H), 2.70-2.62 (m, 2H), 1.89-1.77 (m, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.42 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.6, 152.8, 148.2, 142.8, 139.9, 139.5, 135.6, 135.4, 132.5, 129.4, 129.2, 125.8, 120.5, 113.2, 113.2, 109.2, 96.6, 79.2, 77.6, 62.5, 59.7, 31.9, 28.2 (3 × C), 15.9, 14.0. [M+H]+ calcd for $C_{27}H_{31}N_4O_5$, 491.22890; found 491.22872.

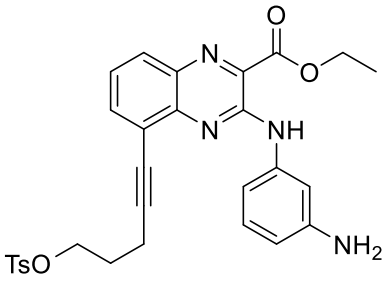
8. Ethyl 3-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)amino)-5-(5-(tosyloxy)pent-1-yn-1-yl)quinoxaline-2-carboxylate (**31**)



Chemical Formula: $C_{34}H_{36}N_4O_7S$
Molecular Weight: 644,74

In a round bottom flask were added compound **30** (75 mg, 0.15 mmol), triethylamine (63 µl, 0.45 mmol), and 4-dimethylaminopyridine (1.1 mg, 9.00 µmol) in anhydrous dichloromethane (5 mL) at 0 °C. After 10 minutes of stirring, tosyl chloride (116 mg, 0.61 mmol) was added at 0 °C and the reaction mixture was stirred magnetically at 30 °C for 16 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–50%) as eluent to give compound **31** as a yellow solid (85 mg, 87%), m.p. 155 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.21 (s, 1H), 9.39 (s, 1H), 8.41 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.96 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 1H), 7.75 (m, 3H), 7.60 (s, 1H), 7.53-7.47 (m, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.22 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.51 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.16 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.63 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.26 (s, 3H), 1.94 (m, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.5, 152.8, 148.1, 144.7, 142.7, 139.9, 139.4, 135.6, 135.3, 132.6, 132.1, 130.0 (2 × C), 129.0, 127.6 (2 × C), 125.7, 120.0, 113.3, 94.4, 79.1, 78.4, 69.4, 62.4, 28.1 (3 × C), 27.6, 20.9, 20.8, 15.4, 14.0.

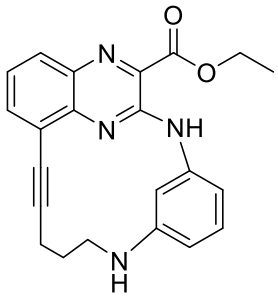
9. Ethyl 3-((3-aminophenyl)amino)-5-(5-(tosyloxy)pent-1-yn-1-yl)quinoxaline-2-carboxylate (**32**)



Chemical Formula: $C_{29}H_{28}N_4O_5S$
Molecular Weight: 544,63

To a solution of compound **31** (85 mg, 0.13 mmol) in dichloromethane (DCM) (6 mL) was added dropwise trifluoroacetic acid (0.9 mL) at 0 °C. The resulting mixture was stirred magnetically at room temperature for 3 h. A solution of sodium hydroxide (1M) was added until pH 14. The resulting solution was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to give the compound **32** as a red oil (72 mg, 100%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.06 (s, 1H), 7.93 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 7.75 (m, 4H), 7.50-7.44 (m, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.00 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.34 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 5.05 (s, 2H), 4.49 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.17 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.63 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.26 (s, 3H), 1.98 – 1.92 (m, 2H), 1.42 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.5, 152.6, 148.3, 148.1, 144.8, 139.9, 135.6, 132.1, 130.1 (2 × C), 129.5, 128.0, 127.6 (2 × C), 125.5, 120.0, 94.4, 78.4, 77.9, 69.5, 66.4, 62.4, 54.9, 30.7, 27.6, 21.0, 20.8, 15.4, 14.0. [M+H]+ calcd for $C_{29}H_{29}N_4O_5S$, 545.18532; found 545.18555.

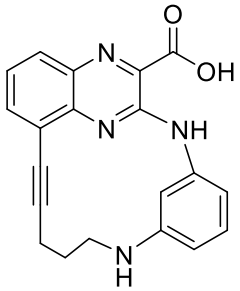
10. Ethyl 7, 13, 16, 22-tetraazatetracyclo[12.6.2.1^{8,12}.0^{17,21}]tricosa-1(20), 8(23), 9, 11, 14, 16, 18, 21-octaen-2-yne-15-carboxylate (**33**)



Chemical Formula: $C_{22}H_{20}N_4O_2$
Molecular Weight: 372,43

To a round bottom flask was added compound **32** (48 mg, 88 µmol) and triethylamine (12 µl, 86 µmol) in a solution of ethanol/ethyl acetate (90/10) (70 mL). The reaction mixture was refluxed and stirred magnetically for 16 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–20%) as eluent to give compound **33** as a red powder (26.6 mg, 81%), m.p 180 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.27 (s, 1H), 8.86 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.91 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 7.82 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 7.47 (dd, *J* = 8.3, 7.3 Hz, 1H), 6.98 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.24 (m, 2H), 5.99 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.48 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.41-3.34 (m, 2H), 2.53 (m, 2H), 1.87-1.73 (m, 2H), 1.41 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.6, 149.4, 148.3, 143.0, 140.9, 135.1, 134.9, 132.3, 129.4, 128.9, 125.5, 120.3, 108.9, 105.9, 99.2, 96.7, 77.9, 62.4, 41.1, 28.4, 16.4, 14.0. [M+H]+ calcd for $C_{22}H_{21}N_4O_2$, 373.16590; found 373.16520.

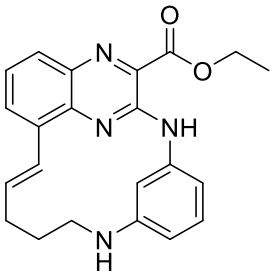
11. 7, 13, 16, 22-tetraazatetracyclo[12.6.2.1^{8,12}.0^{17,21}]tricosa-1(20), 8(23), 9, 11, 14, 16, 18, 21-octaen-2-yne-15-carboxylique acid (**34**)



Chemical Formula: $C_{20}H_{16}N_4O_2$
Molecular Weight: 344,37

To ester **33** (11 mg, 30 µmol) in aqueous methanol (80%, 2 mL), potassium carbonate (4.1 mg, 30 µmol) was added and the reaction mixture was stirred magnetically at room temperature for 1 h. The resulting mixture was evaporated, redissolved in ethyl acetate, and was acidified until pH 1 with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution, and then extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to give the compound **34** as a red solid (10 mg, 100%), m.p. 188 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 13.25 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.95 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.14 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.92 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 2.52-2.50 (m, 2H), 1.78 (m, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 167.7, 149.84, 149.8, 142.8, 142.0, 141.4, 136.0, 133.5, 129.6, 124.9, 120.0, 108.8, 106.6, 99.6, 96.9, 78.9, 41.7, 28.8, 16.8. [M+H]+ calcd for $C_{20}H_{17}N_4O_2$, 345.13460; found 345.13408.

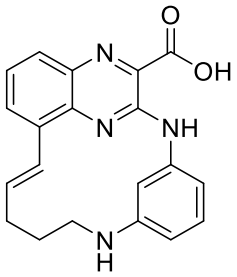
12.Ethyl (E)-2,4-diaza-1(2,8)-quinoxalina-3(1,3)-benzenacyclononaphan-8-ene-1[3]-carboxylate (**35a**)



Chemical Formula: $C_{22}H_{22}N_4O_2$
Molecular Weight: 374,44

The macrocycle **33** (10 mg, 27 µmol) in acetone (10 mL) and ethyl acetate (20 mL) was connected to the sample inlet line of the ThalesNano H-cube® flow hydrogenation reactor. "Full Hydrogen" mode was selected using a 10% Pd/C catalyst cartridge. The solution was injected into the reactor at a rate of 1 mL.min^{-1} under a pressure of 3 bar at room temperature. The collected reaction mixture was evaporated to dryness and the residue was finally purified by semi-preparative HPLC (gradient A). The resulting mixture was evaporated, redissolved in ethyl acetate, neutralized with a 1 M sodium hydroxide aqueous solution, and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, and dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to give the compound **35a** as a red oil (2 mg, 20%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.03 (s, 1H), 8.70 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.83 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.50 (dd, *J* = 8.3, 7.3 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 6.97 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.64 (dt, *J* = 16.4, 5.9 Hz, 1H), 6.30-6.19 (m, 2H), 5.92 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.49 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.20 (m, 2H), 2.27 (m, 2H), 1.82 (m, 2H), 1.42 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 165.6, 149.2, 147.6, 140.8, 139.7, 135.6, 134.8, 133.9, 131.4, 129.6, 129.0, 127.8, 125.8, 125.6, 109.0, 105.9, 99.9, 62.3, 40.4, 28.4, 26.5, 14.01. [M+H]+ calcd for $C_{22}H_{23}N_4O_2$, 375.18155; found 375.18086.

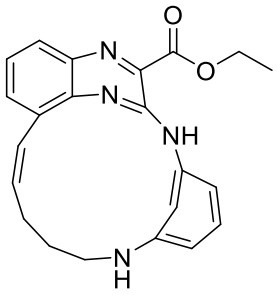
13. (E)-2,4-diaza-1(2,8)-quinoxalina-3(1,3)-benzenacyclononaphan-8-ene-1^{3}-carboxylic acid (**36a**)



Chemical Formula: $C_{20}H_{18}N_4O_2$
Molecular Weight: 346,39

To ester **35a** (3 mg, 8.01 µmol) in aqueous DMSO (80%, 2 mL), sodium hydroxide (0.32 mg, 8.00 µmol) was added and the reaction mixture was stirred magnetically at room temperature for 15 min. The resulting mixture was evaporated, redissolved in ethyl acetate and was acidified until pH 1 with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution, and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to give the compound **36a** as a yellow solid (2.8 mg, 100%), m.p 192 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.03 (s, 1H), 7.35-7.10 (m, 3H), 7.02 – 6.60 (m, 3H), 6.02 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.98-5.80 (m, 1H), 3.18-3.12 (m, 2H), 2.24-2.14 (m, 2H), 1.85-1.73 (m, 2H) (NH and COOH are missing). [M+H]+ calcd for $C_{20}H_{19}N_4O_2$, 347.15025; found 347.14969. The ^{13}C NMR spectrum was not exploitable because of the small amount of compound **36a** obtained, this compound must be resynthesized to complete all the analyses.

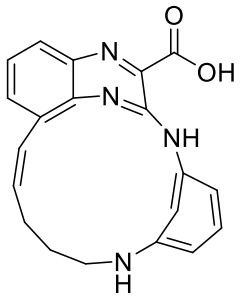
14.Ethyl (Z)-2,4-diaza-1(2,8)-quinoxalina-3(1,3)-benzenacyclononaphan-8-ene-1[3]-carboxylate (**35b**)



Chemical Formula: $C_{22}H_{22}N_4O_2$
Molecular Weight: 374,44

The macrocycle **33** (10 mg, 27 µmol) in acetone (10 mL) and ethyl acetate (20 mL) was connected to the sample inlet line of the ThalesNano H-cube® flow hydrogenation reactor. "Full Hydrogen" mode was selected using a 10% Pd/C catalyst cartridge. The solution was injected into the reactor at a rate of 1 mL.min^{-1} under a pressure of 3 bar at room temperature. The collected reaction mixture was evaporated to dryness and the residue was finally purified by semi-preparative HPLC (gradient A). The resulting mixture was evaporated, redissolved in ethyl acetate, neutralized with a 1 M sodium hydroxide aqueous solution, and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, and dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to give the compound **35b** as red oil (1 mg, 10%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 9.84 (s, 1H), 7.94-7.88 (m, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.60-7.50 (m, 2H), 6.96 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 6.25 (td, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 2H), 5.96 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 5.92 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.48 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.20-3.15 (m, 2H), 2.24-2.19 (m, 2H), 1.69-1.60 (m, 2H), 1.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). The ^{13}C NMR spectrum was not exploitable because of the small amount of compound **35b** obtained. This compound must be resynthesized to complete all the analyses.

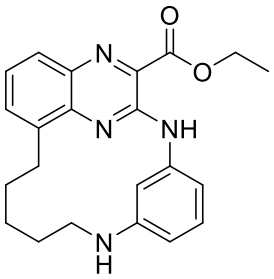
15.(Z)-2,4-diaza-1(2,8)-quinoxalina-3(1,3)-benzenacyclononaphan-8-ene-1^{3}-carboxylic acid (**36b**)



Chemical Formula: $C_{20}H_{18}N_4O_2$
Molecular Weight: 346,39

To ester **35b** (3 mg, 8.01 µmol) in aqueous DMSO (80%, 2 mL), sodium hydroxide (0.32 mg, 8.00 µmol) was added and the reaction mixture was stirred magnetically at room temperature for 15 min. The resulting mixture was evaporated, redissolved in ethyl acetate and was acidified until pH 1 with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution, and then extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to give the compound **36b** as yellow solid (2.8 mg, 100%), m.p. 190 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.61 (s, 1H), 7.17 (bs, 1H), 6.82 (bs, 1H), 6.69 (m, 2H), 6.20 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 5.94 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.82 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 5.55-5.41 (m, 1H), 3.06-2.96 (m, 2H), 2.31-2.19 (m, 2H), 1.71-1.59 (m, 2H). [M+H]+ calcd for $C_{20}H_{19}N_4O_2$, 347.15025; found 347.14959. The ^{13}C NMR spectrum was not exploitable because of the small amount of compound **36b** obtained. This compound must be resynthesized to complete all the analyses.

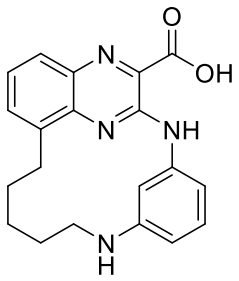
16.Ethyl 2,4-diaza-1(2,8)-quinoxalina-3(1,3)-benzenacyclononaphane-1^3-carboxylate (**35c**)



Chemical Formula: $C_{22}H_{24}N_4O_2$
Molecular Weight: 376,46

The macrocycle **33** (26 mg, 70 µmol) in acetone (20 mL) and ethyl acetate (30 mL) was connected to the sample inlet line of the ThalesNano H-cube® flow hydrogenation reactor. "Full Hydrogen" mode was selected using a 10% Pd/C catalyst cartridge. The solution was injected into the reactor at a rate of 1 $mL.min^{-1}$ under a pressure of 3 bar at room temperature. The collected reaction mixture was evaporated to dryness, and the residue was finally purified by semi-preparative HPLC (gradient A). The resulting mixture was evaporated, redissolved in ethyl acetate, neutralized with a 1 M sodium hydroxide aqueous solution, and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, and dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to give the compound **35c** as a red oil (15 mg, 57%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.03 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.81 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 7.46 (dd, *J* = 8.3, 7.1 Hz, 1H), 7.00 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.30 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 6.24 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 5.97 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.48 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.05 (m, 4H), 1.82-1.67 (m, 4H), 1.59-1.44 (m, 2H), 1.41 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.7, 149.2, 147.5, 140.3, 140.2, 138.6, 135.6, 132.6, 131.8, 129.0, 127.6, 125.8, 109.3, 106.3, 99.2, 62.3, 41.1, 30.4, 29.2, 25.8, 25.3, 14.1. [M+H]+ calcd for $C_{22}H_{25}N_4O_2$, 377.19720; found 377.19657.

17.2,4-diaza-1(2,8)-quinoxalina-3(1,3)-benzenacyclononaphane-1^3-carboxylic acid (**36c**)

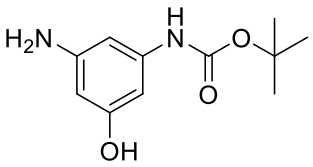


Chemical Formula: $C_{20}H_{20}N_4O_2$
Molecular Weight: 348,41

To ester **35c** (15 mg, 40 µmol) in aqueous DMSO (80%, 4 mL), sodium hydroxide (1.6 mg, 40 µmol) was added and the reaction mixture was stirred magnetically at room temperature for 15 min. The resulting mixture was evaporated, redissolved in ethyl acetate and was acidified until pH 1 with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution, and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to give the compound **36c** as a yellow solid (14 mg, 100%), m.p. 200 °C ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 8.13 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.81 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.48 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.30 (dd, *J* = 8.0, 7.1 Hz, 1H), 6.95 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.21 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 6.14-6.10 (m, 1H), 3.09 – 2.90 (m, 4H), 1.84 – 1.69 (m, 4H), 1.55-1.48 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 166.6, 149.3, 148.9, 141.6, 141.2, 139.3, 137.7, 135.9, 130.0, 128.8, 127.3, 123.8, 108.0, 105.8, 98.7, 41.7, 30.8, 29.1, 25.8, 25.4. [M+H]+ calcd for $C_{20}H_{21}N_4O_2$, 349.16590 ; found 349.16529.

C. Phenol series

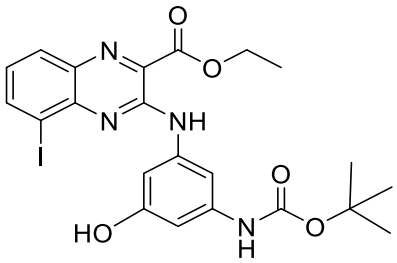
1. *Tert*-butyl (3-amino-5-hydroxyphenyl)carbamate (**37**)



Chemical Formula: $C_{11}H_{16}N_2O_3$
Molecular Weight: 224,26

Into a dry round bottom flask, were added 3,5-diaminophenol (380 mg, 3.06 mmol) and guanidinium chloride (34.5 mg, 0.36 mmol) in absolute ethanol (30 mL) at 0 °C. Di-*tert*-butyle dicarbonate (534 mg, 2.45 mmol) was then added at 0 °C and the solution was magnetically stirred at 60 °C for 1 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using dichloromethane with methanol gradient (0–5%) as eluent to give intermediate **37** (300 mg, 54%) as a white moss. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 8.85 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 6.22 (s, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.63 (s, 1H), 4.81 (s, 2H), 1.44 (s, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 158.0, 152.6, 149.6, 140.6, 95.8, 95.6, 94.4, 78.4, 28.2 (3 × C).

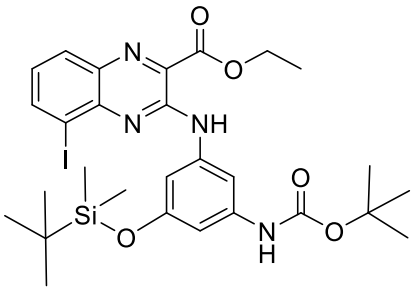
2. Ethyl 3-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-hydroxyphenyl)amino)-5-iodoquinoxaline-2-carboxylate (**38**)



Chemical Formula: $C_{22}H_{23}IN_4O_5$
Molecular Weight: 550,35

To a solution of *tert*-butyl (3-amino-5-hydroxyphenyl)carbamate **37** (90 mg, 0.40 mmol) and *N*,*N*'-diisopropylethylamine (DIPEA) (69 µl, 0.40 mmol) in dry THF (3 mL), was added dropwise compound **12** (145 mg, 0.40 mmol) dissolved in dry THF (1 mL). The resulting mixture was refluxed and stirred magnetically for 3 days. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–50 %) as eluent to give intermediate **38** (132 mg, 60%) as a red oil. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.27 (s, 1H), 9.25 (s, 2H), 8.38 (dd, *J* = 8.2, 1.2 Hz, 1H), 8.01 (dd, *J* = 8.2, 1.2 Hz, 1H), 7.96 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.34 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.12 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.70 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 4.50 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.42 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.2, 158.1, 152.7, 148.7, 142.3, 142.2, 140.3, 139.7, 135.2, 133.2, 130.2, 127.4, 102.3, 100.9, 100.8, 98.4, 79.0, 62.5, 28.2 (3 × C), 14.0. [M+H]+ calcd for $C_{22}H_{24}IN_4O_5$, 551.07859; found 551.07880.

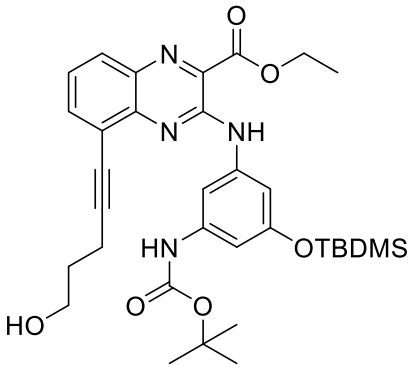
3. Ethyl 3-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)amino)-5-iodoquinoxaline-2-carboxylate (**39**)



Chemical Formula: $C_{28}H_{37}IN_4O_5Si$
Molecular Weight: 664,62

To a solution of *Tert*-butyldimethylsilyl chloride (73 mg, 0.48 mmol) in dichloromethane (4 mL) put 0 °C were added 4-diméthylaminopyridine (1.6 mg, 13 µmol), and triethylamine (0.1 mL, 0.72 mmol). The solution was stirred at 0 °C for 10 min. Compound **38** (133 mg, 0.24 mmol) in DCM (4 mL) was then added to the solution at 0 °C. After 10 min of stirring the solution was stirred at room temperature for 24 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–20 %) as eluent to give intermediate **39** (128 mg, 79%) as an orange powder, m.p. 180 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.36 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 8.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.37 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 4.50 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.42 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.97 (s, 9H), 0.22 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.2, 156.0, 152.7, 148.7, 142.3, 142.0, 140.4, 139.9, 135.5, 133.4, 130.4, 127.6, 106.3, 104.4, 102.4, 97.6, 79.2, 62.6, 30.7, 28.1 (3 × C), 25.7 (3 × C), 17.9, -4.38 (2 × C). [M+H]+ calcd for $C_{28}H_{38}IN_4O_5Si$, 665.16507; found 665.16516.

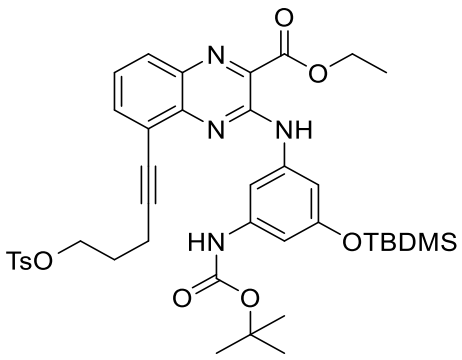
4. Ethyl 3-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)amino)-5-(5-hydroxypent-1-yn-1-yl)quinoxaline-2-carboxylate (**40**)



Chemical Formula: $C_{33}H_{44}N_4O_6Si$
Molecular Weight: 620,82

Into a sealed tube were introduced bis(triphenylphosphine)palladium (II) dichloride ($PdCl_2(PPh_3)_2$) (14 mg, 20 µmol), CuI (1.7 mg, 8.93 µmol), triethylamine (80 µl, 0.57 mmol) and pent-4-yn-1-ol (48 mg, 0.57 mmol) in dry THF (2 mL), under an argon atmosphere. Then, compound **39** (128 mg, 0.19 mmol) dissolved in 3 mL of THF was added, and the reaction mixture was refluxed and stirred magnetically for 16 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–60%) as eluent to give compound **40** as a yellow solid (95 mg, 79%), m.p. 182 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.09 (s, 1H), 9.28 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.49 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.39 (s, 2H), 6.77 (s, 1H), 4.52-4.44 (m, 2H), 3.51 (m, 2H), 2.60 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.78-1.66 (m, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.94 (s, 9H), 0.21 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.5, 155.9, 152.7, 148.0, 142.6, 140.4, 139.9, 135.8, 135.5, 132.8, 129.3, 125.7, 120.6, 105.6, 105.0, 103.3, 96.3, 79.1, 77.5, 62.4, 59.5, 31.6, 28.1 (3 × C), 25.7 (3 × C), 18.3, 15.9, 14.0, -4.2 (2 × C).

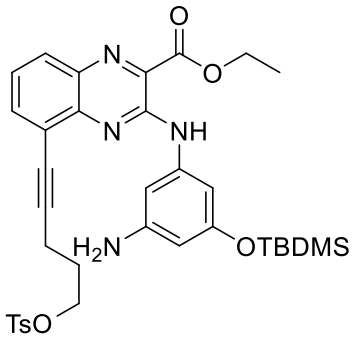
5. Ethyl 3-((3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)amino)-5-(5-(tosyloxy)pent-1-yn-1-yl)quinoxaline-2-carboxylate (**41**)



Chemical Formula: $C_{40}H_{50}N_4O_8SSi$
Molecular Weight: 775,01

In a round bottom flask were added compound **40** (95 mg, 0.15 mmol), triethylamine (63 µl, 0.45 mmol), and 4-dimethylaminopyridine (1.0 mg, 8.19 µmol) in anhydrous dichloromethane (8 mL) at 0 °C. After 10 minutes of stirring, tosyl chloride (117 mg, 0.61 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred magnetically at 30 °C for 16 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–30%) as eluent to give compound **41** as a yellow solid (100 mg, 87%). m.p 184 °C : ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.02 (s, 1H), 9.30 (s, 1H), 7.94 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.73 (dd, *J* = 6.0, 1.2 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.51-7,47 (m, 2H), 7.37 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 6.76 (s, 1H), 4.49 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.08 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.57 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.22 (s, 3H), 1.87 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.42 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.91 (s, 9H), 0.18 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.4, 155.8, 152.7, 148.0, 144.6, 142.5, 140.4, 139.9, 135.7, 135.4, 132.9, 132.1, 130.0 (2 × C), 129.5, 127.5 (2 × C), 125.7, 120.1, 105.7, 105.0, 103.4, 94.0, 79.2, 78.6, 69.2, 62.4, 28.1 (3 × C), 27.2, 25.7 (3 × C), 20.9, 18.2, 15.5, 14.0, -4.3 (2 × C). [M+H]+ calcd for $C_{40}H_{51}N_4O_8SSi$, 775.31914; found 775.31932.

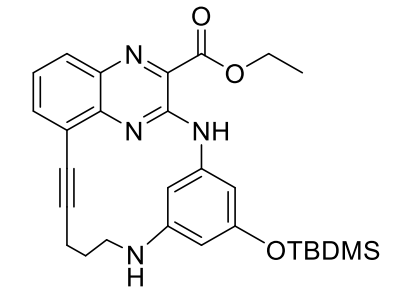
6. Ethyl 3-((3-amino-5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)amino)-5-(5-(tosyloxy)pent-1-yn-1-yl)quinoxaline-2-carboxylate (**42**)



Chemical Formula: $C_{35}H_{42}N_4O_6SSi$
Molecular Weight: 674,89

To a solution of compound **41** (100 mg, 0.13 mmol) in dichloromethane (DCM) (4 mL) was added dropwise trifluoroacetic acid (0.6 mL) at 0 °C. The resulting mixture was stirred magnetically at room temperature for 3 h. A solution of sodium hydroxide (1M) was then added until pH 14. The resulting solution was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to give the compound **42** as a red oil (76 mg, 85%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 9.89 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.72-7,69 (m, 3H), 7.47 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 5.01 (s, 2H), 4.48 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.12 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.64-2.57 (m, 2H), 2.23 (s, 3H), 1.93-1.88 (m, 2H), 1.41 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.93 (s, 9H), 0.16 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.5, 156.2, 149.9, 148.1, 142.8, 142.4, 141.4, 140.1, 135.7, 135.3, 132.6, 129.7 (2 × C), 129.5, 125.4, 124.9 (2 × C), 120.2, 101.3, 100.0, 99.6, 94.9, 78.3, 63.3, 62.4, 28.4, 25.7 (3 × C), 20.9, 18.1, 15.9, 14.0, -4.3 (2 × C).

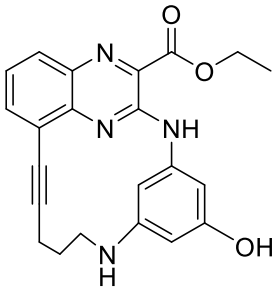
7. Ethyl 10-(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy-7, 13, 16, 22-tetraazatetracyclo[12.6.2.1^{18,12}.0^{17,21}]tricosa-1(20), 8(23), 9, 11, 14, 16, 18, 21-octaen-2-yne-15-carboxylate **43**



Chemical Formula: $C_{28}H_{34}N_4O_3Si$
Molecular Weight: 502,69

Into a round bottom flask, was added compound **42** (74 mg, 0.11 mmol) and triethylamine (15 µl, 0.11 mmol) in ethanol/ethyl acetate (90/10) (80 mL). The reaction mixture was refluxed and stirred magnetically for 16 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–20%) as eluent to give compound **43** as a red oil (46 mg, 84%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.13 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.47 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.00 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.74 (s, 1H), 4.47 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.50 (m, 4H), 1.88-1.71 (m, 2H), 1.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 0.96 (s, 9H), 0.20 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.5, 155.7, 150.6, 148.2, 142.9, 141.5, 135.1, 134.9, 132.5, 129.4, 125.5, 120.3, 100.1, 98.0, 96.7, 93.7, 77.8, 62.4, 41.2, 28.6, 25.6 (3 × C), 17.9, 16.3, 14.0, -4.4 (2 × C). [M+H]+ calcd for$C_{28}H_{35}N_4O_3Si$, 503.24729; found 503.24517.

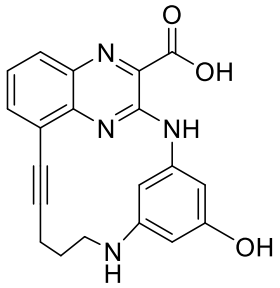
8. Ethyl 10 - hydroxy - 7, 13, 16, 22-tetraazatetracyclo[12.6.2.1^{18,12}.0^{17,21}]tricosa-1(20), 8(23), 9, 11, 14, 16, 18, 21-octaen-2-yne-15-carboxylate **44**



Chemical Formula: $C_{22}H_{20}N_4O_3$
Molecular Weight: 388,43

To a solution of compound **43** (10 mg, 20 µmol,) in tetrahydrofuran (THF) (2 mL) at 0 °C, was added dropwise a tetrabutylammonium fluoride solution (1.0 M in THF, 72 µL). The resulting mixture was stirred magnetically at room temperature for 1 h 30. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–40%) as eluent to give compound **44** as a red oil (5.2 mg, 65%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.12 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.41 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.47 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.89 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.76 (s, 1H), 5.70 (s, 1H), 4.48 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.50 (m, 4H), 1.84-1.74 (m, 2H), 1.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.6, 157.9, 150.5, 148.3, 143.1, 141.4, 135.0, 134.9, 132.3, 129.4, 125.5, 120.3, 96.8, 95.9, 93.9, 91.9, 77.8, 62.4, 41.3, 28.6, 16.4, 14.0. [M+H]+ calcd for $C_{22}H_{21}N_4O_3$, 389.16082; found 389.15915.

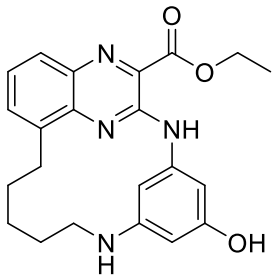
9. 10 - hydroxy - 7, 13, 16, 22-tetraazatetracyclo[12.6.2.1^{18,12}.0^{17,21}]tricosa-1(20), 8(23), 9, 11, 14, 16, 18, 21-octaen-2-yne-15-carboxylic acid **45**



Chemical Formula: $C_{20}H_{16}N_4O_3$
Molecular Weight: 360,37

To ester **44** (6.2 mg, 16 µmol) in aqueous methanol (80%, 2 mL), potassium carbonate (2.2 mg, 16 µmol) was added and the reaction mixture was stirred magnetically at room temperature for 1 h. The resulting mixture was evaporated, redissolved in ethyl acetate and was acidified until pH 1 with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution, and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to give the compound **45** as a red oil (5.8 mg, 100%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 10.67 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.80 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.74 (s, 1H), 5.68 (s, 1H), 2.50 (m, 4H), 1.85 – 1.72 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 157.9, 150.5, 149.1, 143.3, 141.5, 134.1, 129.6, 125.2, 120.2, 96.7, 95.7, 93.8, 91.9, 77.9, 41.3, 28.7, 16.4. (Signals of the CO and of 2 aromatics C are missing). [M+H]+ calcd for $C_{20}H_{17}N_4O_3$, 361.12952; found 361.12784. The ^{13}C NMR spectrum was not completely exploitable. Compound **45** must be resynthesized to complete all the analyses.

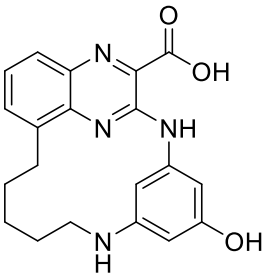
10.Ethyl 3^5-hydroxy-2,4-diaza-1(2,8)-quinoxalina-3(1,3)-benzena-cyclononaphane-1^3-carboxylate (**46**)



Chemical Formula: $C_{22}H_{24}N_4O_3$
Molecular Weight: 392,46

The macrocycle **44** (10 mg, 26 µmol) was dissolved in ethanol (15 mL) and ethyl acetate (5 mL) and was connected to the sample inlet line of the ThalesNano H-cube® flow hydrogenation reactor. "Full Hydrogen" mode was selected using a 10% Pd/C catalyst cartridge. The solution was injected into the reactor at a rate of 1 mL.min^{-1} under a pressure of 3 bar at room temperature. The collected reaction mixture was evaporated to dryness and the residue was finally purified by semi-preparative HPLC (gradient A). The resulting mixture was evaporated, redissolved in ethyl acetate, neutralized with a 1 M sodium hydroxide aqueous solution, and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, and dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to give the compound **46** as red solid (6.5 mg, 65%), m.p. 197 °C ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 9.90 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 7.79 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.47-7.40 (m, 1H), 5.85 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 5.77 (s, 1H), 5.72 (s, 1H), 4.47 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.03- 2,97 (m, 4H), 1.74-1,70 (m, 4H), 1.52-1,48 (m, 2H), 1.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.7, 158.0, 150.2, 147.6, 140.6, 140.6, 138.7, 135.5, 132.5, 131.7, 127.5, 125.7, 96.0, 94.5, 91.7, 62.2, 41.4, 30.5, 29.1, 26.0, 25.3, 14.0. [M+H]+ calcd for $C_{22}H_{25}N_4O_3$, 393.19212; found 393.19007.

11.3^{5}-hydroxy-2,4-diaza-1(2,8)-quinoxalina-3(1,3)-benzenacyclononaphane-1^{3}-carboxylic acid (**47**)



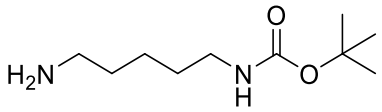
Chemical Formula: $C_{20}H_{20}N_4O_3$
Molecular Weight: 364,41

To a solution of ester **46** (6.4 mg, 16 µmol) in DMSO (0.5 mL) was added sodium hydroxide (0.64 mg, 16 µmol) dissolved in 0.2 mL of water. The reaction mixture was stirred magnetically at room temperature for 15 min. The resulting mixture was evaporated, redissolved in ethyl acetate and was acidified until pH 1 with a 1 M hydrochloric acid aqueous solution, and then extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to give the compound **47** as a red solid (6.0 mg, 100%), m.p. 201 °C degradation. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 8.89 (s, 1), 8.30 (bs, 1H), 7.56 (bs, 2H), 7.37 (bs, 1H), 5.73 (s, 1H), 5.68 (s, 1H), 2.98 (m, 4H), 1.72 (m, 4H), 1.47 (m, 2H) (Signals of COOH and NH are missing). [M+H]+ calcd for $C_{21}H_{21}N_4O_3$, 365.16082; found 365.15914. The ^{13}C NMR spectrum was not exploitable. Compound **47** must be resynthesized to complete all the analyses.

IV. Approach 2

A. Macrocycle 55

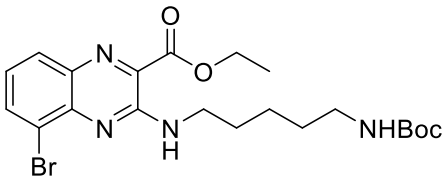
1. *tert*-butyl (5-aminopentyl)carbamate (**48**)



Chemical Formula: $C_{10}H_{22}N_2O_2$
Molecular Weight: 202,30

Into a round bottom flask containing pentane-1,5-diamine (250 mg, 2.45 mmol) in chloroform (2 mL) at 0 °C, was added dropwise a solution of Boc_2O (100 mg, 0.46 mmol) in chloroform (2 mL). The solution was then stirred at rt for 24 h. An aqueous solution of $NaHCO_3$ (5 %) was then slowly added. The organic layer was then washed with $NaHCO_3$ (1M) and brine, dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under reduce pressure to give compound **48** as a colorless oil (84 mg, 89%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 6.75 (s, 1H), 3.33 (bs, 2H), 2.88 (dd, *J* = 12.9, 6.8 Hz, 2H), 2.50 (m, 2H), 1.45 – 1.07 (m, 15H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 155.6, 77.3, 41.6, 39.5, 33.1, 29.4, 28.3 (3 x C), 23.7.

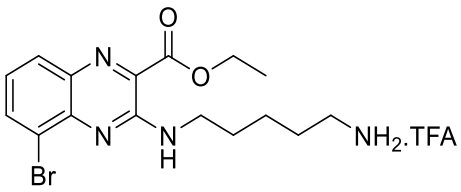
2. Ethyl 5-bromo-3-((5-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)pentyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**49**)



Chemical Formula: $C_{21}H_{29}BrN_4O_4$
Molecular Weight: 481,39

Into a round bottom flask were added ethyl 5-bromo-3-chloroquinoxaline-2-carboxylate **11** (20 mg, 63 µmol) and *tert*-butyl (5-aminopentyl)carbamate **48** (19 mg, 94 µmol) in dry THF (2 mL). Then, CuI (1.5 mg, 7.88 µmol) and Cs_2CO_3 (26 mg, 80 µmol) were added and the reaction mixture was refluxed for 6 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–70%) as eluent to give the compound **49** as a yellow oil (27 mg, 88%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 8.14 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.04 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 7.90 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 7.37-7.28 (m, 1H), 6.76 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 4.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.59-3.55 (m, 2H), 2.94-2.89 (m, 2H), 1.75-1.62 (m, 2H), 1.47-1.41 (m, 2H), 1.39-1.33 (m, 14H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 164.9, 155.6, 151.3, 140.7, 135.4, 135.2, 132.4, 129.5, 124.9, 119.5, 77.3, 62.1, 40.5, 40.3, 29.3, 28.3 (3 x C), 27.7, 23.9, 14.0.

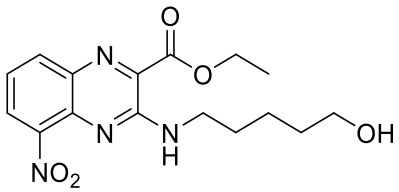
3. 5-((8-bromo-3-(ethoxycarbonyl)quinoxalin-2-yl)amino)pentan-1-aminium (**50**)



Chemical Formula: $C_{18}H_{21}BrF_3N_4O_3$
Molecular Weight: 478,29

Into a round bottom flask containing compound **49** (118 mg, 0.25 mmol) in dichloromethane (DCM) (4 mL) was added dropwise trifluoroacetic acid (0.4 mL) at 0 °C. The resulting mixture was stirred magnetically at room temperature for 3 h and evaporated under reduced pressure to give compound **50** as a yellowish oil (121 mg, 100%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 8.17 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.06 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 7.91 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 7.66 (s, 3H), 7.34 (dd, *J* = 8.3, 7.7 Hz, 1H), 4.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.61-3.55 (m, 2H), 2.87-2.74 (m, 2H), 1.78-1.67 (m, 2H), 1.62-1.58 (m, 2H), 1.43-1.38 (m, 5H).

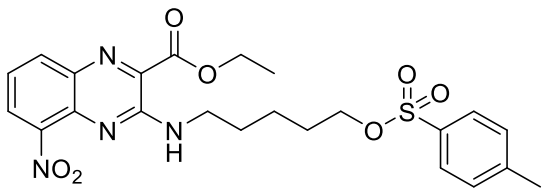
4. Ethyl 3-((5-hydroxypentyl)amino)-5-nitroquinoxaline-2-carboxylate (**51**)



Chemical Formula: $C_{16}H_{20}N_4O_5$
Molecular Weight: 348,36

Into a round bottom flask containing compound **14** (25 mg, 89 µmol) in EtOH (2 mL) was added 5-aminopentan-1-ol (9.2 mg, 89 µmol). The solution was refluxed and stirred magnetically for 3 days. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–50%) as eluent to give the compound **51** as a yellow oil (21 mg, 68%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 8.33 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.23 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H), 8.16 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H), 7.53-7.46 (m, 1H), 4.44 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.34 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 3.48-3.43 (m, 2H), 3.41-3.37 (m, 2H), 1.69-1.58 (m, 2H), 1.49-1.44 (m, 2H), 1.41-1.33 (m, 5H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 164.6, 151.2, 144.2, 135.4, 134.9, 133.9, 133.8, 126.8, 122.6, 62.3, 60.6, 40.5, 32.2, 27.9, 23.1, 14.0. [M+H]+ calcd for $C_{16}H_{21}N_4O_5$, 349.15065; found 349.15034.

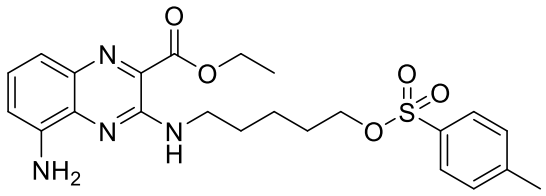
5. Ethyl 5-nitro-3-((5-(tosyloxy)pentyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**52**)



Chemical Formula: $C_{23}H_{26}N_4O_7S$
Molecular Weight: 502,54

Into a round bottom flask containing compound **51** (121 mg, 0.35 mmol) in anhydrous dichloromethane (10 mL) at ice bath temperature were added triethylamine (146 µl, 1.05 mmol) and 4-(dimethylamino)pyridine (2.3 mg ,19 µmol). Tosyl chloride (400 mg, 2.10 mmol) in DCM (2 mL) was then slowly added at 0 °C and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 10 min and then stirred at room temperature for 5 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–50%) as eluent to give the compound **52** as a yellow oil (170 mg, 97%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 8.30 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.24 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H), 8.17 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.54-7.46 (m, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 4.44 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.01 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.43-3.39 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.65-1.57 (m, 2H), 1.58-1.50 (m, 2H), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.34-1.25 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 164.5, 151.2, 144.8, 144.1, 135.3, 134.9, 133.9, 133.8, 132.5, 130.1 (2 x C), 127.5 (2 x C), 126.9, 122.7, 70.8, 62.3, 40.1, 27.8, 27.2, 22.2, 21.1, 14.0. [M+H]+ calcd for $C_{23}H_{27}N_4O_7S$, 503.15950; found 503.15933.

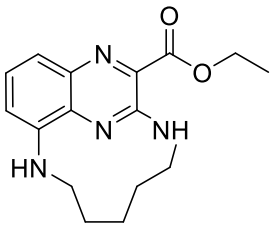
6. Ethyl 5-amino-3-((5-(tosyloxy)pentyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**53**)



Chemical Formula: $C_{23}H_{28}N_4O_5S$
Molecular Weight: 472,56

Into a round bottom flask containing compound **52** (170 mg, 0.34 mmol) in Ethanol/ Ethyl acetate (90/10) (120 mL), was added Pd/C (10 % wt.) under hydrogen flux. The solution was stirred at room temperature 16 h. The solvent was then removed under reduced pressure to give the compound **53** as a red oil (158 mg, 99%) which was used without purification because of its instability. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 7.76 (d, *J* = 8.4 Hz, 3H), 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.19-7.13 (m, 1H), 7.07 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 6.84 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 5.63 (s, 2H), 4.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.02 (m, 2H), 3.49 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.68-1.59 (m, 2H), 1.58-1.52 (m, 2H), 1.38-1.35 (m, 5H). [M+H]+ calcd for $C_{23}H_{29}N_4O_5S$, 473.18532; found 473.18571.

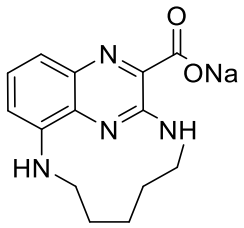
7. Ethyl 4,5,6,7,8,9-hexahydro-3H-13,2-(azenome-theno)benzo[d][1,3,6]triazacycloundecine-15-carboxylate (**54**)



Chemical Formula: $C_{16}H_{20}N_4O_2$
Molecular Weight: 300,36

Into a round bottom flask, compound **53** was introduced (15 mg, 32 µmol) in Ethanol/ Ethyl acetate (90/10) (50 mL) and the mixture was stirred at 78 °C for 24 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by semi-preparative HPLC (gradient A). The resulting mixture was evaporated, redissolved in ethyl acetate, neutralized with a 1 M sodium hydroxide aqueous solution, and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, and dried over $MgSO_4$, filtered, and evaporated under reduced pressure to give the compound **54** as a yellow oil (1.0 mg, 10%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 7.77 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H), 7.17-7.08 (m, 2H), 6.84 (dd, *J* = 6.5, 2.8 Hz, 1H), 6.13 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.39-3.34 (m, 2H), 3.26-3,23 (m, 2H), 2.28-2,12 (m, 2H), 1.75-1,69 (m, 2H), 1.49-1,43 (m, 2H), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.3, 147.8, 146.3, 136.4, 133.8, 130.0, 125.2, 116.7, 114.2, 61.5, 44.7, 29.4, 28.9, 24.5, 23.2, 14.1. [M+H]+ calcd for $C_{16}H_{21}N_4O_2$, 301.16590; found 301.16548.

8. Sodium 4,5,6,7,8,9-hexahydro-3*H*-13,2-(azenome-theno)benzo[*d*][1,3,6]triazacycloundecine-15-carboxylate salt (55)

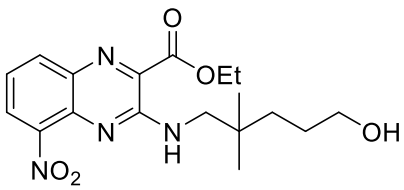


Chemical Formula: $C_{14}H_{15}N_4NaO_2$
Molecular Weight: 294,29

Into a round bottom flask containing ester **54** (1.0 mg, 3.33 µmol) in DMSO (0.5 mL) was added sodium hydroxide (0.14 mg, 3.50 µmol) dissolved in 0.1 mL of water. The reaction mixture was stirred magnetically at room temperature for 15 min. The resulting mixture was evaporated under reduced pressure to give the compound **55** as a yellow solid (1.0 mg, 100%). m.p > 350 °C. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 9.16 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.96 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.68 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.79 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.33-3.30 (m, 4H), 2.30-2,12 (m, 2H), 1.73-1.63 (m, 2H), 1.49-1.40 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 173.3, 167.1, 148.9, 146.1, 141.9, 137.1, 132.0, 123.0, 116.7, 112.3, 45.1, 29.6, 24.8, 23.5. [M+2H]+ calcd for $C_{14}H_{17}N_4O_2$, 273.13460; found 273.13416.

B. Macrocycle 60

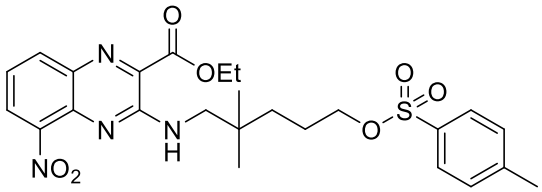
1. Ethyl 3-((5-hydroxy-2,2-dimethylpentyl)amino)-5-nitroquinoxaline-2-carboxylate (**56**)



Chemical Formula: $C_{18}H_{24}N_4O_5$
Molecular Weight: 376,41

To a solution of 5-amino-4,4-dimethylpentan-1-ol (53 mg, 0.40 mmol) in EtOH (7 mL) was added compound **14** (127 mg, 0.45 mmol). The resulting mixture was refluxed for 2 days. The solvent was then removed under reduced pressure, and the resulting residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–50%) as eluent to give compound **56** as a yellow oil (118 mg, 79%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 8.37 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 8.23 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 8.17 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.50 (dd, *J* = 8.4, 7.6 Hz, 1H), 4.45 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.36 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 3.44–3.33 (m, 4H), 1.47–1.36 (m, 5H), 1.32–1.25 (m, 2H), 0.92 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 164.9, 152.0, 144.1, 135.3, 135.0, 133.9, 133.3, 127.0, 122.7, 62.4, 61.5, 49.6, 36.0, 34.2, 27.1, 26.3, 25.0, 14.0. [M+H]+ calcd for $C_{18}H_{25}N_4O_5$, 377.18195; found 377.18153.

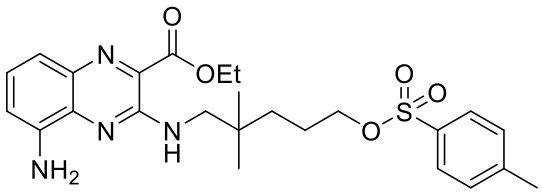
2. Ethyl 3-((2,2-dimethyl-5-(tosyloxy)pentyl)amino)-5-nitroquinoxaline-2-carboxylate (**57**)



Chemical Formula: $C_{25}H_{30}N_4O_7S$
Molecular Weight: 530,60

Into a round bottom flask was introduced compound **56** (120 mg, 0.32 mmol) in anhydrous DCM (5 mL) at ice bath temperature. Then, Et_3N (133 µL, 0.95 mmol), 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (2.1 mg, 17 µmol), and tosyl chloride (243 mg, 1.27 mmol) dissolved in 2 mL of DCM were slowly added. The mixture was stirred magnetically at 0 °C for 10 min, and at room temperature for 6 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the residue was finally purified by silica column chromatography using cyclohexane with ethyl acetate gradient (0–50%) as eluent to give the compound **57** as a yellow oil (150 mg, 88 %). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 8.32 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 8.24 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.17 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.51 (dd, J = 8.4,7.6 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.45 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.94 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.34 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.64–1.51 (m, 2H), 1.39 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.21–1.13 (m, 2H), 0.87 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.3, 152.3, 145.2, 144.5, 135.7, 135.5, 134.4, 133.8, 133.0, 130.5 (2 × C), 127.9 (2 × C), 127.5, 123.2, 72.1, 62.8, 49.4, 35.2, 34.7, 25.3 (2 × C), 23.6, 21.5, 14.5. [M+H]+ calcd for $C_{25}H_{31}N_4O_7S$, 531.19080; found 531.19045.

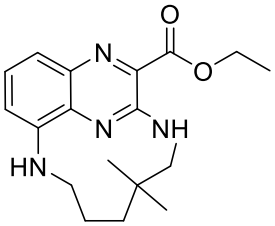
3. Ethyl 5-amino-3-((2,2-dimethyl-5-(tosyloxy)pentyl)amino)quinoxaline-2-carboxylate (**58**)



Chemical Formula: $C_{25}H_{32}N_4O_5S$
Molecular Weight: 500,61

A solution of compound **57** (114 mg, 0.22 mmol) in EtOH/ethyl acetate (9/1) (80 mL) was connected to the sample inlet line of the ThalesNano H-Cube® flow hydrogenation reactor. "Full Hydrogen" mode was selected using a 10% Pd/C catalyst cartridge. The solution was injected into the reactor at a rate of 1 $mL.min^{-1}$ under a pressure of 3 bar at room temperature. The collected reaction mixture was evaporated to dryness affording compound **58** (70 mg, 64 %) as a red oil. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 7.88 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.16 (dd, J = 8.4, 7.2 Hz, 1H), 7.08 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 6.84 (dd, J = 7.2, 1.2 Hz, 1H), 5.65 (s, 2H), 4.42 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.95 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.41 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.67–1.52 (m, 2H), 1.38 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.24–1.19 (m, 2H), 0.89 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.9, 150.4, 144.8, 137.6, 135.2, 132.8, 132.5, 130.2, 130.1 (2 × C), 128.0, 127.5 (2 × C), 125.5, 125.3, 71.8, 61.9, 49.2, 34.9, 34.1, 24.9 (2 × C), 23.3, 21.0, 14.1.

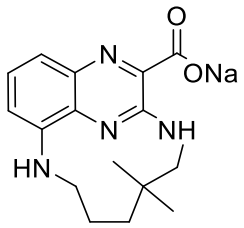
4. Ethyl 5,5-dimethyl-4,5,6,7,8,9-hexahydro-3*H*-13,2-(azenome-theno)benzo[*d*][1,3,6]triazacycloundecine-15-carboxylate (**59**)



Chemical Formula: $C_{18}H_{24}N_4O_2$
Molecular Weight: 328,42

A solution of compound **58** (25 mg, 50 µmol) in EtOH/ethyl acetate (9/1) (100 mL) was refluxed for 24 h. The solvent was then removed under reduced pressure, and the resulting mixture was neutralized with a 1 M sodium hydroxide aqueous solution and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, and dried over $MgSO_4$, filtered, evaporated under reduced pressure, and finally purified by semi-preparative HPLC to obtain derivative **59** as a red oil (5 mg, 31%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 7.69 (dd, *J* = 8.4, 5.2 Hz, 1H), 7.21 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.14 (dd, *J* = 8.4, 7.6 Hz, 1H), 6.92 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 5.92 (m, 1H), 4.41 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.81 (dd, *J* = 13.5, 5.2 Hz, 1H), 3.57 (m, 1H), 2.79 (dd, *J* = 13.5, 5.2 Hz, 1H), 2.42–2.25 (m, 2H), 1.85–1.72 (m, 1H), 1.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.34–1.26 (m, 2H), 0.97 (s, 3H), 0.83 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.5, 150.3, 148.4, 136.6, 135.0, 129.3, 125.0, 118.2, 116.0, 61.6, 51.6, 50.1, 41.6, 35.2, 29.2, 28.0, 25.0, 14.1. HRMS (ESI) m/z: [M+H]+ calcd for $C_{18}H_{25}N_4O_2$, 329.19775; found 329.19662.

5. 5,5-dimethyl-4,5,6,7,8,9-hexahydro-3H-13,2-(azenome-theno)benzo[d][1,3,6]triazacycloundecine-15-carboxylate salt (**60**)

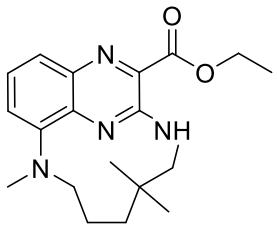


Chemical Formula: $C_{16}H_{19}N_4NaO_2$
Molecular Weight: 322,34

To ester **59** (2.6 mg, 7.92 µmol) in DMSO (0.5 mL), was added sodium hydroxide (0.32 mg, 8.00 µmol) dissolved in water (0.2 mL). The reaction mixture was stirred magnetically at room temperature for 15 mins. The resulting mixture was then evaporated under reduced pressure to give the compound **60** as a yellow oil (2.5 mg, 100%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 8.43-8.33 (bs, 1H), 8.09-7.84 (bs, 3H), 7.43 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.33 (under water, 2H), 2.91-2.76 (bs, 2H), 2.03-1.79 (bs, 2H), 1.39-1.30 (bs, 2H), 0.93 (s, 3H), 0.84 (s, 3H). [M+2H]+ calcd for $C_{16}H_{21}N_4O_2$, 301.16590; found 301.16550. The ^{13}C NMR spectrum was not exploitable because of the small amount of compound **60** obtained, this compound must be resynthesized to complete all the analyses.

C. Macrocycle 62

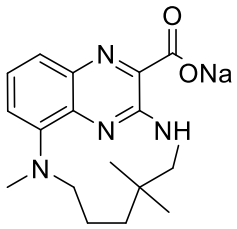
1. Ethyl 5,5,9-trimethyl-4,5,6,7,8,9-hexahydro-3*H*-13,2 (azenometheno)benzo[*d*][1,3,6]triazacycloundecine-15-carboxylate (**61**)



Chemical Formula: $C_{19}H_{26}N_4O_2$
Molecular Weight: 342,44

To a solution of compound **59** (8.5 mg, 26 µmol) in DMF (2 mL) was added methyl iodide (2.5 µL, 40 µmol). The resulting mixture was stirred magnetically at 40 °C for 6 days. The solvent was then removed under reduced pressure, and the resulting mixture was neutralized with a 1 M sodium hydroxide aqueous solution and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, and dried over $MgSO_4$, filtered, evaporated under reduced pressure, and finally purified by semi-preparative HPLC to obtain derivative **61** as a red solid (5.6 mg, 63%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 7.74 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.30–7.19 (m, 2H), 6.86 (dd, J = 6.8, 2.0 Hz, 1H), 4.42 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.84 (m, 1H), 3.45–3.25 (m, 2H), 2.90 (s, 3H), 2.80 (m, 1H), 2.43–2.33 (m, 1H), 2.05–1.87 (m, 1H), 1.41–1.28 (m, 5H), 0.97 (s, 3H), 0.85 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 165.9, 150.7, 149.5, 137.0, 136.7, 129.5, 125.5, 118.9, 113.3, 70.2, 62.1, 50.2, 40.6, 40.4, 40.2, 29.4, 29.2, 22.5, 14.6. HRMS (ESI) *m/z*: [M+H]+ calcd for $C_{19}H_{27}N_4O_2$, 343.21340; found 343.21246.

2. 5,5,9-trimethyl-4,5,6,7,8,9-hexahydro-3*H*-13,2-(azenome-theno)benzo[*d*][1,3,6]triazacycloundecine-15-carboxylate salt (**62**)



Chemical Formula: $C_{17}H_{21}N_4O_2^-$
Molecular Weight: 313,38

To compound **61** (2.1 mg, 6.13 µmol) in DMSO (0.5 mL) was added NaOH (0.25 mg, 6.25 µmol) dissolved in water (0.1 mL). The reaction mixture was stirred magnetically at room temperature for 1 h. Solvent was removed under reduced pressure to yield macrocycle **62** (2 mg, 97%) as a yellow oil. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ 7.28 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.09 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.73 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 3.78 (s, 1H), 2.87 (s, 3H), 2.5 (bs, 2H) 1.93 (s, 2H), 1.35-1.28 (bs, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.85 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d6*) δ 167.5, 151.3, 148.9, 139.7, 136.5, 134.9, 122.9, 118.7, 111.0, 49.7, 41.4, 40.4, 35,0, 28,9, 28.3, 27.2, 24.7. HRMS (ESI) *m/z*: [M+2H]+ calcd for $C_{17}H_{23}N_4O_2$, 315.18155; found 315.18114.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Hang Korng Ea; Lioté, F. LES COMMUNICATIONS INTERCELLULAIRES PAR LES VOIES DE SIGNALISATION; Université Denis-Diderot, Paris VII.

(2) Patterson, H.; Nibbs, R.; McInnes, I.; Siebert, S. Protein Kinase Inhibitors in the Treatment of Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Clin. Exp. Immunol.* **2014**, *176* (1), 1–10. https://doi.org/10.1111/cei.12248.

(3) Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* **2002**, *298* (5600), 1912–1934. https://doi.org/10.1126/science.1075762.

(4) Mary Photini, S.; Chaiwangyen, W.; Weber, M.; Al-Kawlani, B.; Favaro, R. R.; Jeschke, U.; Schleussner, E.; Morales-Prieto, D. M.; Markert, U. R. PIM Kinases 1, 2 and 3 in Intracellular LIF Signaling, Proliferation and Apoptosis in Trophoblastic Cells. *Exp. Cell Res.* **2017**, *359* (1), 275–283. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.07.019.

(5) Blanco-Aparicio, C.; Carnero, A. Pim Kinases in Cancer: Diagnostic, Prognostic and Treatment Opportunities. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85* (5), 629–643. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.09.018.

(6) Alvarado, Y.; Giles, F. J.; Swords, R. T. The PIM Kinases in Hematological Cancers. *Expert Rev. Hematol.* **2012**, *5* (1), 81–96. https://doi.org/10.1586/ehm.11.69.

(7) Swords, R.; Kelly, K.; Carew, J.; Nawrocki, S.; Mahalingam, D.; Sarantopoulos, J.; Bearss, D.; Giles, F. The Pim Kinases: New Targets for Drug Development. *Curr. Drug Targets* **2011**, *12* (14), 2059–2066. https://doi.org/10.2174/138945011798829447.

(8) Nawijn, M. C.; Alendar, A.; Berns, A. For Better or for Worse: The Role of Pim Oncogenes in Tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11* (1), 23–34. https://doi.org/10.1038/nrc2986.

(9) Vainchenker, W.; Constantinescu, S. N. JAK/STAT Signaling in Hematological Malignancies. *Oncogene* **2013**, *32* (21), 2601–2613. https://doi.org/10.1038/onc.2012.347.

(10) Narlik-Grassow, M.; Blanco-Aparicio, C.; Carnero, A. The PIM Family of Serine/Threonine Kinases in Cancer: THE PIM FAMILY. *Med. Res. Rev.* **2014**, *34* (1), 136–159. https://doi.org/10.1002/med.21284.

(11) Kennedy, V. E.; Smith, C. C. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 612880. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.612880.

(12) Agrawal, S.; Koschmieder, S.; Bäumer, N.; Reddy, N. G. P.; Berdel, W. E.; Müller-Tidow, C.; Serve, H. Pim2 Complements Flt3 Wild-Type Receptor in Hematopoietic Progenitor Cell Transformation. *Leukemia* **2008**, *22* (1), 78–86. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404988.

(13) Curi, D. A.; Beauchamp, E. M.; Blyth, G. T.; Arslan, A. D.; Donato, N. J.; Giles, F. J.; Altman, J. K.; Platanias, L. C. Pre-Clinical Evidence of PIM Kinase Inhibitor Activity in BCR-ABL1 Unmutated and Mutated Philadelphia Chromosome-Positive (Ph+) Leukemias. *Oncotarget* **2015**, *6* (32), 33206–33216. https://doi.org/10.18632/oncotarget.5091.

(14) Druker, B. J.; Tamura, S.; Buchdunger, E.; Ohno, S.; Segal, G. M.; Fanning, S.; Zimmermann, J.; Lydon, N. B. Effects of a Selective Inhibitor of the Abl Tyrosine Kinase on the Growth of Bcr–Abl Positive Cells. *Nat. Med.* **1996**, *2* (5), 561–566. https://doi.org/10.1038/nm0596-561.

(15) PIM Kinase as an Executional Target in Cancer. *J. Cancer Prev.* **2018**, *23* (3), 109–116. https://doi.org/10.15430/JCP.2018.23.3.109.

(16) Fox, C. J.; Hammerman, P. S.; Cinalli, R. M.; Master, S. R.; Chodosh, L. A.; Thompson, C. B. The Serine/Threonine Kinase Pim-2 Is a Transcriptionally Regulated Apoptotic Inhibitor. *Genes Dev.* **2003**, *17* (15), 1841–1854. https://doi.org/10.1101/gad.1105003.

(17) Julson, J. R.; Marayati, R.; Beierle, E. A.; Stafman, L. L. The Role of PIM Kinases in Pediatric Solid Tumors. *Cancers* **2022**, *14* (15), 3565. https://doi.org/10.3390/cancers14153565.

(18) Xie, Y.; Burcu, M.; Linn, D. E.; Qiu, Y.; Baer, M. R. Pim-1 Kinase Protects P-Glycoprotein from Degradation and Enables Its Glycosylation and Cell Surface Expression. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *78* (2), 310–318. https://doi.org/10.1124/mol.109.061713.

(19) Xie, Y.; Xu, K.; Linn, D. E.; Yang, X.; Guo, Z.; Shimelis, H.; Nakanishi, T.; Ross, D. D.; Chen, H.; Fazli, L.; Gleave, M. E.; Qiu, Y. The 44-KDa Pim-1 Kinase Phosphorylates BCRP/ABCG2 and Thereby Promotes Its Multimerization and Drug-Resistant Activity in Human Prostate Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (6), 3349–3356. https://doi.org/10.1074/jbc.M707773200.

(20) Bullock, A. N.; Debreczeni, J. É.; Fedorov, O. Y.; Nelson, A.; Marsden, B. D.; Knapp, S. Structural Basis of Inhibitor Specificity of the Human Protooncogene Proviral Insertion Site in Moloney Murine Leukemia Virus (PIM-1) Kinase. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (24), 7604–7614. https://doi.org/10.1021/jm0504858.

(21) Schenone, S.; Tintori, C.; Botta, M. Using Insights into Pim1 Structure to Design New Anticancer Drugs. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16* (35), 3964–3978. https://doi.org/10.2174/138161210794454996.

(22) Pim Kinase Inhibitors in Cancer: Medicinal Chemistry Insights into Their Activity and Selectivity. *Drug Discov. Today* **2020**, *25* (11), 2062–2069. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.09.017.

(23) Kumar, A.; Mandiyan, V.; Suzuki, Y.; Zhang, C.; Rice, J.; Tsai, J.; Artis, D. R.; Ibrahim, P.; Bremer, R. Crystal Structures of Proto-Oncogene Kinase Pim1: A Target of Aberrant Somatic Hypermutations in Diffuse Large Cell Lymphoma. *J. Mol. Biol.* **2005**, *348* (1), 183–193. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.039.

(24) Bullock, A. N.; Russo, S.; Amos, A.; Pagano, N.; Bregman, H.; Debreczeni, J. É.; Lee, W. H.; Delft, F. von; Meggers, E.; Knapp, S. Crystal Structure of the PIM2 Kinase in Complex with an Organoruthenium Inhibitor. *PLoS ONE* **2009**, *4* (10), e7112. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007112.

(25) Lee, S. J.; Han, B.-G.; Cho, J.-W.; Choi, J.-S.; Lee, J.; Song, H.-J.; Koh, J. S.; Lee, B. I. Crystal Structure of Pim1 Kinase in Complex with a Pyrido[4,3-D]Pyrimidine Derivative Suggests a Unique Binding Mode. *PLoS ONE* **2013**, *8* (7), e70358. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070358.

(26) Brault, L.; Gasser, C.; Bracher, F.; Huber, K.; Knapp, S.; Schwaller, J. PIM Serine/Threonine Kinases in the Pathogenesis and Therapy of Hematologic Malignancies and Solid Cancers. *Haematologica* **2010**, *95* (6), 1004–1015. https://doi.org/10.3324/haematol.2009.017079.

(27) Foulks, J. M.; Carpenter, K. J.; Luo, B.; Xu, Y.; Senina, A.; Nix, R.; Chan, A.; Clifford, A.; Wilkes, M.; Vollmer, D.; Brenning, B.; Merx, S.; Lai, S.; McCullar, M. V.; Ho, K.-K.; Albertson, D. J.; Call, L. T.; Bearss, J. J.; Tripp, S.; Liu, T.; Stephens, B. J.; Mollard, A.; Warner, S. L.; Bearss, D. J.; Kanner, S. B. A Small-Molecule Inhibitor of PIM Kinases as a Potential Treatment for Urothelial Carcinomas. *Neoplasia* **2014**, *16* (5), 403–412. https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.05.004.

(28) Keeton, E. K.; McEachern, K.; Dillman, K. S.; Palakurthi, S.; Cao, Y.; Grondine, M. R.; Kaur, S.; Wang, S.; Chen, Y.; Wu, A.; Shen, M.; Gibbons, F. D.; Lamb, M. L.; Zheng,

X.; Stone, R. M.; DeAngelo, D. J.; Platanias, L. C.; Dakin, L. A.; Chen, H.; Lyne, P. D.; Huszar, D. AZD1208, a Potent and Selective Pan-Pim Kinase Inhibitor, Demonstrates Efficacy in Preclinical Models of Acute Myeloid Leukemia. *Blood* **2014**, *123* (6), 905–913. https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-495366.

(29) Cortes, J.; Tamura, K.; DeAngelo, D. J.; de Bono, J.; Lorente, D.; Minden, M.; Uy, G. L.; Kantarjian, H.; Chen, L. S.; Gandhi, V.; Godin, R.; Keating, K.; McEachern, K.; Vishwanathan, K.; Pease, J. E.; Dean, E. Phase I Studies of AZD1208, a Proviral Integration Moloney Virus Kinase Inhibitor in Solid and Haematological Cancers. *Br. J. Cancer* **2018**, *118* (11), 1425–1433. https://doi.org/10.1038/s41416-018-0082-1.

(30) Oyallon, B.; Brachet-Botineau, M.; Logé, C.; Robert, T.; Bach, S.; Ibrahim, S.; Raoul, W.; Croix, C.; Berthelot, P.; Guillon, J.; Pinaud, N.; Gouilleux, F.; Viaud-Massuard, M.-C.; Denevault-Sabourin, C. New Quinoxaline Derivatives as Dual Pim-1/2 Kinase Inhibitors: Design, Synthesis and Biological Evaluation. *Molecules* **2021**, *26* (4), 867. https://doi.org/10.3390/molecules26040867.

(31) Raab, M. S.; Thomas, S. K.; Ocio, E. M.; Guenther, A.; Goh, Y.-T.; Talpaz, M.; Hohmann, N.; Zhao, S.; Xiang, F.; Simon, C.; Vanasse, K. G.; Kumar, S. K. The First-in-Human Study of the Pan-PIM Kinase Inhibitor PIM447 in Patients with Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma. *Leukemia* **2019**, *33* (12), 2924–2933. https://doi.org/10.1038/s41375-019-0482-0.

(32) Koblish, H.; Li, Y.; Shin, N.; Hall, L.; Wang, Q.; Wang, K.; Covington, M.; Marando, C.; Bowman, K.; Boer, J.; Burke, K.; Wynn, R.; Margulis, A.; Reuther, G. W.; Lambert, Q. T.; Dostalik Roman, V.; Zhang, K.; Feng, H.; Xue, C.-B.; Diamond, S.; Hollis, G.; Yeleswaram, S.; Yao, W.; Huber, R.; Vaddi, K.; Scherle, P. Preclinical Characterization of INCB053914, a Novel Pan-PIM Kinase Inhibitor, Alone and in Combination with Anticancer Agents, in Models of Hematologic Malignancies. *PLOS ONE* **2018**, *13* (6), e0199108. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199108.

(33) Patel, M. R.; Donnellan, W.; Byrne, M.; Asch, A. S.; Zeidan, A. M.; Baer, M. R.; Fathi, A. T.; Kuykendall, A. T.; Zheng, F.; Walker, C.; Cheng, L.; Marando, C.; Savona, M. R. Phase 1/2 Study of the Pan-PIM Kinase Inhibitor INCB053914 Alone or in Combination With Standard-of-Care Agents in Patients With Advanced Hematologic Malignancies. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2023**, S2152265023001428. https://doi.org/10.1016/j.clml.2023.05.002.

(34) Czardybon, W.; Windak, R.; Gołas, A.; Gałęzowski, M.; Sabiniarz, A.; Dolata, I.; Salwińska, M.; Guzik, P.; Zawadzka, M.; Gabor-Worwa, E.; Winnik, B.; Żurawska, M.; Kolasińska, E.; Wincza, E.; Bugaj, M.; Danielewicz, M.; Majewska, E.; Mazan, M.; Dubin, G.; Noyszewska-Kania, M.; Jabłońska, E.; Szydłowski, M.; Sewastianik, T.; Puła, B.; Szumera-Ciećkiewicz, A.; Prochorec-Sobieszek, M.; Mądro, E.; Lech-Marańda, E.; Warzocha, K.; Tamburini, J.; Juszczyński, P.; Brzózka, K. A Novel, Dual Pan-PIM/FLT3 Inhibitor SEL24 Exhibits Broad Therapeutic Potential in Acute Myeloid Leukemia. *Oncotarget* **2018**, *9* (24), 16917–16931. https://doi.org/10.18632/oncotarget.24747.

(35) Wang, X.; Blackaby, W.; Allen, V.; Chan, G. K. Y.; Chang, J. H.; Chiang, P.-C.; Diène, C.; Drummond, J.; Do, S.; Fan, E.; Harstad, E. B.; Hodges, A.; Hu, H.; Jia, W.; Kofie, W.; Kolesnikov, A.; Lyssikatos, J. P.; Ly, J.; Matteucci, M.; Moffat, J. G.; Munugalavadla, V.; Murray, J.; Nash, D.; Noland, C. L.; Del Rosario, G.; Ross, L.; Rouse, C.; Sharpe, A.; Slaga, D.; Sun, M.; Tsui, V.; Wallweber, H.; Yu, S.-F.; Ebens, A. J. Optimization of Pan-Pim Kinase Activity and Oral Bioavailability Leading to Diaminopyrazole (GDC-0339) for the Treatment of Multiple Myeloma. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (4), 2140–2153. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01857.

(36) Oyallon, B.; Brachet-Botineau, M.; Logé, C.; Bonnet, P.; Souab, M.; Robert, T.; Ruchaud, S.; Bach, S.; Berthelot, P.; Gouilleux, F.; Viaud-Massuard, M.-C.; Denevault-Sabourin, C. Structure-Based Design of Novel Quinoxaline-2-Carboxylic Acids and Analogues as Pim-1 Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *154*, 101–109. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.04.056.

(37) Mallinson, J.; Collins, I. Macrocycles in New Drug Discovery. *Future Med. Chem.* **2012**, *4* (11), 1409–1438. https://doi.org/10.4155/fmc.12.93.

(38) Baeyer A. Ueber Ein Condensationsproduct von Pyrrol Mit Aceton. Ber. Disctz. Chem. Ger. 1886, pp 2184–2185.

(39) Driggers, E. M.; Hale, S. P.; Lee, J.; Terrett, N. K. The Exploration of Macrocycles for Drug Discovery — an Underexploited Structural Class. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7* (7), 608–624. https://doi.org/10.1038/nrd2590.

(40) K. Oyelere, A. Editorial [Hot Topic: Macrocycles in Medicinal Chemistry and Drug Discovery (Guest Editors: Adegboyega K. Oyelere)]. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10* (14), 1359–1360. https://doi.org/10.2174/156802610792232097.

(41) Amrhein, J. A.; Knapp, S.; Hanke, T. Synthetic Opportunities and Challenges for Macrocyclic Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (12), 7991–8009. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00217.

(42) Tao, Z.-F.; Wang, L.; Stewart, K. D.; Chen, Z.; Gu, W.; Bui, M.-H.; Merta, P.; Zhang, H.; Kovar, P.; Johnson, E.; Park, C.; Judge, R.; Rosenberg, S.; Sowin, T.; Lin, N.-H. Structure-Based Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Potent and Selective Macrocyclic Checkpoint Kinase 1 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (7), 1514–1527. https://doi.org/10.1021/jm061247v.

(43) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (12), 2615–2623. https://doi.org/10.1021/jm020017n.

(44) Cee, V. J.; Chavez, F.; Herberich, B.; Lanman, B. A.; Pettus, L. H.; Reed, A. B.; Wu, B.; Wurz, R. P.; Andrews, K. L.; Chen, J.; Hickman, D.; Laszlo, J.; Lee, M. R.; Guerrero, N.; Mattson, B. K.; Nguyen, Y.; Mohr, C.; Rex, K.; Sastri, C. E.; Wang, P.; Wu, Q.; Wu, T.; Xu, Y.; Zhou, Y.; Winston, J. T.; Lipford, J. R.; Tasker, A. S.; Wang, H.-L. Discovery and Optimization of Macrocyclic Quinoxaline-Pyrrolo-Dihydropiperidinones as Potent Pim-1/2 Kinase Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7* (4), 408–412. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00403.

(45) Xu, J.; Shen, C.; Xie, Y.; Qiu, B.; Ren, X.; Zhou, Y.; Li, G.; Zheng, G.; Huang, N. Design, Synthesis, and Bioactivity Evaluation of Macrocyclic Benzo[b]Pyrido[4,3-e][1,4]Oxazine Derivatives as Novel Pim-1 Kinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2022**, *72*, 128874. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2022.128874.

(46) Martínez-González, S.; Alvarez, R. M.; Martín, J. I.; García, A. B.; Riesco-Fagundo, C.; Varela, C.; Rodríguez Hergueta, A.; González Cantalapiedra, E.; Albarrán, M. I.; Gómez-Casero, E.; Cebriá, A.; Aguirre, E.; Ajenjo, N.; Cebrián, D.; Di Geronimo, B.; Cunningham, D.; O'Neill, M.; Dave, H. P. G.; Blanco-Aparicio, C.; Pastor, J. Macrocyclization as a Source of Desired Polypharmacology. Discovery of Triple PI3K/MTOR/PIM Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, *12* (11), 1794–1801. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.1c00412.

(47) Lipinski, C. A. Drug-like Properties and the Causes of Poor Solubility and Poor Permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44* (1), 235–249. https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00107-6.

(48) Muchmore, S. W.; Edmunds, J. J.; Stewart, K. D.; Hajduk, P. J. Cheminformatic Tools for Medicinal Chemists. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (13), 4830–4841. https://doi.org/10.1021/jm100164z.

(49) Gautier Peyrat. Conception d'inhibiteurs de protéines kinases à partir de méthodes in silico basées sur les fragments, Université d'Orléan, **2021**.

(50) Pereira, J. A.; Pessoa, A. M.; Cordeiro, M. N. D. S.; Fernandes, R.; Prudêncio, C.; Noronha, J. P.; Vieira, M. Quinoxaline, Its Derivatives and Applications: A State of the Art Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 664–672. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.06.058.

(51) Yashwantrao, G.; Saha, S. Recent Advances in the Synthesis and Reactivity of Quinoxaline. *Org. Chem. Front.* **2021**, *8* (11), 2820–2862. https://doi.org/10.1039/D0QO01575J.

(52) Mahesh, R.; Dhar, A. K.; Sasank T.V.N.V., T.; Thirunavukkarasu, S.; Devadoss, T. Citric Acid: An Efficient and Green Catalyst for Rapid One Pot Synthesis of Quinoxaline Derivatives at Room Temperature. *Chin. Chem. Lett.* **2011**, *22* (4), 389–392. https://doi.org/10.1016/j.cclet.2010.11.002.

(53) Das, B.; Venkateswarlu, K.; Suneel, K.; Majhi, A. An Efficient and Convenient Protocol for the Synthesis of Quinoxalines and Dihydropyrazines via Cyclization–Oxidation Processes Using HClO4·SiO2 as a Heterogeneous Recyclable Catalyst. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (31), 5371–5374. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.06.036.

(54) Nageswar, Y. V. D.; Reddy, K. H. V.; Ramesh, K.; Murthy, S. N. Recent Developments in the Synthesis of Quinoxaline Derivatives by Green Synthetic Approaches. *Org. Prep. Proced. Int.* **2013**, *45* (1), 1–27. https://doi.org/10.1080/00304948.2013.743419.

(55) Takano, Y.; Shiga, F.; Asano, J.; Ando, N.; Uchiki, H.; Fukuchi, K.; Anraku, T. Design, Synthesis, and AMPA Receptor Antagonistic Activity of a Novel 6-Nitro-3-Oxoquinoxaline-2-Carboxylic Acid with a Substituted Phenyl Group at the 7 Position. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13* (20), 5841–5863. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.05.030.

(56) Saha, B.; Mitra, B.; Brahmin, D.; Sinha, B.; Ghosh, P. 2-Iodo Benzoic Acid: An Unconventional Precursor for the One Pot Multi-Component Synthesis of Quinoxaline Using Organo Cu (II) Catalyst. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59* (41), 3657–3663. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.08.051.

(57) Climent, M. J.; Corma, A.; Hernández, J. C.; Hungría, A. B.; Iborra, S.; Martínez-Silvestre, S. Biomass into Chemicals: One-Pot Two- and Three-Step Synthesis of Quinoxalines from Biomass-Derived Glycols and 1,2-Dinitrobenzene Derivatives Using Supported Gold Nanoparticles as Catalysts. *J. Catal.* **2012**, *292*, 118–129. https://doi.org/10.1016/j.jcat.2012.05.002.

(58) Monopoli, A.; Cotugno, P.; Cortese, M.; Calvano, C. D.; Ciminale, F.; Nacci, A. Selective N-Alkylation of Arylamines with Alkyl Chloride in Ionic Liquids: Scope and Applications. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012* (16), 3105–3111. https://doi.org/10.1002/ejoc.201200202.

(59) Lücking, U.; Siemeister, G.; Schäfer, M.; Briem, H.; Krüger, M.; Lienau, P.; Jautelat, R. Macrocyclic Aminopyrimidines as Multitarget CDK and VEGF-R Inhibitors with Potent Antiproliferative Activities. *ChemMedChem* **2007**, *2* (1), 63–77. https://doi.org/10.1002/cmdc.200600199.

(60) Wang, D.; Gao, S. Sonogashira Coupling in Natural Product Synthesis. *Org Chem Front* **2014**, *1* (5), 556–566. https://doi.org/10.1039/C3QO00086A.

(61) Mohapatra, D. K.; Bhattasali, D.; Gurjar, M. K.; Khan, M. I.; Shashidhara, K. S. First Asymmetric Total Synthesis of Penarolide Sulfate A $_1$. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008* (36), 6213–6224. https://doi.org/10.1002/ejoc.200800680.

(62) Nafe, J.; Herbert, S.; Auras, F.; Karaghiosoff, K.; Bein, T.; Knochel, P. Functionalization of Quinoxalines by Using TMP Bases: Preparation of Tetracyclic Heterocycles with High Photoluminescene Quantum Yields. *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21* (3), 1102–1107. https://doi.org/10.1002/chem.201405240.

(63) Bryden, F.; Martin, C.; Letast, S.; Lles, E.; Viéitez-Villemin, I.; Rousseau, A.; Colas, C.; Brachet-Botineau, M.; Allard-Vannier, E.; Larbouret, C.; Viaud-Massuard, M.-C.; Joubert, N. Impact of Cathepsin B-Sensitive Triggers and Hydrophilic Linkers on *in Vitro* Efficacy of Novel Site-Specific Antibody–Drug Conjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (11), 1882–1889. https://doi.org/10.1039/C7OB02780J.

(64) Benzodipyrrole-Based Donor-Acceptor-Type Boron Complexes as Tunable Near-Infrared-Absorbing Materials. *Chem. - Asian J.* **2016**, *11* (14), 2016–2020. https://doi.org/10.1002/asia.201600673.

(65) Lo, H. Y.; Bentzien, J.; White, A.; Man, C. C.; Fleck, R. W.; Pullen, S. S.; Khine, H. H.; King, J.; Woska, J. R.; Wolak, J. P.; Kashem, M. A.; Roth, G. P.; Takahashi, H. 2-Aminobenzimidazoles as Potent ITK Antagonists: De Novo Design of a Pyrrole System Targeting Additional Hydrogen Bonding Interaction. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49* (51), 7337–7340. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.10.057.

(66) Nemeth, A. M.; Basak, A. K.; Weig, A. W.; Marrujo, S. A.; Barker, W. T.; Jania, L. A.; Hendricks, T. A.; Sullivan, A. E.; O'Connor, P. M.; Melander, R. J.; Koller, B. H.; Melander, C. Structure–Function Studies on IMD-0354 Identifies Highly Active Colistin Adjuvants. *ChemMedChem* **2020**, *15* (2), 210–218. https://doi.org/10.1002/cmdc.201900560.

(67) Jerry Leroy Adams; et al. Preparation of 5-Sulfamoyl-2-Hydroxybenzamide Derivatives as CD73 Inhibitors for the Treatment of Diseases. WO 2017/153952 Al.

(68) Hussain, A.; Rao L, M.; Sharma, D. K.; Tripathi, A. K.; Singh, B.; Mukherjee, D. Synthesis of Carbohydrate Fused Chiral Macrocyclic Benzolactones through Sonogashira Reaction. *RSC Adv.* **2013**, *3* (43), 19899. https://doi.org/10.1039/c3ra43827a.

(69) Shafir, A.; Buchwald, S. L. Highly Selective Room-Temperature Copper-Catalyzed C−N Coupling Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (27), 8742–8743. https://doi.org/10.1021/ja063063b.

(70) Viswanadham, B.; Mahomed, A. S.; Friedrich, H. B.; Singh, S. Efficient and Expeditious Chemoselective BOC Protection of Amines in Catalyst and Solvent-Free Media. *Res. Chem. Intermed.* **2017**, *43* (3), 1355–1363. https://doi.org/10.1007/s11164-016-2702-9.

(71) Nasveschuk; Christopher G; Henderson, James A; Vora, Harit U; Veits, Gesine Kerstin; Philips, Andrew J. Preparation of Dioxopiperidinyl Dioxoisoindoline Derivatives as BRD9 or MTH1 Degraders for the Treatment of BRD9- and MTH1-Mediated Diseases. WO2020051235, March 12, **2020**.

(72) Chen, K.; Huang, X.; Kan, S. B. J.; Zhang, R. K.; Arnold, F. H. Enzymatic Construction of Highly Strained Carbocycles. *Science* **2018**, *360* (6384), 71–75. https://doi.org/10.1126/science.aar4239.

(73) Shan, G.; Flegel, J.; Li, H.; Merten, C.; Ziegler, S.; Antonchick, A. P.; Waldmann, H. C−H Bond Activation for the Synthesis of Heterocyclic Atropisomers Yields Hedgehog Pathway Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (43), 14250–14254. https://doi.org/10.1002/anie.201809680.

(74) FU, Jiping; KARUR, Subramanian; LEE, Patrick; SWEENEY, Zachary Kevin; JIN, Xianming; LAPOINTE, Guillaume. ISOXAZOLINE HYDROXAMIC ACID DERIVATIVES AS LPXC INHIBITORS, October 29, **2015.**

(75) Jahani, F.; Tajbakhsh, M.; Golchoubian, H.; Khaksar, S. Guanidine Hydrochloride as an Organocatalyst for N-Boc Protection of Amino Groups. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52* (12), 1260–1264. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.01.023.

(76) Patschinski, P.; Zhang, C.; Zipse, H. The Lewis Base-Catalyzed Silylation of Alcohols—A Mechanistic Analysis. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (17), 8348–8357. https://doi.org/10.1021/jo5016568.

(77) McKerlie, F.; Rudkin, I. M.; Wynne, G.; Procter, D. J. Evaluation of a New Linker System Cleaved Using Samarium(Ii) Iodide. Application in the Solid Phase Synthesis of Carbonyl Compounds. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (15), 2805. https://doi.org/10.1039/b506294b.

(78) Li, B.; Luo, X.; Deng, B.; Wang, J.; McComb, D. W.; Shi, Y.; Gaensler, K. M. L.; Tan, X.; Dunn, A. L.; Kerlin, B. A.; Dong, Y. An Orthogonal Array Optimization of Lipid-like Nanoparticles for MRNA Delivery in Vivo. *Nano Lett.* **2015**, *15* (12), 8099–8107. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b03528.

(79) Soeberdt, Michael; Knie, Ulrich; Abels, Christoph. Preparation of Perhydroquinoxaline Derivatives Useful as Analgesics. WO2014184355, November 20, **2014**.

(80) Pilch, Daniel S; Lavoie, Edmond J; Kaul, Malvika; Parhi, Ajit. Preparation of Benzo[c]Phenanthridines as Antimicrobial Agents. WO2010083436, January 15, **2010**.

(81) Zegzouti, H.; Zdanovskaia, M.; Hsiao, K.; Goueli, S. A. ADP-Glo: A Bioluminescent and Homogeneous ADP Monitoring Assay for Kinases. *ASSAY Drug Dev. Technol.* **2009**, *7* (6), 560–572. https://doi.org/10.1089/adt.2009.0222.

(82) Desplat, V.; Vincenzi, M.; Lucas, R.; Moreau, S.; Savrimoutou, S.; Pinaud, N.; Lesbordes, J.; Peyrilles, E.; Marchivie, M.; Routier, S.; Sonnet, P.; Rossi, F.; Ronga, L.; Guillon, J. Synthesis and Evaluation of the Cytotoxic Activity of Novel Ethyl 4-[4-(4-Substitutedpiperidin-1-Yl)]Benzyl-Phenylpyrrolo[1,2-a]Quinoxaline-Carboxylate Derivatives in Myeloid and Lymphoid Leukemia Cell Lines. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *113*, 214–227. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.047.

(83) Desplat, V.; Vincenzi, M.; Lucas, R.; Moreau, S.; Savrimoutou, S.; Rubio, S.; Pinaud, N.; Bigat, D.; Enriquez, E.; Marchivie, M.; Routier, S.; Sonnet, P.; Rossi, F.; Ronga, L.; Guillon, J. Synthesis and Antiproliferative Effect of Ethyl 4-[4-(4-Substituted Piperidin-1-Yl)]Benzylpyrrolo[1,2- *a*]Quinoxalinecarboxylate Derivatives on Human Leukemia Cells. *ChemMedChem* **2017**, *12* (12), 940–953. https://doi.org/10.1002/cmdc.201700049.

(84) Guillon, J.; Savrimoutou, S.; Albenque-Rubio, S.; Pinaud, N.; Moreau, S.; Desplat, V. Synthesis, Crystal Structure and Anti-Leukemic Activity of 1,3-Dihydro-1-{1-[4-(4-Phenylpyrrolo[1,2-a]Quinoxalin-3-Yl)Benzyl]Piperidin-4-Yl}-2H-Benzimidazol-2-One. *Molbank* **2022**, *2022* (1), M1333. https://doi.org/10.3390/M1333.

(85) Cohen, P.; Cross, D.; Jänne, P. A. Kinase Drug Discovery 20 Years after Imatinib: Progress and Future Directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (7), 551–569. https://doi.org/10.1038/s41573-021-00195-4.

(86) Ropp, P. J.; Spiegel, J. O.; Walker, J. L.; Green, H.; Morales, G. A.; Milliken, K. A.; Ringe, J. J.; Durrant, J. D. Gypsum-DL: An Open-Source Program for Preparing Small-Molecule Libraries for Structure-Based Virtual Screening. *J. Cheminformatics* **2019**, *11* (1), 34. https://doi.org/10.1186/s13321-019-0358-3.

(87) Koes, D. R.; Baumgartner, M. P.; Camacho, C. J. Lessons Learned in Empirical Scoring with Smina from the CSAR 2011 Benchmarking Exercise. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53* (8), 1893–1904. https://doi.org/10.1021/ci300604z.

(88) Quiroga, R.; Villarreal, M. A. Vinardo: A Scoring Function Based on Autodock Vina Improves Scoring, Docking, and Virtual Screening. *PLOS ONE* **2016**, *11* (5), e0155183. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155183.

(89) Etienne Auvert; Reidun Aesoy; Francis Giraud; Lars Herfindal; Fabrice Anizon; Pascale Moreau. Synthesis of New Pyrazolo[4,3-a]Phenanthridine Pim-1 Inhibitors and Evaluation of Their Cytotoxic Activity towards the MOLM-13 Acute Myeloid Leukemia Cell Line. October 1, **2022**. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2022.128914.

(90) Pierrik Lassalas; Bryant Gay; Caroline Lasfargeas; Michael J. James; Van Tran; Krishna G. Vijayendran; Kurt R. Brunden; Marisa C. Kozlowski; Craig J. Thomas; Amos B. Smith; Donna M. Huryn; Carlo Ballatore. Structure Property Relationships of Carboxylic Acid Isosteres. J. Med. Chem. March 11, **2016**.

ANNEXE

A. Annexe 1 : Structure cristallographique intermédiaire 13

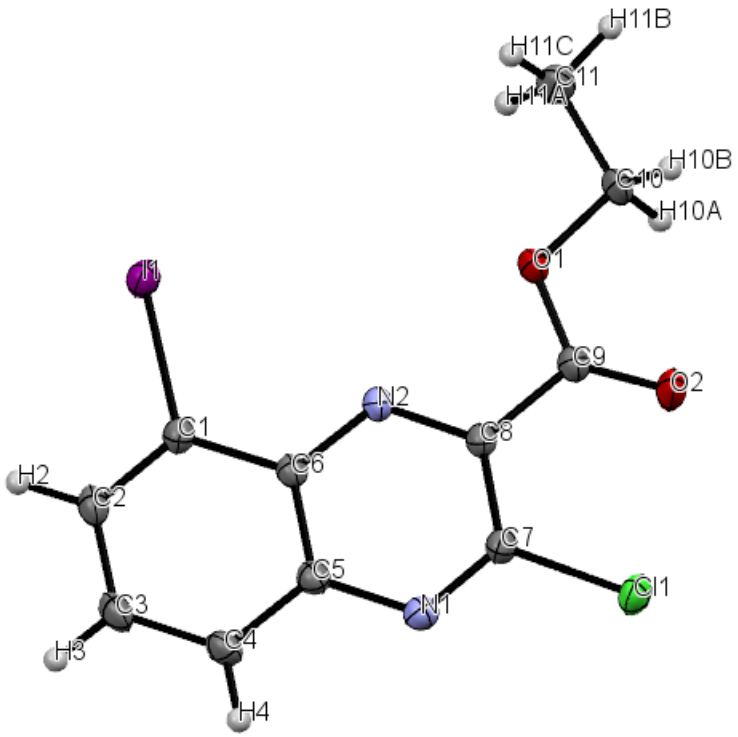


Figure 57. Le dessin ORTEP (*Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot*) du 3-chloro-8-iodoquinoxaline-2-carboxylate d'éthyle (13) avec des ellipsoïdes thermiques à un niveau de 30 %.

B. Annexe 2 : Structure cristallographique du macrocycle 36c

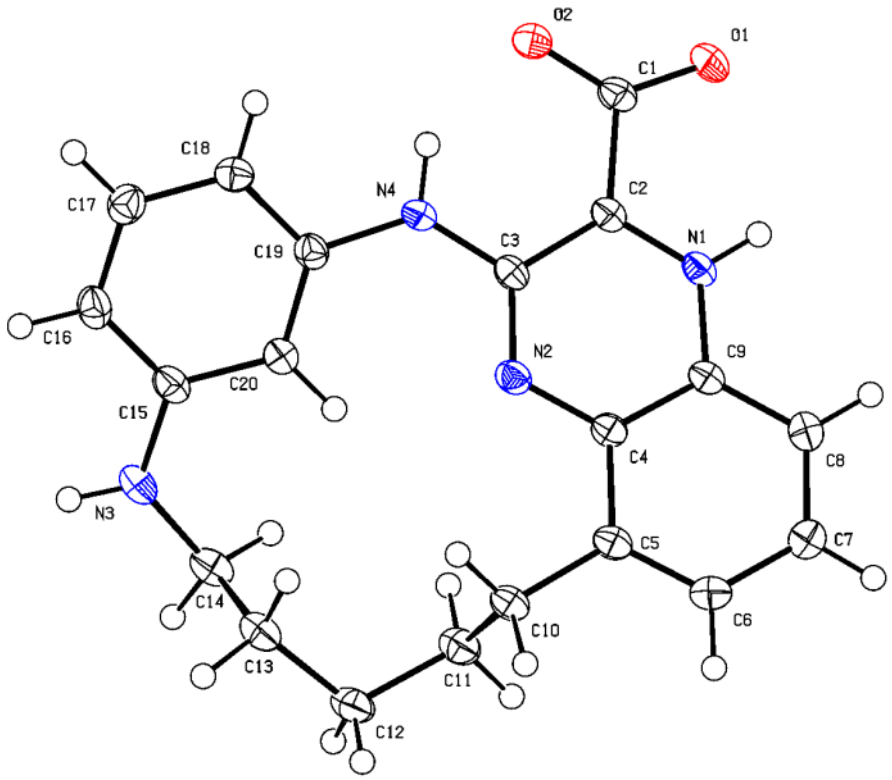


Figure 58. Le dessin ORTEP (Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot) du macrocycle le plus réduit de la série phényle (36c)

C. Annexe 3 : Alignement de séquences d'acides aminés 2D de Pim1, Pim2, DYRK1A et GSK3β humaines.

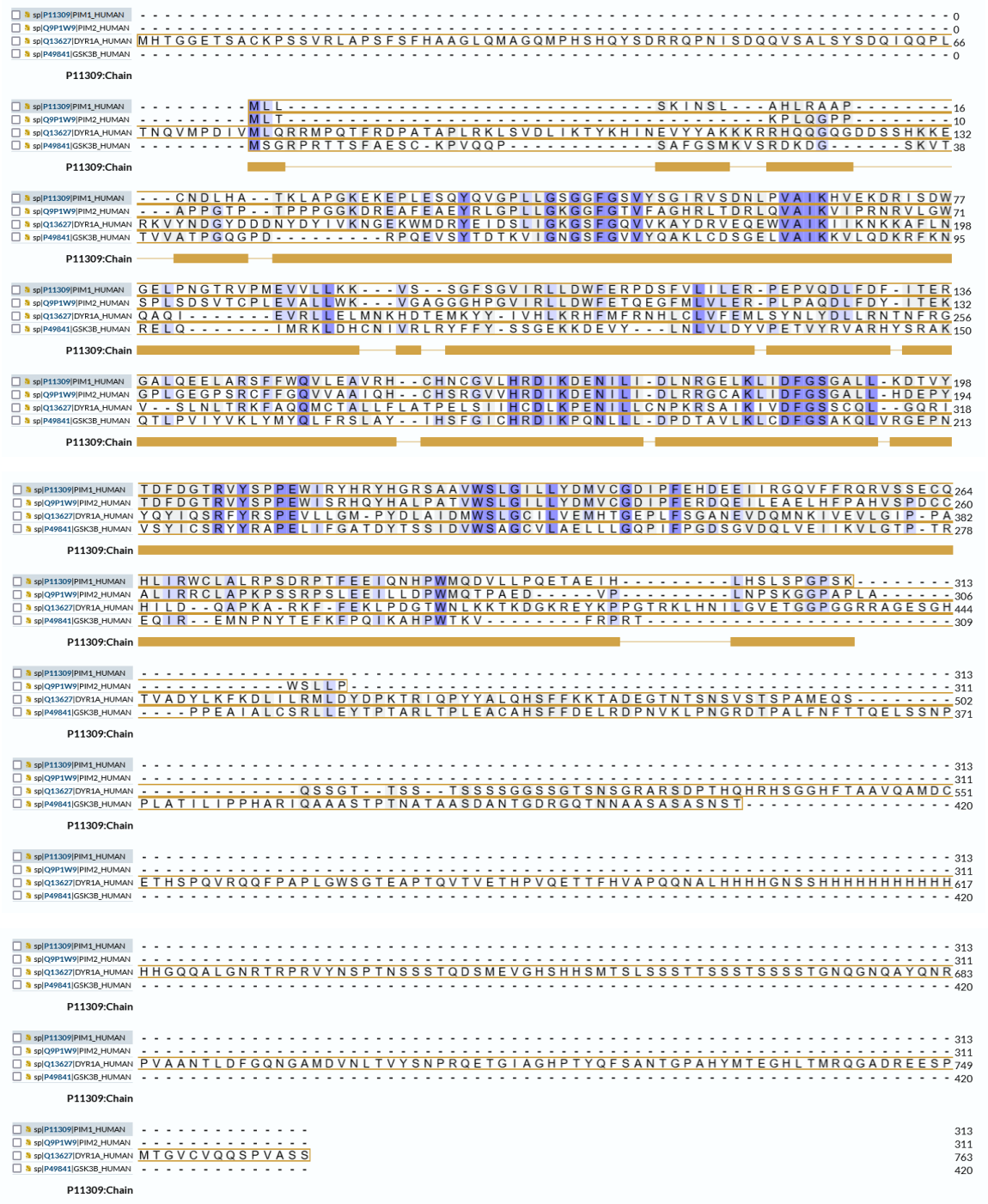


Figure 59. Alignement de séquences d'acides aminés 2D de Pim1 humain (PDB ID : P11309), Pim2 (PDB ID : Q9P1W9), DYRK1A (PDB ID : Q13627) et GSK3β (PDB ID : P49841), à l'aide d'Uniprot (https://www.uniprot.org). Les acides aminés du site de liaison sont indiqués en violet.

Camille BLOUET

Développement de nouveaux inhibiteurs macrocycliques des kinases Pim-1/2, à potentiel anti-leucémique

Les kinases Pim (Pim-1, 2 et 3) sont des sérine/thréonine kinases codées par un proto-oncogène, surexprimées dans une grande variété de cancers hématopoïétiques, notamment dans les leucémies myéloïdes aiguës et chroniques, et considérées comme des cibles d'intérêt en cancérologie. Par ailleurs, elles possèdent des caractéristiques structurales singulières par rapport aux autres kinases, pouvant être exploitées pour concevoir des inhibiteurs sélectifs. Des travaux préliminaires nous ont permis d'identifier une nouvelle quinoxaline chef de file capable d'inhiber l'activité enzymatique de Pim-1 et de Pim-2 au submicromolaire (CI_{50} de 130 et 170 nM sur Pim-1 et Pim-2, respectivement). L'objectif de ce projet de thèse était de développer de nouveaux inhibiteurs macrocycliques des kinases Pim, dérivés de la quinoxaline chef de file, possédant une activité cellulaire optimisée et un bon profil de sélectivité, en utilisant une approche de conception assistée par ordinateur. Au terme de ce travail, 10 macrocycles ont été développés dont 6 possédant une activité anti-Pim-1/2 submicromolaire comparable à celles de la quinoxaline chef de file et du composé de référence SGI-1776. Parmi ces 6 macrocycles, 4 d'entre eux ont montré un profil de sélectivité largement amélioré (CI_{50} > 10 µM) sur un petit panel de kinases de mammifères *off-target*. La stratégie de macrocyclisation utilisée dans cette thèse a donc permis d'améliorer le profil de sélectivité des inhibiteurs. Elle n'a en revanche pas permis d'optimiser leur activité *in vitro* sur lignée cellulaire leucémique humaine.

Mots clés : leucémie, kinases Pim-1/2, inhibiteurs, macrocycle, quinoxaline

Pim kinases (Pim-1, 2 et 3) are proto-oncogene-encoded serine/threonine kinases, overexpressed in a large range of hematopoietic malignancies, particularly in acute and chronic myeloid leukemias, and considered as relevant targets for cancer therapy. Moreover, they possess unique structural features in comparison to other kinases, providing an opportunity for the design of selective inhibitors. Preliminary studies allowed us to identify a new quinoxaline lead compound, able to block Pim-1 and Pim-2 enzymatic activity at submicromolar concentrations (IC_{50} of 130 and 170 nM on Pim-1 and Pim-2, respectively). The aim of this PhD project was to use a computer-based drug design approach to develop new macrocyclic Pim kinases inhibitors, derived from the quinoxaline lead compound, with an improved cellular potency and a good selectivity profile. At the end of this work, 10 macrocycles were developed and 6 of them showed anti-Pim-1/2 submicromolar activity, comparable to the quinoxaline lead compound and to the SGI-1776 reference activities. Four of these 6 macrocycles showed an improve selectivity profile (IC_{50} > 10 µM for the 6 *off-target mammalian* kinases tested). The macrocyclization used in this thesis has therefore improved the inhibitors selectivity profile. However, it did not optimize their *in vitro* activity on human leukemia cell lines.

Keywords : Leukemia, Pim-1/2-kinases, inhibitors, macrocycles, quinoxaline