

## THESE

Pour l'obtention du grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITE de LILLE 2

*Spécialité : Sciences du médicament*

Soutenue par **Vanessa HOGUET**

Le 27 Septembre 2017

---

# Optimisation de nouveaux agonistes topiques intestinaux du récepteur aux acides biliaires TGR5 pour le traitement du diabète de type 2

---

#### Jury :

Docteur Patricia BUSCA	Université Paris Descartes	Rapporteur
Docteur Muriel AMBLARD	Université de Montpellier	Rapporteur
Docteur Olivier DEFERT	OleaMedChem Consulting	Examineur
Professeur Anne MUHR-TAILLEUX	Université de Lille 2	Examineur
Docteur Julie CHARTON	Université de Lille 2	Directrice de thèse
Professeur Benoit DEPRez	Université de Lille 2	Examineur



**Inserm**

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale



**Université  
de Lille**  
DROIT  
ET SANTÉ

Laboratoire *Médicaments et Molécules pour Agir sur les Systèmes Vivants*

INSERM U1177 – Institut Pasteur de Lille – Université de Lille 2

3<sup>ème</sup> étage Aile Ouest, Faculté de Pharmacie des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

3, Rue du Pr Laguesse, B.P. 83, 59006 LILLE CEDEX



## Optimisation de nouveaux agonistes topiques intestinaux du récepteur aux acides biliaires TGR5 pour le traitement du diabète de type 2

### Résumé

Le récepteur membranaire TGR5 (Takeda G Protein-coupled Receptor 5) est un récepteur ubiquitaire sensible aux acides biliaires. Il est exprimé dans de nombreux tissus et organes dont l'intestin (dans les cellules entéroendocrines L), la vésicule biliaire, les muscles lisses et squelettiques, le tissu adipeux brun et dans certaines cellules immunitaires. Des études menées *in vitro* et *in vivo* chez l'animal ont montré des effets bénéfiques de l'activation de TGR5 sur l'homéostasie énergétique et glucidique. Il est maintenant communément admis que les effets bénéfiques de TGR5 sur l'homéostasie du glucose sont, au moins en partie, médiés par sa capacité à promouvoir la sécrétion de l'incrétine intestinale glucagon-like peptide-1 (GLP-1) au niveau des cellules entéroendocrines L.

Cependant, de récentes expériences ont montré que l'activation de TGR5 par des agonistes systémiques dans des modèles animaux peut induire des effets non souhaités tels qu'une augmentation du volume de la vésicule biliaire, des démangeaisons et des effets cardiovasculaires. Afin de s'affranchir des effets non désirés d'agonistes systémiques de TGR5, le projet s'est orienté vers le développement d'agonistes de TGR5 présentant une distribution tissulaire ciblée et limitée à l'intestin et dont la biodisponibilité orale serait très faible, voire nulle. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'une activation de TGR5 limitée à l'épithélium intestinal sans exposition systémique permettrait d'obtenir des effets bénéfiques sur l'homéostasie du glucose, *via* l'effet GLP-1 sécrétagogue, tout en minimisant les effets non souhaités sur d'autres tissus ou organes exprimant TGR5.

A partir des études de relations structure-activité obtenues au laboratoire sur une série d'agonistes de TGR5, nous avons conçu des composés chimériques de la façon suivante : le pharmacophore responsable de l'activité sur le récepteur TGR5 est lié, *via* un bras espaceur, à des éléments structuraux appelés kinétophores qui ajustent les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques de nos agonistes pour limiter leur absorption intestinale. Ainsi, l'objectif de ce travail était d'obtenir des agonistes non systémiques de TGR5, puissants et originaux, exerçant leur action dans l'intestin afin de générer la preuve de concept *in vivo* de l'intérêt d'utiliser de tels agonistes dans le traitement du diabète de type 2.

Une étude systématique de l'effet de kinétophores variés a été réalisée. Une trentaine de composés ont été synthétisés en 8 à 12 étapes permettant l'identification d'agonistes puissants et présentant des propriétés pharmacocinétiques en accord avec notre objectif d'obtention de composés topiques intestinaux. Des études *in vivo* ont ensuite permis de valider l'effet GLP-1 sécrétagogue de certains composés. Enfin, l'évaluation d'un des meilleurs composés dans un modèle murin de diabète nous a permis de valider l'hypothèse qu'un agoniste topique intestinal de TGR5 peut avoir un effet bénéfique sur la tolérance au glucose.

**Mots-clés :** TGR5, agoniste, topique intestinal, GLP-1, incrétine, kinétophore

## Optimization of new topical intestinal agonists of the bile acid receptor TGR5 for the treatment of type 2 diabetes.

### Summary

The membrane receptor TGR5 (Takeda G Protein-coupled Receptor 5) is an ubiquitous receptor sensitive to bile acids. It is expressed in many tissues and organs including the intestine (in enteroendocrine L cells), the gallbladder, smooth and skeletal muscles, brown adipose tissue and in some immune cells. *In vitro* and *in vivo* studies in animals have shown beneficial effects of TGR5 activation on energy and glucose homeostasis. It is now commonly accepted that the beneficial effects of TGR5 on glucose homeostasis are, at least in part, mediated by its ability to promote the secretion of the intestinal incretin glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in enteroendocrine L cells.

However, recent experiments have shown that the activation of TGR5 by systemic agonists in animal models can induce unwanted effects such as increased gallbladder volume, itching and cardiovascular issues. In order to avoid the undesired effects of systemic agonists of TGR5, the project focused on the development of TGR5 agonists with an intestine targeted distribution and a very low oral bioavailability. Then, we hypothesized that the activation of TGR5 limited to the intestinal epithelium without systemic exposure would promote the beneficial effects on glucose homeostasis *via* the GLP-1 secretagogue effect, while minimizing systemic effects on other tissues or organs expressing TGR5.

On the basis of structure-activity relationships on a series of TGR5 agonists developed in the laboratory, we have designed chimeric compounds as follows: the pharmacophore responsible for activity on the TGR5 receptor is bound, *via* a linker, at structural elements called kinetophores that fine-tune the physicochemical and pharmacokinetic properties of our agonists to limit their intestinal absorption. Thus, the aim of this work was to obtain powerful and original non-systemic TGR5 agonists acting in the intestine to generate the *in vivo* proof of concept of the therapeutic potential of such agonists in the treatment of type 2 diabetes.

A systematic study of the effect of various kinetophores was performed. About thirty compounds have been synthesized in 8 to 12 steps allowing the identification of powerful agonists with pharmacokinetic properties in accordance with our goal of obtaining topical intestinal compounds. *In vivo* studies were then used to validate the GLP-1 secretagogue effect of some compounds. Finally, evaluation of one of the best compounds in a murine model of diabetes allowed us to validate the hypothesis that a topical intestinal agonist of TGR5 can have a beneficial effect on glucose tolerance.

**Keywords:** TGR5, agonist, topical intestinal, GLP-1, incretine, kinetophore

## Avant-propos

Ces travaux de recherche ont été effectués au sein de l'équipe du Professeur Benoit Déprez, sous la direction du Docteur Julie Charton, dans l'unité INSERM U1177 *Médicaments et Molécules pour Agir sur les Systèmes Vivants*.

Les expériences de pharmacodynamie *in vitro* et *in vivo* présentées dans ce manuscrit ont été réalisées et sont l'aboutissement d'une étroite collaboration avec les membres de l'équipe INSERM U1011 *Récepteurs nucléaires, Maladies Cardiovasculaires et Diabète* dirigée par le Professeur Bart Staels.

Les expériences ADME *in vitro* et *in vivo* présentées dans ce manuscrit ont été réalisées par la plateforme ADME du laboratoire (U1177).

Les expériences de perméabilité Caco-2 ont été effectuées en collaboration avec le Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique EA2465 (LBHE) de Lens dirigé par le Professeur Fabien Gosselet.

Les expériences RMN ont été effectuées au Laboratoire d'Application de Résonance Magnétique Nucléaire (LARMN) dirigé par le Professeur Nathalie Azaroual.



*« Quelqu'un m'a dit un jour :*

*Fais de ta vie un rêve.*

*J'ai pris un rêve et j'en ai fait ma vie. »*

*A la mémoire de mon grand-père, Alphonse Rouger*





## Remerciements

Je remercie tout d'abord les trois tutelles de l'unité U1177 : l'Institut Pasteur de Lille, l'INSERM, et l'Université de Lille 2 pour les différentes aides qui m'ont permis de mener à bien ce projet. Je remercie également le Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche pour avoir financé cette thèse.

### **Mesdames Muriel Amblard et Patricia Busca**

Je suis très honorée de l'intérêt que vous avez porté à ces travaux en acceptant d'en être les rapporteurs. Un merci particulier au docteur Patricia Busca pour m'avoir suivi lors de mes comités de suivi de thèse.

### **Monsieur Olivier Defert**

Je vous remercie d'apporter votre vision industrielle à ce jury de thèse en ayant accepté de juger ce travail. Merci également de l'intérêt que vous portez à ce projet depuis la thèse du Docteur Lasalle.

### **Madame Anne Tailleux**

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de juger mes travaux de recherche. Je vous remercie très sincèrement pour tous les échanges que nous avons pu avoir au cours de ces trois années.

### **Monsieur Benoit Déprez**

Je vous remercie très sincèrement d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Merci aussi pour la confiance que vous m'avez accordée en m'accueillant au sein de votre unité.

### **Madame Julie Charton**

Je vous exprime toute ma gratitude pour l'encadrement et le soutien que vous m'avez apporté durant ces quelques années. Je vous remercie d'avoir accepté de juger cette thèse.

*Ce travail de thèse est le fruit de recherches scientifiques qui n'auraient pas été possibles sans le soutien d'un grand nombre de personnes qui m'ont permis d'être épanouie dans ce domaine qu'est la découverte de molécules pour agir sur les systèmes vivants.*

*Pour cela, je souhaite tout d'abord remercier le Professeur Benoit Déprez, directeur de l'unité U1177, pour m'avoir accueillie dans son unité lors de mes stages et de ma thèse. Merci pour le partage de vos connaissances lors des réunions, pour l'environnement propice de travail que vous offrez aux membres du laboratoire et qui m'ont permis de m'épanouir pleinement dans ces locaux. Je ressors grandie de ces quelques années d'expérience à vos côtés.*

*Merci infiniment à ma directrice de thèse Julie Charton, sans qui ce travail ne pourrait exister. Merci pour la confiance et le temps que tu m'as accordés pendant ces presque 4 années à tes côtés. Merci pour ton soutien quotidien, pour tes conseils, tes connaissances et tes encouragements qui m'ont permis de développer mes compétences et mes connaissances aussi bien en chimie qu'en biologie. Merci pour ta bonne humeur, ta joie de vivre, ta sympathie, ta patience, et ta disponibilité (en particulier pour ces derniers mois de rédaction). Je ne cesserai de répéter que mon épanouissement dans ce projet est le résultat de cette collaboration avec ma directrice de thèse. Grâce à toi, cette expérience restera humainement et professionnellement inoubliable.*

*Merci à Manuel Lasalle, pour le travail que tu as réalisé avant mon arrivée en thèse, pour le travail d'équipe que nous avons partagé pendant mon stage de master 2 et ma première année de thèse, pour ta bonne humeur quotidienne, ton aide et tes conseils. Le nombre de citations de tes travaux dans ce manuscrit montre l'importance qu'a eue ton travail sur les résultats que je présente aujourd'hui.*

*Merci aux Docteurs Sylvain Picon, et Rajaa Boulahjar avec qui j'ai pris plaisir à travailler pendant ces quelques années. Vos conseils et vos expériences m'ont permis de me perfectionner.*

*A mes co-thésards Paul Hermant, Marion Prieri, Hugues Prevet, Abdallah Jeoual, et Béatrice Colin, merci pour tous les moments que nous avons pu partager ensemble ! A très vite aux 4 coins du monde ;-)*

*Un merci indéfinissable à Nathalie Dekeyne, pour toute la logistique que tu m'as aidé à gérer pendant ces trois années. Des commandes aux envois de colis, en passant par les déboires informatiques et j'en passe, tu es une gestionnaire en or !*

*Je n'oublie surtout pas nos « ADME-workers » Catherine Piveteau, Alexandre Biela et Céline Lengart ! Merci infiniment pour tout le travail que vous avez effectué pour ce projet. Que ce soit pour des expériences prévues, pour des PEGs récalcitrants, ou encore des problèmes d'HPLC divers et variés, vous avez toujours répondu présents.*

*Je remercie également tous nos collaborateurs biologistes. Merci aux membres de l'unité U1177, et en particulier Florence Leroux, Adrien Herledan, Julie Dumont, Sandrine Warengem, Cyril Couturier, et Valérie Landry, qui ont effectué les expériences de pharmacocinétiques in vivo exposées dans ce manuscrit.*

*Je remercie également tous les membres de l'unité U1011 et en particulier Anne Tailleur, Loic Belloy, Nathalie Hennuyer, Emmanuelle Vallez, Oscar Manuel Chavez-Talavera, Sophie Lestavel, Emilie Dorchie, Isabelle Duplan et Bart Staels pour toutes les expériences in vivo de sécrétion de GLP-1, de prélèvements de vésicules biliaires, et d'OGTT qui font de cette étroite collaboration et de ce manuscrit un travail abouti.*

*Merci à l'équipe du Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique de Lens et en particulier, Fabien Gosselet, Maxime Culot et Emmanuel Sévin pour les études de perméabilité membranaire sur cellules Caco-2. Ce fut un plaisir de collaborer avec vous pendant ces trois années.*

*Un merci particulier à Rebecca Deprez pour m'avoir impliquée dans la conception et l'incrémentation des fiches de l'application développée par le laboratoire (MedChem Structure Genius). Ces fiches me permettront de combler petit à petit cette part de non pharmacienne en moi !*

*Merci à tous les membres du laboratoire qui de près ou de loin m'ont aidée dans les différentes étapes de cette thèse : Terence Beghyn, Damien Bosc, Marilyne Bourotte, Ingrid Ciliberti, Geoffroy Desquirez, Marion Flipo, Ronan Gealageas, Jouda Jakhlal, Bao Vy Lam, Camille Moreau, Catalin Pintiala, Nicolas Probst, Baptiste Villemagne, et Nicolas Willand. Marion, merci pour le temps que tu as passé à solutionner les problèmes sur les flashes et la prep Varian. Baptiste et Ingrid, merci pour les nombreux dégivrages du lyophilisateur pour*

*mes scale-up et mes poubelles de produits. Et merci à tous les autres pour le partage de vos connaissances, vos conseils, et pour les séances de mots fléchés le midi dans la cuisine !*

*Merci aux stagiaires que j'ai pu encadrer à la paillasse et qui ont contribué à leur façon à ces travaux : Kevin, Romain, Victorien, Maxime, Séverine, et Stéphane.*

*Merci aux formateurs de la préparation du concours Ma thèse en 180 secondes Géraldine et Fred qui m'ont aidée à construire mon discours, me permettant d'être finaliste régionale en 2016. Ce fût une expérience extraordinaire à vos côtés.*

*Je remercie tous les membres du Photo Club de Loos avec qui j'ai pu partager passion de la photographie pendant près de deux ans.*

*A ma colocataire de début de thèse Ju', merci de m'avoir supportée tous les jours pendant près d'un an à Capinghem. Merci pour ton éternelle bonne humeur, restes telle que tu es, sportive, joyeuse, et vivement la prochaine soirée crêpes ;-)*

*A mes amies d'enfance, Hélène et Dorothée, merci pour votre soutien de toujours, je me souviens encore des moments passés en votre compagnie pendant nos années collèves... qui aurait cru qu'on en arriverait là aujourd'hui...*

*Aux Lillois Dorian, Mylène, et à la team Freeletics Lille, merci pour les moments sportifs que nous avons pu partager durant cette dernière année et qui m'ont permis d'évacuer le stress et l'énergie en trop que j'avais durant la rédaction de ce manuscrit. « No pain, no ribs » !*

*A Ludovic, Angélie, Didier, Christelle, Anémone, Enrick, Yoann, merci pour le soutien, et la bonne humeur que vous avez pu m'apporter pendant ces 3 années grâce aux soirées diverses et variées. « Mèsi on lo mes zanmís » !*

*A ma famille, à mes oncles et tantes, cousins et cousines proches ou éloignés, merci pour m'avoir accompagnée durant toutes ces années et pour votre soutien.*

*A Paul-Emmanuel, merci pour ton amitié des débuts qui s'est transformée peu à peu en une belle histoire d'amour. Merci pour ton soutien pendant ces 3 années, pour les répétitions de MT180 avec « Camille »*

*et ses bons petits plats (« Humm »). Merci de m'avoir écoutée pendant les nombreuses répétitions que j'ai pu faire. Merci pour ta patience de tous les jours lors de la rédaction de ce manuscrit, pour les « Attention, je ne veux pas t'entendre me dire que tu es en retard ! ». Merci pour tout ce que tu me fais découvrir de jour en jour. I love you...*

*A mes parents chéris, merci est un mot trop faible pour décrire ce que je ressens. Merci pour votre confiance et votre amour qui font de moi ce que je suis aujourd'hui. Malgré la distance, les déménagements à répétition (et les nombreux escaliers !) depuis près de 10 ans, vous m'avez toujours permis de réussir tous les projets que j'entreprenais. Merci à Maman pour les relectures de phrases qui n'en finissent pas ! Merci pour votre soutien de tous les jours. Je vous aime.*

*A mon petit frère Franck, merci pour ton soutien (ainsi que celui d'Amélie) et nos rares entrevues pendant ces dernières années... La vie sans toi n'aurait pas été la même : un petit frère à dorloter, à embêter, et surtout à envier lorsqu'il fallait se mettre aux devoirs ! Je suis fière de toi.*

*A Mamie, pour l'amour inconditionnel que tu me portes chaque jour, et pour ton soutien à chaque grande étape de ma vie. Merci pour ta contribution à cette rédaction grâce aux corrections de fautes d'orthographe. Je suis l'unique petite fille d'une grand-mère unique. Je t'aime.*

*Une pensée toute particulière à mon Papi pour terminer ces remerciements. C'est un peu grâce à toi que je suis qui je suis professionnellement. Je reste convaincue au plus profond de moi que tu serais une des personnes les plus fières de me voir réussir ! Alors MERCI...*



## Liste des publications et communications

### Publications :

- ✓ Impact of PEGylation on Pharmacokinetic Properties: Structure-Properties Relationships of PEG-modified Agonists of the Bile Acid Receptor TGR5, Hoguet V. *et al.*, *En cours de rédaction*.
- ✓ Topical intestinal aminoimidazole agonists of TGR5 promote GLP-1 secretion and improve glucose tolerance. Lasalle M., Hoguet V., Hennuyer N., Leroux F., Piveteau C., Belloy L., Lestavel S., Vallez E., Dorchies E., Duplan I., Sevin E., Culot M., Gosselet F., Boulahjar R., Herledan A., Staels B., Deprez B., Tailleux A., Charton J., *Journal of Medicinal Chemistry*, **2017**, 60 (10), 4185-4211. (Co-first author)
- ✓ Access to newly functionalized imidazole derivatives : efficient synthesis of novel 5-amino-2-thioimidazoles using propylphosphonic anhydride (T3P), Lasalle M., Picon S., Boulahjar R., Hoguet V., Van Obbergen J., Roussel P., Deprez B., Charton J., *Tetrahedron Letters*, **2015**, Vol. 56, 1011–1014.

### Brevets :

- ✓ Novel dihydropyridinone and dihydropyrimidinone compounds and their use, Charton J., Deprez B., Boulahjar R., Leroux F., Hoguet V., Staels B., Tailleux A., Hennuyer N., Belloy L., PCT/EP2017/052308 (**2017**). (Co-author)
- ✓ Novel 5-amino-2-thioimidazole compounds and their use, Charton J., Deprez B., Hoguet V., Lasalle M., Leroux F., Staels B., Tailleux A., Hennuyer N., Belloy L., PCT/EP2016/071415 (**2016**). (Co-author)

### Communications orales :

- ✓ Optimization and development of novel topical intestinal agonists of the bile acid receptor TGR5 for treatment of type 2 diabetes and associated metabolic diseases, Hoguet V., Lasalle M., Tailleux A., Hennuyer N., Belloy L., Leroux F., Piveteau C., Staels B., Deprez B., Charton J., *5<sup>th</sup> annual meeting of the GDR 3545 GPCR-PhysioMed*, Tours, **2016**.
- ✓ Concours “Ma thèse en 180 secondes”, Optimisation de nouveaux agonistes topiques du récepteur aux acides biliaires TGR5, Finaliste régionale Nord/Pas-de-Calais, Lille, **2016**.

Posters :

- ✓ Development of novel topical intestinal agonists of the bile acid receptor TGR5 for treatment of type 2 diabetes, Hoguet V., Lasalle M., Tailleux A., Hennuyer N., Belloy L., Leroux F., Piveteau C., Staels B., Deprez B., Charton J., *1<sup>st</sup> Research Day of the Faculty of Pharmacy of Lille*, Lille, **2017**. (Best Poster Award)
- ✓ Development of novel topical intestinal agonists of the bile acid receptor TGR5 for treatment of type 2 diabetes, Hoguet V., Lasalle M., Tailleux A., Hennuyer N., Belloy L., Leroux F., Piveteau C., Staels B., Deprez B., Charton J., *24<sup>th</sup> Young Research Fellow Meeting*, Châtenay-Malabry, **2017**. (Best Poster Award)
- ✓ Optimization and development of novel topical intestinal agonists of the bile acid receptor TGR5 for treatment of type 2 diabetes and associated metabolic diseases, Hoguet V., Lasalle M., Tailleux A., Hennuyer N., Belloy L., Leroux F., Piveteau C., Staels B., Deprez B., Charton J., *5<sup>th</sup> annual meeting of the GDR 3545 GPCR-PhysioMed*, Tours, **2016**.
- ✓ Structure-Properties Relationships of PEGylated Small Molecules Agonists of TGR5, Hoguet V., Lasalle M., Piveteau C., Leroux F., Herledan A., Biela A., Belloy L., Hennuyer N., Boulahjar R., Sevin E., Culot M., Gosselet F., Staels B., Tailleux A., Deprez B., Charton J., *52<sup>nd</sup> International Conference on Medicinal Chemistry*, Caen, **2016**.
- ✓ Pharmacokinetic study of topical intestinal compounds, Hoguet V., Lasalle M., Piveteau C., Leroux F., Herledan A., Biela A., Belloy L., Hennuyer N., Boulahjar R., Sevin E., Culot M., Gosselet F., Staels B., Tailleux A., Deprez B., Charton J., *23<sup>rd</sup> Young Research Fellow Meeting*, Lille, **2016**. (flash poster)
- ✓ Discovery and structure-activity relationships of a new class of agonists of the bile acid receptor TGR5, Boulahjar R., Belloy L., Picon S., Hoguet V., Hennuyer N., Lasalle M., Leroux F., Piveteau C., Sevin E., Culot M., Gosselet F., Staels B., Deprez B., Tailleux A., Charton J., *23<sup>rd</sup> Young Research Fellow Meeting*, Lille, **2016**.
- ✓ Optimization and development of novel topical intestinal agonists of the bile acid receptor TGR5 for treatment of diabetes mellitus and associated metabolic diseases, Lasalle M., Tailleux A., Hennuyer N., Belloy L., Piveteau C., Herledan A., Hoguet V., Leroux F., Gras-Masse H., Staels B., Deprez B., Charton J., *18<sup>th</sup> SCI/RSC Medicinal Chemistry Symposium*, Cambridge, **2015**.



## Sommaire

<b>Avant-propos</b> .....	<b>5</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>9</b>
<b>Liste des publications et communications</b> .....	<b>15</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>17</b>
<b>Table des abréviations</b> .....	<b>23</b>
A. Général .....	23
B. Chimie.....	25
<b>Introduction</b> .....	<b>27</b>
<b>I. Le diabète</b> .....	<b>29</b>
A. Généralités .....	29
B. Traitements actuels.....	31
C. Focus sur la voie incrétine <sup>7,8</sup> .....	32
1. Généralités.....	32
2. Le GLP-1 et ses effets biologiques .....	33
3. Intérêt de cibler la voie incrétine dans le traitement du diabète de type 2 .....	36
<b>II. Le récepteur membranaire aux acides biliaires TGR5</b> .....	<b>37</b>
A. Les acides biliaires .....	37
B. Découverte et caractérisation de TGR5 .....	38
C. Expression du récepteur TGR5 .....	40
D. Effets biologiques et applications thérapeutiques potentielles d'agonistes de TGR5 .....	41
E. Les agonistes de TGR5 .....	44
1. Dérivés d'acides biliaires .....	44
2. Produits naturels et dérivés de produits naturels.....	47
3. Produits synthétiques (non stéroïdiens) .....	50
4. Conclusion .....	51
<b>III. Agonistes de TGR5 à visée tissulaire ciblée</b> .....	<b>53</b>
A. Stratégies pour l'obtention de composés non absorbés .....	53
1. Composés pro-drogues.....	53
2. Composés « soft drug » .....	54

3.	Composés à action topique intestinale .....	55
a.	Composés très polaires et/ou encombrés : stratégie « kinétophore ».....	56
b.	Composés très lipophiles et peu solubles.....	58
4.	Formulation des composés pour une libération intestinale .....	58
5.	Conclusion .....	59
B.	Stratégie « kinétophore » appliquée à l'obtention d'agonistes de TGR5 à visée topique intestinale .....	60
<b>IV.</b>	<b>Optimisation du pharmacophore .....</b>	<b>63</b>
A.	Identification de nouvelles structures agonistes de TGR5.....	63
B.	Modifications de la position 4 de l'imidazole .....	68
1.	Synthèse des composés.....	69
2.	Evaluation <i>in vitro</i> .....	70
C.	Conclusion sur l'optimisation du pharmacophore.....	71
<b>V.</b>	<b>Optimisation du kinétophore.....</b>	<b>73</b>
A.	Conception et synthèse d'agonistes topiques intestinaux de TGR5.....	74
1.	Conception et synthèse de composés PEGylés .....	74
a.	Introduction sur les polyéthylènes glycols .....	74
b.	Synthèses d'analogues PEGylés .....	76
i.	Synthèse de composés PEGylés avec un lien éther .....	77
ii.	Synthèse de composés PEGylés avec un espaceur biphenyl-amide.....	80
iii.	Synthèse de composés PEGylés avec un espaceur fonctionnalisé par une amine ou un ammonium .....	82
iv.	Synthèse de composés PEGylés avec un espaceur amide inversé .....	84
c.	Caractérisation des composés PEGylés .....	84
2.	Conception et synthèses de composés anioniques à pH physiologique.....	88
a.	Etat de l'art.....	88
b.	Synthèses de composés fonctionnalisés par des groupements sulfonates .....	89
i.	Composés mono-sulfonates.....	89
ii.	Composé disulfonate.....	91
c.	Synthèse de composés fonctionnalisés par un acide carboxylique.....	92
i.	Composé acide carboxylique .....	93

ii.	Composé diacide carboxylique .....	93
3.	Conception et synthèses de composés cationiques à pH physiologique .....	96
a.	Etat de l'art.....	96
b.	Synthèses de composés fonctionnalisés par une amine tertiaire et des ammoniums ... .....	97
4.	Conception et synthèse d'un composé zwitterionique.....	99
a.	Etat de l'art.....	99
b.	Synthèse d'un composé zwitterionique .....	99
5.	Conception et synthèses de composés dimériques .....	102
a.	Etat de l'art.....	102
b.	Synthèse de composés dimériques .....	103
i.	Dimères présentant un lien de type polyéthylène glycol .....	103
ii.	Dimère présentant un lien protonable à pH physiologique .....	104
6.	Conception et synthèse de composés fonctionnalisés par des polyols .....	105
a.	Etat de l'art.....	105
b.	Synthèse de composés fonctionnalisés par des groupements polyols .....	106
i.	Composés couplés à la glucamine/N-méthylglucamine .....	106
ii.	Composés couplés à la N-méthylglucamine via un lien alkyle ou PEG .....	107
iii.	Composé couplé à un polyol acide.....	108
7.	Conclusion sur la synthèse des composés.....	109
B.	Evaluation <i>in vitro</i> des composés synthétisés .....	110
1.	Evaluation biologique <i>in vitro</i> des composés présentant un kinétophore de type polyéthylène glycol (PEG) .....	110
a.	Influence du bras espaceur.....	110
b.	Influence de la longueur de chaîne polyéthylène glycol (composés <b>13</b> à <b>16</b> ).....	111
c.	Influence du sens de la liaison amide .....	112
d.	Impact du lien fonctionnalisé avec une amine ou un ammonium .....	113
e.	Conclusion sur les activités des composés PEGylés.....	114
2.	Evaluation biologique <i>in vitro</i> des composés présentant un kinétophore anionique à pH physiologique .....	116
3.	Evaluation biologique <i>in vitro</i> des composés présentant un kinétophore cationique .....	118

4. Evaluation biologique <i>in vitro</i> des composés présentant un kinétophore zwitterionique.	120
5. Evaluation biologique <i>in vitro</i> des composés dimères	121
6. Evaluation biologique <i>in vitro</i> des composés présentant un kinétophore polyol	122
7. Conclusion sur les activités <i>in vitro</i> des composés sur le récepteur TGR5	123
C. Etudes des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	125
1. Etude de la solubilité et de la lipophilie (logD)	125
2. Etude de la perméabilité	130
3. Stabilité microsomale	138
4. Etude des propriétés pharmacocinétiques <i>in vivo</i>	143
a. Composés fonctionnalisés par un groupement PEG	143
b. Composé <b>21</b> fonctionnalisé par un groupement sulfonate	149
c. Conclusion sur l'étude des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	151
D. Etudes pharmacodynamiques <i>in vivo</i>	153
1. Etude pharmacodynamique <i>in vivo</i> du composé polyol <b>32</b>	154
2. Etude pharmacodynamique <i>in vivo</i> des composés PEGylés	157
a. Composé <b>15</b>	157
b. Composé <b>14</b>	159
3. Etude pharmacodynamique <i>in vivo</i> du composé sulfonate <b>21</b>	160
a. Résultats préliminaires obtenus par le Docteur Lasalle	160
b. Resynthèse à plus grande échelle du composé <b>21</b> pour des études chez l'animal	165
c. Etudes pharmacodynamiques dans un modèle murin de diabète de type 2	168
4. Conclusion sur les études pharmacodynamiques <i>in vivo</i>	171
<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>173</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>177</b>
<b>Table des illustrations</b>	<b>189</b>
Table des figures	189
Table des tableaux	195
<b>Partie expérimentale</b>	<b>197</b>
A. Chemistry	197

1. Molecules table .....	197
2. Abbreviations.....	198
3. General informations.....	198
a. Synthesis .....	198
b. Analysis .....	198
c. Purifications .....	199
4. General Procedures .....	200
5. Pharmacophore optimization.....	203
6. Compounds with PEGylated kinetophores.....	218
7. Compounds with anionic kinetophores .....	246
8. Compounds with cationic kinetophores.....	261
9. Compounds with zwitterionic kinetophores .....	264
10. Dimers .....	265
11. Compounds with polyol kinetophores.....	271
B. Compound evaluation .....	278
1. Sample analysis – LCMS/MS Method .....	278
2. Physicochemical properties.....	278
a. Solubility.....	278
b. Log D.....	278
3. In vitro TGR5 assay .....	279
4. ADME .....	279
a. Caco-2 experiment.....	279
b. Microsomal stability experiment .....	280
c. In vivo pharmacokinetics experiments .....	281
5. In vivo experiments .....	281
a. Animals and diets.....	281
b. GLP-1 secretion .....	282
c. Gallbladder volume measurement .....	282
d. OGTT.....	282



## Table des abréviations

### A. Général

ADME	Absorption, Distribution, Métabolisation, Elimination
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
AUC	Aire sous la courbe
CA	Acide cholique
Caco-2	Lignée cellulaire de cancer colorectal
CCK	Cholescystokinine
CDCA	Acide chénodéoxycholique
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CHO	Chinese Hamster Ovary
Cl <sub>int</sub>	Clairance intrinsèque
CREB	C-AMP Response Element-Binding protein
DCA	Acide déoxycholique
DIO	Diet-induced obesity
DIO2	Déiodinase de type 2 (D2)
DPP-IV	DiPeptidyl Peptidase 4
EC50	Concentration efficace 50
FDA	Federal Drug Administration
FXR	Farsenoid X Receptor
GIP	Glucose-Dependant Insulinotropic Peptide
GLP-1	Glucagon-Like Peptide 1
GLP-1R	Récepteur au Glucagon-Like Peptide 1
HbA1c	Hémoglobine glyquée A1c
HEK293	Human embryonic kidney 293
HFD	High Fat Diet
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IBAT	Ileal Bile acid Trasporter - ASBT (Apical Sodium-dependant Bile Acid Transporter)
IPGTT	Intraperitoneal Glucose Tolerance Test
LCA	Acide Lithocholique
LCMS	Chromatographie Liquide couplée à un spectromètre de masse
LPS	Lipopolysaccharides
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales
MRP2	Multidrug Resistance-associated Protein 2
NASH	Stéatohépatite non-alcoolique
NCEs	New Chemical Entities

## Table des abréviations

NO	Oxyde Nitrique
OGTT	Oral Glucose Tolerance Test
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OXM	Oxyntomoduline
P <sub>app</sub>	Perméabilité apparente
PC 1/3	Prohormone convertase 3
P-gp	Glycoprotein P - MDR1 (Multi-Drug Resistance protein 1)
PKA	Protein Kinase A
PSA	Polar Surface Area
PYY	Peptide YY
Rho123	Rhodamine 123
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SGLT2	Sodium/Glucose co-transporteur 2
t <sub>1/2</sub>	Temps de demi-vie
TGR5	Takeda G protein coupled Receptor 5
UDCA	Acide Urodéoxycholique
VB	Vésicule biliaire



## B. Chimie

Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyle
CCE	Chromatographie sur Couche Epaisse
DCC	Dicyclohexylcarbodiimine
DCU	Dicyclohexylurée
DIBAL-H	Hydruure de diisobutylaluminium
DIEA	Diisopropyléthylamine
DME	Diméthoxyétane
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDCI	1-éthyl-3-[3-(diméthylamino) propyl]carbodiimide
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle
HCOOH	Acide formique
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
$I_p$	Indice de polydispersité
$M_n$	Masse moléculaire moyenne en nombre
$M_p$	Masse moléculaire la plus probable
$M_w$	Masse moléculaire moyenne en masse
PEG	Polyéthylène glycol
T3P	Anhydride d'acide propylphosphonique
TCDI	Thiocarbonyldiimidazole
THF	Tétrahydrofurane

## Table des abréviations

## Introduction

Les modifications du mode de vie actuel dans les pays industrialisés (sédentarité, surnutrition) ont conduit à une augmentation de la prévalence du diabète de type 2 et de ses complications métaboliques. Les chiffres prévisionnels alarmants ont poussé l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à qualifier cette pathologie d'« épidémique ».

Le diabète de type 2, dit non-insulinodépendant, représente 90% des cas de diabète. Il se caractérise par une résistance à l'insuline, et donc à une mauvaise utilisation du glucose par l'organisme. Cette résistance entraîne la production accrue d'insuline par les cellules pancréatiques conduisant à un épuisement du pancréas et aboutissant à terme à une insulino-pénie. Malgré l'existence d'un grand nombre d'outils thérapeutiques, les traitements actuels ne permettent souvent pas un abaissement suffisant du glucose sanguin et/ou sont souvent associés à des effets secondaires, dont des épisodes d'hypoglycémie, des problèmes gastro-intestinaux, une prise de poids corporel et une perte d'efficacité au cours du temps.

La production d'insuline en réponse à une prise alimentaire n'est pas le seul effet responsable de la régulation de la glycémie. En effet, différentes hormones sécrétées au niveau du tractus gastro-intestinal préparent l'organisme à la digestion. Dans l'intestin, des hormones jouant ce rôle sont importantes : le Glucose independent Insulinotropic Peptide (GIP), le Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1), le Glucagon-Like Peptide 2 (GLP-2), l'Oxyntomoduline (OXM) et le peptide YY (PYY). Le GLP-1 est une hormone sécrétée par les cellules entéroendocrines L de l'intestin et exerce ses effets sur divers tissus et organes. Le GLP-1 induit une augmentation de la production d'insuline au niveau pancréatique, diminue la production hépatique de glucose, diminue l'appétit et ralentit la vidange gastrique. Ces différents effets permettent une meilleure utilisation des nutriments par l'organisme et montrent l'intérêt de ce système incrétine dans un traitement antidiabétique.

D'ailleurs, parmi les traitements pharmacologiques utilisés actuellement pour le diabète de type 2, les inhibiteurs de la DiPeptidylPeptidase IV (DPP-IV) et les incrétinomimétiques sont deux classes pharmacologiques qui ciblent le système incrétine. La DPP-IV est l'enzyme responsable de la demi-vie très courte du GLP-1 et les incrétinomimétiques sont des peptides agonistes du récepteur au GLP-1, résistants à la dégradation par la DPP-IV. Le système incrétine étant un moyen puissant de régulation de la glycémie, une nouvelle stratégie émergente s'intéresse à la stimulation de la sécrétion de GLP-1 endogène. L'obtention d'agonistes du récepteur membranaire sensible aux acides biliaires TGR5, est une stratégie prometteuse pour atteindre cet effet sécrétagogue.

TGR5 est un récepteur membranaire découvert en 2002-2003 dont les ligands naturels sont les acides biliaires. L'expression de TGR5 étant ubiquitaire, son activation est à l'origine de divers effets biologiques. Au niveau des cellules entéroendocrines L intestinales, l'activation de TGR5 conduit à l'augmentation de la sécrétion de GLP-1. En plus de ces effets bénéfiques sur l'homéostasie du glucose, TGR5 joue également un rôle positif dans l'homéostasie énergétique, au niveau du tissu adipeux brun et des muscles. Ces effets renforcent l'intérêt croissant de l'industrie pharmaceutique pour le développement d'agonistes de TGR5, pour le traitement du diabète de type 2 et de ses complications métaboliques. Cependant, des études dans des modèles précliniques d'agonistes systémiques de TGR5 ont révélé des effets indésirables, comme une augmentation de la vésicule biliaire, ou encore du prurit.

Une stratégie, pour l'obtention d'agonistes n'induisant pas ces effets secondaires, consiste à concevoir des composés, non systémiques, ayant une distribution contrôlée limitée à l'intestin. La modulation des propriétés physicochimiques, conduisant à l'obtention de composés très polaires ou au contraire très lipophiles, ou bien encore à haut poids moléculaire, font parties des stratégies permettant de limiter cette absorption intestinale. Des médicaments, sur le marché, utilisent déjà ces diverses approches pour obtenir des composés qui n'exposent pas ou peu la circulation systémique, dans le cadre d'applications thérapeutiques variées.

Ainsi, l'objectif de cette thèse est de répondre à la problématique suivante : un agoniste topique intestinal du récepteur TGR5 peut-il avoir un effet sur l'homéostasie du glucose, sans déclencher les effets secondaires connus des agonistes systémiques de TGR5 ?

Je commencerai par présenter brièvement le contexte de la pathologie d'intérêt, et nous nous intéresserons plus particulièrement au rôle de la voie incrétine, dans le traitement du diabète de type 2. Puis je présenterai le récepteur TGR5 et un état de l'art des agonistes de ce récepteur décrits dans la littérature. Les différentes techniques utilisées dans la littérature pour obtenir des composés à action ciblée dans l'intestin seront ensuite détaillées. Je présenterai alors la stratégie « kinétophore » mise en œuvre avec la conception, la synthèse et l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de composés fonctionnalisés par divers groupements kinétophores.

## I. Le diabète

Depuis une trentaine d'années, la sédentarité et la surnutrition ont provoqué une augmentation de l'incidence de l'obésité dans les pays industrialisés avec un risque accru de développer d'autres maladies métaboliques comme l'hypertension artérielle, les dyslipidémies ou encore le diabète de type 2. Malgré l'existence d'un grand nombre d'outils thérapeutiques, il subsiste un très grand besoin médical pour les maladies métaboliques et notamment pour le diabète de type 2<sup>1</sup>.

### A. Généralités

Le diabète, défini par une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L, est caractérisé par une mauvaise utilisation du glucose sanguin par l'organisme et apparaît lorsque le pancréas ne produit plus assez d'insuline ou quand le corps humain n'arrive plus à utiliser cette insuline efficacement.

Le diabète est une pathologie qui atteint des proportions qualifiées « d'épidémiques » par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Alors qu'en 1980, le nombre de diabétiques était estimé à 108 millions<sup>2</sup>, en 2015, cette maladie touche près de 10% de la population mondiale, soit 415 millions de personnes. Les prévisions pour 2040 sont alarmantes avec une croissance de 65% de la population diabétique représentant près de 650 millions de personnes. Le diabète de type 2 est actuellement la 5<sup>ème</sup> cause de décès dans le monde d'après les dernières estimations de l'OMS (Figure 1)<sup>3,4</sup>.

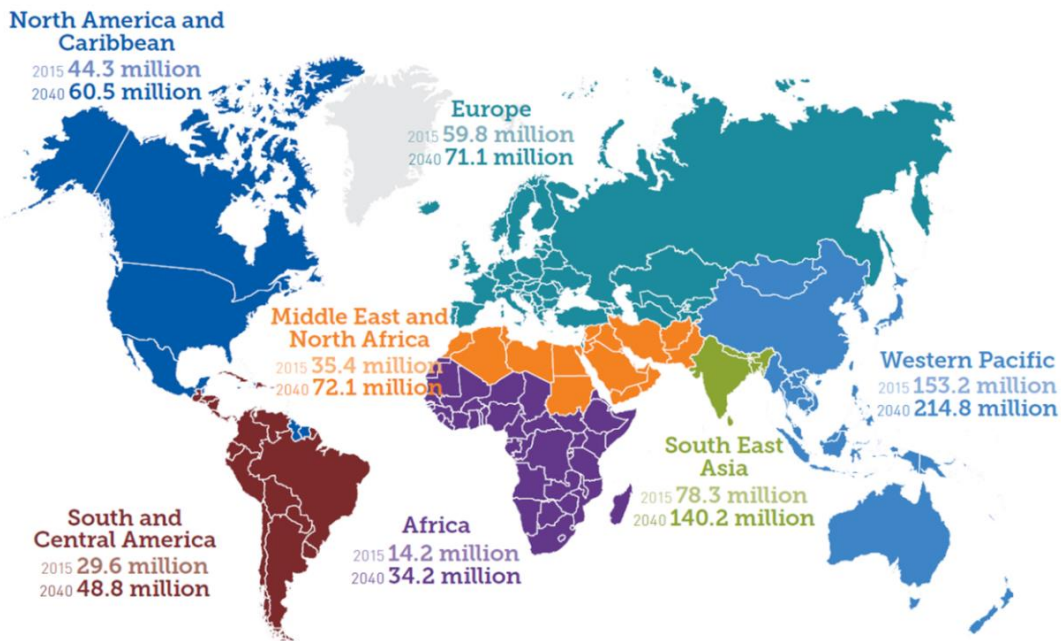


Figure 1 : Estimation du nombre de personnes diabétiques à travers le monde en 2015 et les prévisions pour 2040 (20 - 79 ans)<sup>3</sup>

Il existe 3 principaux types de diabète :

- Le diabète de type 1, dit insulinodépendant, caractérisé par une hyperglycémie due à une déficience du pancréas à produire l'insuline. Les patients doivent alors subir des injections quotidiennes d'insuline pour réguler leur glycémie.
- Le diabète de type 2, dit non-insulinodépendant, caractérisé par une résistance à l'insuline et une mauvaise utilisation du glucose par l'organisme.
- Le diabète gestationnel correspondant à une hyperglycémie apparaissant pendant la grossesse et pouvant donner suite à un diabète de type 2.

Nous ne nous intéresserons dans ce travail qu'au diabète de type 2 et à ses complications métaboliques.

Parmi les 415 millions de malades, 91% ont un diabète de type 2 et en plus s'ajouterait 193 millions de personnes qui ne sont pas encore diagnostiquées diabétiques et seraient donc susceptibles de développer des complications liées à cette pathologie<sup>3</sup>. Quel que soit le type de diabète, si la pathologie n'est pas contrôlée, le taux de mortalité élevé (5 millions en 2015) est principalement dû à une toxicité vasculaire. En effet, l'atteinte au niveau macrovasculaire entraîne des complications cardiovasculaires, première cause de décès dans le monde. Les maladies cardiovasculaires qui accompagnent le diabète sont des arrêts cardiaques, des maladies artérielles périphériques ou encore des insuffisances cardiaques. Des facteurs comme l'hypertension ou un taux de cholestérol élevé contribuent à l'augmentation du risque de développer des maladies cardiovasculaires. Au niveau microvasculaire, les complications sont nombreuses et peuvent atteindre les yeux (cécité), les reins (néphropathie), les nerfs (neuropathie) ou les pieds (pied diabétique). Toutes ces complications sont résumées en Figure 2.

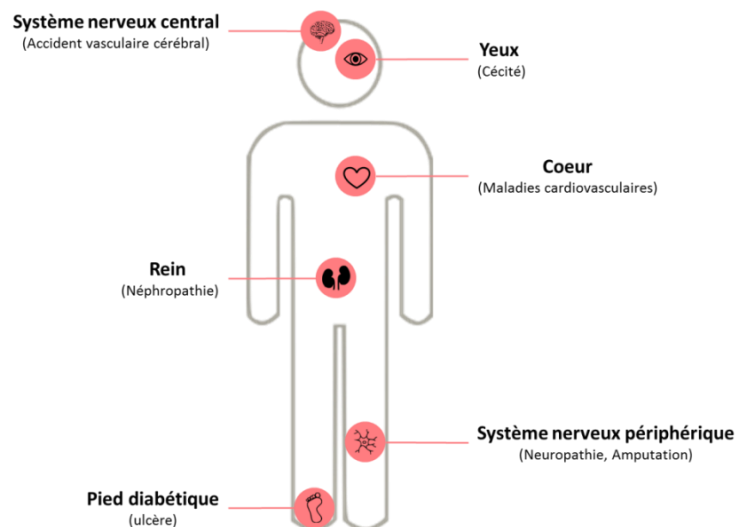


Figure 2 : Complications majeures du diabète<sup>3</sup>

## **B. Traitements actuels**

La prévention et le traitement du diabète ont pris un essor considérable depuis la découverte de l'insuline par Frederick Banting et Charles Best en 1921, et ont permis le développement très rapide de traitements permettant d'augmenter de façon très importante l'espérance de vie des patients<sup>5</sup>. Les traitements pharmacologiques actuellement mis en place pour pallier à cette insuffisance de l'organisme à gérer le taux de glucose sanguin consistent à atteindre un contrôle glycémique satisfaisant :

- une glycémie à jeun comprise entre 0,7 et 1,3 g/L,
- une glycémie postprandiale (1 à 2h après le repas) inférieure à 1,8 g/L,
- et un pourcentage d'hémoglobine glyquée, reflet de la glycémie sur une longue période (2 à 3 mois), inférieure à 7% (HbA1c).

Le traitement de première intention pour cette pathologie consiste à mettre en place des mesures hygiéno-diététiques. Ces dernières vont entraîner une modification des habitudes de vie comme une modification de l'alimentation ou encore l'activité physique. Ces mesures hygiéno-diététiques conduisent à une perte de poids d'au moins 5% pour les patients en surpoids. La pratique de sport ou encore une alimentation équilibrée et saine peuvent permettre d'empêcher des modifications trop importantes de la glycémie, mais également prévenir l'apparition de diverses complications. Il arrive que la mise en place de ces mesures hygiéno-diététiques ne suffise pas à réguler le taux de glucose sanguin. Dans ce cas, les médecins utilisent alors un algorithme de traitement pour permettre la diminution du taux d'HbA1c (Figure 3)<sup>6</sup>.

Le traitement à la metformine est mis en place très rapidement après le dépistage, en plus des mesures hygiéno-diététiques. Si le pourcentage d'hémoglobine glyquée fixé n'est pas atteint au bout de trois mois, une combinaison de la metformine avec un des six traitements proposés pour la double thérapie est donnée au patient. Le choix de la classe de médicament est décidé en fonction des caractéristiques de cette dernière, mais également en fonction de l'objectif fixé et des effets secondaires plus ou moins importants qu'elle peut générer. De la même façon, si au bout de trois mois supplémentaires le taux d'HbA1c n'est pas diminué, une triple combinaison est envisagée. Chez certains patients, la combinaison de trois agents anti-hyperglycémiques ne permet pas un abaissement suffisant du taux de glucose sanguin conduisant à l'administration d'insuline.

## Le diabète

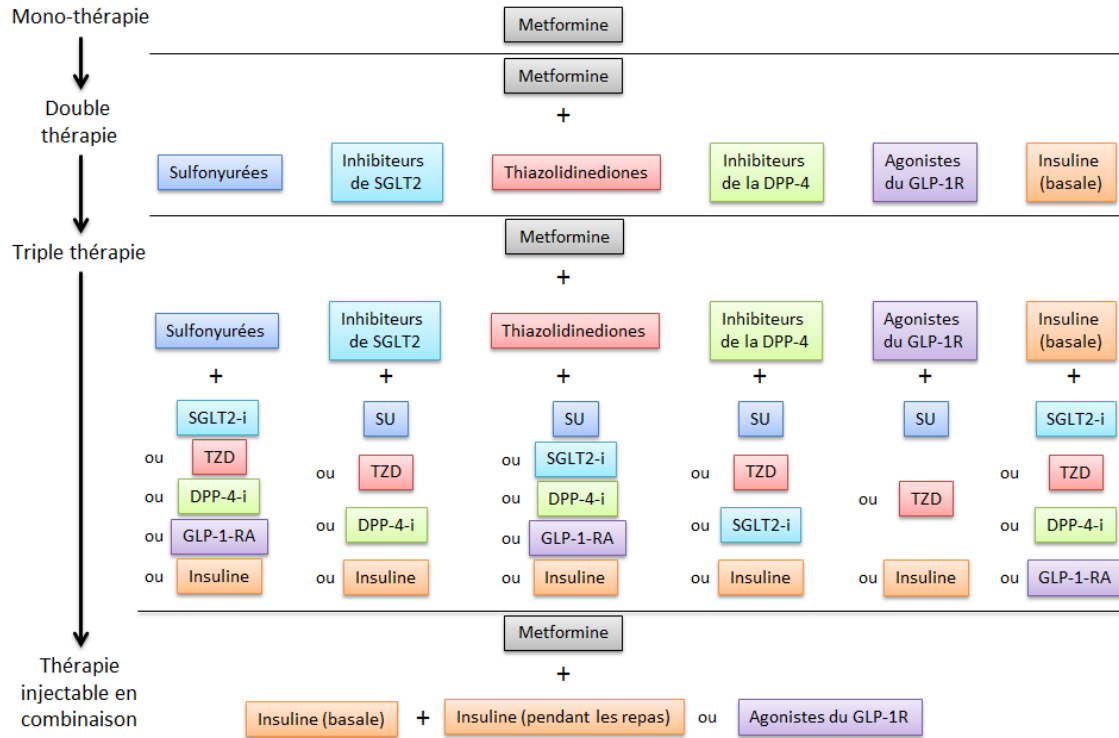


Figure 3 : Algorithme de traitement (SGLT2-i : inhibiteurs de SGLT-2, SU : sulfonylurées, TZD : thiazolidinediones, DPP-4-i : inhibiteurs de la DPP-4, GLP-1-RA : Agonistes du récepteur au GLP-1)

Cependant, les traitements actuels ne permettent pas toujours un abaissement suffisant du taux de glucose sanguin. Ils sont souvent associés à des effets secondaires, dont des épisodes hypoglycémiques, des problèmes gastro-intestinaux, une prise de poids corporel et une perte d'efficacité au cours du temps qui entraînent une diminution de l'observance chez les patients. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter le diabète de type 2, afin de rétablir le contrôle glycémique s'attaquant également aux déséquilibres métaboliques sous-jacents.

### C. Focus sur la voie incrétine<sup>7, 8</sup>

#### 1. Généralités

Les incrétines sont des hormones libérées par l'intestin en réponse à une prise alimentaire. Le concept d'incrétine a été décrit dans les années 1930 pour exposer les observations indiquant que l'administration de glucose par voie orale était associée à une plus forte augmentation de la sécrétion d'insuline par rapport à une administration par voie intraveineuse<sup>9</sup>. L'effet incrétine compte pour près de 50% de la sécrétion d'insuline totale, caractérisant ces incrétines d'insulinothropiques de façon strictement glucose-dépendantes<sup>10</sup>.



Il existe deux hormones incrétines : le GIP (Glucose-Dependant Insulinotropic Peptide) et le GLP-1 (Glucagon-Like Peptide 1). Le GIP est un peptide de 42 acides aminés issu d'un processus post-transcriptionnel du proGIP par la prohormone convertase 1/3 (PC 1/3) dans les cellules entéroendocrines K. Le GLP-1, peptide composé de 30 acides aminés, est le produit du clivage post-transcriptionnel du gène du proglucagon par la PC 1/3 dans les cellules entéroendocrines L intestinales<sup>11</sup>. Le GLP-1 actif est généré à partir du GLP-1(1-37) et existe sous deux formes : le GLP-1(7-37) et le GLP-1(7-36)amide. Ce dernier représente la majorité du GLP-1 plasmatique<sup>12</sup>. Tous ces peptides contiennent une alanine en position 2 et sont très rapidement dégradés par la DiPeptidylPeptidase IV (DPP-IV), enzyme de la famille des sérines protéases, responsable de la demi-vie très courte du GLP-1 (1 à 2 min)<sup>13</sup>. En plus de cette rapide inactivation par la DPP-IV, ces hormones incrétines sont également rapidement excrétées par les reins ( $t_{1/2} \sim 5$  min).

## 2. Le GLP-1 et ses effets biologiques

Le GLP-1 est un peptide sécrété par les cellules entéroendocrines L intestinales qui représentent environ 1% des cellules épithéliales intestinales et sont majoritairement présentes dans la partie distale de l'intestin<sup>14</sup>. Il exerce ses effets, *via* l'activation de son récepteur (GLP-1R), dans de nombreux tissus et types cellulaires comme les ilots pancréatiques, le système nerveux central et périphérique, le tractus gastro-intestinal, le cœur, les reins et le foie.

Le GLP-1 entraîne des effets divers au niveau du pancréas : l'effet majeur de cette incrétine est son effet insulinothrompique, puisqu'il induit une libération d'insuline glucose-dépendante par les cellules  $\beta$  pancréatiques. En effet, il a été démontré qu'en présence de l'antagoniste du GLP-1R, l'exendine 9-39, la sécrétion d'insuline en réponse à une prise alimentaire était supprimée<sup>15</sup>. De plus, le GLP-1 induit une diminution de la sécrétion de glucagon par les cellules  $\alpha$  pancréatiques par action directe du GLP-1 sur son récepteur à la surface de ces cellules, et également par action indirecte, résultant d'un effet paracrine du GLP-1 sur les cellules  $\beta$  et  $\delta$  (augmentation de la sécrétion de somatostatine par les cellules  $\delta$ )<sup>16</sup>. Le GLP-1 améliore également la prolifération des cellules  $\beta$  et inhibe leur apoptose *via* le gène Pdx-1 et la réduction de l'expression de caspase-3<sup>12</sup>.

D'autres effets ont également été reportés :

- dans le cerveau : l'administration de GLP-1 conduit à une augmentation de la sensation de satiété, une diminution de l'appétit favorisant la perte de poids, et un effet neuroprotecteur sur les cellules neuronales<sup>17, 18</sup>.

- au niveau gastro-intestinal : le GLP-1 ralentit la vidange gastrique et la sécrétion gastrique acide en réponse à une prise alimentaire, *via* des mécanismes complexes induisant ainsi une diminution de la motilité intestinale<sup>16</sup>.
- au niveau cardiaque : l'effet protecteur et anti-apoptotique du GLP-1, cité pour les cellules pancréatiques, est également retrouvé dans les cellules cardiaques<sup>16</sup>. De plus, le GLP-1 conduit à une amélioration des fonctions cardiovasculaires comme la pression artérielle dans des modèles pathologiques<sup>16</sup>.
- dans le tissu adipeux : le GLP-1 stimule l'absorption de glucose et la lipolyse<sup>16</sup>.
- au niveau rénal : le GLP-1 provoque des réponses natriurétiques et diurétiques associées avec une augmentation de la filtration glomérulaire<sup>16</sup>.

Tous ces effets, que je viens de décrire, sont résumés dans la Figure 4 ci-après.

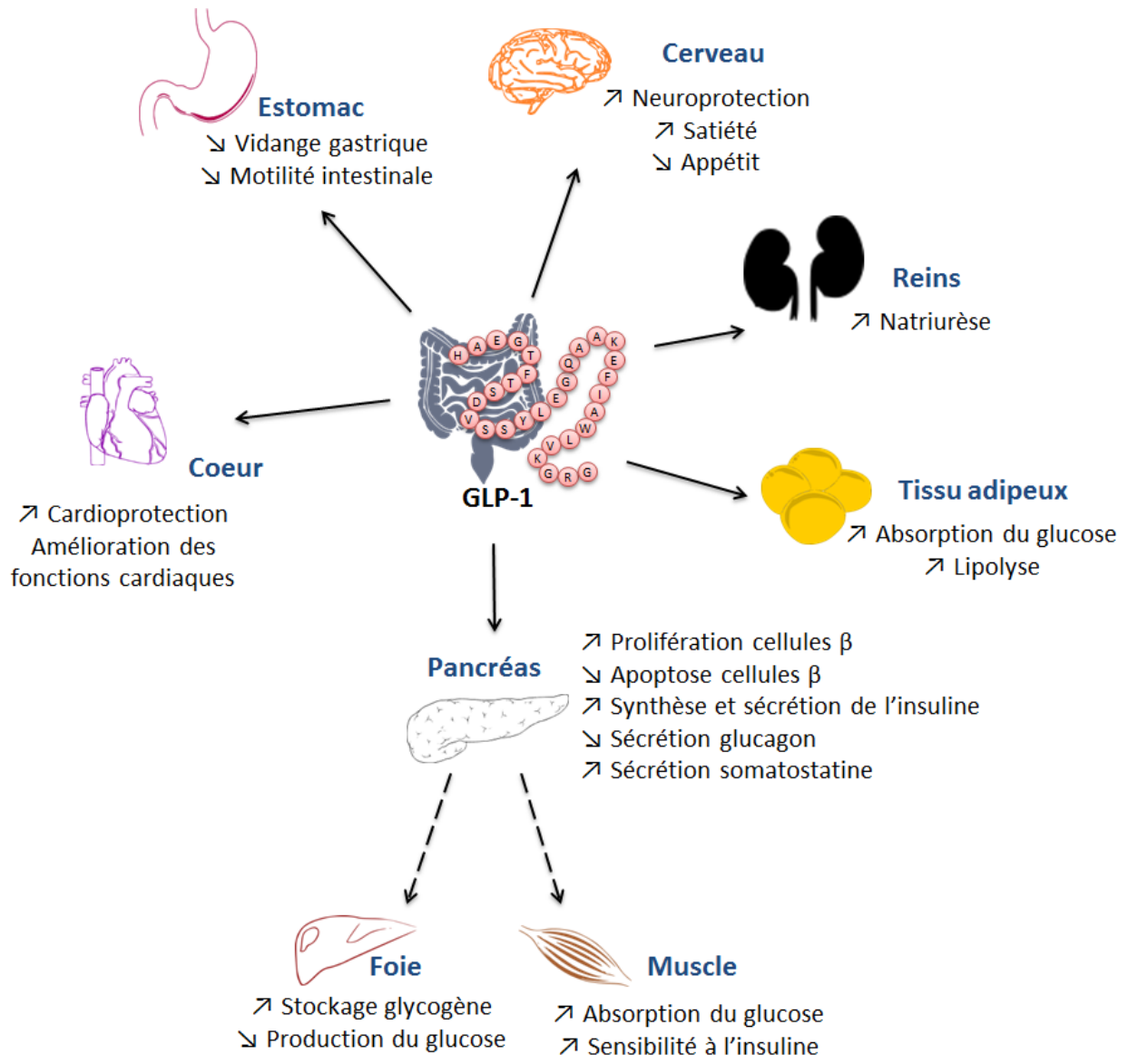


Figure 4 : Effets biologiques du GLP-1

### 3. Intérêt de cibler la voie incrétine dans le traitement du diabète de type 2

Tout d'abord, cibler la voie incrétine permet d'avoir des effets positifs sur la régulation de la glycémie (augmentation de la sécrétion d'insuline, diminution de la sécrétion de glucagon, diminution de la vidange gastrique, augmentation de la sensation de satiété...). En plus de ces effets, le GLP-1 a un effet neutre ou bénéfique sur le poids et préserve les fonctions pancréatiques, cardiaques et rénales.

Parmi les traitements pharmacologiques utilisés actuellement pour le diabète de type 2, les inhibiteurs de la DiPeptidylPeptidase IV et les incrétinomimétiques sont deux classes pharmacologiques ciblant le système incrétine. Cependant, malgré une bonne tolérance des inhibiteurs de DPP-4, l'efficacité de cette classe pharmacologique reste moyenne. Les agonistes du récepteur au GLP-1 sont administrés par voie injectable ce qui diminue l'observance et le confort des patients.

Le système incrétine étant un moyen puissant de régulation de la glycémie, une stratégie émergente s'intéresse à la stimulation de la sécrétion de GLP-1 endogène par activation de récepteurs couplés aux protéines G localisés dans l'intestin. Dans ce contexte, l'obtention d'agonistes du récepteur membranaire aux acides biliaires TGR5 est une stratégie prometteuse pour atteindre cet effet GLP-1 sécrétagogue.

## II. Le récepteur membranaire aux acides biliaires TGR5

Le récepteur membranaire TGR5 (Takeda G-protein coupled Receptor 5), aussi appelé GPBAR-1 (G-Protein coupled Bile Acid Receptor 1) est un récepteur couplé aux protéines G, décrit en 2002-2003 par deux équipes japonaises<sup>19, 20</sup>.

Les ligands naturels de ce récepteur étant les acides biliaires, je vais brièvement m'intéresser à leurs rôles avant de caractériser le récepteur TGR5.

### A. Les acides biliaires

Les acides biliaires sont synthétisés à partir du cholestérol dans le foie *via* un processus enzymatique. La première étape induit des modifications sur le cycle stéroïdien puis, des modifications sur la chaîne latérale sont effectuées pour donner les acides biliaires primaires : l'acide cholique et l'acide chénodéoxycholique. Dans le foie, ces acides biliaires sont conjugués à la taurine (majoritairement chez la souris) ou la glycine (majoritairement chez l'homme). Les acides biliaires primaires subissent ensuite une réaction de 7 $\alpha$ -déshydroxylation par les enzymes bactériennes intestinales pour donner les acides biliaires secondaires (acide lithocholique et acide déoxycholique, provenant respectivement de l'acide cholique et chénodéoxycholique). Les acides biliaires (95%) sont réabsorbés, *via* le transporteur ASBT (Apical Sodium-dépendant Bile Acid Transporter ou IBAT – Ileal Bile acid Transporter), dans l'iléon pour retourner vers le foie. Les acides biliaires qui n'auraient pas été réabsorbés vont l'être de façon passive dans le colon ou éliminés dans les fèces. Ce cycle entérohépatique, ou cycle de Schiff qui comprend la synthèse, le transport et l'élimination des acides biliaires, est essentiel pour le maintien d'une concentration constante d'acides biliaires et l'homéostasie du cholestérol (Figure 5)<sup>21</sup>.

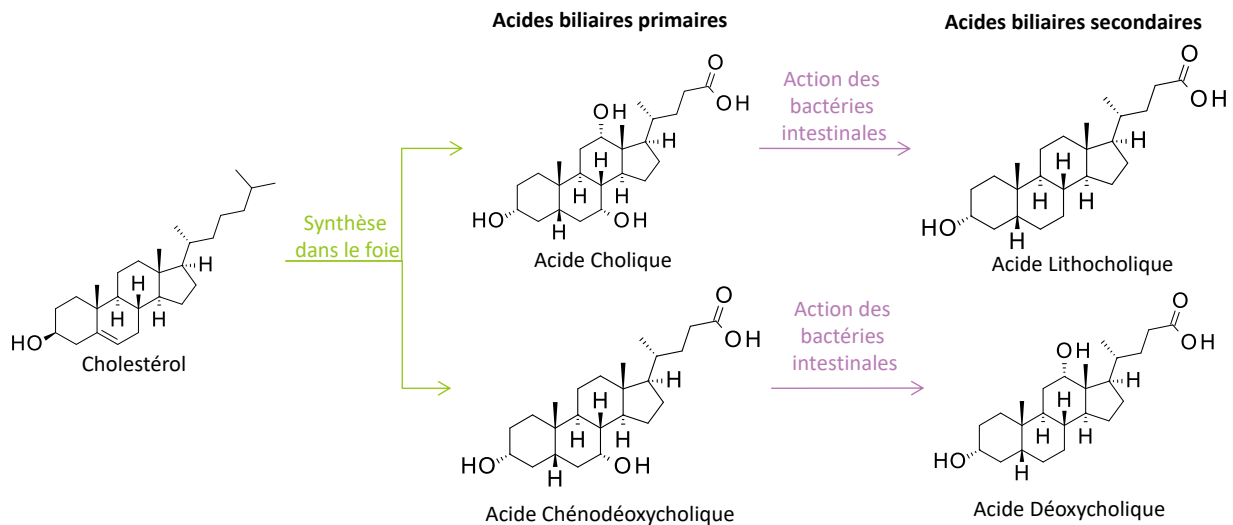


Figure 5 : Biosynthèse des acides biliaires primaires et secondaires

Les acides biliaires sont des molécules amphipathiques comportant un noyau stéroïde. Lors du cycle entérohépatique, ils vont être excrétés par la bile dans le duodénum par contraction de la vésicule biliaire en réponse à la cholecystokinine (CCK). La structure chimique des acides biliaires leur permet de jouer un rôle très important dans la solubilisation et l'absorption des graisses alimentaires.

En plus de leurs propriétés tensio-actives, les acides biliaires ont un rôle de signalisation en agissant sur deux types de récepteurs :

- des récepteurs nucléaires : en 1999, le récepteur FXR (Farnesoid X Receptor) a été identifié comme cible des acides biliaires. Fortement exprimé dans le foie, l'intestin, et les reins, FXR a de nombreux effets et en particulier un effet sur l'homéostasie des acides biliaires *via* la régulation de nombreux gènes impliqués dans la synthèse, la conjugaison et le transport de ces derniers<sup>22, 23</sup>.
- un récepteur membranaire couplé aux protéines G est également décrit comme étant activé par les acides biliaires : le récepteur TGR5 (Takeda G Protein-coupled Receptor 5), également appelé GPBAR1, M-BAR ou GPR131<sup>19, 20</sup>.

## **B. Découverte et caractérisation de TGR5**

Deux équipes japonaises ont découvert en 2002-2003 un récepteur membranaire couplé aux protéines G, de classe A, le récepteur TGR5 (famille des récepteurs Rhodopsin-like)<sup>19, 20</sup>. TGR5 possède moins de 34% d'identité avec la famille des Rhodopsin-like et constitue donc à lui seul une famille de récepteur<sup>24</sup>. Le récepteur TGR5 humain possède respectivement 82, 83, 86 et 90% d'identité avec les récepteurs de rat, souris, bœuf et lapin<sup>19</sup>.

Dans le but de découvrir les ligands naturels de ce récepteur, un criblage a été effectué sur une lignée cellulaire CHO (Chinese Hamster Ovary), co-transfectées par le récepteur TGR5 humain et par le gène codant pour la luciférase permettant de détecter la capacité des composés testés à activer TGR5. Le résultat du criblage a montré que les acides biliaires endogènes induisaient de façon rapide et dose-dépendante la production intracellulaire d'AMPc (Figure 6A)<sup>19</sup>. Ces courbes dose-réponse permettent de classer les acides biliaires en fonction de leur puissance ou DE<sub>50</sub> (dose efficace 50). La puissance d'activation de TGR5 par les acides biliaires endogènes est la suivante : acide lithocholique LCA (0,53 µM) > acide déoxycholique DCA (1,01 µM) > acide chénodéoxycholique CDCA (4,43 µM) > acide cholique CA (7,72 µM). On remarque que l'activité des acides biliaires croît avec l'hydrophobicité de ces derniers. Le LCA a ensuite été considéré comme composé de référence pour les études de relations structure-activité dans la littérature.

De plus, l'analyse de dérivés du cholestérol suggère que les groupements hydroxyles ainsi que la structure acide 5 $\beta$ -cholanique sont importants pour maintenir l'activité des agonistes sur TGR5, puisque seule la prégnandione possède une activité sur le récepteur (Figure 6B)<sup>19</sup>. Les acides biliaires étant aussi des ligands du récepteur nucléaire FXR, des agonistes de ce dernier ont également été testés et ne montrent aucune activité sur TGR5 (exemple du TTNPB – acide (E)-([tétrahydratétraméthyl-naphthalényl]propyl)benzoïque). Il est donc possible de dissocier l'activité des ligands de TGR5 vis-à-vis du récepteur FXR.

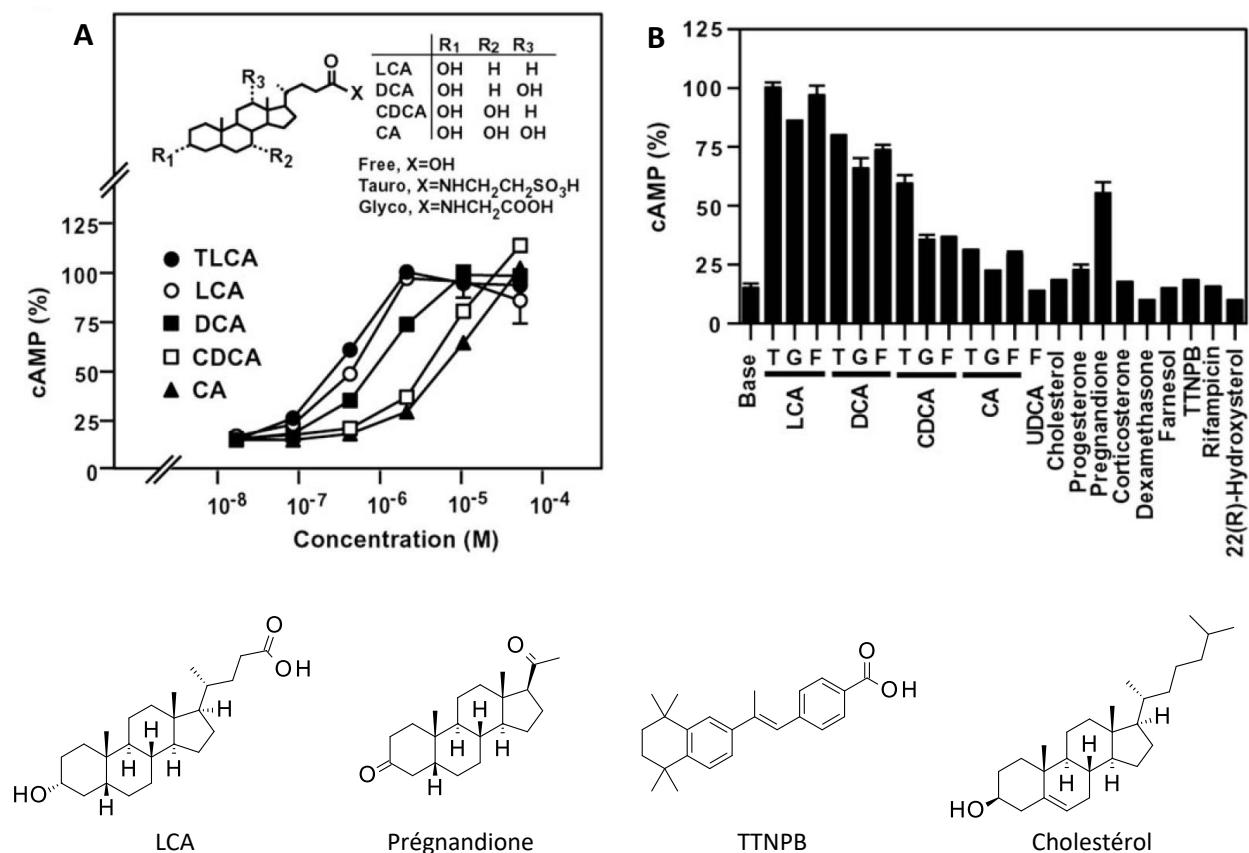


Figure 6 : (A) Courbe dose réponse de la production d'AMPc induite par les acides biliaires. (B) Production d'AMPc pour les acides biliaires et les dérivés du cholestérol. T, tauro-conjugué; G, glyco-conjugué; F, libre; UDCA, acide ursodeoxycholique; TTNPB, acide (E)-([tétrahydratétraméthyl-naphthalényl]propyl)benzoïque<sup>19</sup>

**C. Expression du récepteur TGR5**

L'expression du récepteur TGR5 est ubiquitaire chez de nombreux mammifères. Chez l'homme, il est majoritairement présent dans le cœur, les muscles, la rate, le foie, l'intestin, les reins, le placenta, les poumons<sup>19</sup>. Au niveau cellulaire, TGR5 est exprimé dans les monocytes et macrophages<sup>19, 25</sup>, dans les cellules entéroendocrines intestinales<sup>20</sup>, dans les cholangiocytes<sup>26</sup>, dans les ganglions spinaux<sup>27</sup>, dans les cellules endothéliales du foie<sup>28</sup> et également dans les cellules épithéliales de la vésicule biliaire (Figure 7)<sup>29</sup>.

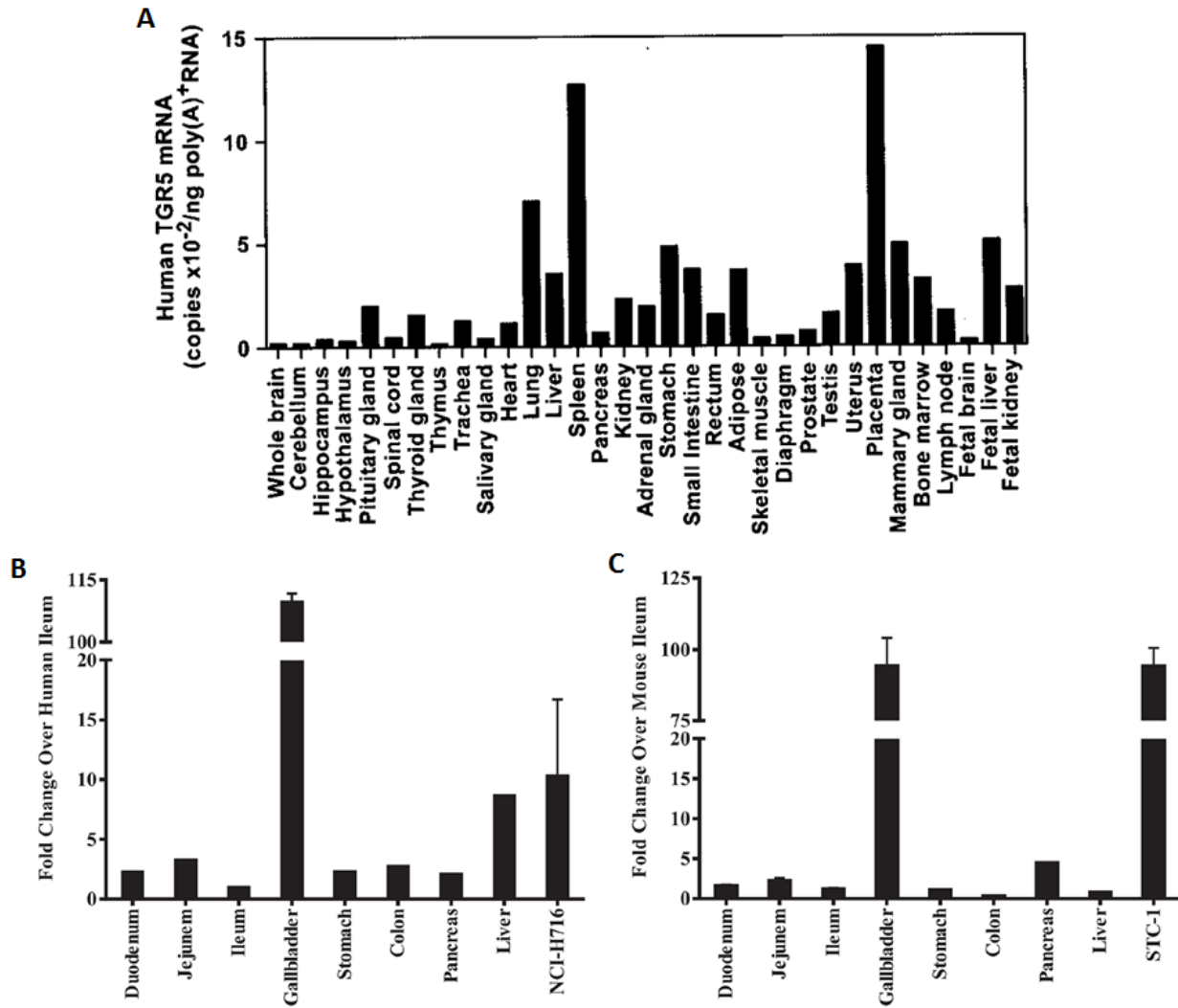


Figure 7 : (A) Expression de TGR5 chez l'homme<sup>19</sup>, (B) Expression de TGR5 chez l'homme rapporté à l'iléon<sup>30</sup>, (C) Expression de TGR5 chez la souris rapporté à l'iléon<sup>30</sup>



#### **D. Effets biologiques et applications thérapeutiques potentielles d'agonistes de TGR5**

La liaison des acides biliaires au récepteur TGR5 active de nombreuses voies de signalisation impliquées notamment dans le métabolisme, l'inflammation et la fibrose. L'activation de TGR5 dans les différents tissus et types cellulaires suivants conduit à son internalisation puis à l'activation de l'adénylate cyclase, provoquant l'augmentation de la concentration intracellulaire en Adénosine MonoPhosphate cyclique (AMPc), à l'origine de divers effets biologiques<sup>31</sup>.

- Dans les cellules immunitaires :

Dans les monocytes et les macrophages, la stimulation de TGR5 conduit à une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (interleukines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) et du facteur de nécrose tumorale TNF- $\alpha$ <sup>32</sup>. Cette diminution des facteurs d'inflammation a été montrée comme présentant un intérêt dans le traitement de pathologies inflammatoires comme l'athérosclérose ou la maladie de Crohn<sup>32</sup>.

- Au niveau du système nerveux :

Dans le système nerveux entérique, qui contrôle le système digestif, l'activation de TGR5 induit l'inhibition de la contraction intestinale, provoque un retardement de la vidange gastrique et un ralentissement du transit intestinal *via* la relaxation des muscles lisses<sup>33</sup>. Ces effets sur la motilité de l'intestin pourraient être bénéfiques, en plus de l'effet anti-inflammatoire présenté ci-dessus, dans le cadre de la prise en charge des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

Dans les neurones sensoriels, l'action d'agonistes de TGR5 induit l'excitation intrinsèque de ces neurones à l'origine de la transmission de la douleur et de démangeaisons<sup>27, 34</sup>.

- Dans le foie et la vésicule biliaire :

Dans les cellules endothéliales sinusoidales, l'activation de TGR5 conduit à une cascade de signalisation provoquant la synthèse d'oxyde nitrique (NO), vasodilatateur, et pourrait donc avoir un effet bénéfique dans le cadre d'hypertension artérielle<sup>35</sup>.

Il a également été montré que TGR5 joue un rôle anti-apoptotique et protecteur contre l'inflammation induite par les lipopolysaccharides (LPS) *in vitro* et *in vivo* par diminution de la production de facteurs pro-inflammatoires dans les cellules de Kupffer<sup>35</sup>.

Enfin, l'activation de TGR5 au niveau des cellules épithéliales de la vésicule biliaire conduit à deux effets. Comme cité précédemment, TGR5 a un effet sur la contractilité des

muscles lisses. Au niveau de la vésicule biliaire, l'activation de TGR5 dans les cellules musculaires lisses conduit à la relaxation des muscles lisses à l'origine d'une augmentation du volume de la vésicule biliaire<sup>36</sup>. Par ailleurs, l'activation de TGR5, dans les cellules épithéliales, induit également la sécrétion de chlorures, *via* la stimulation du canal CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), et donc une augmentation du flux biliaire<sup>35</sup>.

L'utilisation d'agonistes du récepteur TGR5 aurait donc un potentiel dans le traitement de maladies hépatiques comme la stéatohépatite non alcoolique (NASH) par réduction de l'inflammation, ou encore, dans la cirrhose biliaire primitive (PBC) *via* l'effet anti-apoptotique et la régulation du flux biliaire<sup>37</sup>. Cependant, les effets sur la vésicule biliaire pourraient être un frein dans le développement de traitements de nombreuses pathologies.

- Dans les muscles et le tissu adipeux brun :

Dans le tissu adipeux brun et les muscles, l'activation de TGR5 augmente la dépense énergétique, *via* une augmentation de la thermogénèse. Cet effet métabolique dépend de l'augmentation de l'expression de l'enzyme déiodinase de type 2 (DIO2), qui convertit la thyroxine inactive T4 en 3,5,3'-tri-iodothyronine T3 active, et augmente ainsi le métabolisme de base et la consommation en oxygène<sup>38</sup>. Cet effet est particulièrement intéressant pour le traitement du surpoids et de l'obésité.

- Dans les cellules entéroendocrines L intestinales :

Les cellules entéroendocrines L intestinales co-sécrètent divers peptides : les hormones incrétines glucagon-like peptide 1 et 2 (GLP-1, GLP-2), l'oxyntomoduline (OXM) et le peptide tyrosine-tyrosine (PYY).

Il a été montré que l'activation de TGR5 par les acides biliaires provoque une augmentation de la sécrétion de GLP-1 dans les cellules intestinales STC-1<sup>39</sup>. Les deux peptides GLP-1 et GLP-2 étant co-sécrétés, une augmentation de la concentration en GLP-2 est également attendue, suite à une activation de TGR5 au niveau des cellules L.

Le GLP-2 joue également un rôle dans l'homéostasie énergétique. Il diminue la motilité gastro-intestinale permettant ainsi une augmentation de l'absorption des nutriments<sup>40</sup>. Au niveau neuronal, le récepteur au GLP-2 est exprimé dans des régions clés du cerveau, et son activation induit une diminution de la prise alimentaire, ou encore, une diminution de la production hépatique de glucose<sup>40</sup>.

Le peptide YY (dont la sécrétion a également été montrée, suite à l'activation de TGR5 par des agonistes) et l'oxyntomoduline ont également des effets bénéfiques sur la régulation du

ponds corporel, par diminution de la prise alimentaire et augmentation de la sensation de satiété, mais aussi par augmentation de la dépense énergétique<sup>41, 42</sup>.

La sécrétion de toutes ces hormones, suite à l'activation de TGR5 dans les cellules entéroendocrines L intestinales, est donc très intéressante pour le traitement du diabète, de l'obésité et des complications métaboliques associées comme la dyslipidémie. De plus, l'effet intestintrophique du GLP-2 est également utilisé dans le traitement de maladies inflammatoires de l'intestin comme le syndrome de l'intestin court avec le Teduglutide (analogue du GLP-2)<sup>40</sup>.

Tous ces effets sont résumés en Figure 8 : en bleu sont représentés les effets bénéfiques de l'activation de TGR5 dans les différents organes/tissus/types cellulaires et en rouge les effets non souhaités de son activation.

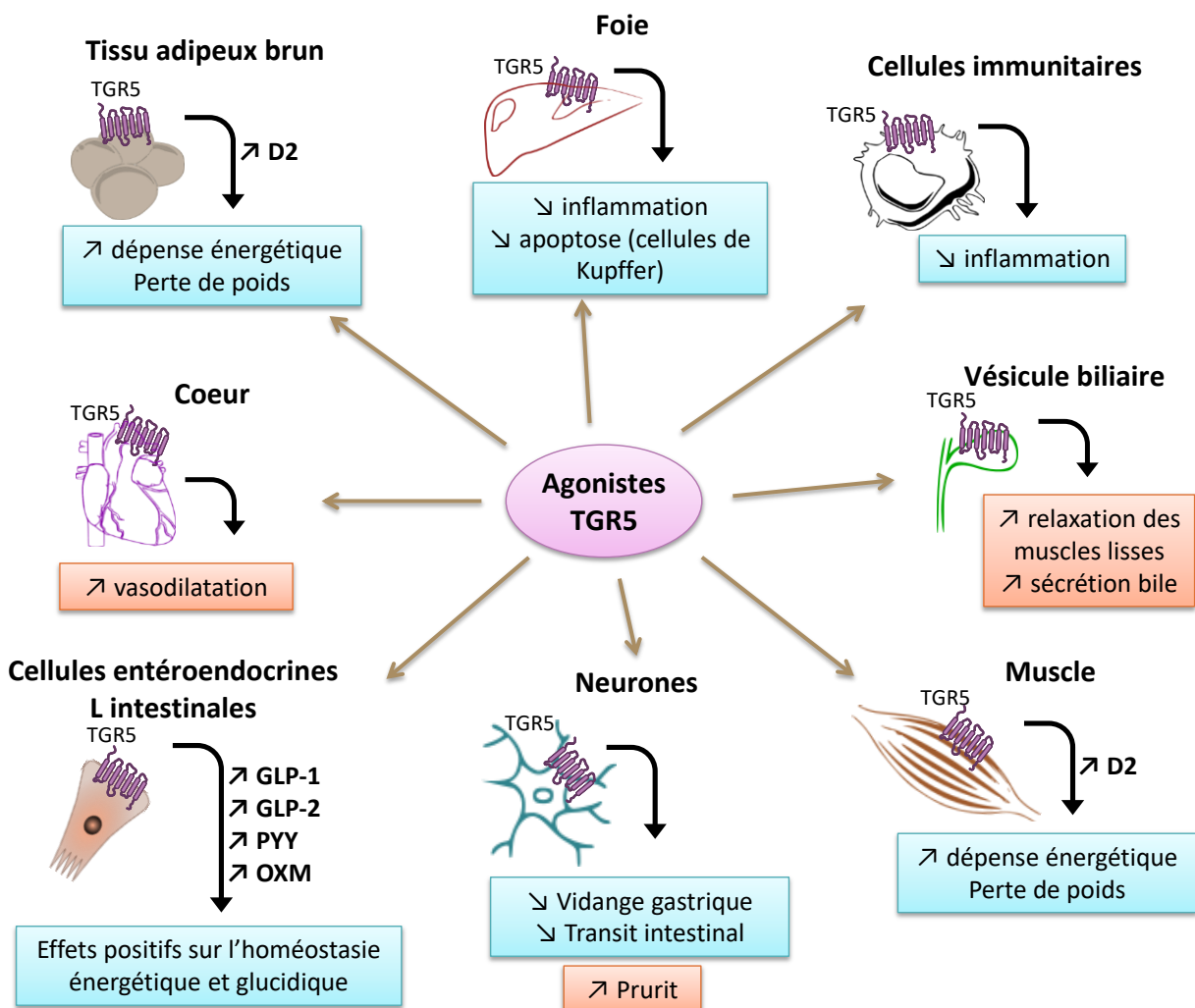


Figure 8 : Effets biologiques de TGR5

En raison de ces divers effets biologiques, on observe un intérêt croissant de l'industrie pharmaceutique pour TGR5, cible thérapeutique prometteuse pour plusieurs pathologies, comme le diabète de type 2 et ses complications métaboliques<sup>43</sup>, ou certaines maladies inflammatoires.

## E. Les agonistes de TGR5

Depuis la découverte du récepteur TGR5 et de ses ligands endogènes, les acides biliaires, de nombreuses équipes de recherches académiques et industrielles ont dirigé leurs efforts vers le développement de ligands de TGR5 puissants, sélectifs et avec un profil pharmacocinétique approprié, dans le but d'évaluer leurs effets biologiques et thérapeutiques.

Les nombreux criblages de bibliothèques de produits naturels ou synthétiques ont conduit à l'identification de divers composés agonistes de TGR5. Ces composés ont ensuite été modifiés afin de permettre d'augmenter l'affinité pour la cible thérapeutique et d'améliorer également leur profil pharmacocinétique. En fonction de leur structure chimique, les ligands de TGR5 peuvent être classés comme composés stéroïdiens ou non stéroïdiens. Je vais à présent faire un état de l'art des composés, naturels et synthétiques qui ont été décrits comme agonistes de TGR5 pour le traitement des maladies métaboliques<sup>44, 45</sup>.

### 1. Dérivés d'acides biliaires

Les études de relations structure-activité de composés, dérivés d'acides biliaires, effectuées sur le récepteur FXR, ont permis de découvrir que l'introduction d'un groupement méthyle en position 23 de l'acide chénodéoxycholique (CDCA) conduisait à un composé actif sur TGR5 et sélectif vis-à-vis du récepteur nucléaire FXR (TGR5  $EC_{50} = 3,58 \mu M$  versus FXR  $EC_{50} > 100 \mu M$ ). Puis l'introduction d'un groupement éthyle en position 6 du CDCA a permis d'augmenter considérablement l'activité sur TGR5 ( $EC_{50} = 0,095 \mu M$ ) mais également sur FXR ( $EC_{50} = 11,80 \mu M$ ). Dans le but d'obtenir un composé plus sélectif vis-à-vis de FXR et avec de meilleures propriétés pharmacocinétiques, ces deux modifications ont été introduites sur la structure de l'acide cholique (CA) pour donner l'INT-777 avec une activité sur le récepteur TGR5 de  $0,82 \mu M$  et avec une perte totale de l'activité sur FXR. La stabilité supérieure de l'INT-777 par rapport à l'acide cholique est liée à l'alkylation de la position 6, provoquant un encombrement stérique, et empêchant ainsi le processus de  $7\alpha$ -déshydroxylation par les bactéries intestinales (Figure 9)<sup>46</sup>.

Suite à des études de modélisation QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) de ligands de type acides biliaires sur le récepteur TGR5, un brevet a été déposé en 2014 pour revendiquer l'activité sur le récepteur TGR5 du composé 23(S)-méthyl-LCA pour lequel la

configuration *S* du carbone 23 est encore une fois importante pour que la molécule se fixe dans le site de liaison du récepteur (Figure 9)<sup>47</sup>.

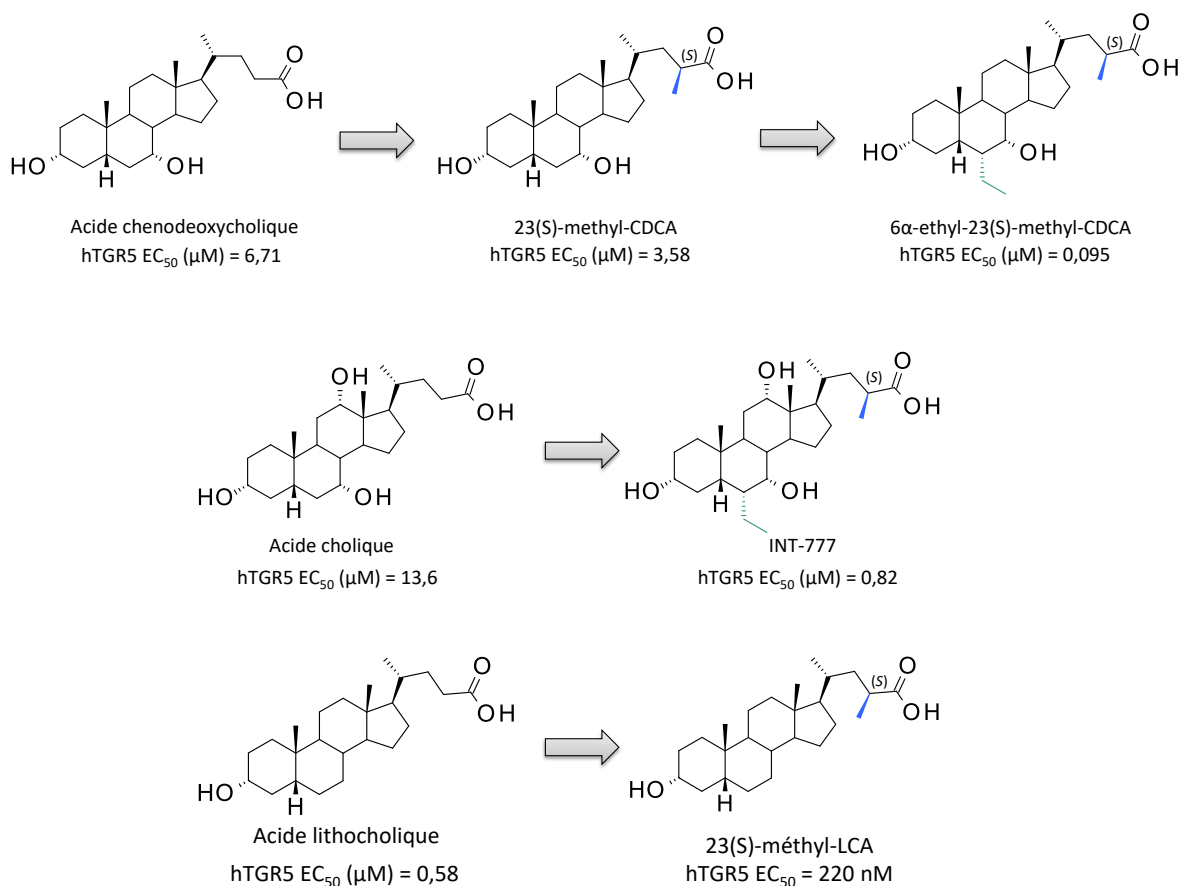
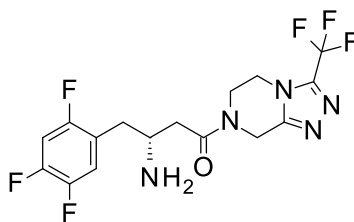


Figure 9 : Structures de dérivés d'acides biliaires

Le composé INT-777, dérivé de l'acide cholique, a fait l'objet d'études plus poussées sur l'effet GLP-1 sécrétagogue et sur la tolérance au glucose. En effet, l'administration en aigu du composé INT-777 a montré une augmentation de la sécrétion de GLP-1 *in vivo* chez des souris C57Bl6 TGR5<sup>+/+</sup> en combinaison avec un inhibiteur de DPP-4, la sitagliptine (Figure 10)<sup>43</sup>.



Sitagliptine – Inhibiteur de la DPP-IV

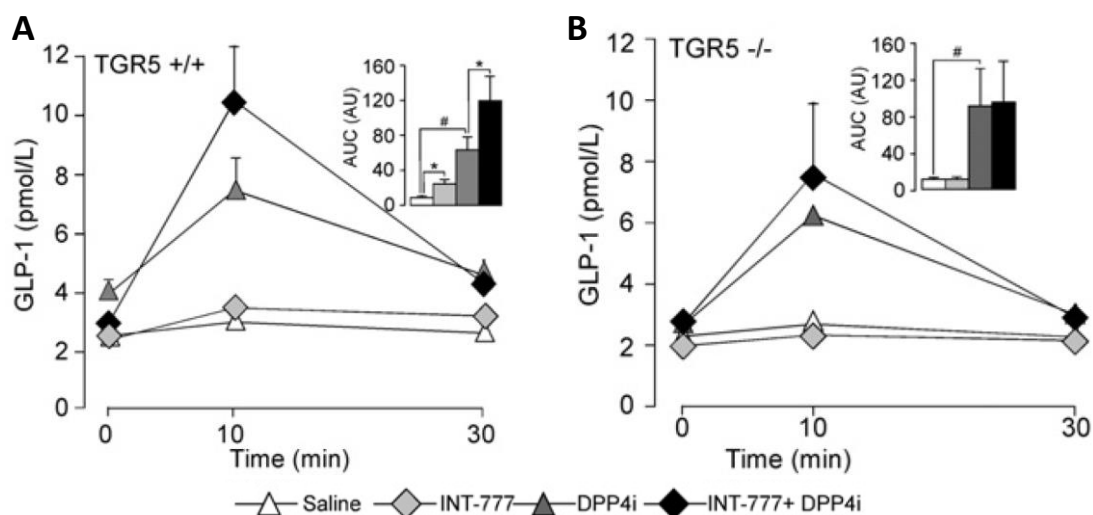


Figure 10 : GLP-1 plasmatique chez des souris TGR5<sup>+/+</sup> (A) et TGR5<sup>-/-</sup> (B) après administration du composé INT-777 (30 mg/kg) seul ou en combinaison avec un inhibiteur de DPP-4 (Sitagliptine, 3 mg/kg)<sup>43</sup>

Puis, un traitement de 8 semaines, sur des souris C57Bl6 rendues obèses et insulino-résistantes avec un régime hyper-lipidique (High Fat Diet), a montré une augmentation de la tolérance au glucose, avec le composé INT-777, à une dose journalière de 30 mg/kg durant un test de tolérance au glucose (OGTT) (Figure 11A)<sup>43</sup>. Cependant, ce composé entraîne une augmentation du volume de la vésicule biliaire d'un facteur 2 chez les souris traitées par rapport au groupe véhicule. Cet effet, supprimé chez des souris TGR5<sup>-/-</sup>, est TGR5-dépendant (Figure 11B)<sup>36</sup>.

## Le récepteur TGR5

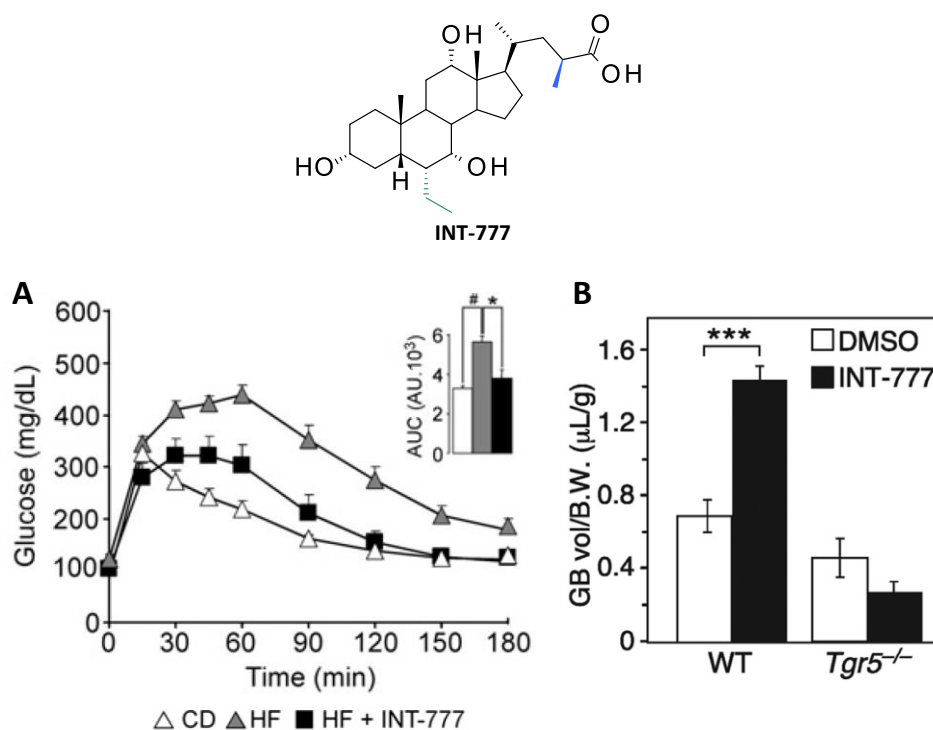


Figure 11 : (A) OGTT chez des souris C57Bl6/J mâles (HFD) traitées avec l'INT-777 (30 mg/kg/jour) pendant 8 semaines<sup>43</sup>  
(B) Volumes des vésicules biliaires rapportées au poids corporel chez des souris TGR5<sup>+/+</sup> ou TGR5<sup>-/-</sup> 30 minutes après l'administration de l'INT-777 (60 mg/kg) ou du DMSO (contrôle)<sup>36</sup>

Parmi tous les agonistes de type stéroïdien identifiés et développés, peu ont été poussés dans des phases de tests précliniques. Le composé INT-777 est, à l'heure actuelle, le composé dérivé d'acide biliaire le plus décrit dans la littérature.

## 2. Produits naturels et dérivés de produits naturels

La découverte de produits naturels en tant que solutions thérapeutiques a pris un essor considérable depuis la découverte de la pénicilline, il y a 75 ans. En 2013, parmi environ 1500 nouvelles entités chimiques (new chemical entities – NCEs), 40% sont des produits naturels ou dérivés de produits naturels<sup>48</sup>.

Dans le cadre de la recherche de traitements contre le diabète de type 2 et de ses complications métaboliques, plusieurs équipes se sont intéressées à l'effet de molécules naturelles sur le métabolisme du glucose. Ci-dessous sont présentés quelques composés ayant fait l'objet de recherche sur leur effet antidiabétique *via* l'activation du récepteur TGR5.

- Les feuilles d'olivier, connues pour avoir des effets sur le métabolisme, agiraient comme un antidiabétique naturel. En effet, un des constituants de ces feuilles, l'acide oléanolique, a été décrit en 2007 comme agoniste de TGR5 présentant une activité comparable aux agonistes endogènes de TGR5<sup>49</sup>. Il a également été montré que ce triterpène naturel

permettait une amélioration de la tolérance au glucose dans un modèle de souris DIO (Diet Induced Obesity) lors d'un test IPGTT (Intraperitoneal Glucose Tolerance Test) après 14 jours de traitement (Figure 12)<sup>49</sup>.

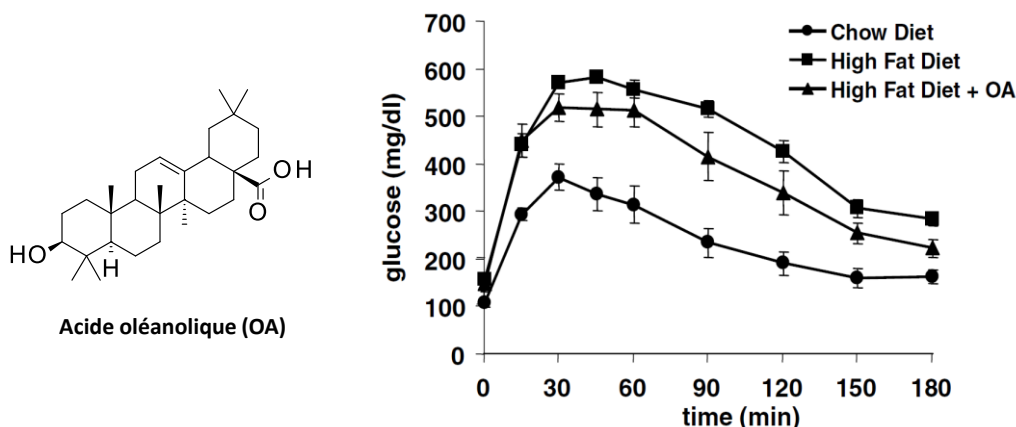


Figure 12 : Structure de l'acide oléanolique et effet du composé sur la tolérance au glucose lors d'un IPGTT après 14 jours de traitement avec les différents régimes<sup>49</sup>

- Deux triterpènes, l'acide bétulinique et l'acide ursolique ont également été décrits comme agonistes de TGR5 (Figure 13), et présentent des activités similaires aux ligands naturels de TGR5<sup>50</sup>.

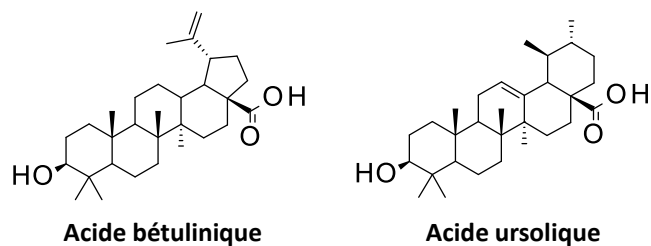


Figure 13 : Structure de l'acide bétulinique et de l'acide ursolique

- L'obacunone fait partie de la famille des limonoïdes, principalement retrouvés dans les pépins des agrumes. L'obacunone est connue pour inhiber la prolifération cellulaire par augmentation de l'apoptose dans le cancer<sup>51</sup>. Une équipe japonaise a montré, en 2015, que ce triterpène présente une activité sur le récepteur TGR5. L'obacunone induit également une baisse significative du taux de glucose sanguin, chez des souris obèses et diabétiques, durant un traitement chronique de 28 jours par administration de 0,1% d'obacunone dans la nourriture (Figure 14)<sup>51</sup>.



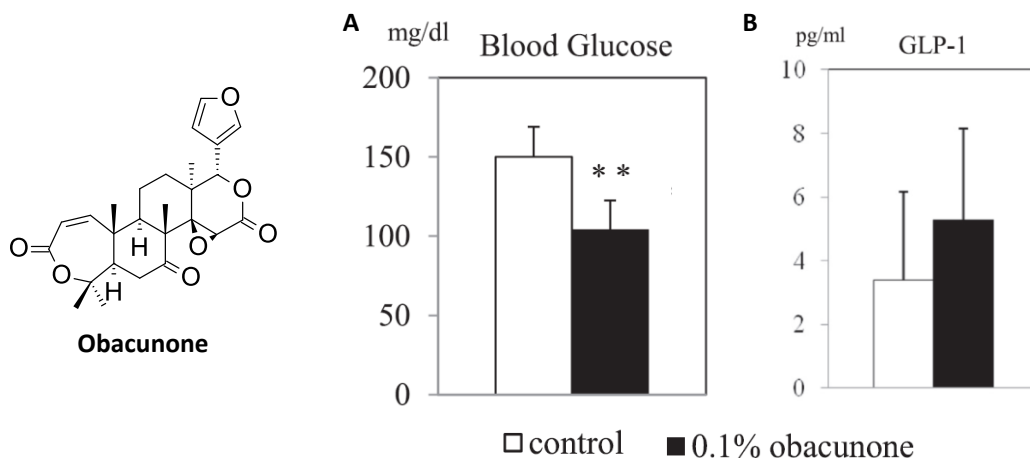


Figure 14 : Structure de l'obacunone et ses effets sur le taux de glucose sanguin (A) et sur la sécrétion de GLP-1 (B)<sup>51</sup>

• L'acide quinovique et ses analogues (Figure 15), extraits de la plante *Fagonia Cretica*, ont également montré une activité agoniste sur le récepteur TGR5 à une concentration de 100  $\mu$ M conduisant à une augmentation de la sécrétion de GLP-1 *in vitro*<sup>52</sup>. Des études de relations structure-activité à partir de l'acide quinovique sont actuellement en cours par l'équipe ayant découvert ces molécules.

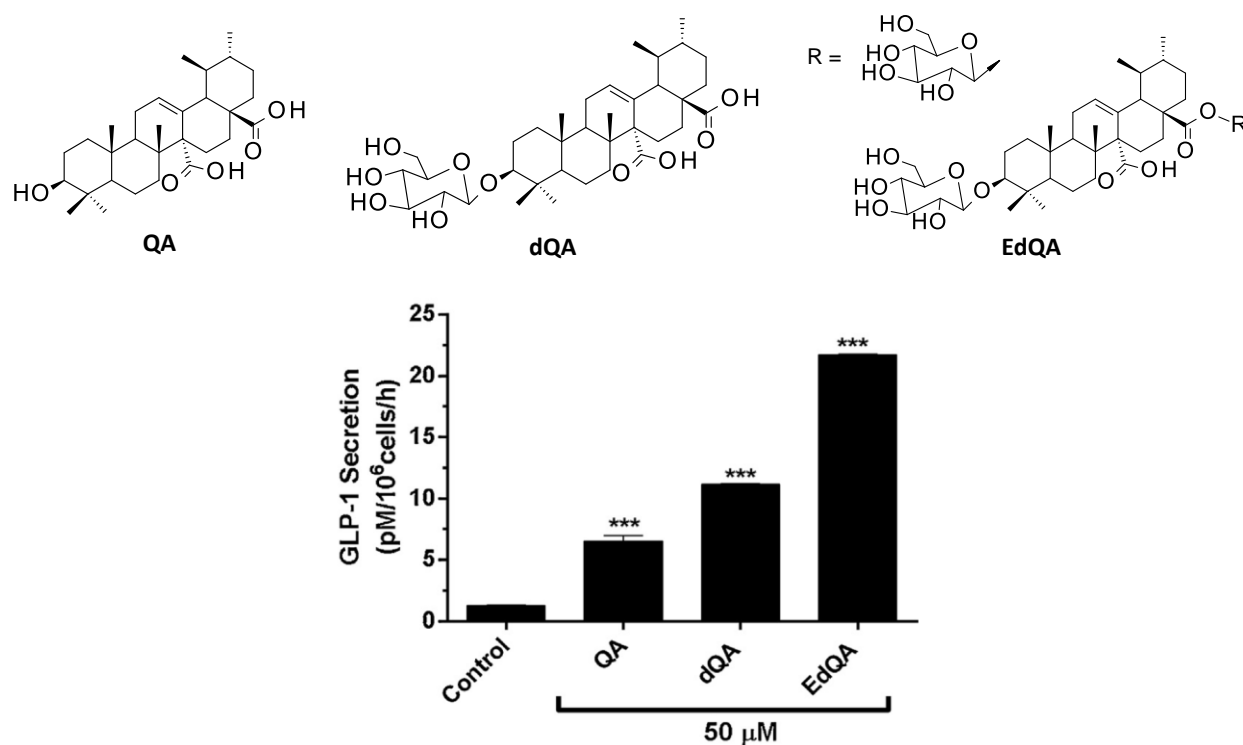


Figure 15 : Structures de l'acide quinovique (QA), de l'acide quinovique-3 $\beta$ -O- $\beta$ -D-glycopyranoside (dQA), de l'ester d'acide quinovique-3 $\beta$ -O- $\beta$ -D-glycopyranosyl-(28 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-glycopyranosyle (EdQA) et leur effet GLP-1 sécrétagogue *in vitro* dans des cellules STC-1<sup>52</sup>

D'autres triterpènes naturels et semi-synthétiques ont également été décrits comme des agonistes de TGR5 dans un brevet de la société Merck<sup>53</sup>.

### 3. Produits synthétiques (non stéroïdiens)

Depuis la découverte du récepteur TGR5, de nombreuses molécules synthétiques ont été décrites pour leurs activités agonistes sur ce récepteur (Figure 16)<sup>30, 54-69</sup>. Je ne présenterai ici que certaines séries chimiques agonistes de TGR5, pour lesquelles des études chez l'animal ont été décrites, et permettent d'établir des conclusions sur l'effet de ces composés. D'autres agonistes synthétiques sont présentés dans diverses revues<sup>44, 45</sup>.

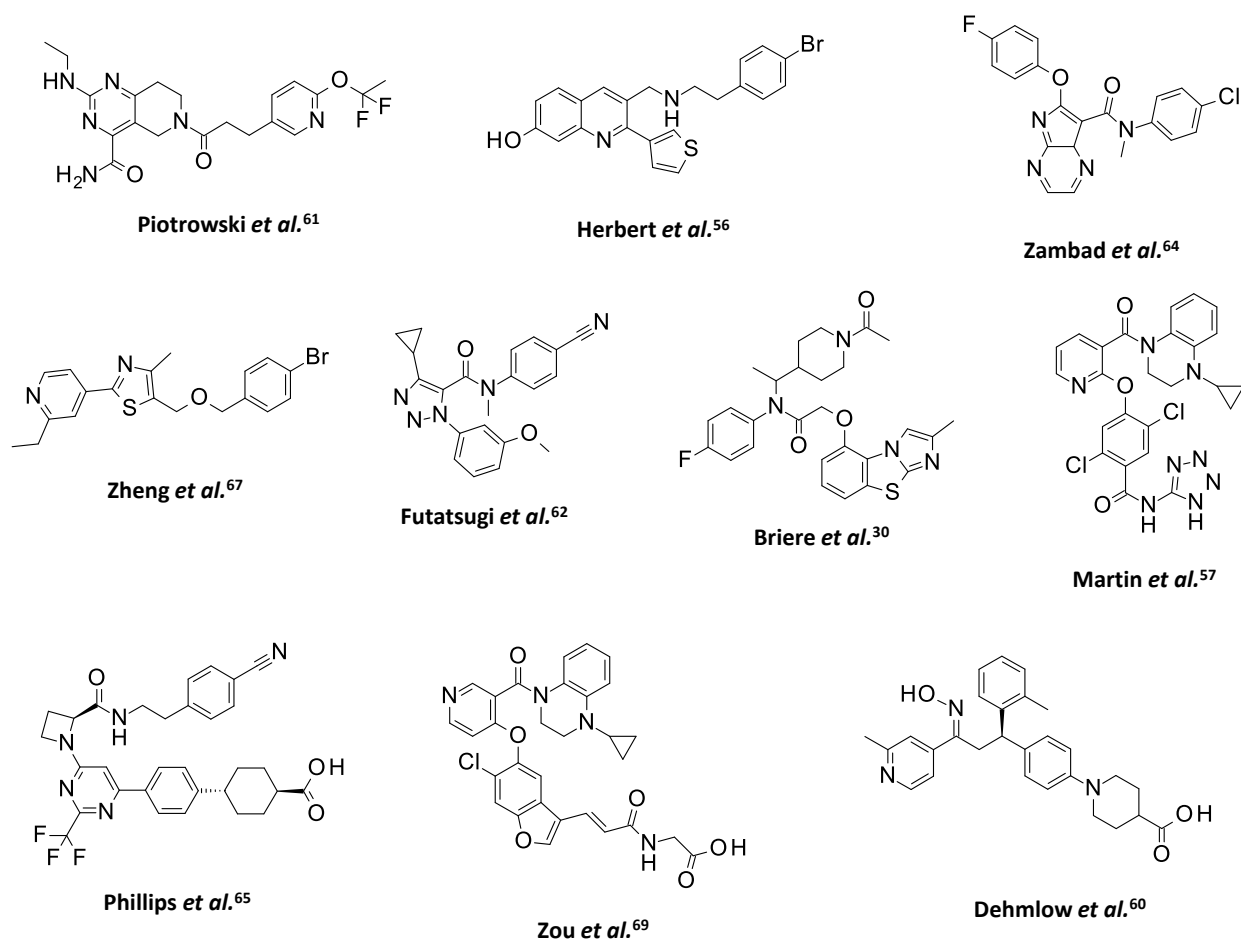


Figure 16 : Structures de composés agonistes de TGR5 synthétiques

L'objectif de ces différentes équipes était d'obtenir des composés avec une bonne biodisponibilité orale. Suite aux études de relations structure-propriétés, certains composés possèdent toujours des propriétés pharmacocinétiques non adaptées comme une clairance microsomale élevée. Des composés, étudiés dans des expériences *in vivo*, ont montré l'apparition d'effets non désirés, comme des effets cardiovasculaires chez le chien<sup>62</sup>. Concernant

le composé de Phillips *et al.*<sup>65</sup>, une étude chronique chez des souris ob/ob n'a pas permis de confirmer une amélioration de la tolérance au glucose après 26 jours de traitement dû à une potentielle désensibilisation du récepteur<sup>65</sup>. D'autres effets ont été reportés, comme une augmentation du volume de la vésicule biliaire<sup>30, 67, 69</sup>. Cet effet est TGR5-dépendant, puisque lors d'une expérience *in vivo* sur 3 jours de traitement chez des souris TGR5<sup>+/+</sup> et TGR5<sup>-/-</sup> avec le composé publié par la société Eli Lilly<sup>30</sup>, une augmentation du poids de la bile a été observée uniquement chez les souris TGR5<sup>+/+</sup> traitées avec le composé<sup>30</sup>.

Des composés non dérivés d'acides biliaires et agonistes sélectifs de TGR5 ont donc montré une capacité à promouvoir la sécrétion de GLP-1 *in vivo* et à améliorer l'homéostasie du glucose, permettant ainsi de faire la preuve de concept de l'intérêt des agonistes de TGR5 pour le traitement du diabète de type 2<sup>30, 56, 65, 67, 69, 70</sup>.

#### 4. Conclusion

De nombreuses séries de composés, dérivés d'acides biliaires ou de type non stéroïdien, ont été découvertes. Certains composés sont capables de stimuler la sécrétion de GLP-1 et d'avoir des effets positifs sur la régulation de la glycémie dans des modèles animaux. Cependant, des effets secondaires non souhaités, dans le cadre du développement d'agonistes systémiques de TGR5 pour le traitement du diabète de type 2, ont été observés.

Les démangeaisons, décrites chez la souris suite à l'activation de TGR5 par des acides biliaires et leurs dérivés, au niveau des neurones cutanés afférents, sont un paramètre à prendre en compte dans le développement d'agonistes du récepteur TGR5. En effet, même si l'activation de TGR5 au niveau du système nerveux central et périphérique induit certains effets positifs, ces effets de prurit pourraient néanmoins être délétères pour le développement d'agonistes de TGR5 pour le traitement du diabète de type 2.

Concernant les effets reportés sur la vésicule biliaire par des agonistes systémiques de TGR5, l'augmentation du volume de cette dernière a été décrite comme un effet non dissociable de l'effet GLP-1 sécrétagogue, et représente donc un frein pour le développement d'agonistes systémiques de TGR5.

Tous ces effets non souhaités des agonistes systémiques de TGR5, pour le développement d'un traitement pour le diabète de type 2, nous ont poussés à développer des agonistes ayant une action tissulaire ciblée à l'intestin, pour limiter les effets systémiques décrits précédemment. En effet, puisque TGR5 est exprimé dans les cellules entéroendocrines L intestinales, nous nous sommes intéressés au développement d'agonistes de TGR5 ayant une action limitée à l'intestin avec une faible exposition systémique pour éviter les effets secondaires cutanés, cardiaques et biliaires connus des agonistes absorbés de TGR5.



### III. Agonistes de TGR5 à visée tissulaire ciblée

La fenêtre thérapeutique d'un composé est caractérisée par son index thérapeutique ; une relation quantitative entre efficacité et sécurité. Cet index correspond au ratio de l'exposition systémique la plus élevée, dépourvue de toxicité, sur l'exposition générant l'efficacité désirée. En conséquence, une stratégie pour augmenter l'index thérapeutique d'un composé, et donc son profil de sécurité, implique de diminuer l'exposition systémique à la dose où l'efficacité est atteinte, en ciblant directement l'organe/tissu d'intérêt<sup>71, 72</sup>.

#### A. Stratégies pour l'obtention de composés non absorbés

La méthode la plus simple, pour diminuer l'exposition systémique, est l'approche topique. En effet, de nombreux exemples de cette méthodologie, dans le traitement de maladies de la peau, des yeux ou encore des oreilles, sont décrits<sup>71</sup>. L'objectif de la découverte de molécules « non absorbées » ou « non systémiques » est d'augmenter la concentration du principe actif localement, pour augmenter son efficacité et ainsi avoir un engagement local de cible élevé.

Définir une limite entre le domaine des composés systémiques et des composés non systémiques est complexe. Le terme de composé non systémique est donc appliqué aux efforts entrepris pour minimiser l'exposition sanguine<sup>71</sup>. Un composé ciblant l'intestin est donc un composé non absorbé, avec une faible biodisponibilité.

Différentes stratégies peuvent être utilisées pour limiter l'exposition systémique au niveau intestinal. Pour déterminer une stratégie pertinente dans le contexte du développement d'agonistes de TGR5 à visée tissulaire ciblée, je vais présenter les différentes stratégies reportées dans la littérature<sup>71, 73-75</sup>.

#### 1. Composés pro-drogues

Une classe de composés pouvant permettre une action ciblée dans l'intestin sont les composés de type « pro-drogues ». Les pro-drogues sont des composés administrés sous une forme inactive et qui sont métabolisés *in vivo* en métabolites actifs. Dans le cas de composés topiques intestinaux, la métabolisation peut avoir lieu après clivage enzymatique par des bactéries intestinales, comme les azo-réductases<sup>71</sup> (Figure 17), les glucosidases (Figure 18)<sup>71</sup> ou encore les glucuronidases<sup>75</sup>.

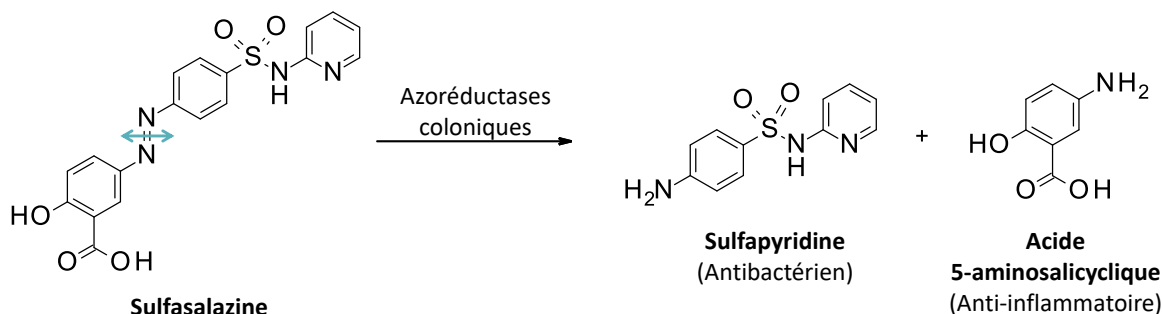


Figure 17 : Action des azoréductases coloniques sur la Sulfasalazine

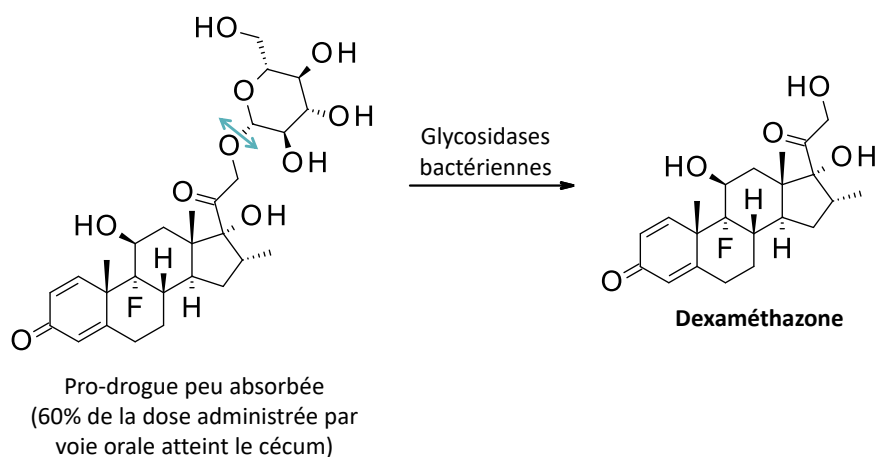


Figure 18 : Pro-drogue de la Dexaméthazone

## 2. Composés « soft drug »

Les composés « soft drug » (ou antedrug) sont des composés qui vont agir localement. Ils subissent une rapide biotransformation (prévisible) conduisant à des métabolites inactifs après avoir exercé leur effet thérapeutique. Ces composés possèdent des liaisons fragiles métaboliquement, par exemple une fonction ester ou acétal, sur des positions critiques du pharmacophore conduisant à une molécule complètement inactive sur la cible après clivage, et évitant ainsi, les effets liés à la cible dans d'autres tissus (Figure 19).

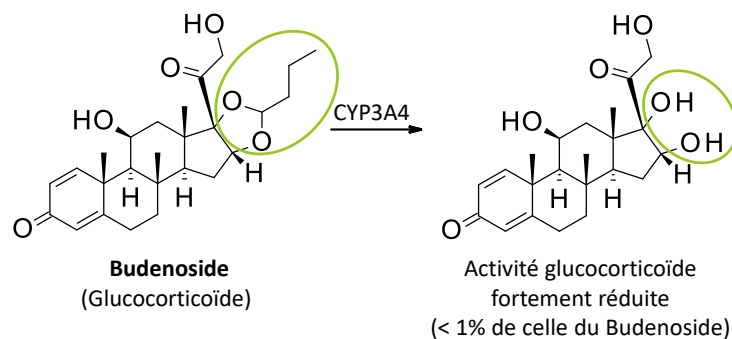


Figure 19 : Clivage de la fonction acétal du Budesonide par les cytochromes 3A4

### 3. Composés à action topique intestinale

La règle de Lipinski décrit des critères favorables à une bonne absorption intestinale. Dans cette règle, trois paramètres, parmi ceux décrits ci-dessous, doivent être respectés pour maximiser les chances d'obtenir une molécule absorbée dans le tractus gastro-intestinal<sup>74</sup> :

- Un poids moléculaire inférieur ou égal à 500 Da,
- Un nombre de donneurs de liaisons hydrogène inférieur ou égal à 5,
- Un nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène inférieur ou égal à 10,
- Un clogP inférieur ou égal à 5.

Alors que la majorité des efforts de découverte de médicaments se sont concentrés à utiliser ces lignes directrices, pour construire des composés avec une absorption orale et une biodisponibilité optimale, certains chercheurs ont fait exactement l'opposé, et ont délibérément conçu des composés avec des propriétés moléculaires en dehors de ces règles, afin de permettre leur rétention dans l'intestin.

Les caractéristiques d'un composé faiblement absorbé pourront être les suivantes :

- Un composé très polaire ( $\text{clogP} < 0$ ). Il ne pourra pas être dé-solvaté pour passer les membranes,
- Un composé très lipophile ( $\text{clogP} > 4$ ) de façon à ce qu'il ne se dissolve pas suffisamment dans l'environnement aqueux du tractus gastro-intestinal,
- Un composé de poids moléculaire élevé, rendant le composé moins soluble et moins perméable, par augmentation de sa surface polaire (PSA – Polar Surface Area)<sup>76</sup>.

Les deux paramètres de lipophilie (clogP) et poids moléculaire sont les plus importants pour influencer la perméabilité d'un composé. Les autres paramètres, décrits dans la règle de Lipinski, ont été étudiés, mais n'ont pas permis d'élaborer des règles pouvant permettre de guider l'absorption des composés<sup>71</sup>.

Les composés non absorbés à travers la paroi de l'épithélium intestinal, que l'on peut également appeler composés topiques intestinaux, peuvent être classés en trois sous-catégories :

a. Composés très polaires et/ou encombrés : stratégie « kinétophore »

Cette classe de composés, non systémiques, repose sur le principe que la perméabilité des composés diminue de façon très importante, avec l'augmentation de la polarité et de la charge et/ou de l'encombrement<sup>71</sup>. Des composés, comme l'acarbose (dérivé de sucres) ou la larazotide (peptide), composés très polaires et très solubles, possédant un  $\text{clogP} < 0$ , ont été décrits comme étant des composés à action topique intestinale<sup>71</sup>. Des chercheurs, travaillant sur la recherche de composés, inhibiteurs du transporteur aux acides biliaires IBAT, avec une action limitée à l'intestin, ont conçu des composés présentant des groupements polaires et/ou chargés et/ou encombrés selon la stratégie « kinétophore »<sup>77</sup>.

Dans cette stratégie, les composés sont constitués de deux parties : un pharmacophore responsable de l'activité pharmacologique sur la cible, et un groupement appelé kinétophore guidant les propriétés pharmacocinétiques du composé. Le kinétophore est donc une unité structurale, qui modifie les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques des molécules, comme leur perméabilité ou leur transport. Il est introduit sur le pharmacophore, sur une position « silencieuse », n'influençant pas l'activité pharmacologique du composé avec sa cible. Ainsi, des exemples de composés, possédant des groupements kinétophores introduits tels que des cations organiques, des dérivés de peptides ou encore des dérivés de sucres, sont décrits (Figure 20)<sup>77, 78</sup>.

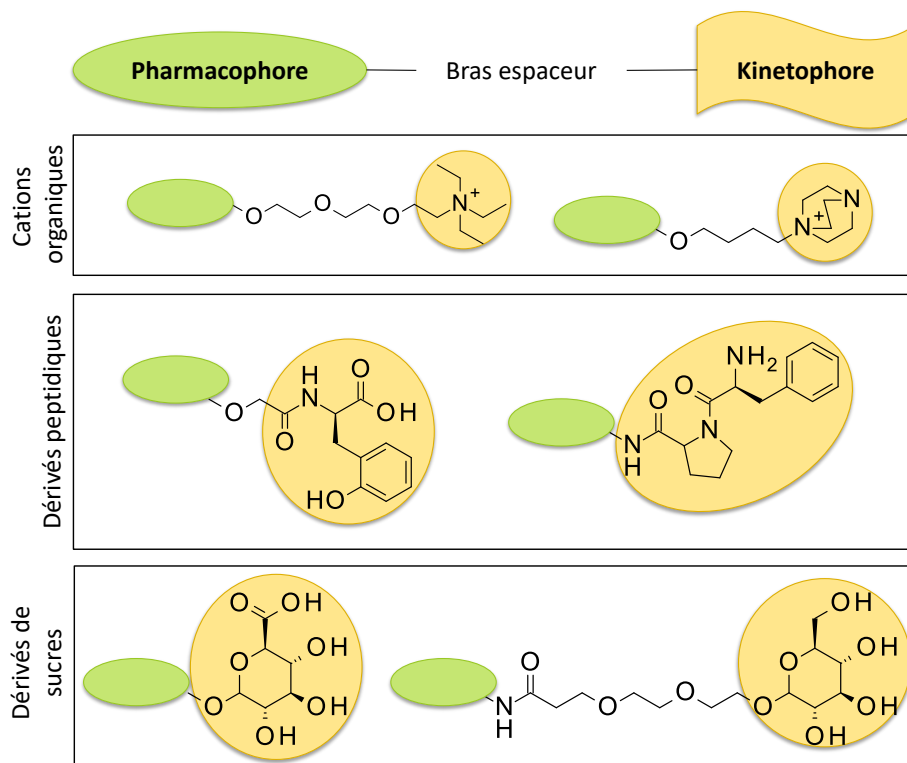
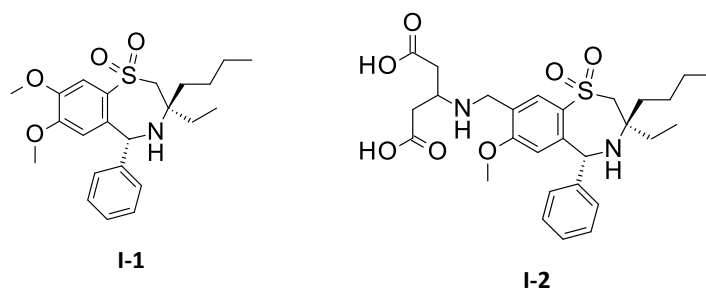


Figure 20 : Exemples de kinétophores utilisés pour modifier les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques<sup>77</sup>



L'exemple décrit pour l'obtention d'inhibiteurs d'IBAT est issu du composé I-1, fortement métabolisé après administration par voie orale, et ne permettant pas au composé d'atteindre la partie distale de l'intestin. L'introduction de la fonction zwitterionique a permis de diminuer la perméabilité et l'exposition systémique du composé I-2 (Figure 21) <sup>78</sup>.



Composé	P <sub>app</sub> (nm/s)	C <sub>max</sub> plasma (ng/mL)
I-1	107	19
I-2	8	0

Figure 21 : Utilisation de la stratégie kinétophore pour l'obtention d'inhibiteur d'IBAT<sup>78</sup>

Le Canosimibe est un exemple de l'utilisation de la stratégie kinétophore par augmentation du poids moléculaire. L'Ezetimibe inhibe l'absorption du cholestérol, mais est absorbé et conduit à un métabolite actif après passage dans le foie, qui est éliminé très lentement. Afin de palier à cette exposition trop longue de la drogue et de son métabolite actif, l'Ezetimibe a été modifié pour donner le Canosimibe, avec un poids moléculaire de 810 g/mol (Figure 22)<sup>71</sup>. Ce candidat clinique est non absorbé, mais a conduit à une trop faible activité durant les études cliniques de phase III.

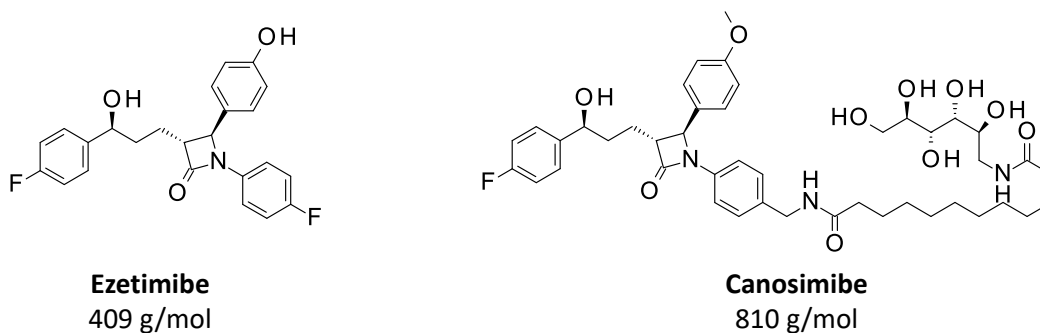
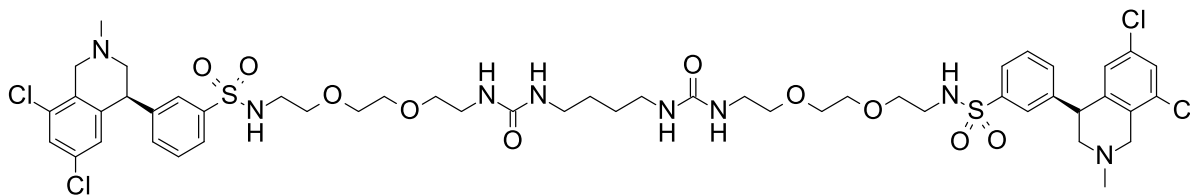


Figure 22 : Structure de l'Ezetimibe et du Canosimibe

Un autre exemple est le Tenapanor, qui est un composé dimérique utilisé comme inhibiteur non systémique de l'échangeur sodium/proton NHE3, et qui agit ainsi uniquement au niveau intestinal, pour inhiber l'absorption de sodium (99% de la dose retrouvée dans les fèces) (Figure 23)<sup>71</sup>.

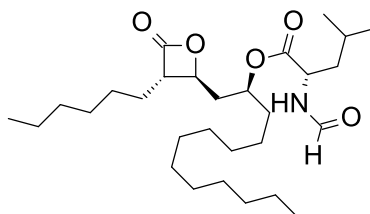


**Tenapanor**

Figure 23 : Structure du Tenapanor

**b. Composés très lipophiles et peu solubles**

La solubilité est un facteur déterminant dans l'absorption des composés. La solubilité diminue lorsque la lipophilie augmente. Augmenter la lipophilie est une stratégie pour diminuer l'absorption intestinale. De plus, les composés avec une lipophilie élevée sont plus sujets à un métabolisme oxydatif *via* les cytochromes, diminuant d'autant plus l'exposition systémique de ce type de composés. De nombreuses molécules, possédant un caractère très lipophile ( $\text{clogP} > 5$ ), ont été décrites comme ayant une perméabilité sur cellules Caco-2 très faible<sup>71</sup>. Un exemple est l'Orlistat, un composé très lipophile possédant une biodisponibilité orale très faible et utilisé pour le traitement de l'obésité (Figure 24)<sup>71</sup>.



**Orlistat**

Figure 24 : Structure de l'Orlistat

**4. Formulation des composés pour une libération intestinale**

Une autre solution pour augmenter l'exposition intestinale, et limiter l'exposition systémique, est d'encapsuler le principe actif dans une formulation (en général un polymère) afin d'ajuster la libération du principe actif en fonction de la partie de l'intestin visée<sup>73, 79, 80</sup>.

Pour libérer un produit dans la partie proximale de l'intestin, les polymères utilisés vont gonfler au contact du fluide gastrique, et se dégrader pour agir dès la sortie de l'estomac. Pour cibler plus spécifiquement la partie distale de l'intestin, plusieurs techniques sont actuellement utilisées, et dépendent de paramètres comme les propriétés physicochimiques du composé, la dose incorporée dans la formulation et le type de formulation utilisée<sup>80</sup>. Ainsi, l'utilisation de polymères qui se dégradent en fonction du temps de transit, du pH, de la pression ou encore qui sont dégradés par des enzymes bactériennes coloniques permettent de cibler la partie distale

de l'intestin. Des exemples, dans la littérature, montrent l'efficacité de l'utilisation de formulations enzyme-dépendante, pH-dépendante, temps-dépendante ainsi que des combinaisons de deux formulations pour les traitements de l'inflammation de l'intestin chez l'animal (Figure 25)<sup>81-83</sup>.

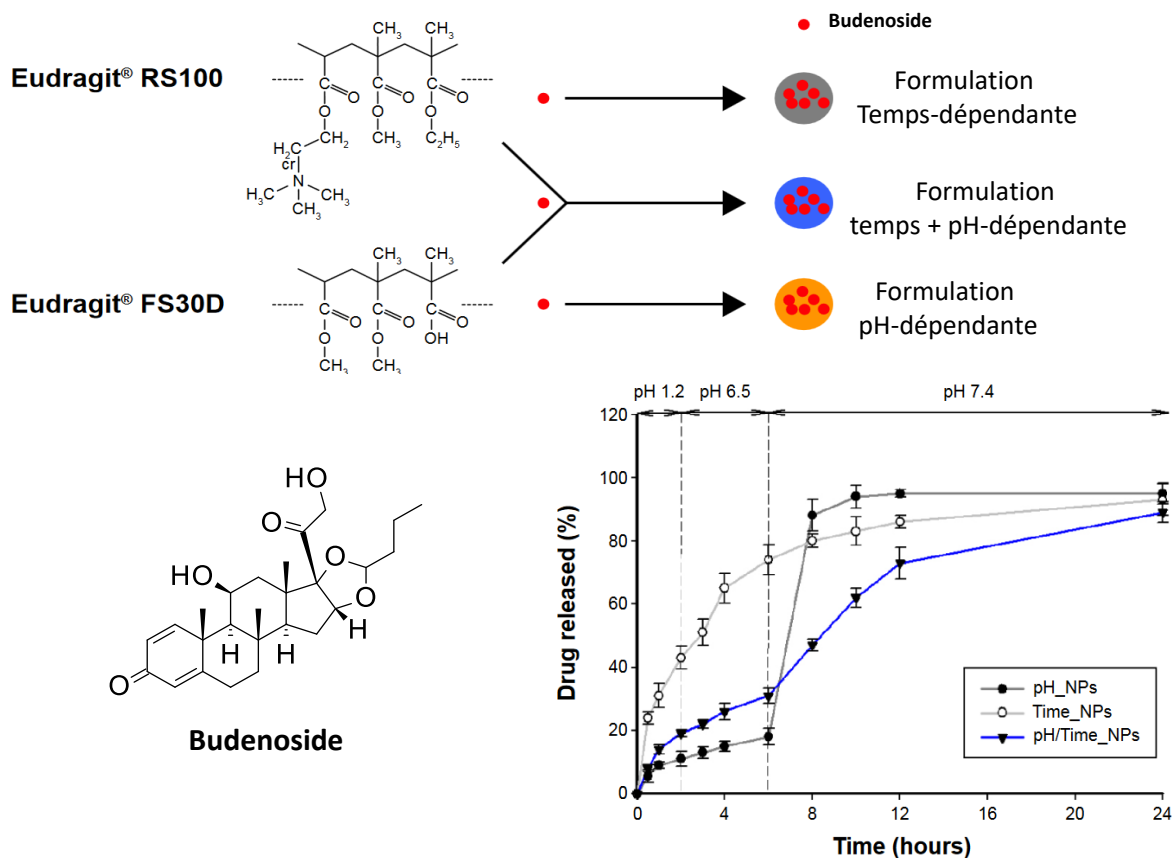


Figure 25 : Exemple d'encapsulation du Budesonide dans des nanoparticules (NPs) et libération du composé en fonction du temps et/ou du pH *in vitro*<sup>82</sup>

## 5. Conclusion

Comme nous venons de le voir, différentes stratégies peuvent être utilisées pour limiter l'exposition systémique de molécules, et ainsi avoir une action topique intestinale.

L'objectif de mon projet de thèse est la recherche de nouveaux agonistes de TGR5, qui atteignent leur efficacité par des concentrations locales élevées au niveau intestinal, et par conséquent, un engagement de cible locale élevée. Dans ce contexte, nous avons choisi de nous intéresser à la stratégie kinétophore, pour l'obtention d'agonistes de TGR5 à visée topique intestinale.

**B. Stratégie « kinétophore » appliquée à l’obtention d’agonistes de TGR5 à visée topique intestinale**

Dans le cadre du projet d’obtention d’agonistes de TGR5, et au vu des résultats obtenus par d’autres équipes concernant les effets non désirés d’agonistes systémiques de TGR5, le projet s’est orienté vers le développement d’agonistes de TGR5 agissant uniquement au niveau intestinal, et dont la biodisponibilité orale serait très faible, voire nulle. L’objectif est de cibler la partie distale de l’intestin (iléon et colon) où TGR5 est fortement exprimé<sup>33</sup>. Ces composés « topiques intestinaux », pourraient ainsi stimuler la sécrétion de GLP-1 au niveau de l’épithélium intestinal, et ainsi avoir des effets sur la régulation de la glycémie, sans déclencher les effets non souhaités cutanés, biliaires et cardiaques connus des agonistes systémiques de TGR5. Les composés sont donc conçus de façon chimérique (Figure 26) : le pharmacophore, responsable de l’activité sur le récepteur TGR5, est lié, *via* un bras espaceur, à un kinétophore ajustant les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques de nos agonistes. Idéalement, la faible fraction de composé absorbée pourra être métabolisée en dérivés inactifs, lors du premier passage hépatique (Figure 27).

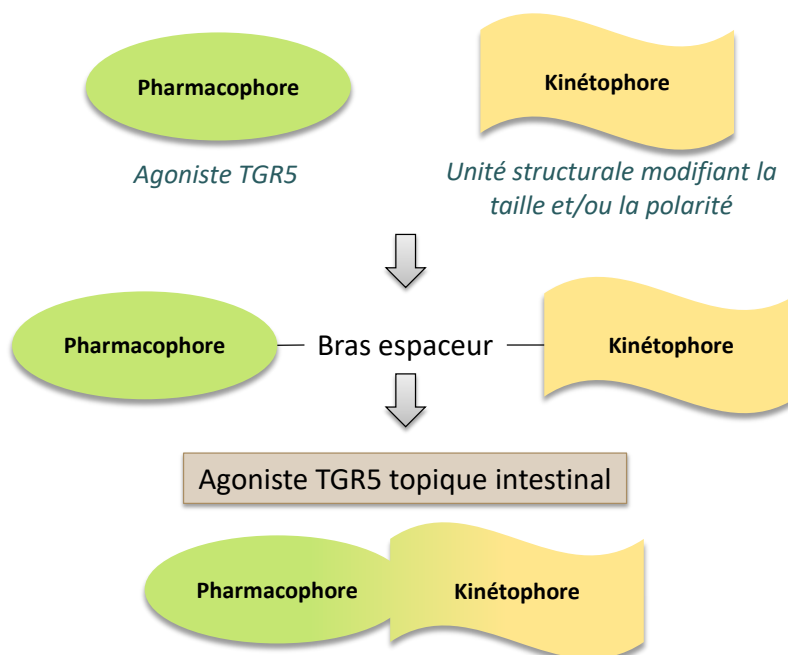


Figure 26 : Conception des composés topiques intestinaux

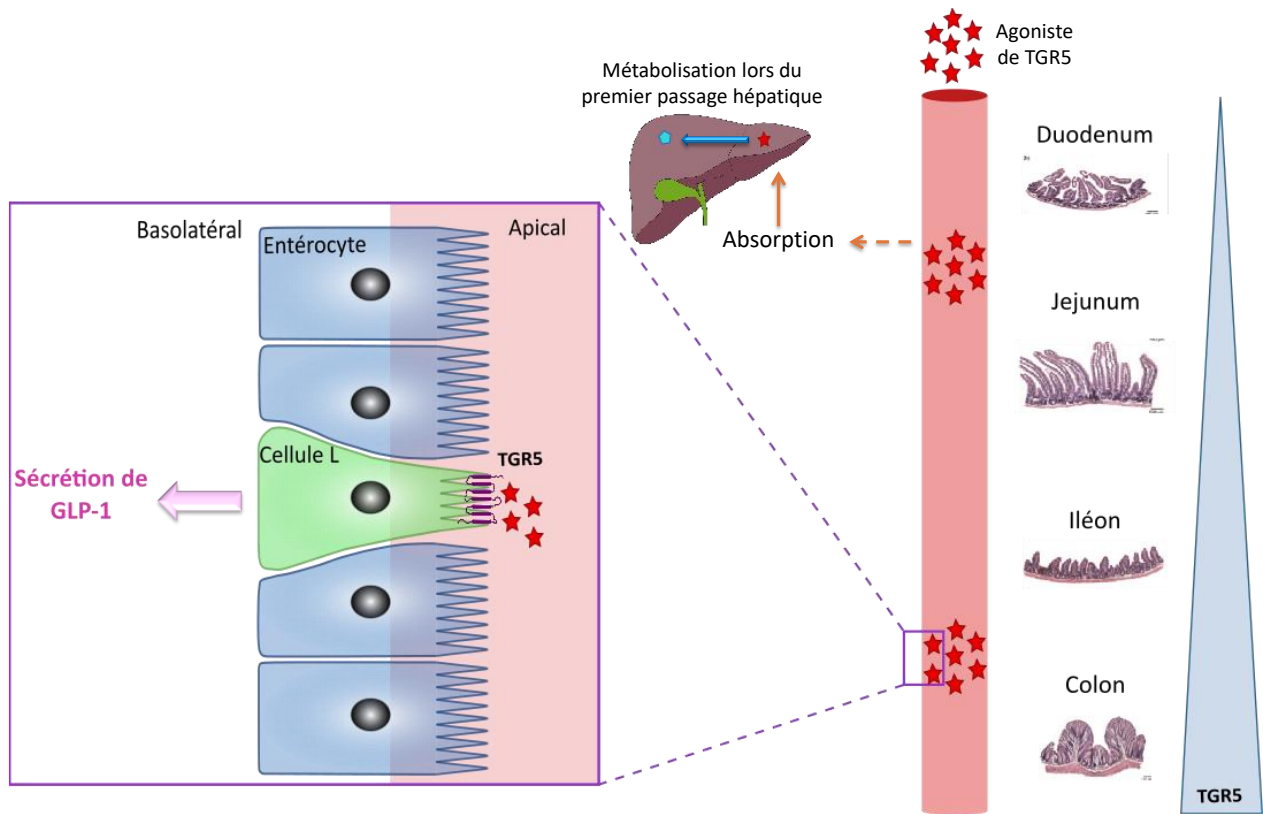


Figure 27 : Evolution d'un composé topique intestinal à travers le tractus gastro-intestinal<sup>84</sup>

Dans ce contexte, l'objectif de mon projet de thèse est la conception, la synthèse et l'évaluation de composés originaux agonistes du récepteur TGR5, ayant une absorption intestinale très faible, et une biodisponibilité par voie orale quasi nulle, afin de générer la preuve de concept *in vivo* de l'intérêt d'utiliser de tels agonistes dans le traitement du diabète de type 2.

Des travaux, publiés au cours de ma deuxième année de thèse en novembre 2015, ont montré que la sécrétion de GLP-1 était majoritairement provoquée par l'activation de TGR5 au niveau basolatéral des cellules entéroendocrines L intestinales, et non du côté apical (lumière intestinale)<sup>85</sup>. Ces nouvelles données sur l'activation basolatérale de TGR5, pour l'obtention de l'effet GLP-1 sécrétagogue de TGR5, remettent en cause la stratégie d'agonistes totalement non absorbés et non perméables. En effet, une trop faible perméabilité de composés topiques intestinaux, conçus pour une action ciblée dans la lumière intestinale, pourrait devenir un frein au développement d'agonistes de TGR5, GLP-1 sécrétagogues. Il semble donc nécessaire d'avoir une faible absorption des composés, pour permettre leur distribution jusqu'au colon, mais non nulle, pour permettre l'activation du récepteur sur la partie basolatérale des cellules L (Figure 28).

Le cahier des charges est donc d'obtenir un composé avec les caractéristiques suivantes :

- une activité sur les récepteurs humain et murin inférieure à 10 nM,
- une stabilité microsomale faible,
- une perméabilité membranaire faible, mais non nulle, et idéalement un fort efflux actif.

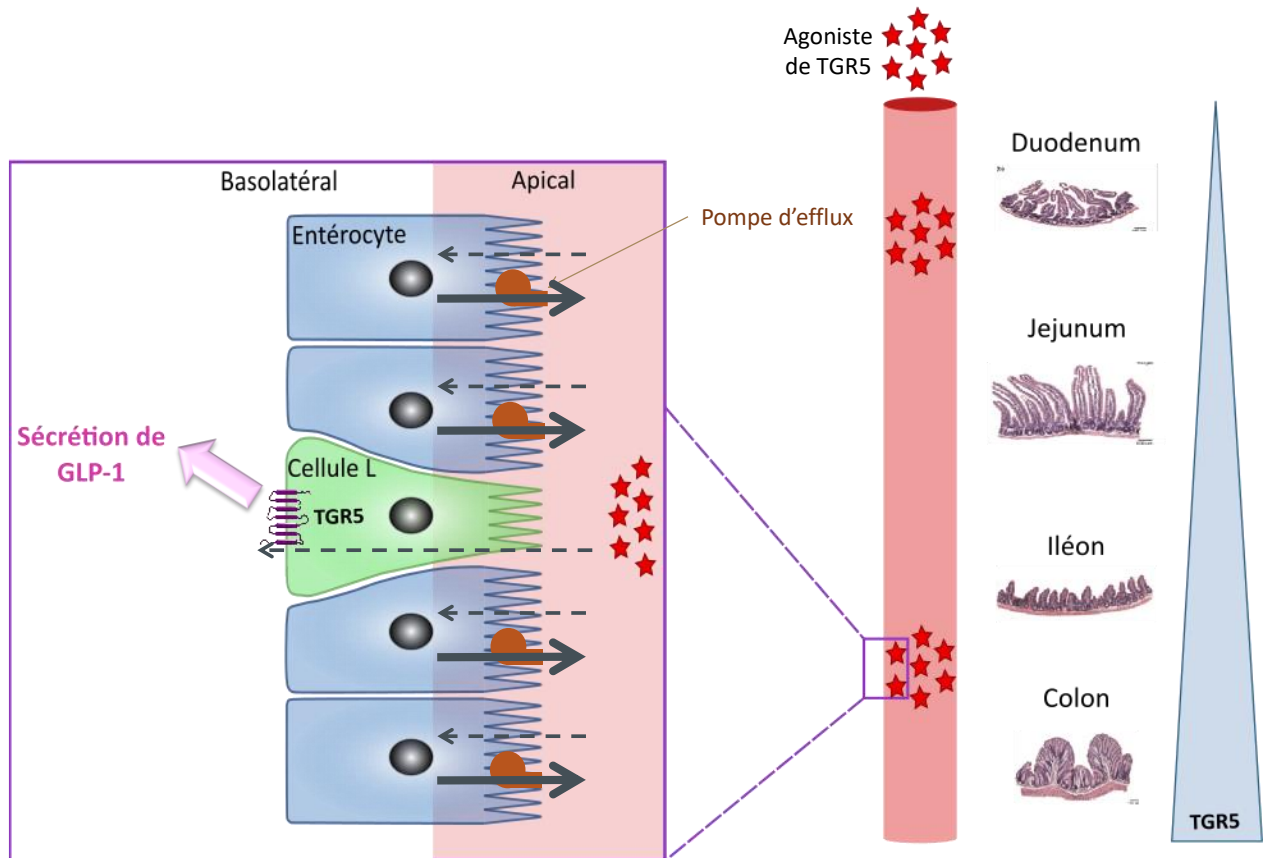


Figure 28 : Activation de TGR5 du côté basolatéral des cellules entéroendocrines L intestinales

## IV. Optimisation du pharmacophore

### A. Identification de nouvelles structures agonistes de TGR5

La première phase de notre projet mettant en œuvre la stratégie kinétophore a reposé sur l'identification et l'optimisation de la partie « pharmacophore » de nos composés chimériques. Au démarrage du projet, un criblage à haut débit, sur le récepteur TGR5, a été réalisé sur 20 500 composés, par nos collaborateurs biologistes de l'U1011. Le test, utilisé lors de ce criblage, consiste en un test *in vitro* de transactivation évaluant la capacité des composés à augmenter la concentration intracellulaire en AMP cyclique, dans des cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney), transfectées de façon transitoire par le récepteur TGR5 humain et par le gène codant pour la luciférase (Figure 29).

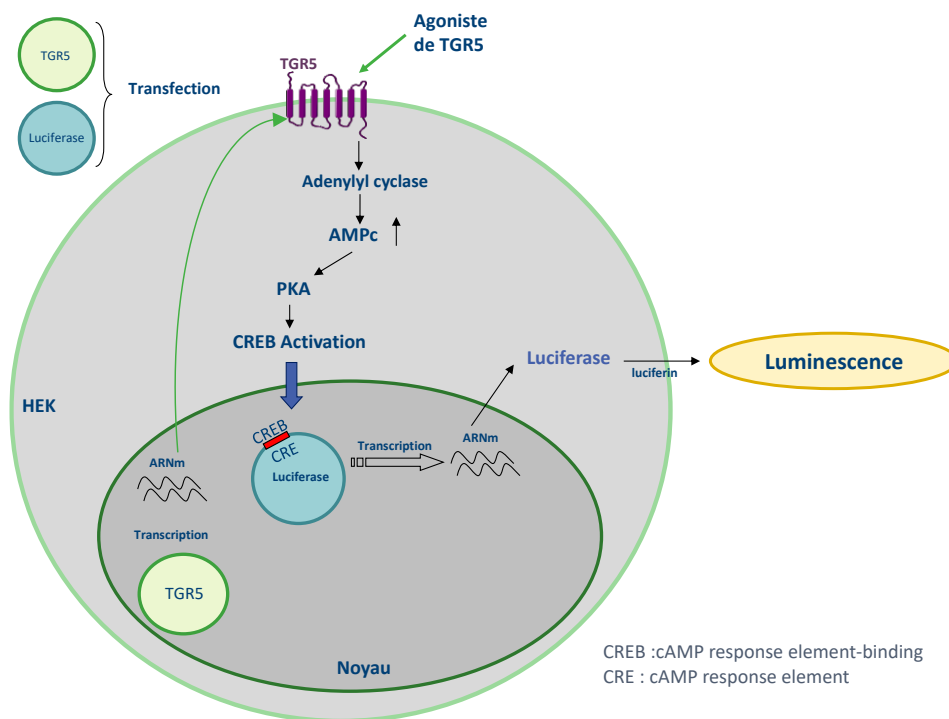


Figure 29 : Test *in vitro* de transactivation du récepteur TGR5

Lors de ce criblage, les composés ont été testés à une concentration de 10  $\mu$ M. Puis les activités des molécules « touches » ont été confirmées par des expériences de dose-réponse, dans le même test, sur des cellules transfectées soit par le récepteur humain, soit par le récepteur murin. L'effet pharmacologique est mesuré pour des doses croissantes de la substance à étudier. La courbe dose-réponse obtenue permet de déterminer deux paramètres représentés sur la Figure 30 :

- L'efficacité ou effet maximal de l'agoniste (pourcentage de réponse par rapport à l'effet du LCA à 10  $\mu$ M, considéré comme 100%),

- La  $DE_{50}$  (dose efficace 50 ou  $CE_{50}$  – concentration efficace) qui est la dose d'agoniste qui permet d'obtenir 50% de son effet maximum. Elle caractérise la puissance de l'agoniste.

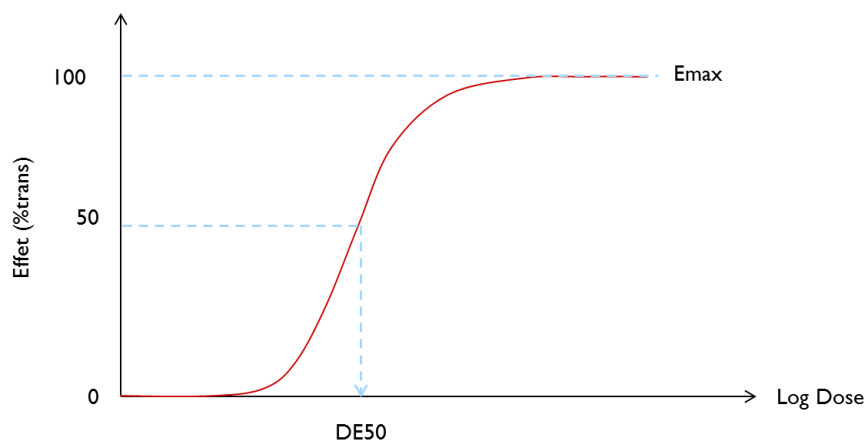


Figure 30 : Courbe dose-réponse

Le criblage a ainsi permis l'identification de plusieurs séries chimiques possédant une activité agoniste sur le récepteur TGR5. Deux séries sont actuellement développées au laboratoire. Ce travail portera sur la série chimique issue de la touche A qui présente des similarités structurales avec une série brevetée également pour son activité sur TGR5 par l'entreprise Exelixis (Figure 31)<sup>86</sup>.

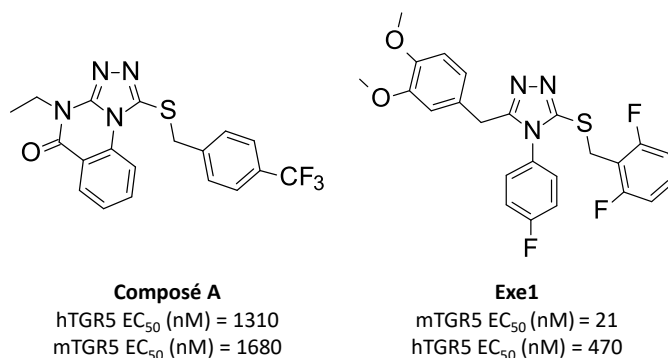
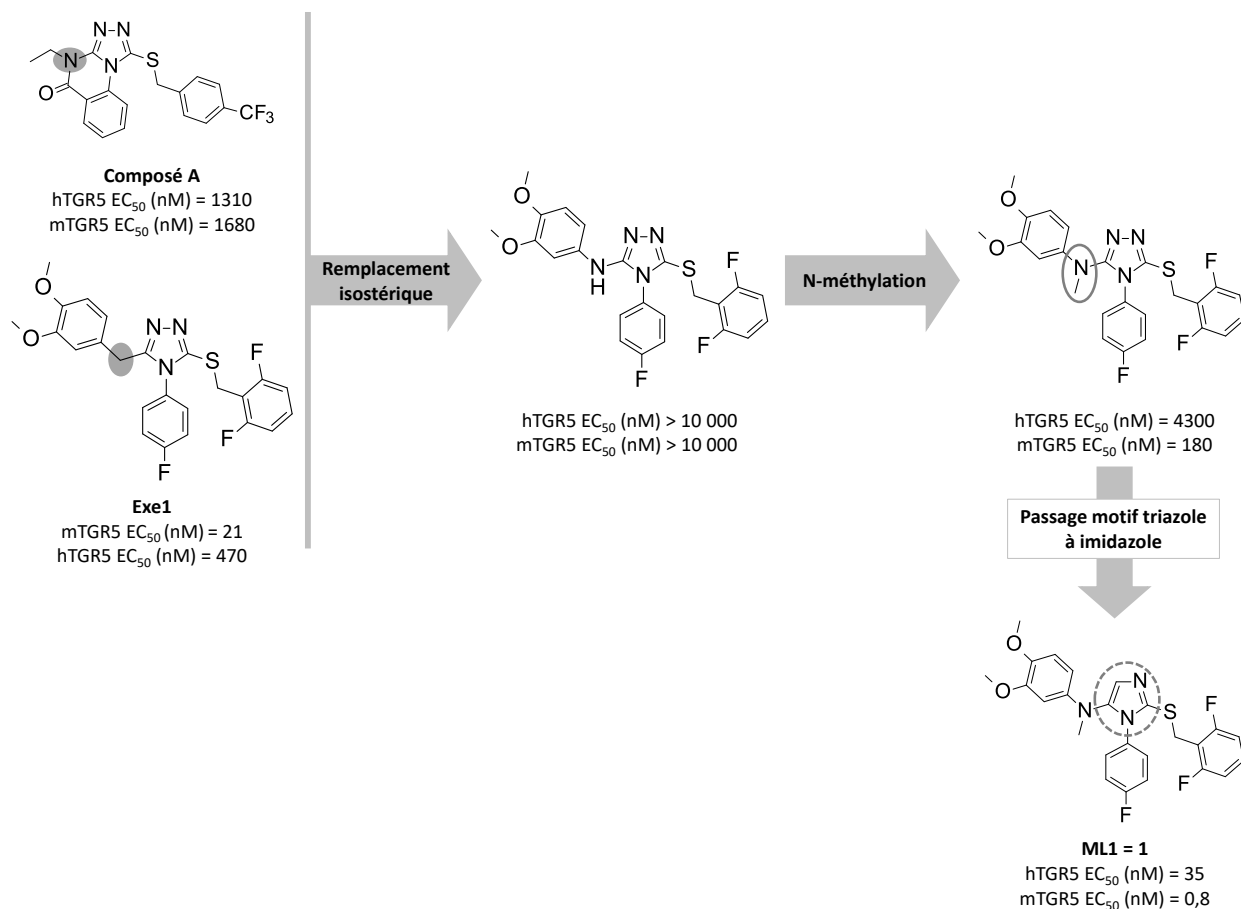


Figure 31 : Structures et activités de la touche A et du composé Exe1 (Exelixis)<sup>86</sup>

Suite à une phase d'optimisation par le Docteur Lasalle, lors de sa thèse, sur cette famille chimique, consistant en un remplacement isostérique d'un atome de carbone par un atome d'azote, et le passage d'un motif central triazole à un noyau imidazole (Figure 32), des études de relations structure-activité ont été réalisées, avant mon arrivée sur le projet, afin d'optimiser ce pharmacophore<sup>87</sup>.



Figure 32 : Remplacement isostérique et changement de cycle conduisant au composé ML1<sup>87</sup>

La voie de synthèse, utilisée pour obtenir les différents composés, est présentée ci-après (Figure 33). Les composés sont obtenus en 6 étapes à partir d'une aniline di-substituée commerciale. La première étape consiste en la méthylation de cette aniline, par réaction d'amination réductrice en présence de paraformaldéhyde, de méthanolate de sodium et de borohydrure de sodium dans le méthanol, pour conduire à la N-méthylaniline di-substituée **Xa**<sup>88</sup>. L'intermédiaire **Xb** est obtenu à partir de la N-méthylaniline **Xa** couplée à la Boc-glycine en présence d'anhydride d'acide propylphosphonique (T3P) et de diisopropyléthylamine (DIEA) dans l'acétate d'éthyle. L'étape de déprotection, en milieu acide, conduit au dérivé aminé **Xc** sous forme de sel d'acide trifluoroacétique. L'amine **Xc** est ensuite mise en réaction, avec une aniline ou un isothiocyanate, pour conduire à la thiourée **Xd**, dont l'atome de soufre est alkylé, en présence d'un chlorure de benzyle, pour former l'isothiourée **Xe**. La vérification de l'alkylation sur l'atome de soufre, et non sur un des atomes d'azote, par le dérivé halogéné a été faite par radiocristallographie, puisque l'absence de tâche de couplage en RMN 2D ne permettait pas de conclure sur la position d'alkylation.

### Optimisation du pharmacophore

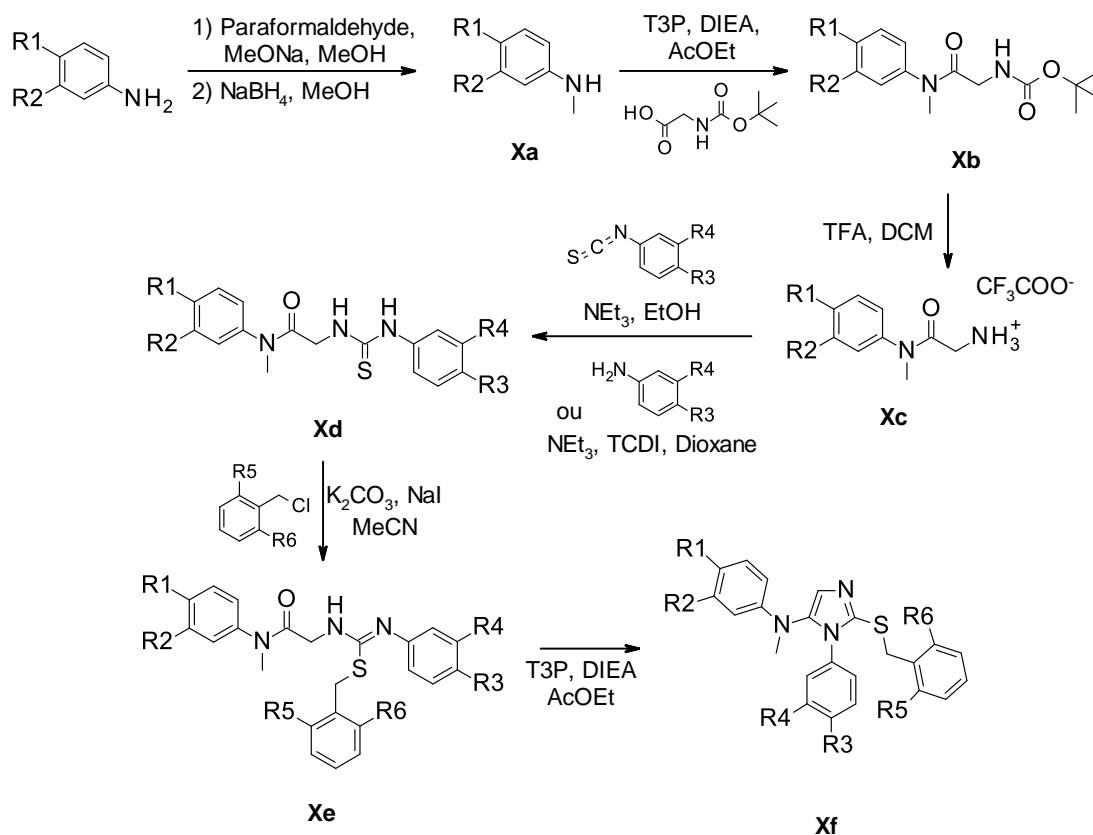


Figure 33 : Schéma de synthèse générale

Pour former le noyau 5-amino-2-thioimidazole **Xf**, peu de méthodes sont décrites dans la littérature et les rendements obtenus sont faibles<sup>89, 90</sup>. L'utilisation de l'anhydride d'acide propylphosphonique T3P (Figure 34) a donc été envisagée. En effet, ce réactif, classiquement utilisé comme agent de couplage peptidique, est peu toxique, et le sous-produit formé (diacide phosphonique) est facilement éliminable par lavage aqueux basique. Depuis une dizaine d'années, le T3P est également utilisé pour de nombreuses applications<sup>91-102</sup>, et notamment, comme agent de cyclodéshydratation dans la synthèse d'hétérocycles, comme des benzothiazoles, des benzoxazoles, des benzimidazoles<sup>103</sup>, des oxadiazoles et des thiadiazoles<sup>104</sup>.

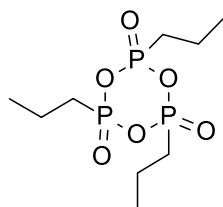


Figure 34 : Structure de l'anhydride d'acide propylphosphonique T3P

Cette étape de cyclodéshydratation au T3P a été optimisée au laboratoire, et a fait l'objet d'une publication en janvier 2015<sup>105</sup>. Grâce à cette voie de synthèse optimisée, une première série d'analogues a été préparée par le docteur Lasalle et des études de relations structure-activité ont pu être établies (Figure 35)<sup>87, 106, 107</sup>.

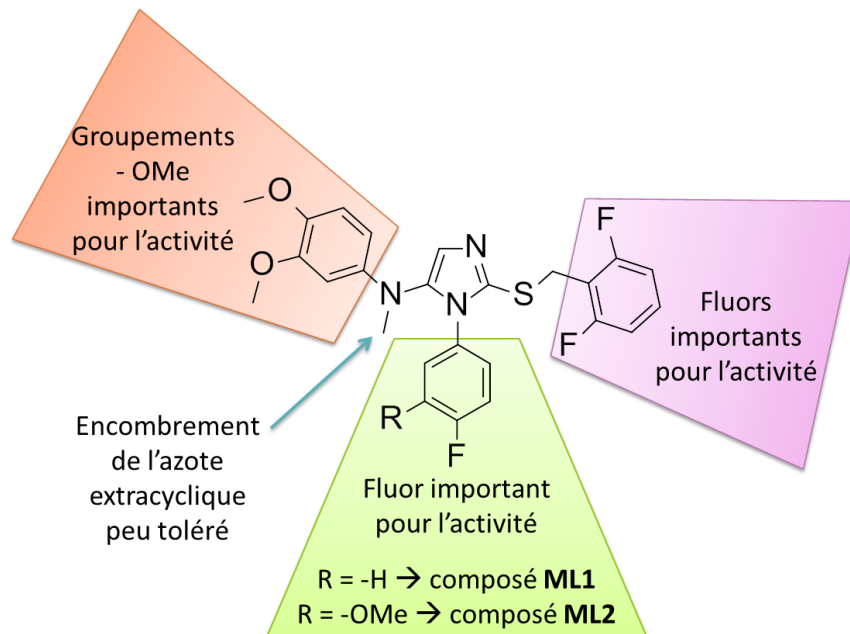


Figure 35 : Relations structure-activité réalisées par le docteur Lasalle<sup>87, 106, 107</sup>

Les composés, présentant les meilleures activités, sont les composés **ML1** et **ML2** avec respectivement des activités de 35 et 20 nM sur le récepteur humain et 0,8 nM sur le récepteur murin. Ces deux composés seront donc les pharmacophores de base pour la suite de mon travail. Ils seront, par la suite, renommés **1** pour le composé **ML1** et **2** pour le composé **ML2**.

La synthèse des pharmacophores **1 (ML1)** et **2 (ML2)**, dont les intermédiaires seront réutilisés fréquemment dans la suite de ce manuscrit, est présentée ci-après (Figure 36). La première étape consiste en une amination réductrice de la diméthoxyaniline, permettant d'obtenir la N-méthyl-3,4-diméthoxyaniline **1a**<sup>88</sup>. Puis, la glycine protégée par un groupement Boc est introduite par couplage de type peptidique pour donner l'intermédiaire **1b**. La déprotection de l'amine, en présence d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane, permet d'obtenir l'amine libre **1c** sous forme de sel d'acide trifluoroacétique avec un rendement quantitatif. Les acétamidothiourées **1d** et **2d** sont ensuite obtenues de deux façons différentes en fonction du réactif commercial. L'intermédiaire **1d** est obtenu en présence du 4-fluoroisothiocyanate dans l'éthanol en milieu basique. L'intermédiaire thiourée **2d** est, quant à lui, obtenu en présence de 4-fluoro-3-méthoxyaniline, de thiocarbonyldiimidazole (TCDI) et de triéthylamine dans le dioxane à 60°C<sup>108</sup>. L'étape suivante est l'alkylation de l'atome de soufre par le 2-bromométhyl-1,3-difluorobenzène et permet la synthèse des isothiourées **1e** et **2e** avec

de bons rendements. L'étape de formation des imidazoles **1** et **2** est réalisée dans les conditions optimisées précédemment (chauffage micro-onde pendant 10 min à 150°C, en présence de T3P et de DIEA dans l'acétate d'éthyle).

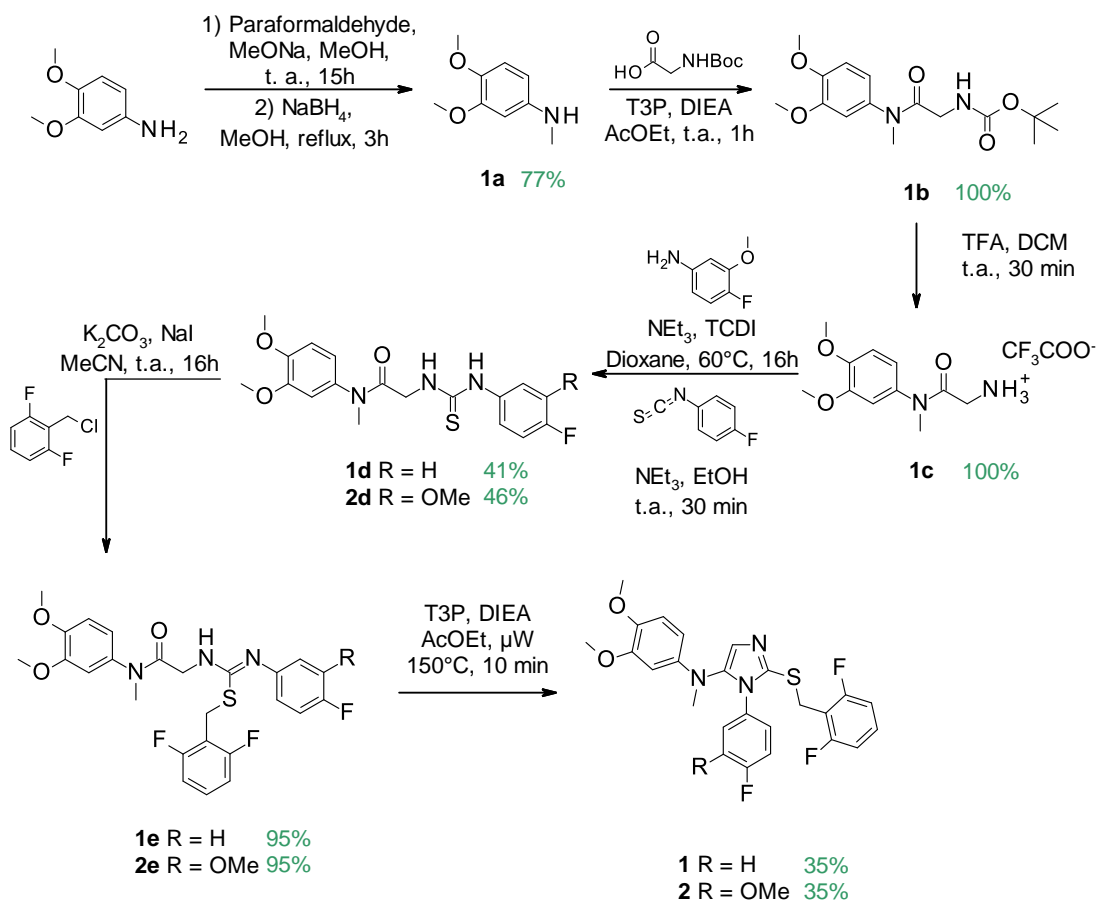


Figure 36 : Synthèse des composés pharmacophores **1** et **2**

Une dernière position a été très peu explorée durant cette phase d'optimisation du pharmacophore par le Docteur Lasalle : la position 4 du cycle imidazole. Je vais maintenant détailler les modifications que j'ai effectuées sur cette position.

## B. Modifications de la position 4 de l'imidazole

Parmi les modifications effectuées par le Docteur Lasalle, une seule modification, sur le cycle imidazole en position 4, avait été effectuée par remplacement de l'hydrogène par un groupement méthyle (**ML3**). Des modifications plus importantes, avec introduction de fonctions ionisables, ont donc été envisagées, pour étudier l'influence de l'introduction de groupements plus encombrés et/ou chargés sur l'activité sur le récepteur TGR5 (Figure 37).

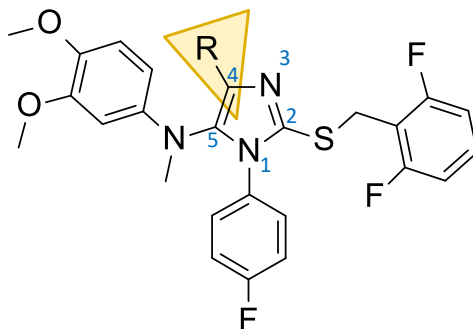


Figure 37 : Modifications sur la position 4 de l'imidazole

### 1. Synthèse des composés

La diversité sur cette position est introduite dès la deuxième étape de synthèse. En effet, après la réaction d'amination réductrice de la diméthoxyaniline, permettant d'obtenir la N-méthyl-3,4-diméthoxyaniline **1a**, différents acides aminés protégés par un groupement Boc sont introduits à cette étape : la L-lysine, pour introduire une fonction amine (**3b**), et l'acide L-glutamique, pour introduire une fonction acide carboxylique (**4b**). La déprotection du groupement Boc en présence d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane conduit aux amines **3c** et **4c** (pour respectivement la lysine et l'acide glutamique). La formation des thiourées correspondantes est réalisée de la même façon que pour le pharmacophore **1**, en présence du 4-fluoroisothiocyanate dans l'éthanol en milieu basique. Puis l'alkylation de l'atome de soufre, par le 2-chlorométhyl-1,3-difluorobenzène, permet la synthèse des isothiourées avec de bons rendements. L'étape de formation des imidazoles substitués, en position 4 par cyclisation intramoléculaire, est réalisée par chauffage en bain d'huile et permet d'obtenir les composés **3** et **4** avec des rendements plus faibles que pour les composés imidazoles non substitués en position 4, dû à des temps de réaction plus longs et des purifications difficiles. Enfin, ces deux composés sont déprotégés, en présence de pipéridine dans l'acétate d'éthyle, et de soude dans le méthanol, respectivement pour donner les composés **5** et **6**. Le composé **5** a ensuite été méthylé en présence d'iodométhane pour obtenir le composé ammonium **7** (Figure 38).

## Optimisation du pharmacophore

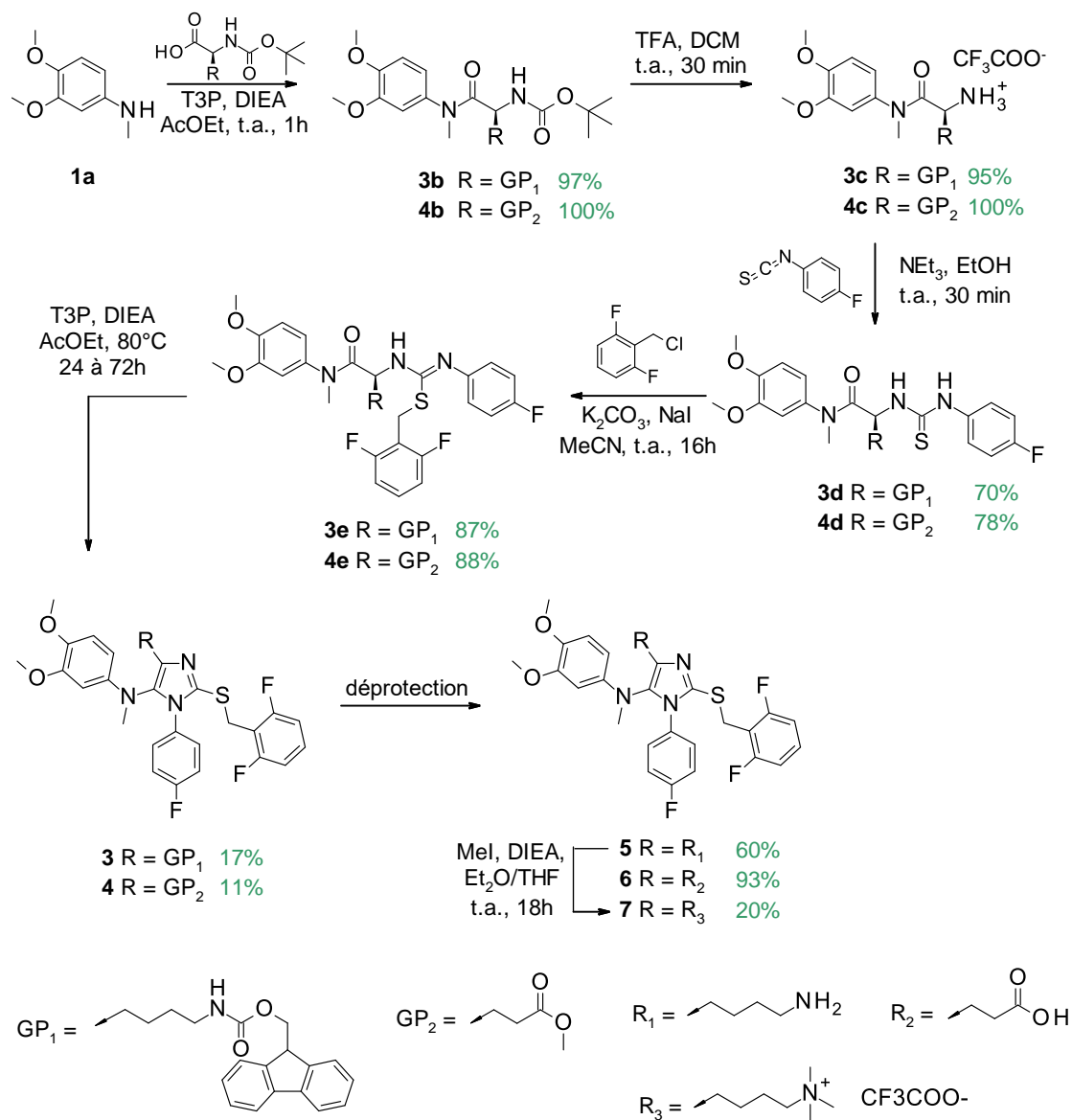
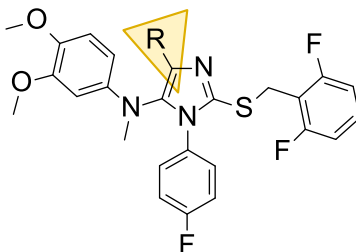


Figure 38 : Schéma de synthèse des composés 3 à 7

## 2. Evaluation *in vitro*

Les composés protégés respectivement par un groupement Fmoc et par un ester méthylique (**3** et **4**), déprotégés (**5** à **7**) et le composé **1**, non substitué en position 4, ont été évalués dans le test primaire sur TGR5 humain et murin. Les résultats des activités sont présentés dans le Tableau 1 ci-après.



Composé	R	hTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)	mTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>1</b>	-H	35	0,8
<b>ML3</b>	-CH <sub>3</sub>	337	7,0
<b>3</b>		1400	140
<b>4</b>		1113	82
<b>5</b>		> 4500	119
<b>6</b>		N.C.	1935
<b>7</b>		≥ 10000	254

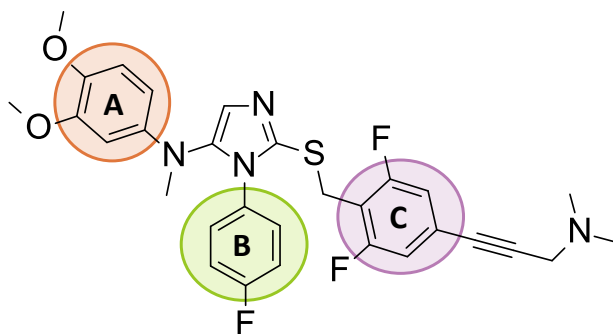
Tableau 1 : Résultats des activités des composés 3 à 7 pour la modification du cycle imidazole  
N.C. : Non calculé (Emax < 20% à 10 µM)

L'introduction du méthyle en position 4 de l'imidazole (**ML3**) est tolérée avec une légère perte de l'activité sur les deux récepteurs. L'introduction de fonctions ionisées à pH physiologique conduit à une perte plus conséquente de l'activité sur le récepteur TGR5. L'encombrement (composés **3**, **4**) et/ou la présence de charges (composés **5** à **7**) sur la position 4 du cycle imidazole est donc peu tolérée par le récepteur TGR5. L'introduction d'autres groupements kinétophores sur cette position ne sera pas explorée.

### C. Conclusion sur l'optimisation du pharmacophore

Suite aux résultats précédemment obtenus au laboratoire, peu de modifications sont tolérées au niveau des différents cycles du pharmacophore 5-amino-2-thioimidazole substitué.

Au vu des données présentées dans le brevet de la société Exelixis<sup>86</sup>, et des activités encourageantes obtenues, par le docteur Lasalle, pour le composé **ML4** (Figure 39)<sup>87</sup>, la position para du cycle **C** du pharmacophore a été explorée pour l'introduction de groupements kinétophores.



**ML4**

hTGR5 EC<sub>50</sub> (nM) = 71

mTGR5 EC<sub>50</sub> (nM) = 4

Figure 39 : Structure et activité du composé ML4

Nous verrons, dans la suite du travail, que cette position s'est effectivement révélée relativement silencieuse sur l'activité. En effet, l'ajout de divers kinétophores sur cette position a permis de conserver des composés très actifs.



## V. Optimisation du kinétophore

Les composés, qui vont être présentés dans cette partie, ont été conçus de façon chimérique avec une partie pharmacophore, dont les phases d'optimisation viennent d'être exposées, liée *via* un bras espaceur à un kinétophore. Ce groupement kinétophore ajuste les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques des composés, pour limiter leur absorption intestinale. Comme évoqué précédemment, la position para du cycle C du pharmacophore, position visiblement silencieuse vis-à-vis de l'activité sur TGR5, a donc été choisie pour l'introduction des divers kinétophores (Figure 40). La suite de ce travail a permis de confirmer que cette position du pharmacophore pouvait être substituée, sans modifier de façon drastique l'activité sur le récepteur.

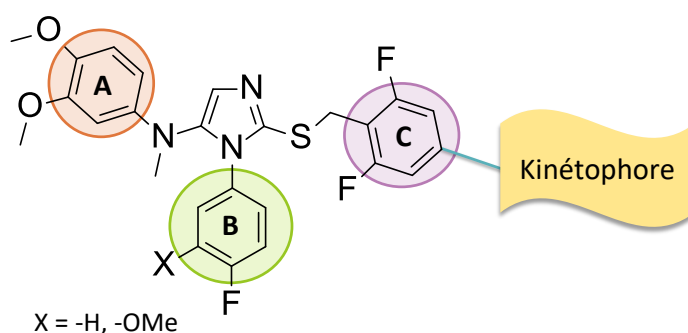


Figure 40 : Structure des composés agonistes de TGR5 envisagés

Une étude systématique des groupements kinétophores décrits dans la littérature a été effectuée, afin d'étudier l'influence de leur activité sur le récepteur TGR5, mais également sur les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques *in vitro* et *in vivo* de ces composés fonctionnalisés. Ainsi, pour chaque kinétophore, je présenterai un bref état de l'art de molécules décrites dans la littérature, avant de présenter mes résultats.

Les différents kinétophores auxquels nous nous sommes intéressés sont présentés dans la Figure 41 ci-dessous.

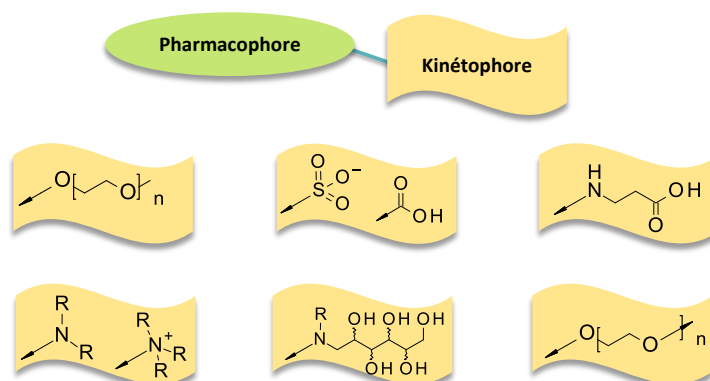


Figure 41 : Kinétophores envisagés

## A. Conception et synthèse d'agonistes topiques intestinaux de TGR5

### 1. Conception et synthèse de composés PEGylés

Actuellement, les polypeptides représentent un tiers des molécules en phase clinique. Cependant, ce type de macromolécules ont certains désavantages comme une potentielle destruction par les enzymes protéolytiques, une faible demi-vie, une faible solubilité, une forte clairance et un mode d'administration par voie injectable<sup>109</sup>. De nombreuses stratégies visant à éviter tous ces désavantages ont été envisagées, et en particulier la conjugaison de ces molécules à des polymères naturels ou synthétiques tels que les polyéthylènes glycols (PEG) (Figure 42).

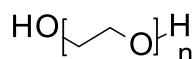


Figure 42 : Structure du polyéthylène glycol

Ces structures polymériques, hydrophiles pouvant atteindre des poids moléculaires très élevés, nous ont donc parus intéressantes dans le cadre de notre projet. En effet, la modulation de la longueur de la chaîne polyéthylène glycol pourra conduire à des modifications de la taille et de la polarité du kinétophore, engendrant ainsi de potentielles modifications des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques du composé chimérique correspondant.

#### a. Introduction sur les polyéthylènes glycols

Les polyéthylènes glycols (PEG) sont des polymères synthétiques constitués de répétitions linéaires ou branchées d'unités d'éthylène glycol. Il a été montré que ce polymère, non toxique, non immunogène, non antigénique, est classé comme étant « Generally Recognised As Safe (GRAS) » par la FDA (Food and Drug Administration). De plus, il a été approuvé pour des utilisations chez l'homme, dans l'alimentation, les cosmétiques et l'industrie pharmaceutique.

Le couplage de polyéthylène glycol aux molécules thérapeutiques, décrit pour la première fois dans les années 70, est maintenant une stratégie très largement utilisée pour modifier les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques des molécules, comme leur solubilité ou encore leur clairance. Dans la littérature, cette stratégie est largement décrite pour des PEG présentant des poids moléculaires supérieurs à 5 000 Da. Depuis ces 25 dernières années, plusieurs macromolécules (protéines, enzymes...) couplées à des PEG de haut poids moléculaire ont reçu leur autorisation de mise sur le marché par la FDA (Tableau 2)<sup>109-114</sup>.

Nom du médicament	Type de molécule	Taille du PEG (Da)	Indication thérapeutique	Année d'approbation
<b>Pegadamase (Adagen®)</b>	Enzyme	5 000	Déficit immunitaire combiné sévère	1990
<b>Pegaspargase (Oncaspar®)</b>	Enzyme	5 000	Leucémie	1994
<b>Peginterferon-<math>\alpha</math>2b (PEG-INTRON®)</b>	Protéine	12 000	Hépatite C	2000
<b>Peginterferon-<math>\alpha</math>2a (PEGASYS®)</b>	Protéine	40 000	Hépatite C	2001
<b>Pegfilgrastim (Neulasta®)</b>	Protéine	20 000	Neutropénie	2002
<b>Pegvisomant (Somavert®)</b>	Protéine	5 000	Acromégalie	2003
<b>Pegaptanib (Macugen®)</b>	Oligonucléotide	40 000	Dégénérescence maculaire liée à l'âge	2004
<b>mPEG-epoetin-<math>\beta</math> (Mircera®)</b>	Protéine	30 000	Maladies chronique du rein	2007
<b>Certolizumab pegol (Cimzia®)</b>	Antigène	40 000	Maladie de Crohn	2008
<b>PEG-uricase (Puricase1®)</b>	Enzyme	10 000	Goutte	2010

Tableau 2 : Exemples de médicaments (macromolécules) fonctionnalisés par des PEGs de haut poids moléculaire (Poids moléculaire > 5 000 Da)<sup>109-114</sup>

Alors que la plupart de ces médicaments PEGylés sont des macromolécules, la PEGylation est également une stratégie émergente pour améliorer les propriétés de petites molécules à visée thérapeutique<sup>115-117</sup>. Cependant, la PEGylation de petites molécules est un véritable défi. En effet, l'introduction de groupement PEG volumineux, sur des composés de petite taille, peut perturber les interactions de ceux-ci avec la cible biologique, et conduit à de fortes pertes d'affinité. Pour la fonctionnalisation de petites molécules par des groupements PEGs, il est donc crucial de disposer de relations structure-activité fines dans la série chimique d'intérêt, afin de choisir la position d'ancrage, la taille et la topologie du PEG<sup>118</sup>. La littérature regorge d'exemples d'études de profil pharmacocinétique pour des macromolécules couplées à des PEG de poids moléculaires élevés<sup>119-121</sup>.

Cependant, très peu de données sont disponibles pour des petites molécules couplées à des PEG de faible poids moléculaire (< 5 000 Da)<sup>122-125</sup>. En effet, seul le Naloxegol, qui a reçu son autorisation de mise sur le marché en 2014 pour le traitement des constipations induites par les opiacés possède un groupement PEG de 7 unités éthylènes glycol (Figure 43). Ce groupement PEG a été introduit pour limiter le passage de la barrière hémato-encéphalique.

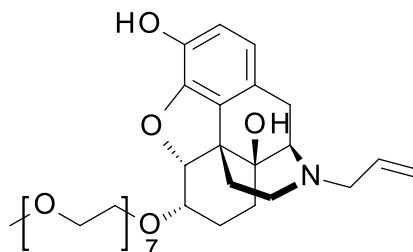


Figure 43 : Structure du Naloxegol

Nous nous sommes donc intéressés au développement d'agonistes de TGR5, couplés à des PEG de courtes longueurs, pour étudier l'effet de la PEGylation d'une part sur l'activité sur le récepteur TGR5, et d'autre part sur les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques *in vitro* et *in vivo* de ces agonistes PEGylés de TGR5.

#### b. Synthèses d'analogues PEGylés

Pour réaliser la synthèse de nos composés, nous avons choisi d'utiliser des mPEG (méthoxy PEG) mono-fonctionnalisés commerciaux. Les différents composés que je vais présenter ont été conçus en faisant varier la nature du bras espaceur ou la longueur de la chaîne PEG (Figure 44).

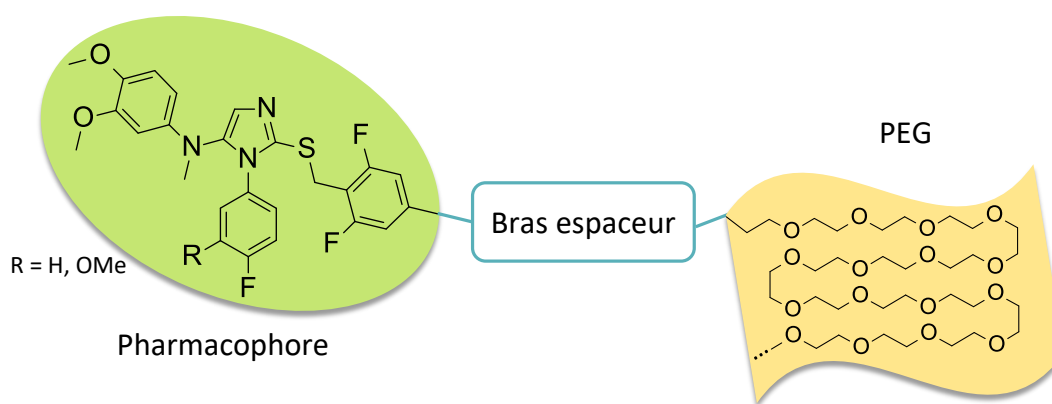


Figure 44 : Conception des composés fonctionnalisés par des PEG

## i. Synthèse de composés PEGylés avec un lien éther

Une première série de composés a été obtenue en introduisant le méthoxy-PEG *via* un lien éther. Afin d'étudier l'influence de la distance entre le groupement PEG et le pharmacophore sur l'activité, deux types de composés ont été synthétisés (Figure 45) :

- Sans bras espaceur
- Avec un espaceur de type phényle

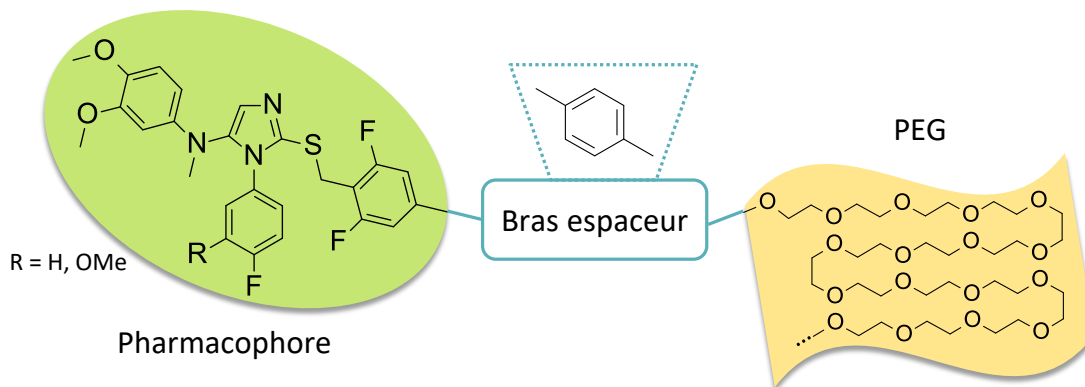
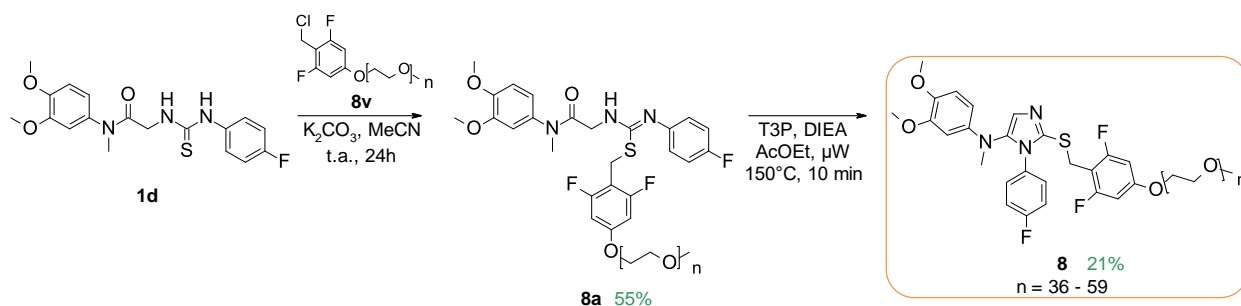


Figure 45 : Structure des types de composés PEGylés envisagés

Pour la synthèse du composé **8**, la thiourée **1d**, dont la synthèse a été présentée précédemment, est alkylée avec l'intermédiaire **8v** pour conduire à l'intermédiaire **8a**. L'étape de cyclisation conduit au composé souhaité, sans espaceur, avec un rendement moyen de 21%, après purification par HPLC préparative (Figure 46).

Figure 46 : Synthèse du composé **8**

La synthèse de l'intermédiaire **8v** est réalisée en 5 étapes à partir du 2,6-difluoro-4-hydroxybenzonnitrile (Figure 47). L'hydrolyse de la fonction nitrile est tout d'abord effectuée dans un milieu basique aqueux, puis l'acide carboxylique **8i** obtenu est estérifié (**8ii**), avant d'être réduit, en présence de DIBAL-H dans le THF, pour conduire à l'alcool phénol **8iii**. Le tosylate de poly(éthylène glycol) méthyl éther ( $M_n = 2\ 000$  g/mol) commercial est couplé au 3,5-difluoro-4-hydroxyméthyl-phénol **8iii** dans l'acétonitrile, en présence de carbonate de potassium, puis l'alcool benzylique **8iv** est substitué par un chlore pour donner l'intermédiaire **8v** avec un

rendement quantitatif. Cette étape de chloration, réalisée en présence de chlorure de mésyle, a été optimisée par le Docteur Lasalle. En effet, l'utilisation d'un agent de chloration classique (chlorure de thionyle) conduisait à la dégradation du milieu réactionnel. La substitution de l'alcool benzylique par un mésylate avait donc été envisagée et avait conduit à l'obtention du dérivé chloré.

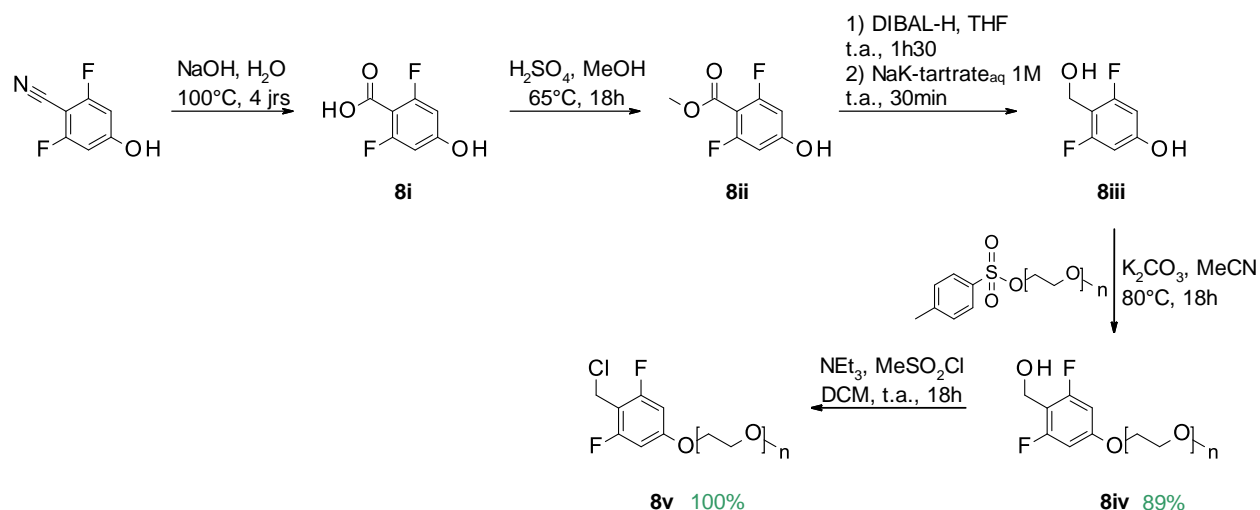


Figure 47 : Synthèse de l'intermédiaire 8v nécessaire à la synthèse du composé 8

Afin de réaliser la synthèse du composé avec l'espaceur phényle, la voie de synthèse a été préalablement optimisée. En effet, l'introduction de l'espaceur phényle a été effectuée par couplage pallado-catalysé et a nécessité une optimisation.

La mise au point de l'étape d'obtention du motif biphenyle a été réalisée sur un composé prototype dépourvu de kinétophore (**9**) à partir du précurseur aryle bromé **9b** (Figure 48). Le composé bromé **9b** est obtenu, comme précédemment, à partir de la thiourée **1d**. L'alkylation avec le 5-bromo-2-(chlorométhyl)-1,3-difluoro-benzène **9i**, obtenu par chloration de l'alcool benzylique commercial correspondant, conduit à l'isothiourée **9a** avec un rendement de 62%. L'étape de cyclisation conduit à l'intermédiaire **9b** avec un rendement moyen. L'étape de couplage de Suzuki est réalisée, lors de la dernière étape de synthèse, par réaction entre l'intermédiaire bromé **9b** et l'acide phénylboronique.

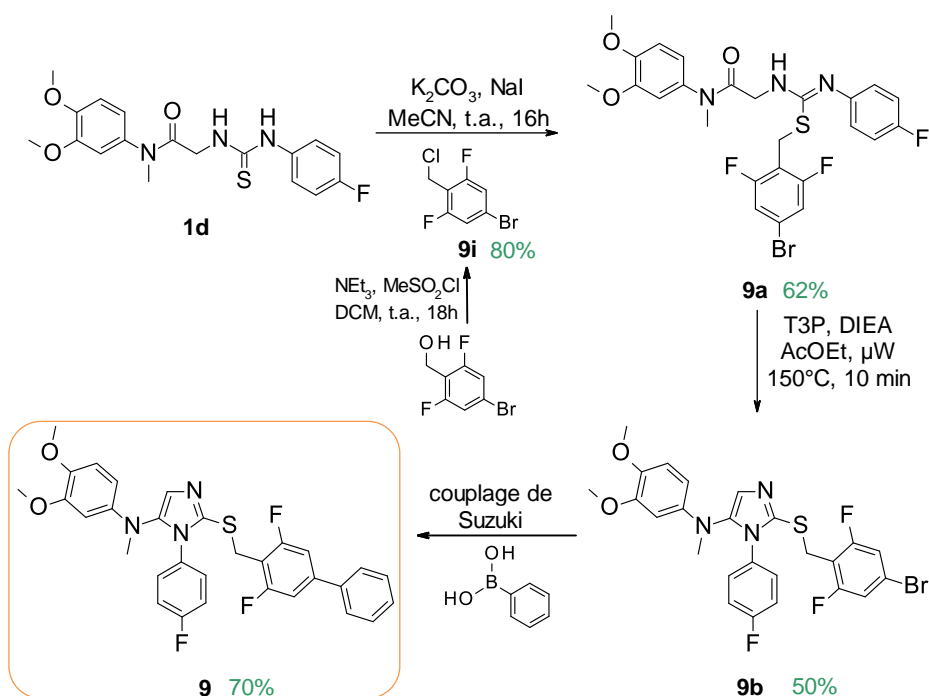


Figure 48 : Synthèse du composé 9

Dans le Tableau 3 ci-dessous sont présentés les différents essais réalisés. Les conditions réactionnelles 1 et 2, issues de réactions effectuées au laboratoire, n'ont pas conduit à la formation du composé souhaité. Les conditions 3 et 4 ont permis la formation du composé 9. La condition 4 a été obtenue à partir de la condition 3, en ajustant la température de chauffage au micro-ondes, pour éviter la dégradation du milieu réactionnel<sup>126</sup>.

Condition	Base	Catalyseur	Solvant	Chauffage/Temp	Commentaires
1	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O/Dioxane (3/1)	60°, 24h	Pas de réaction
2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O/Dioxane (3/1)	70°C, 18h	Pas de réaction
3	CS <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O/DME/EtOH (3/2/1)	μW 150°C, 10 min	Conversion mais dégradation
4	CS <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O/DME/EtOH (3/2/1)	μW 100°C, 10 min	Conversion totale, peu de dégradation

Tableau 3 : Optimisation de la réaction pallado-catalysée de Suzuki pour l'obtention du composé 9

Ces conditions optimisées (condition 4) ont été utilisées pour l'obtention du composé 10, à partir du précurseur bromé 10b (Figure 49). Le composé 10b est obtenu en 2 étapes à partir de la thiourée 2d. La thiourée 2d formée est alkylée avec le 5-bromo-2-(chlorométhyl)-1,3-difluoro-benzène 9i pour former l'intermédiaire 10a. La cyclisation au T3P permet d'obtenir le précurseur bromé 10b voulu avec un rendement quantitatif. Après substitution du 4-(4,4,5,5-

tetraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phénol avec le tosylate de poly(éthylène glycol) méthyl éther ( $M_n = 2\ 000$  g/mol), l'intermédiaire **10i** est obtenu avec un rendement de 31% après purification. Les deux intermédiaires, **10b** et **10i**, sont ensuite engagés dans le couplage de Suzuki pour obtenir le composé **10** après purification par HPLC préparative. Le rendement moyen obtenu (46%) est dû à des difficultés rencontrées lors de la purification et non à une conversion partielle.

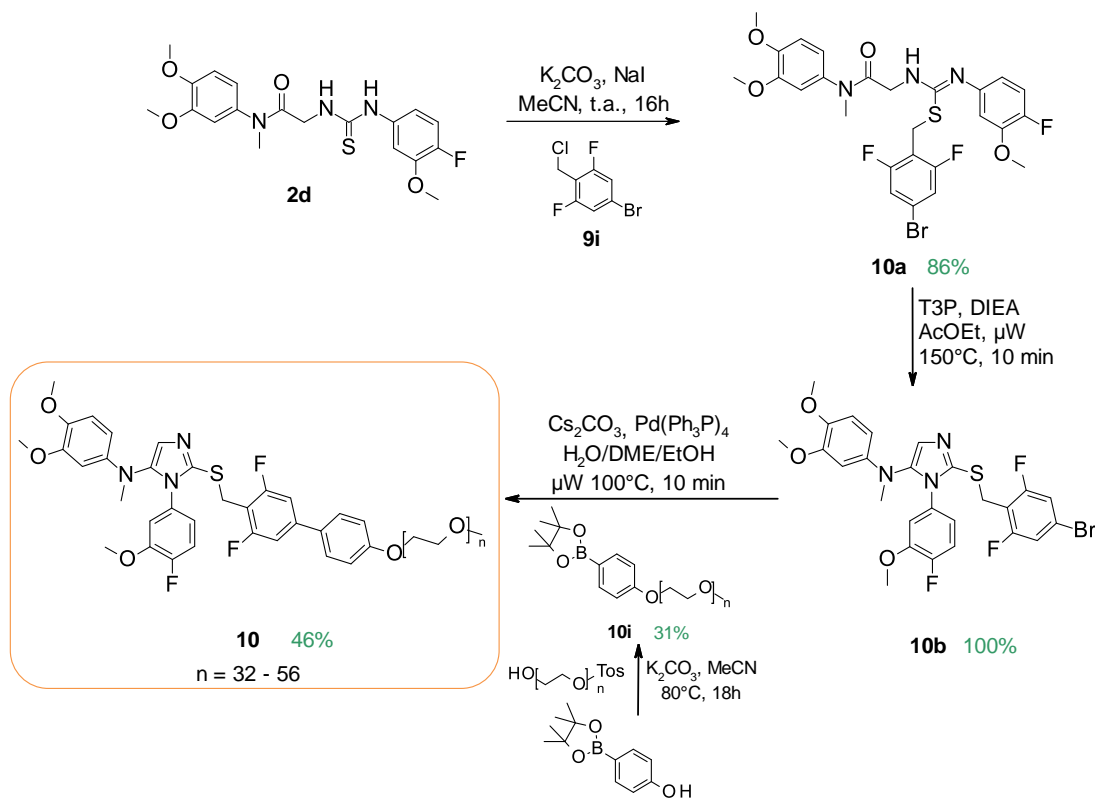
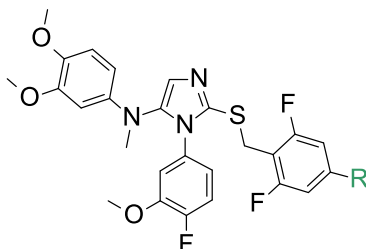


Figure 49 : Synthèse du composé 10

## ii. Synthèse de composés PEGylés avec un espaceur biphenyle-amide

Une deuxième série de composés PEGylés présentant un espaceur biphenyle et un lien amide a été synthétisée. Six composés ont été préparés selon deux voies de synthèse (Tableau 4).

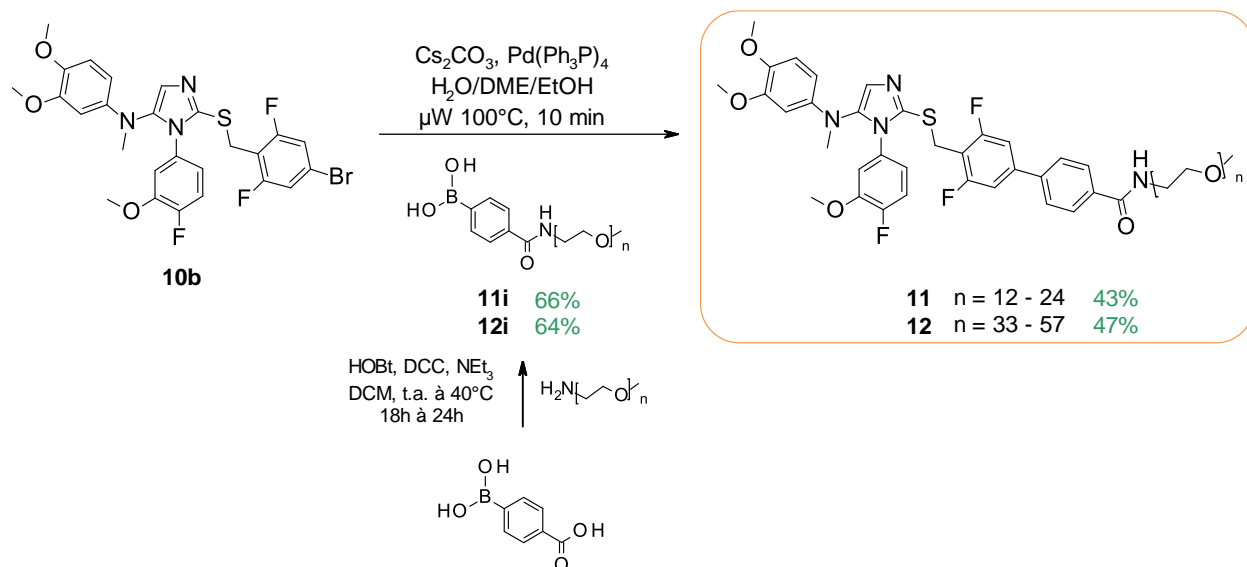




Composé	R	n
<b>2</b>	-H	-
<b>13</b>		4 - 13
<b>14</b>		11 - 25
<b>11</b>		12 - 24
<b>15</b>		31 - 57
<b>12</b>		33 - 57
<b>16</b>		100 - 138

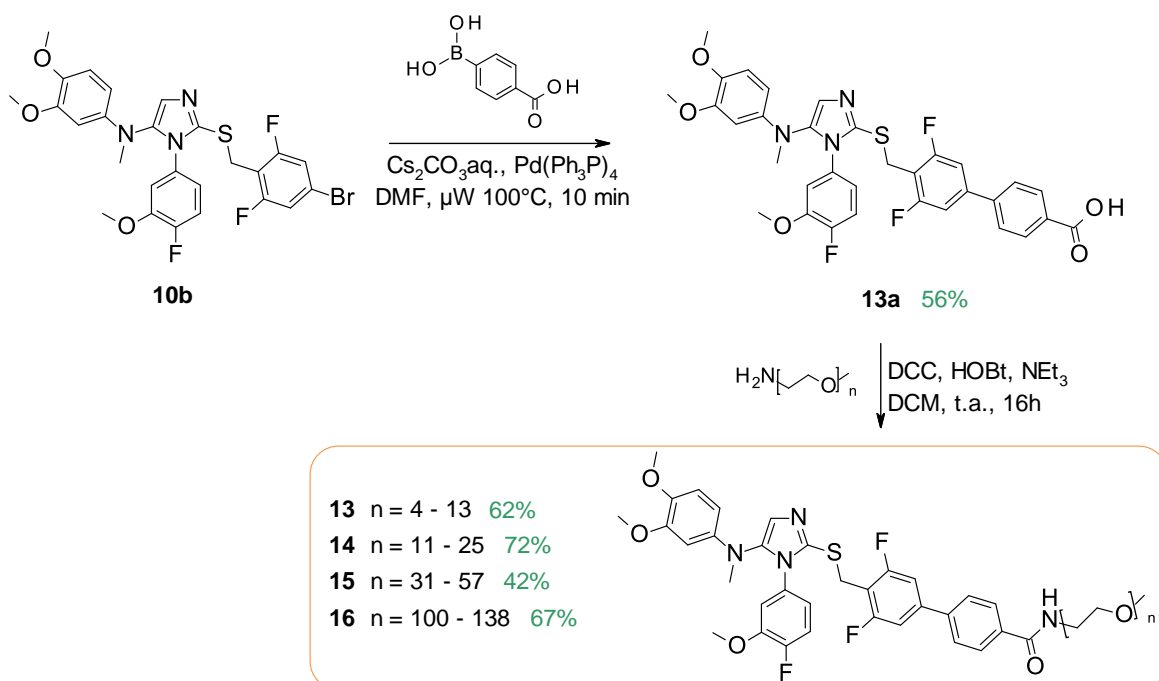
Tableau 4 : Composés avec espaceur phényle-amide envisagés

La première voie de synthèse est similaire à celle précédemment présentée pour l'obtention du composé **10** : le polyéthylène glycol éther amine ( $M_n = 750$  ou  $2\,000$  g/mol) est couplé à l'acide 4-carboxyphénylboronique en présence de 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) et de dicyclohexylcarbodiimine (DCC) pour conduire aux intermédiaires **11i** et **12i**. Le couplage de Suzuki dans les conditions présentées précédemment permet l'obtention des composés **11** et **12** (Figure 50).

Figure 50 : Synthèse des composés **11** et **12**

Dans la deuxième voie de synthèse, plus convergente, le motif PEG est introduit lors de la dernière étape de synthèse (Figure 51). La réaction de Suzuki ne permettant pas d'obtenir de

très bons rendements, l'introduction des PEG a été réalisée, après l'étape de couplage pallado-catalysée, et a conduit à de meilleurs rendements et des étapes de purifications plus simples. Les composés **13** à **16** ont donc été obtenus par un couplage entre l'intermédiaire biphenyle acide carboxylique **13a** et les amines poly(éthylène glycol)méthyl éther commerciales correspondantes ( $M_n = 500, 750, 2\ 000$  et  $5\ 000$  g/mol) en présence de DCC et d'HOBt. Il est important de noter que les composés **11** et **14**, ainsi que **12** et **15** ont été synthétisés à partir des mêmes lots d'amines PEGylées commerciales, mais les étapes de purification conduisent à des composés présentant des profils de masse légèrement différents. Je reparlerai de ces profils de masse plus tard, dans le manuscrit.

Figure 51 : Synthèse des composés **13** à **16**

### iii. Synthèse de composés PEGylés avec un espaceur fonctionnalisé par une amine ou un ammonium

L'introduction d'un espaceur flexible de type alkyle, possédant une fonction protonable à pH physiologique, a été envisagée pour étudier l'influence de la flexibilité de l'espaceur et de l'ajout d'une charge sur les activités *in vitro* et les propriétés ADME. Pour cela, la synthèse est réalisée selon le même schéma réactionnel : la thiourée **1d** est alkylée par l'intermédiaire **17ii** synthétisé au préalable, puis l'isothiourée **17a** est cyclisée pour conduire au 5-amino-2-thioimidazole substitué par un groupement chloropropyle **17b**. Cet intermédiaire chloré est ensuite mis en jeu, dans une réaction de substitution nucléophile avec l'amine poly(éthylène glycol)méthyl éther ( $M_n = 750$  g/mol), ou la diméthylamine poly(éthylène glycol)méthyl éther **17iii**, pour obtenir les composés **17** et **18** (Figure 52). La diméthylamine poly(éthylène

glycol)méthyl éther **17iii** est obtenue avec un rendement de 64%, à partir de l'amine commerciale correspondante, par réaction d'amination réductrice en présence d'une résine cyanoborohydrure d'ammonium<sup>127-129</sup>.

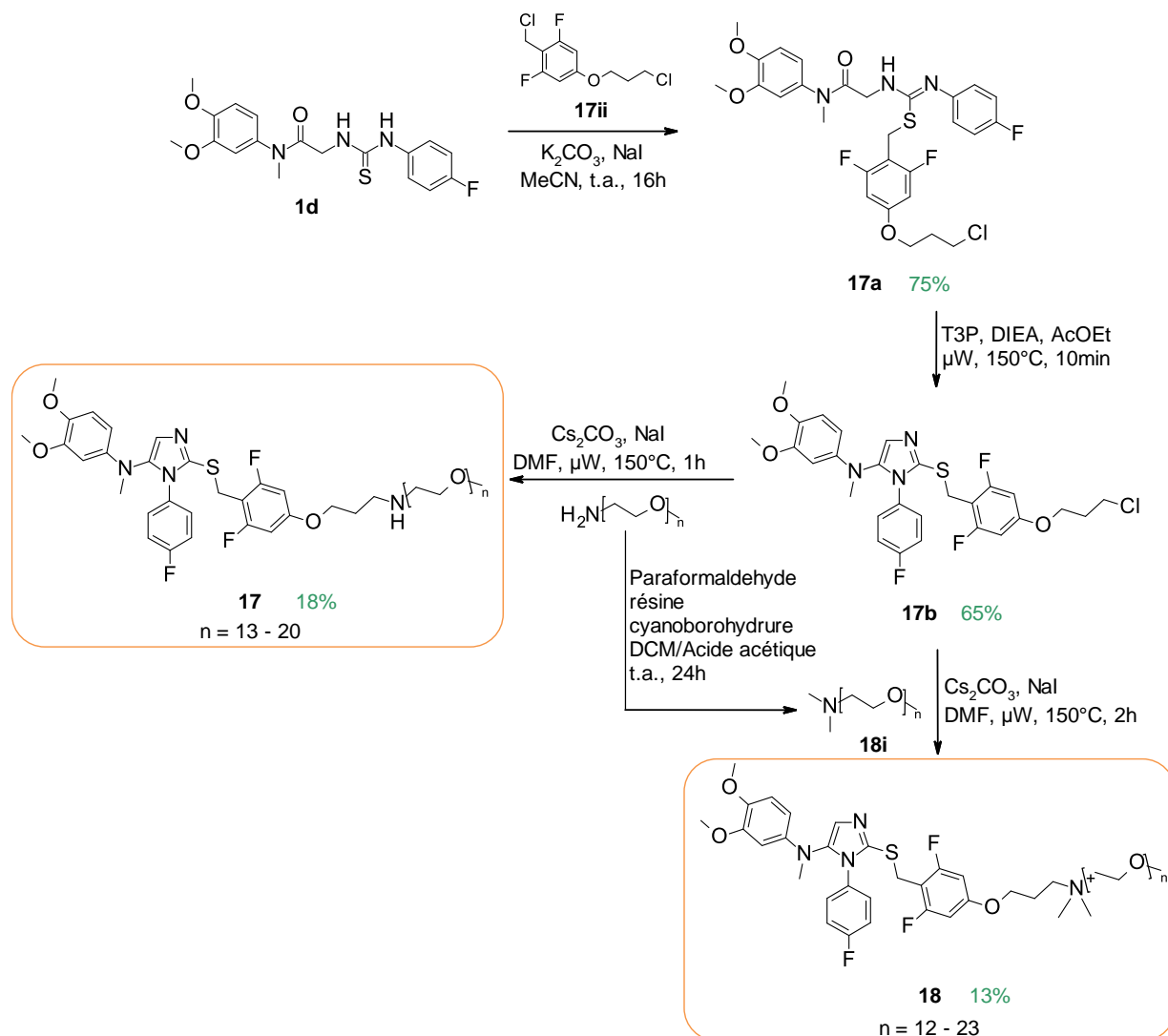


Figure 52 : Synthèse des composés 17 et 18

L'intermédiaire chloré **17ii**, utilisé pour l'alkylation de la thiourée, est obtenu en deux étapes, à partir du 3,5-difluoro-4-hydroxyméthyl-phénol **8iii** par substitution du phénol par le 1-chloro-3-bromopropane. La chloration de l'alcool benzylique de l'intermédiaire **17i**, en présence de chlorure de mésyle dans le dichlorométhane, conduit à l'intermédiaire **17ii** avec un rendement quantitatif (Figure 53).

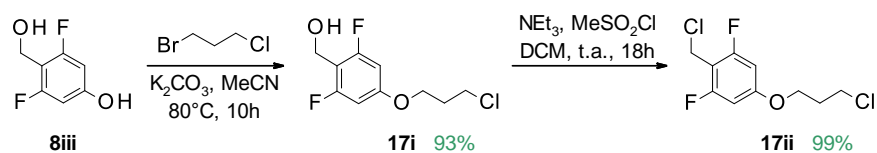


Figure 53 : Synthèse de l'intermédiaire 17ii nécessaire à la synthèse des composés 17 et 18

## iv. Synthèse de composés PEGylés avec un espaceur amide inversé

Afin d'étudier l'influence de la liaison amide, reliant le pharmacophore au kinétophore, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'un composé PEGylé avec une liaison anilide. A partir de l'intermédiaire bromé **10b**, un couplage de Suzuki avec le 4-(4,4,5,5-tetraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline permet d'obtenir l'intermédiaire biphenyle aniline **19a**. Le couplage de l'aniline avec le chlorure de (polyéthylène glycoxy) acétyle **19i** ( $M_n = 5\ 000\text{ g/mol}$ ), préalablement synthétisé, conduit au composé **19**, avec un rendement de 29% (Figure 54).

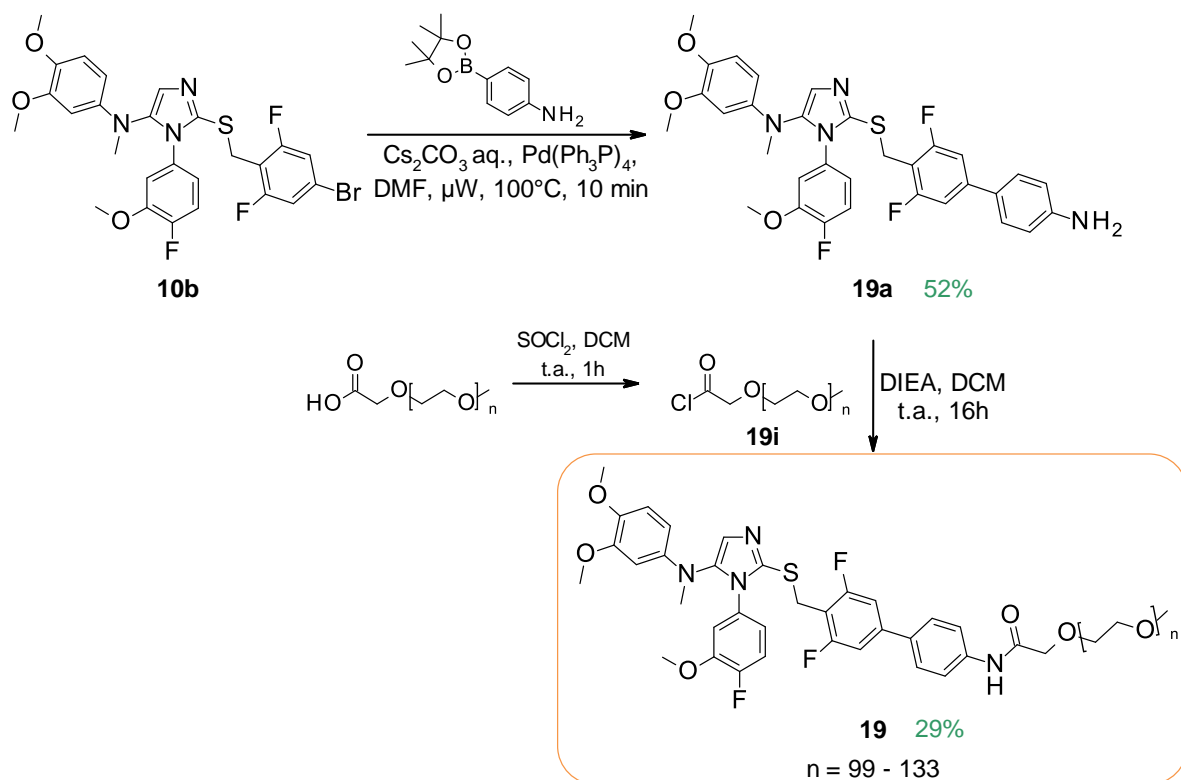


Figure 54 : Synthèse du composé 19

c. Caractérisation des composés PEGylés

Tous les composés obtenus sont synthétisés à partir de réactifs PEGylés commercialisés sous forme de mélanges polydisperses. Ainsi, tous les intermédiaires de synthèse et les produits finaux obtenus à partir de ces produits commerciaux se présentent également sous forme de mélanges polydisperses. Il est donc important de caractériser de façon précise les mélanges de composés PEGylés obtenus<sup>130, 131</sup>. Plusieurs paramètres permettent de caractériser un polymère : la nature du monomère (ici, le motif éthylène glycol), les groupements terminaux (le pharmacophore et un groupement méthoxy dans notre cas), la topologie du polymère (linéaire pour nos composés), et les paramètres de distribution. Ces derniers permettent de déterminer la masse moléculaire moyenne des composés et sont caractérisés par différentes grandeurs :

- La masse moléculaire moyenne en nombre  $M_n$  (exprimée en g/mol) :

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

où  $N_i$  représente le nombre d'oligomères de degré de polymérisation  $i$  et de masse  $M_i$ .

- La masse moléculaire moyenne en masse  $M_w$  (exprimée en g/mol) :

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

Dans le cas d'un polymère isomoléculaire (ou monomoléculaire) les masses moyennes en nombre et en masse sont égales. Pour les polymères polymoléculaires, également appelés polydisperses, les masses moléculaires moyennes en masse sont plus grandes que les masses moléculaires moyennes en nombre, puisqu'elles donnent un poids statistique plus important aux molécules de masses moléculaires élevées. Ainsi, on définit l'indice de polydispersité  $I_p$  qui caractérise la dispersité autour de la longueur de chaîne moyenne :

$$I_p = \frac{M_w}{M_n}$$

Dans le cas de molécules polydisperses dont l'indice de polydispersité est élevé, la largeur de la distribution  $\sigma$  (= écart-type) permet de renseigner sur la largeur de la gaussienne (amplitude de masses du polymère) et est définie par la formule suivante :

$$\sigma = \sqrt{(M_w M_n - M_n^2)}$$

Ces paramètres de distribution peuvent être déterminés à partir d'un spectre de masse,  $N_i$  étant assimilé à l'aire du pic de masse correspondant à l'oligomère de masse  $M_i$ . La spectrométrie de masse permet également de déterminer la valeur modale (statistiquement la plus probable) de la masse moléculaire  $M_p$ , donnée par le pic d'intensité maximale dans la distribution.

En général, avoir un indice de polydispersité faible est un prérequis nécessaire dans le cadre d'applications pharmaceutiques. Un polymère, avec une homogénéité acceptable, possède un indice de polydispersité ( $I_p$ ) inférieur à 1,1, pour assurer la reproductibilité en termes de temps de résidence dans le corps<sup>112</sup>. Cette demande a été rapidement réalisée pour les PEG commerciaux, depuis que la synthèse polymérique peut être contrôlée pour atteindre des  $I_p$  inférieurs à 1,01.

L'appareil qui a été utilisé pour obtenir les spectres de masse est une LC-MS/MS Acquity I-Class Xevo TQD (Waters) (colonne Acquity BEH C18 50 mm × 2,1 mm × 1,7 μm, phases mobiles : acetate d'ammonium 10 mM, acétonitrile 0,1% HCOOH). Tous les composés PEGylés synthétisés ont été caractérisés dans ces conditions (Figure 55, Tableau 5).

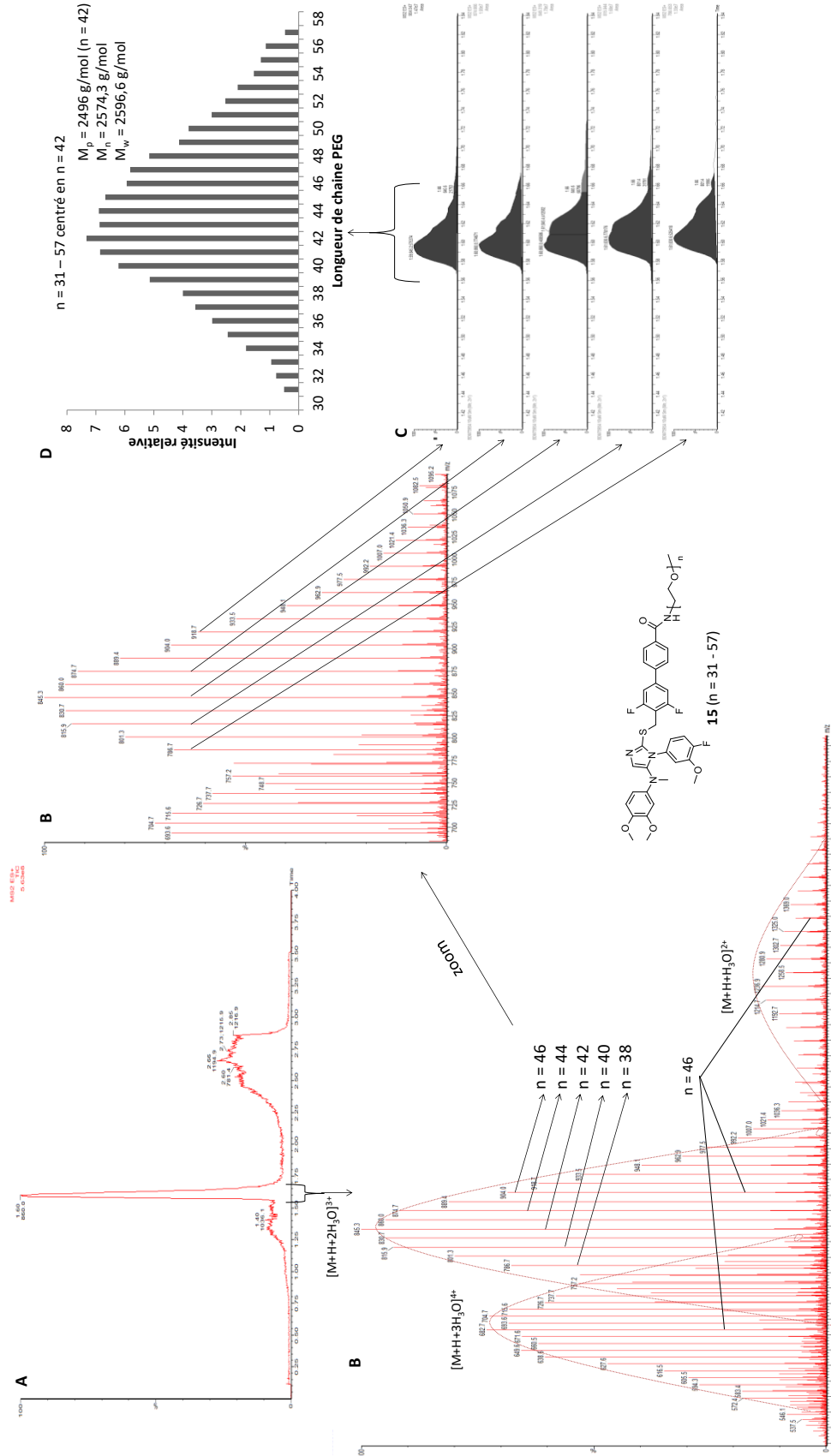
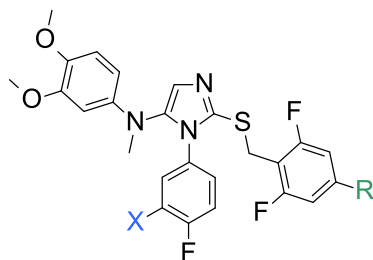


Figure 55 : Exemple de l'analyse de la répartition des longueurs au sein du composé 15. n = nombre d'unités monomériques. A) Chromatogramme MS (ESI+) permettant d'obtenir le spectrogramme de masse. B) Spectrogramme de masse permettant la détermination des longueurs de PEG présentes dans le mélange en fonction des différents états d'ionisation. C) Chromatogramme en MS (chaque ligne correspond à une longueur pour un état d'ionisation). D) Histogramme représentant l'intensité relative de chacune des longueurs.

## Optimisation du kinétophore



N°	X	R	n	M <sub>n</sub>	M <sub>w</sub>	M <sub>p</sub>	I <sub>p</sub>	σ
8	-H		36 - 59	2502,2	2517,3	2408	1,006	194,2
10	-OCH <sub>3</sub>		32 - 56	2513,6	2532,7	2513	1,008	218,7
11	-OCH <sub>3</sub>		12 - 24	1408,5	1416,8	1353	1,006	108,4
12	-OCH <sub>3</sub>		33 - 57	2578,1	2599,8	2672	1,008	236,4
13	-OCH <sub>3</sub>		4 - 13	1081,2	1085,7	1089	1,004	69,8
14	-OCH <sub>3</sub>		11 - 25	1452,4	1461,7	1441	1,006	116,2
15	-OCH <sub>3</sub>		31 - 57	2574,3	2596,6	2496	1,009	239,6
16	-OCH <sub>3</sub>		100 - 138	5831,3	5855,7	5840	1,004	377,8
17	H		13 - 20	1305,3	1313,7	1276	1,006	104,6
18	H		12 - 23	1338,3	1346,5	1349	1,006	104,9
19	-OCH <sub>3</sub>		99 - 133	5782,5	5805,6	5788	1,004	365,4

Tableau 5 : Caractérisation des composés PEGylés synthétisés

Nos composés PEGylés, présentant des indices de polydispersité faibles ( $I_p < 1,01$ ), sont adaptés pour des études pharmacologiques et pharmacocinétiques *in vitro* et *in vivo*.

11 composés, présentant des kinétophores de type polyéthylène glycol de poids moléculaires variés (500 à 5 000 g/mol), ont ainsi été synthétisés afin d'étudier l'influence de la taille du polymère et de la nature du bras espaceur sur l'activité sur le récepteur TGR5, ainsi que sur les propriétés physico-chimiques et ADME de ces potentiels nouveaux agonistes à visée topique intestinale.

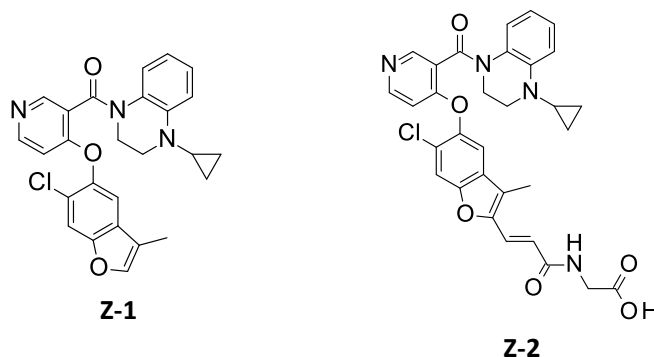
## 2. Conception et synthèses de composés anioniques à pH physiologique

Dans cette partie, je présenterai la conception et la synthèse de composés chimériques portant une unité structurale polaire, chargée négativement à pH physiologique.

### a. Etat de l'art

Dans une publication, concernant la recherche d'inhibiteur du transporteur apical sodium-dépendant aux acides biliaires (ASBT ou IBAT), pour le traitement du diabète de type 2, des composés décrits comme non absorbés sont présentés<sup>78</sup>. Parmi les kinétophores utilisés afin de limiter l'absorption intestinale des composés, des acides sulfoniques et des acides carboxyliques, couplés au pharmacophore, ont permis une diminution très importante de la perméabilité membranaire. Des composés disulfonates et diacides carboxyliques sont également reportés<sup>78</sup>. De plus, une autre équipe, s'intéressant à la découverte d'agonistes non absorbés de TGR5, a également synthétisé des composés possédant une fonction acide carboxylique. Dans l'article publié en 2014, Zou *et al.* montrent que la fonctionnalisation du composé **Z-1** par une fonction acide carboxylique, pour donner le composé **Z-2**, permet d'obtenir un composé moins perméable, et dont la concentration plasmatique est diminuée après une administration du composé chez des souris ICR, à une dose de 50 mg/kg, par rapport au composé **Z-1** (Figure 56)<sup>69</sup>.





Composé	hTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)	mTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)	P <sub>app</sub> A→B (10 <sup>-6</sup> cm/s)	P <sub>app</sub> B→A (10 <sup>-6</sup> cm/s)	Efflux ratio	[Composé] <sub>plasma</sub> (ng/mL)
Z-1	0,28	0,92	2,10	1,50	0,7	65
Z-2	34	13	0,21	3,14	15	23

Figure 56 : Structure des composés Z-1 et Z-2, activités sur le récepteur TGR5, perméabilités (A→B, B→A), exposition systémique<sup>69</sup>

Nous nous sommes donc intéressés à la synthèse de composés possédant une unité structurale chargée négativement à pH physiologique. Nous avons choisi d'introduire des groupements présentant des acidités différentes :

- Des fonctions sulfonates déprotonées quel que soit le pH physiologique (pKa < -1),
- Des acides carboxyliques (pKa = 4 - 5) qui seront neutres, et potentiellement partiellement absorbés dans l'estomac, et déprotonés, donc moins perméables au niveau de l'intestin.

### b. Synthèses de composés fonctionnalisés par des groupements sulfonates

#### i. Composés mono-sulfonates

La fonction sulfonate a été introduite sur une chaîne alkyle, de longueur variable, reliée au pharmacophore par un lien éther (Figure 57).

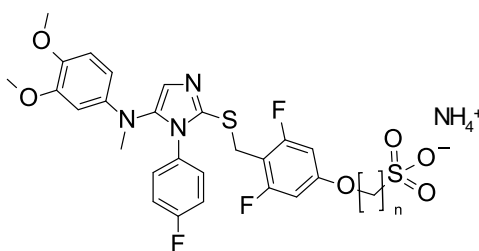
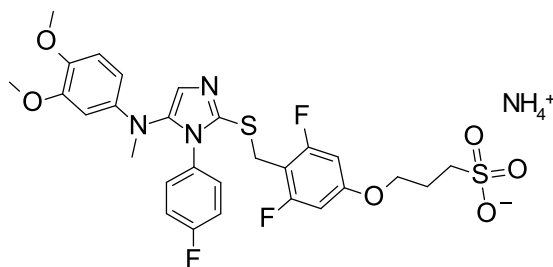


Figure 57 : Structure générale des composés sulfonates

Le composé **ML5** ( $n = 3$ , Figure 58), synthétisé précédemment par le Docteur Lasalle, s'était révélé très prometteur. Il présente de très bonnes activités sur le récepteur TGR5 (hTGR5  $EC_{50} = 24$  nM, mTGR5  $EC_{50} = 0,4$  nM), équivalentes, voire légèrement supérieures, à celles du pharmacophore « nu » **1** montrant que ce type de kinétophore est très bien toléré par le récepteur. Le composé **ML5** sera par la suite nommé composé **21**.



**21 (ML5)**

Figure 58 : Structure du composé 21 (ML5)

Afin d'étudier l'influence de la longueur du bras espaceur, la synthèse de deux autres composés sulfonates, en réduisant ou en allongeant la chaîne carbonée, a été envisagée.

La synthèse de ces trois composés fonctionnalisés par un groupement sulfonate est présentée dans la Figure 59.

La thiourée **1d** est alkylée en milieu basique par les intermédiaires chlorés, préalablement synthétisés en deux étapes à partir du 3,5-difluoro-4-hydroxyméthyl-phénol **8iii**, pour obtenir les isothiourées correspondantes **20a** à **22a** (respectivement  $n = 2$  à  $n = 4$ ), avec des rendements moyens. L'étape suivante consiste à cycliser ces intermédiaires isothiourées, en présence de T3P et de DIEA dans l'acétate d'éthyle, pour donner les intermédiaires **20b** à **22b**. Enfin, l'introduction du groupement sulfonate a été réalisée en dernière étape, en présence de sulfite de sodium et d'iodure de sodium par chauffage micro-onde à 130°C pendant 2 à 4h, pour conduire aux composés **20** à **22** désirés<sup>78, 132</sup>.

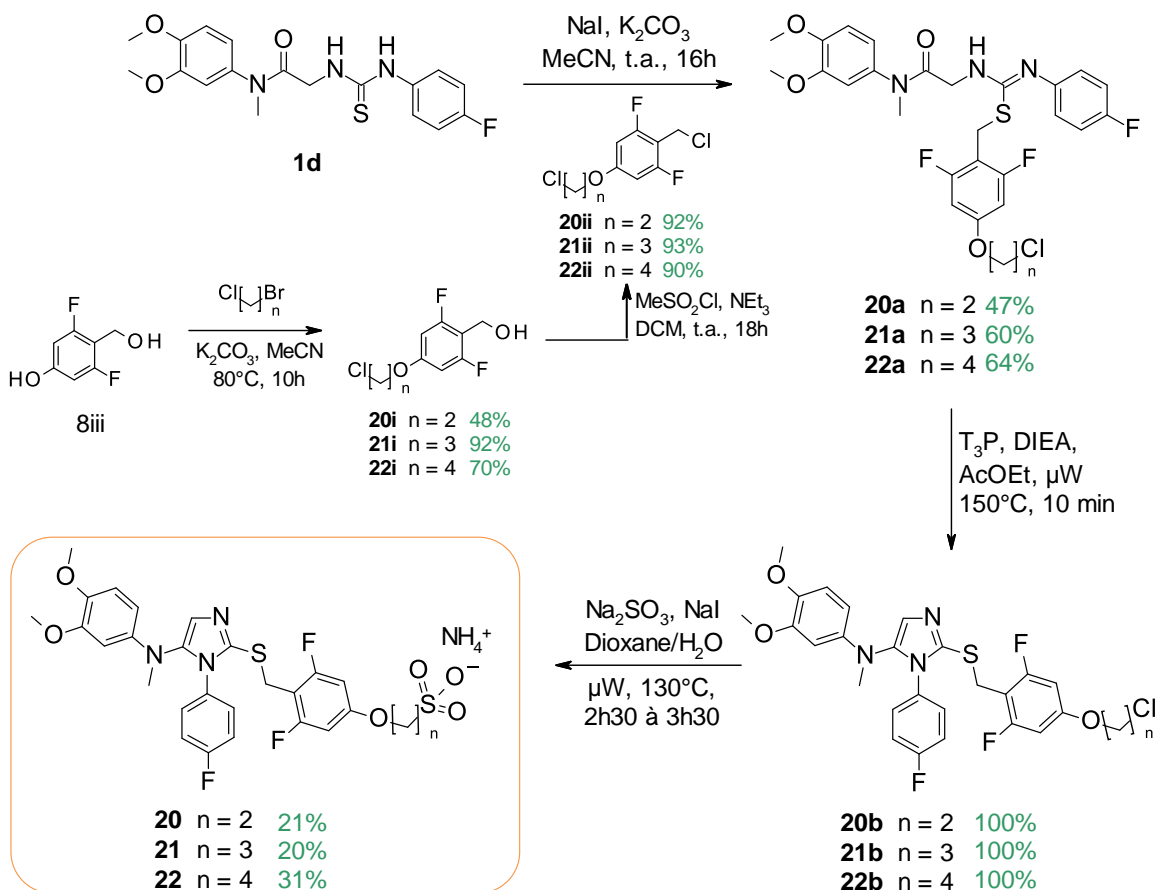


Figure 59 : Synthèse des composés 20 à 22

Les composés ont été obtenus sous forme de sel d'ammonium, après purification par HPLC préparative dans un tampon à pH 3,8 acide formique/ammoniaque. La présence de l'ammonium a pu être vérifiée par la RMN du proton dans l'acétonitrile ou le chloroforme pour les trois composés sulfonate, puisqu'une intégration de 4 protons correspondant aux 4 protons du contre-ion  $\text{NH}_4^+$  a été observée.

## ii. Composé disulfonate

La synthèse d'un composé disulfonate a été envisagée, afin d'évaluer l'effet de l'introduction de charges supplémentaires sur la perméabilité. La voie de synthèse est présentée dans la Figure 60. La thiourée **1d** est alkylée par l'intermédiaire **23iii**, pour donner l'isothiourée correspondante **23a** avec un rendement moyen. L'étape de cyclisation au T3P, puis la déprotection en milieu acide ont permis l'obtention de l'intermédiaire amine **23c**. L'introduction des deux chaînes aliphatiques, comportant le groupement sulfonate, a été réalisée dans un mélange aqueux basique ( $\text{NaOH}$ ,  $\text{NaI}$ ,  $\text{H}_2\text{O}/\text{Dioxane}$ )<sup>133</sup>, et a d'abord conduit à la dégradation du milieu réactionnel. Le composé **23** désiré a été obtenu par passage dans un

milieu organique (DIEA, DMF)<sup>78</sup> et chauffage micro-onde avec un faible rendement de 16% après purification par HPLC préparative. L'analyse RMN a permis d'observer la présence d'un pic large intégrant pour seulement 4 protons, suggérant la présence d'un seul contre-ion NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

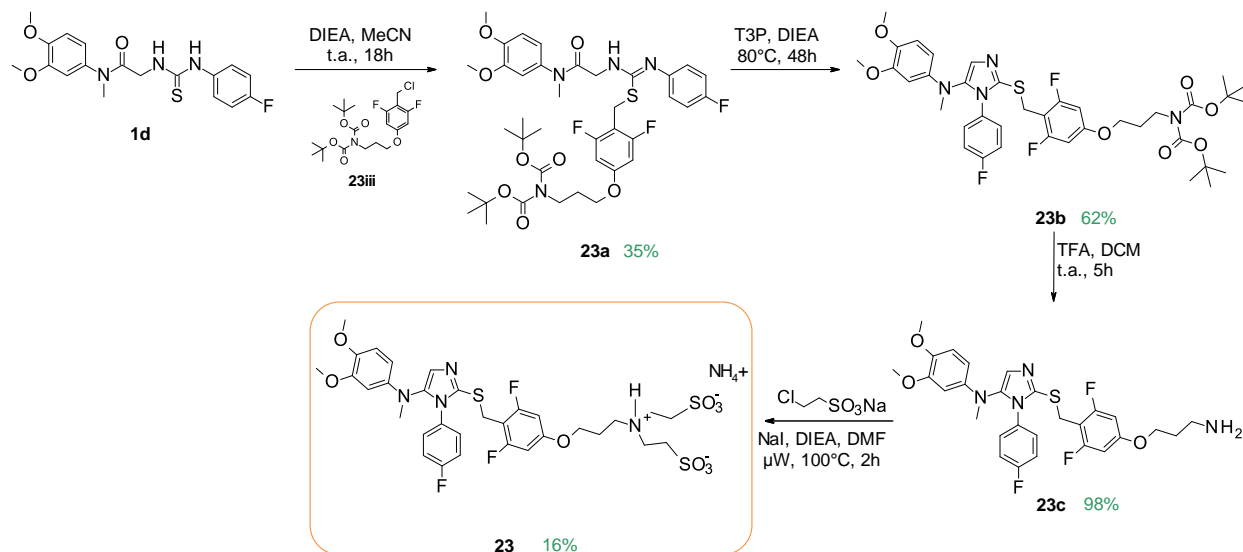


Figure 60 : Synthèse du composé disulfonate 23

L'intermédiaire **23iii** a été synthétisé, comme présenté dans la Figure 61 ci-dessous. Le 3,5-difluoro-4-hydroxyméthyl-phénol **8iii** a été substitué par le 1,3-dibromopropane. La fonction amine est introduite, à l'étape suivante, par réaction entre l'intermédiaire bromé **23i** et le di-*tert*-butyl-iminodicarboxylate pour donner l'intermédiaire **23ii** avec un rendement quantitatif<sup>134</sup>. Puis, l'alcool benzylique a été transformé en dérivé chloré, par substitution nucléophile, en présence de chlorure de mésyle et de triéthylamine dans le dichlorométhane, à température ambiante pendant 18h.

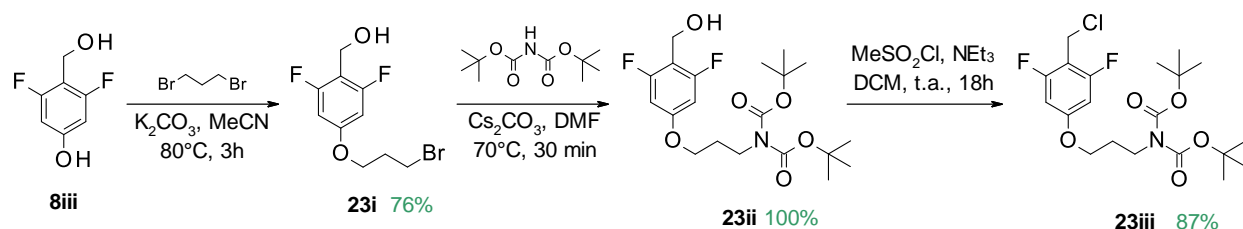


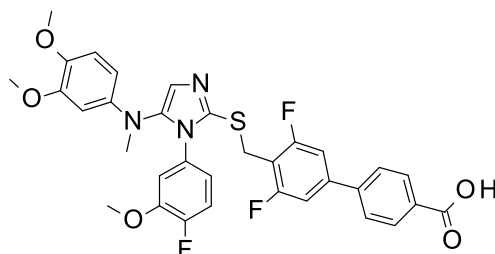
Figure 61 : Synthèse de l'intermédiaire 23iii nécessaire à la synthèse du composé 23

### c. Synthèse de composés fonctionnalisés par un acide carboxylique

Nous nous sommes également intéressés à la conception et la synthèse de composés fonctionnalisés par un ou deux acides carboxyliques.

*i. Composé acide carboxylique*

La fonction acide carboxylique a été introduite sur le pharmacophore *via* un espaceur rigide de type phényle (composé **13a** - Figure 62). La synthèse de ce composé a été présentée précédemment lors de la synthèse des composés PEGylés.



**13a**

Figure 62 : Structure du composé 13a

*ii. Composé diacide carboxylique*

L'introduction de deux fonctions acide carboxylique, a également été envisagée avec la synthèse du composé **24**. Il possède deux fonctions acides carboxyliques et une amine secondaire, ce qui conduit globalement à une seule charge négative (et un zwitterion).

Afin de réaliser la synthèse de ce second composé fonctionnalisé par deux acides carboxyliques, nous avons effectué une analyse rétro-synthétique. Deux voies de synthèses ont été envisagées. Les déconnexions stratégiques de part et d'autre de l'azote de l'amine secondaire permettront de réaliser une amination réductrice, et ceci en inversant les positions respectives de l'amine et du dérivé carbonyle mis en jeu. Puis la déconnection entre les deux cycles aromatiques permettra de réaliser facilement un couplage de type Suzuki entre l'intermédiaire **10b** et l'acide boronique d'intérêt (Figure 63).

### Optimisation du kinétophore

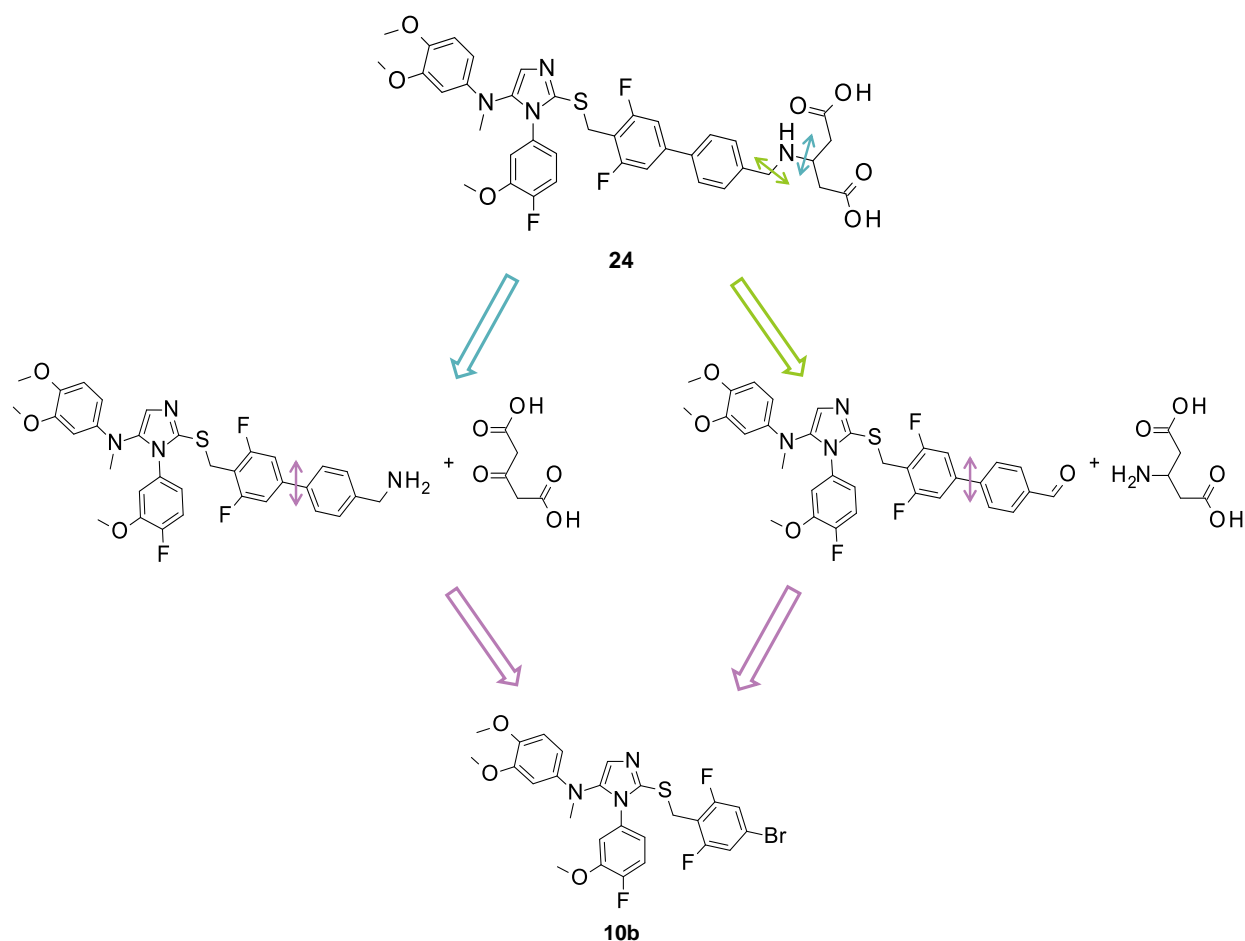


Figure 63 : Analyse rétro-synthétique du composé 24

Dans un premier temps, nous avons choisi la voie de synthèse de gauche. Le premier essai a été réalisé à partir du composé benzylamine **24a** obtenu à partir de l'intermédiaire bromé **10b** couplé avec l'acide [4-[(*tert*-butoxycarbonylamino)méthyl]phényl]boronique après déprotection de l'amine en présence d'acide trifluoroacétique. L'intermédiaire **24a** obtenu est engagé dans une réaction d'amination réductrice avec le diéthyl-3-oxoglutarate, en présence d'acide acétique et de cyanoborohydrure de sodium dans le THF<sup>135, 136</sup>. Lors de cette réaction, le milieu réactionnel s'est dégradé au cours du temps, et n'a donc pas permis d'obtenir le composé **24b** souhaité. Un second essai d'amination réductrice réalisé dans le méthanol, en présence de tamis moléculaire 4Å à température ambiante pendant 72h, a également conduit à la dégradation du milieu réactionnel (Figure 64)<sup>137</sup>.

### Optimisation du kinétophore

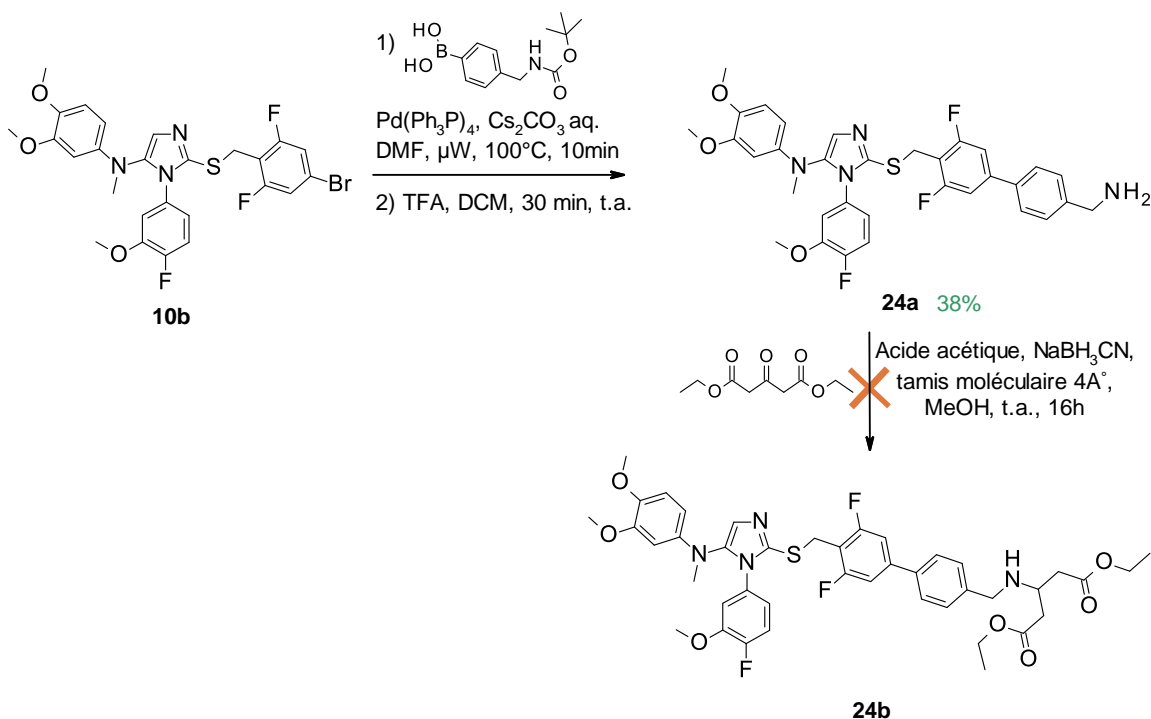


Figure 64 : Première voie de synthèse du composé **24b** infructueuse

L'intermédiaire **24b** n'ayant pas été obtenu par cette première voie de synthèse, la seconde voie de synthèse a été envisagée (Figure 65). Pour cela, l'acide 3-aminopentanedioïque commercial a d'abord été estérifié dans l'éthanol, en présence de chlorure de thionyle pour donner l'ester éthylique du 3-aminopentandioïque **24i**. L'intermédiaire **24a'** est obtenu par couplage de Suzuki à partir du dérivé bromé **10b** et de l'acide 4-formylphénylboronique commercial. La réaction d'amination réductrice a ensuite été réalisée entre l'intermédiaire aldéhyde **24a'** et l'ester éthylique du 3-aminopentandioïque **24i** en deux étapes :

1) la formation de l'imine est réalisée en présence d'acide acétique dans le dichloroéthane (DCE) à température ambiante pendant 16h,

2) le réducteur est ajouté, et le milieu réactionnel est agité pendant 1h, pour obtenir l'intermédiaire **24b** avec un rendement de 38%.

Enfin, la saponification permet d'obtenir le composé **24**, avec un rendement de 40% après purification par HPLC préparative.

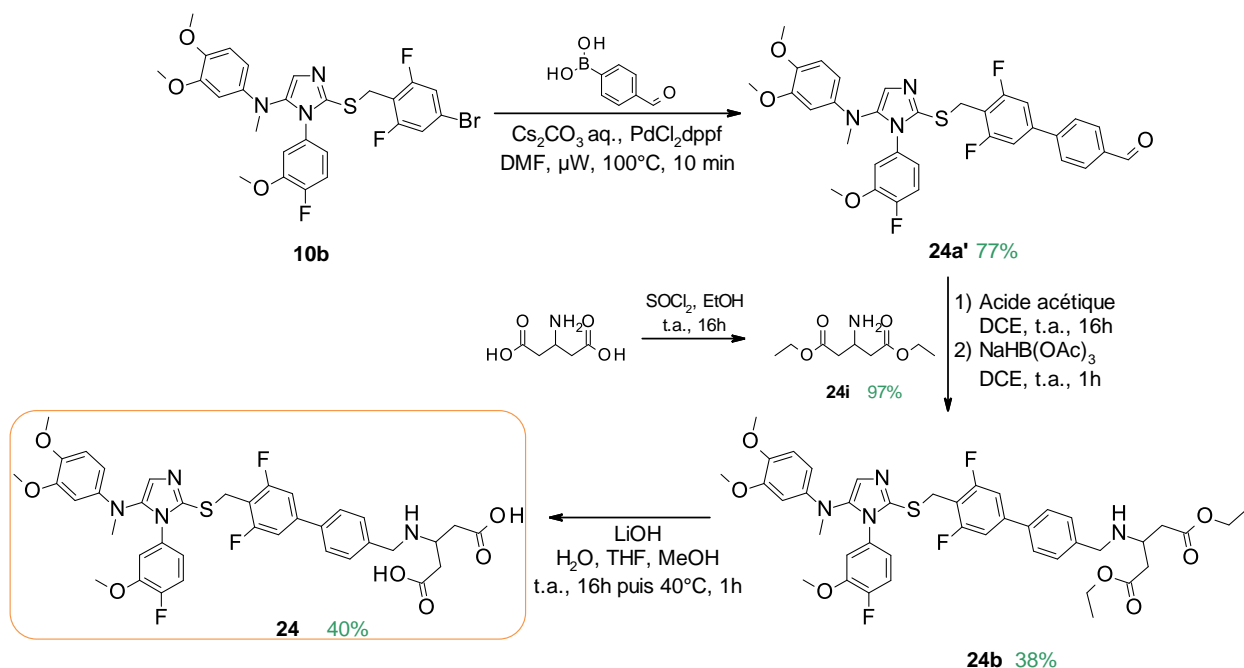


Figure 65 : Seconde voie de synthèse du composé 24

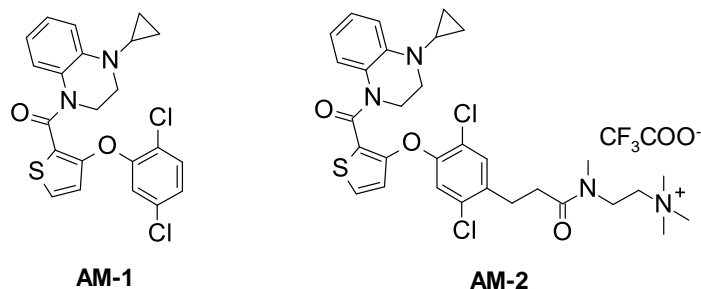
Ainsi, 5 composés, fonctionnalisés par des groupements kinétophores anioniques à pH physiologique, ont été synthétisés. Nous pourrions donc étudier l'influence de la taille et de la nature de l'espaceur, ainsi que du type de fonction acide, sur l'activité et les propriétés ADME de ces composés.

### 3. Conception et synthèses de composés cationiques à pH physiologique

#### a. Etat de l'art

Les composés chargés positivement font aussi l'objet de recherche pour la découverte de nouveaux agonistes non systémiques de TGR5. En effet, dans trois brevets de la société Exelixis, publiés entre 2011 et 2014, des composés imidazoles et triazoles, comportant des ammoniums quaternaires, sont décrits. Cependant aucunes données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques chez l'animal ne sont présentées<sup>138-140</sup>. En 2016, Cao *et al.* se sont intéressés à l'obtention d'agonistes de TGR5 ciblant l'intestin par fonctionnalisation de leur composé avec des ammoniums quaternaires (Figure 66)<sup>141</sup>. Le composé **AM-2** possède de très bonnes activités sur les récepteurs humain et murin, une faible perméabilité et une faible exposition systémique<sup>141</sup>.





Composé	hTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)	mTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)	P <sub>app</sub> A→B (10 <sup>-6</sup> cm/s)	P <sub>app</sub> B→A (10 <sup>-6</sup> cm/s)	Efflux	[Composé] <sub>plasma</sub> (ng/mL)
<b>AM-1</b>	0,55	2,8	0,55	0,43	0,8	nd
<b>AM-2</b>	4,1	0,71	0,06	0,8	14,1	0,071

Figure 66 : Structure, activités, perméabilité et concentration plasmatique des composés AM-1 et AM-2 après une administration orale chez des souris ICR à une dose de 100 mg/kg<sup>141</sup>. nd: non déterminé.

La synthèse de deux composés fonctionnalisés par des ammoniums a été réalisée au laboratoire par le Docteur Lasalle lors de sa thèse (Figure 67)<sup>87</sup>. Ces composés conservent de bonnes activités sur les récepteurs TGR5 humain et murin, avec cependant une légère perte par rapport au pharmacophore « nu » **1**.

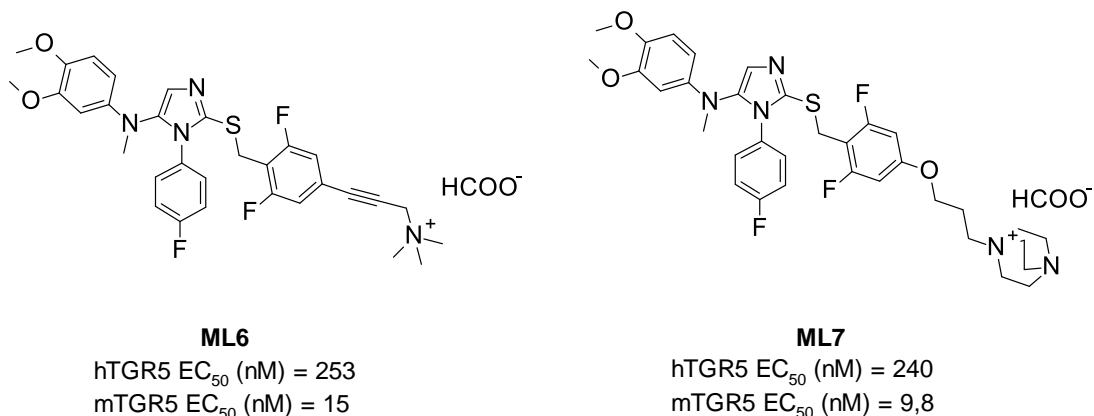


Figure 67 : Structure et activités des composés ML6 et ML7 obtenus par le docteur Lasalle

Dans le but d'affiner les relations structure-activité de ce type de composés cationiques, je me suis intéressée à la synthèse de nouveaux composés fonctionnalisés par des amines tertiaires et des ammoniums quaternaires.

*b. Synthèses de composés fonctionnalisés par une amine tertiaire et des ammoniums*

Nous avons choisi d'affiner les relations structure-activité pour les composés présentant une charge positive à pH physiologique en introduisant des kinétophores amine tertiaire ou ammoniums. Le composé **ML6**, synthétisé par le Docteur Lasalle, présentait un bras espaceur de



La synthèse de deux composés ammoniums et du composé fonctionnalisé par une amine tertiaire (composé **25**) a donc été envisagée, et réalisée de façon plus convergente, à partir de l'intermédiaire chloré **17b**, par substitution nucléophile avec différentes amines secondaires ou tertiaires (Figure 70). Le faible rendement obtenu pour le composé **26** est dû à des difficultés rencontrées lors de l'étape de purification par HPLC préparative.

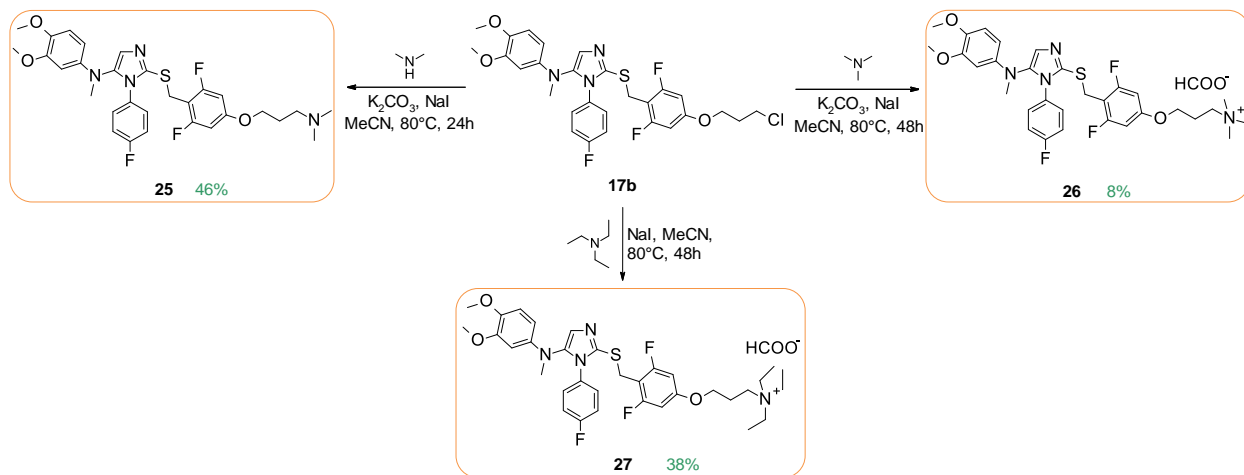


Figure 70 : Synthèse des composés 25 à 27

De cette façon, trois nouveaux composés ont été obtenus pour affiner les relations structure-activité des composés de type cationiques à pH physiologique. Nous pourrions étudier l'influence de la flexibilité du bras espaceur, mais également l'effet de l'encombrement de la fonction ammonium sur l'activité et les propriétés ADME.

#### 4. Conception et synthèse d'un composé zwitterionique

##### a. Etat de l'art

Dans les travaux sur la recherche d'inhibiteurs non systémiques du transporteur aux acides biliaires IBAT, des composés zwitterioniques ont également été décrits, et présentent une très faible exposition systémique (Figure 21)<sup>78</sup>. Dans le cadre de notre stratégie à visée topique intestinale, la synthèse d'un composé de type zwitterionique semblait donc intéressante et a donc été envisagée. Les composés **23** et **24** présentés précédemment comme étant des composés anioniques à pH physiologique, possèdent également une fonction zwitterionique et pourront être comparés au composé présenté ci-dessous.

##### b. Synthèse d'un composé zwitterionique

Nous nous sommes donc intéressés à la synthèse du composé **28** ci-dessous présentant un espaceur rigide, de type phényle (Figure 71).

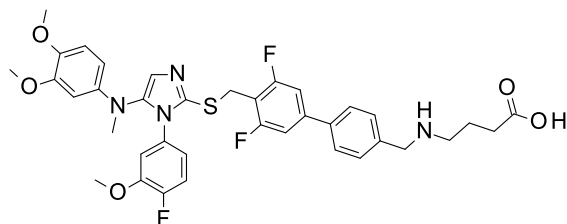
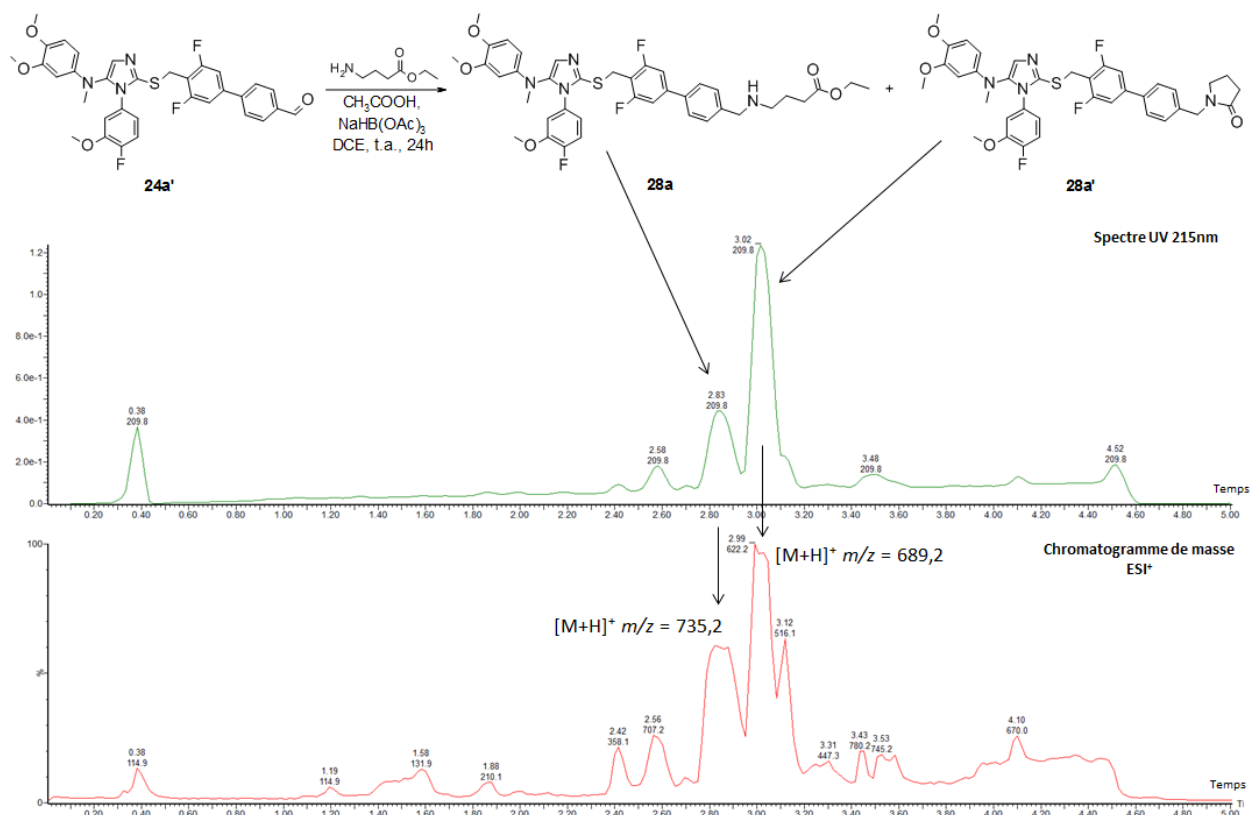


Figure 71 : Structure du composé zwitterionique envisagé

A partir de l'intermédiaire biphenyle aldéhyde **24a'**, l'étape d'amination réductrice a conduit à la formation du produit désiré, mais également à la formation du produit de cyclisation, correspondant à l'attaque de la fonction amine secondaire nucléophile sur la fonction ester éthylique. Ce produit de cyclisation est majoritairement formé lors de cette réaction, comme constaté lors de l'analyse LCMS (Figure 72).



La réouverture du cycle<sup>143</sup>, ainsi que la saponification de l'intermédiaire **28a**, a été tentée sans purification du mélange réactionnel précédent en présence de soude 1M dans un mélange dioxane/eau. Cette réaction d'ouverture du cycle en conditions basiques n'a cependant pas conduit à la conversion du composé en produit attendu (Figure 73).

### Optimisation du kinétophore

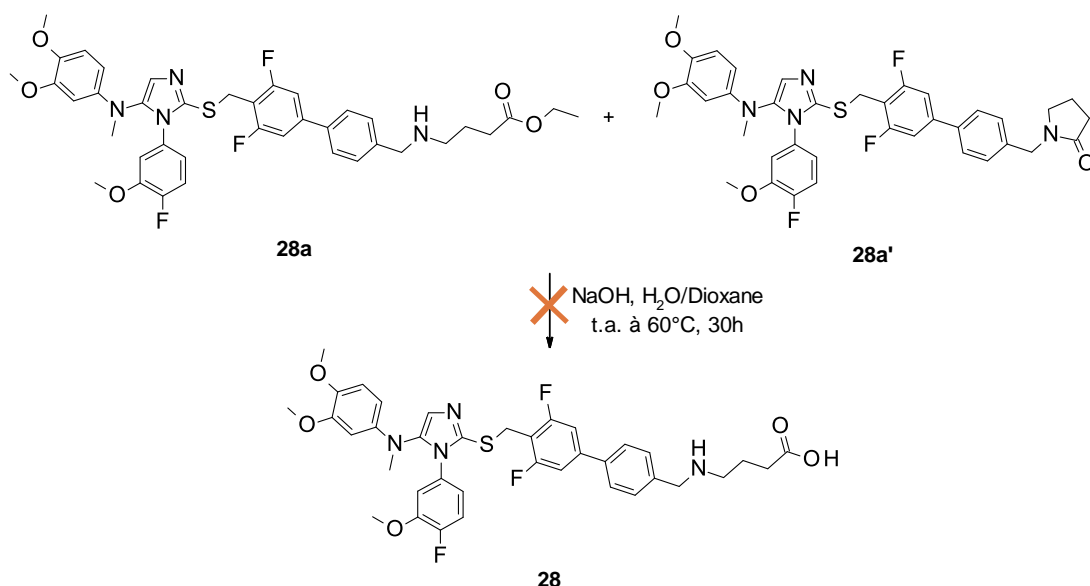


Figure 73 : Synthèse du composé **28** infructueuse

Afin d'éviter la cyclisation intramoléculaire, nous avons choisi de réduire la longueur de la chaîne carbonée, et de réaliser l'amination réductrice avec l'acide 3-aminopropanoïque, et ce dans les mêmes conditions que précédemment (Figure 74). La réaction a été stoppée au bout de 5h pour éviter la cyclisation intramoléculaire. Seulement 70% de conversion du produit de départ a été observé par LCMS. La purification par HPLC préparative en milieu basique a ensuite permis d'isoler 10 mg du composé **28** avec un rendement de 9%. Ce faible rendement est également dû à des problèmes de solubilité rencontrés pour la purification.

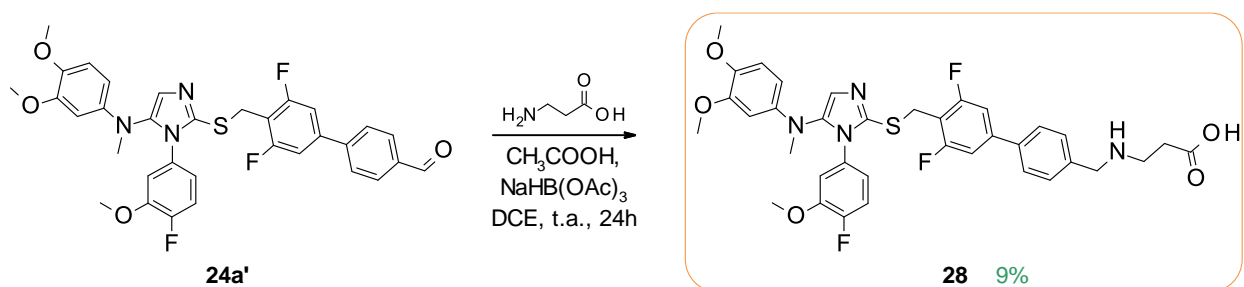


Figure 74 : Deuxième essai de synthèse du composé **28**

Le rendement obtenu étant très faible, un autre essai de synthèse a été réalisé pour augmenter le rendement de cette dernière étape de synthèse (Figure 75). L'amination réductrice mettant en jeu l'intermédiaire **24a'** et l'éthyle 3-aminopropionate a été réalisée en 2 étapes. Le composé saponifié a également été formé lors de la réaction d'amination réductrice, mais de façon minoritaire. Le milieu réactionnel n'est donc pas purifié, et la saponification permet d'obtenir le composé **28** avec un rendement de 11% après purification par HPLC préparative. Le rendement obtenu s'explique de nouveau par des difficultés rencontrées lors de la purification. En effet, un résidu d'oxyde de triphénylphosphine du couplage de Suzuki pour la

synthèse du composé **24a'** n'a pas été éliminé totalement lors de la purification, des fractions de composé impur ont donc dû être écartées.

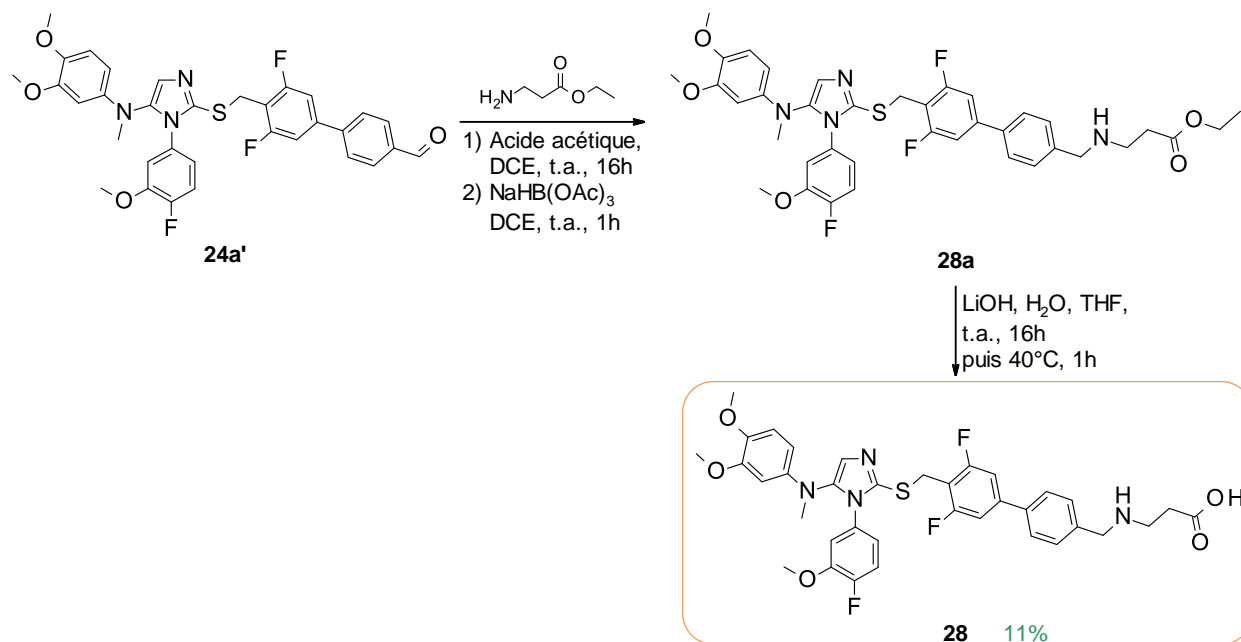


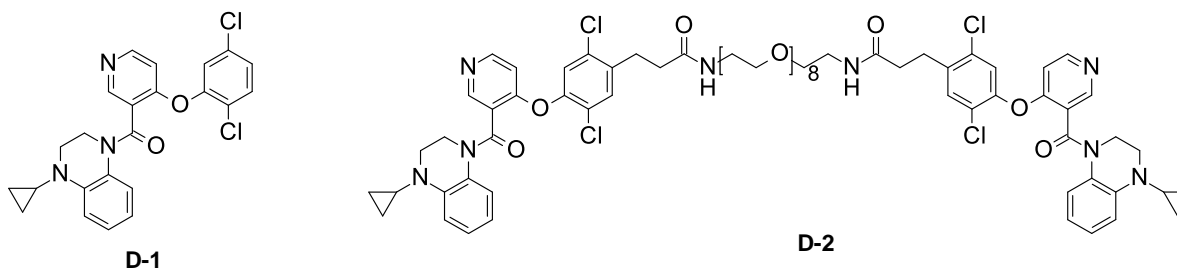
Figure 75 : Troisième essai de la synthèse du composé **28**

Ce composé zwitterionique nous permettra d'étudier l'influence de ce type de kinétophore sur les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques.

## 5. Conception et synthèses de composés dimériques

### a. Etat de l'art

La société Ardelyx, spécialisée dans les thérapies avec une exposition limitée à l'intestin (gut restricted therapies), a un programme de recherche d'agonistes non systémiques de TGR5. Un brevet, déposé en 2013, décrit une série chimique agoniste de TGR5, sur laquelle divers kinétophores, et en particulier des dimères, ont été synthétisés et évalués<sup>144</sup>. D'autres structures multimériques, à visée topique intestinale, sont également reportées dans un brevet de la société Ardelyx, pour diminuer le transport de phosphate au niveau intestinal par l'inhibition de l'échangeur sodium-hydrogène NHE3<sup>145</sup>. En 2015, une autre équipe a également publié des structures dimériques agonistes de TGR5 qui possèdent une exposition systémique limitée<sup>146</sup>. Le composé dimérique **D-2** possède une perméabilité très faible, avec un fort efflux actif, et sa concentration plasmatique est très faible après administration du composé à une dose de 150 mg/kg chez des souris ICR (Figure 76)<sup>146</sup>.



Composé	hTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)	mTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)	P <sub>app</sub> A→B (10 <sup>-6</sup> cm/s)	P <sub>app</sub> B→A (10 <sup>-6</sup> cm/s)	Efflux	[Composé] <sub>plasma</sub> (ng/mL)
D-1	1,5	18	6,75	5,58	0,8	nd
D-2	25	12	0,04	2,24	61	9,65

Figure 76 : Structure des composés D-1 et D-2, activités, perméabilité et concentration plasmatique après une administration des composés à une dose de 150 mg/kg chez des souris ICR<sup>146</sup>. nd : non déterminé

Suite à la publication de ces structures multimériques agonistes de TGR5, et à l'intérêt de telles structures en tant que composés topiques intestinaux, nous nous sommes intéressés à la synthèse de tels composés dans notre série chimique, pour étudier leurs activités sur le récepteur TGR5 et leur profil pharmacocinétique. Les poids moléculaires de ces composés seront relativement élevés, et pourront donc être peu absorbés au regard des règles de Lipinski. Afin d'affiner les relations structure-activité de ce type de composés, nous avons choisi de synthétiser des dimères, avec des bras espaceurs de nature variable.

### b. Synthèse de composés dimériques

#### i. Dimères présentant un lien de type polyéthylène glycol

Les deux premiers dimères ont été synthétisés avec un espaceur PEGylé de 8 et 12 chaînons polyéthylène glycol, à partir de l'intermédiaire biphenyl phénol **29a**, obtenu par réaction de Suzuki entre l'intermédiaire bromé **10b** et le 4-(4,4,5,5-tetraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phénol commercial (Figure 77). La substitution nucléophile de cet intermédiaire **29a**, par les intermédiaires PEG di-tosylés **29i** et **30i**, a ensuite permis d'obtenir les composés **29** et **30**, avec des rendements respectivement de 6 et 8%. Des problèmes rencontrés au niveau de la purification expliquent les très faibles rendements obtenus pour ces deux composés, en particulier à cause de leur très faible solubilité. En effet, une première purification, par flash chromatographique, a conduit à la perte de la quasi-totalité du produit. Sur les 30 mg restants de produit impur, une chromatographie sur couche épaisse (CCE) a été réalisée, et nous a permis d'obtenir respectivement 17 et 21 mg des composés **29** et **30**. La faible solubilité de ces composés pourra devenir un frein au développement de ces composés de type dimérique.

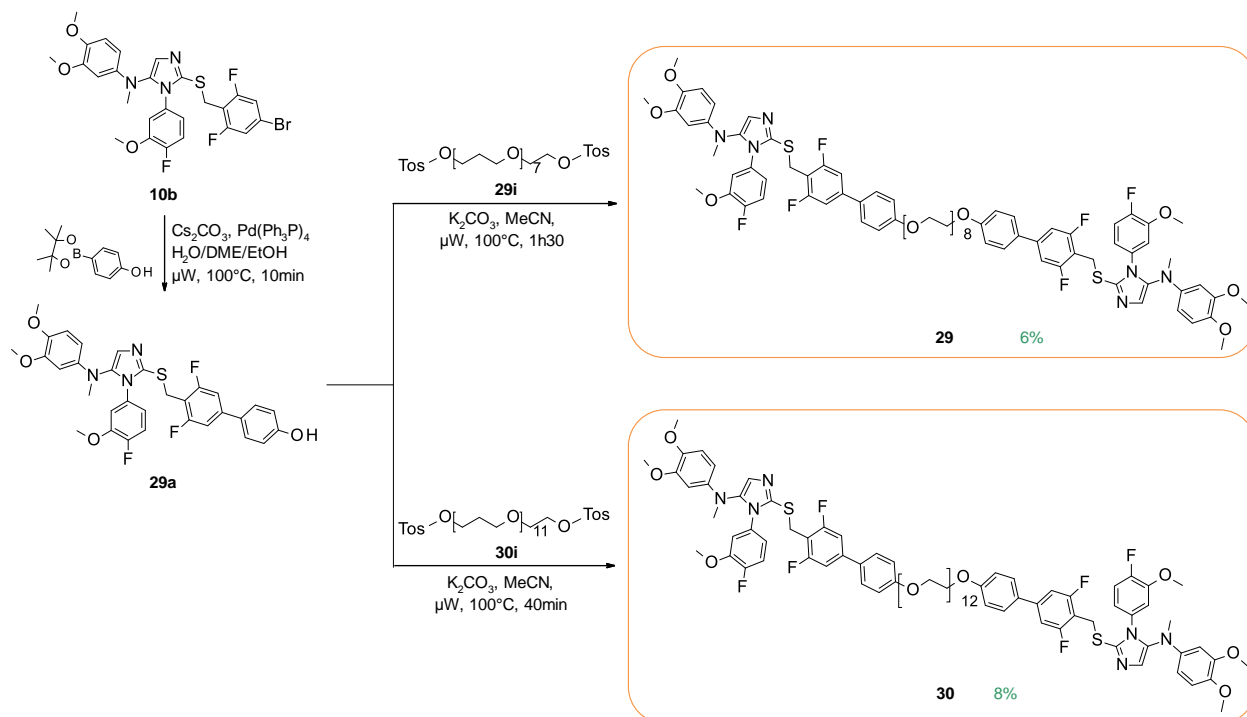


Figure 77 : Synthèse des composés 29 et 30

Les intermédiaires **29i** et **30i** ont été synthétisés, à partir d'octaéthylène glycol ( $n = 8$ ) et de dodécaéthylène glycol ( $n = 12$ ) substitués par le chlorure de tosylé dans le dichlorométhane, en présence de diméthylaminopyridine (DMAP) et de triéthylamine (Figure 78).

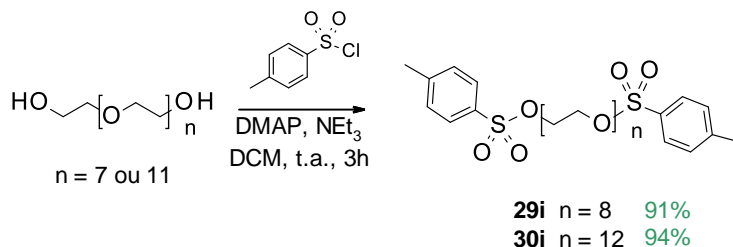


Figure 78 : Synthèse des intermédiaires 29i et 30i nécessaires à la synthèse des dimères 29 et 30

## ii. Dimère présentant un lien protonable à pH physiologique

Un troisième dimère a été synthétisé et présente une fonction ionisable à pH physiologique, pour combiner une structure dimérique avec un kinétophore cationique (Figure 79). La difficulté, dans la synthèse de ce dimère, est encore une fois l'étape de purification du dimère. En effet, un temps de réaction très long (12 jours) a été nécessaire pour ce composé, et les étapes de purifications ont conduit à de très faibles rendements<sup>147</sup>.



## Optimisation du kinétophore

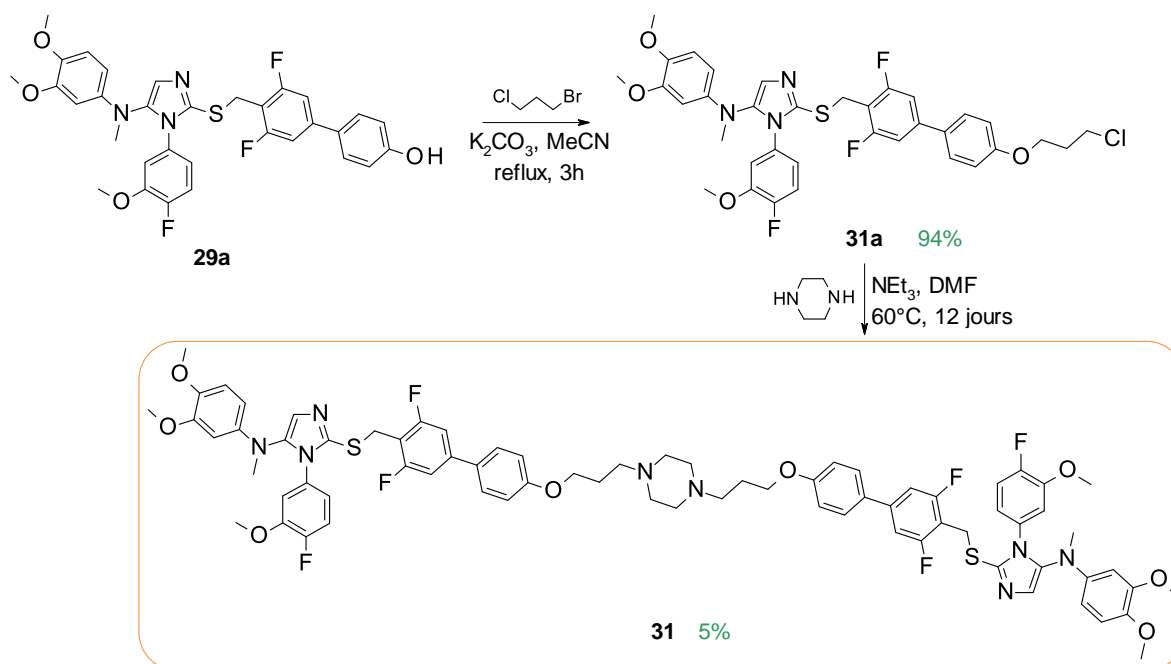


Figure 79 : Synthèse du composé 31

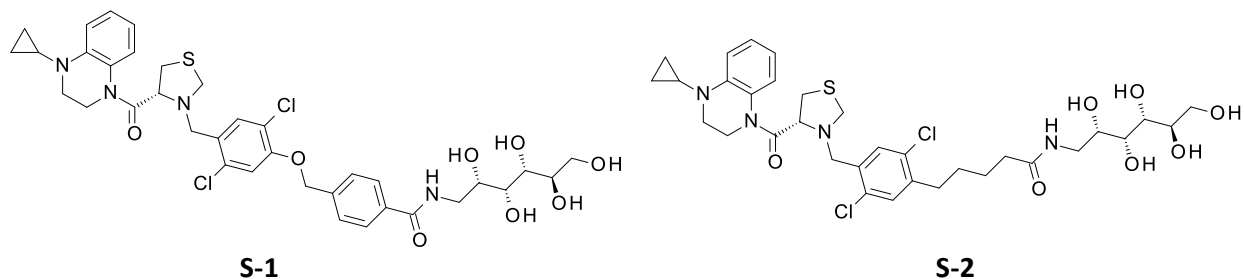
Ces composés dimériques, bien que difficilement isolés, nous donneront de nouvelles informations, quant à l'effet de l'encombrement de ce type de molécules, sur l'affinité pour le récepteur TGR5 et sur les propriétés pharmacocinétiques. Le composé **31** pourra également être comparé avec les composés fonctionnalisés par des kinétophores cationiques à pH physiologique.

Ainsi 3 composés dimériques ont été synthétisés. Plusieurs points faibles sont à noter pour ces composés : une faible solubilité et des difficultés de synthèse, qui seront à optimiser, si ces composés sont retenus pour des études chez l'animal.

## 6. Conception et synthèse de composés fonctionnalisés par des polyols

### a. Etat de l'art

Dans le brevet de la société Ardelyx<sup>144</sup>, présenté précédemment pour les composés dimériques, sont également décrits de nombreux dérivés à base de polyols, tels que la glucamine. De ce brevet ressortent deux composés, fonctionnalisés par un polyol, actifs sur TGR5 avec des activités inférieures au micromolaire (Figure 80)<sup>144</sup> et GLP-1 sécrétagogue *in vivo*.

Figure 80 : Structure des composés S-1 et S-2<sup>144</sup>

De la même façon que pour les dimères, la synthèse de composés fonctionnalisés par un polyol a été réalisée dans notre série, afin de voir si ce kinétophore était toléré par le récepteur TGR5, et étudier les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques de ce type de composés.

*b. Synthèse de composés fonctionnalisés par des groupements polyols*

*i. Composés couplés à la glucamine/N-méthylglucamine*

Un couplage de la glucamine ou la N-méthylglucamine, avec le précurseur biphenyle acide carboxylique **13a**, a conduit à la synthèse des composés **32** et **33**, avec des rendements moyens (Figure 81). Les conditions réactionnelles utilisées pour ces deux réactions diffèrent par l'agent de couplage. En effet, lors de la synthèse du composé **32**, la séparation entre le produit final et la dicyclohexylurée (DCU) étant problématique, nous avons donc remplacé la dicyclohexylcarbodiimide (DCC) par la 1-éthyl-3-[3-(diméthylamino) propyl]carbodiimide (EDCI), permettant une meilleure séparation de l'urée formée avec le composé désiré, lors de la purification par HPLC préparative.

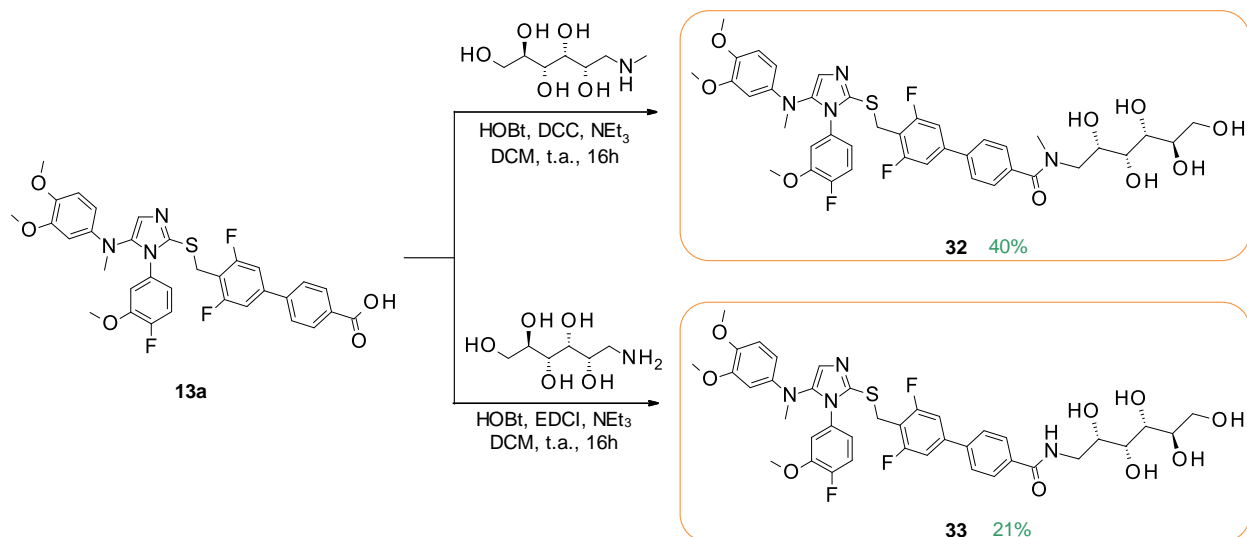


Figure 81 : Synthèse des composés 32 et 33

## ii. Composés couplés à la N-méthylglucamine via un lien alkyle ou PEG

L'introduction d'un espaceur alkyle ou PEG a été ensuite envisagée pour faire varier la nature du bras espaceur. Ainsi, deux autres composés ont été synthétisés. Le composé **34** est obtenu par substitution nucléophile entre le dérivé chloré **17b**, précédemment synthétisé, et la N-méthylglucamine (Figure 82).

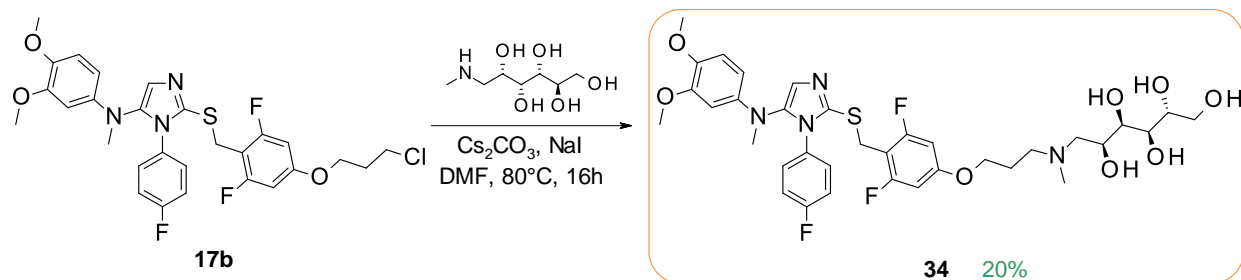


Figure 82 : Synthèse du composé 34

Le composé **35** est, quant à lui, obtenu en 3 étapes à partir de l'intermédiaire bromé **10b**. L'étape de couplage pallado-catalysé a été optimisée lors de la synthèse de ce composé. En effet, en présence de  $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ , les purifications par flash chromatographique ne permettaient pas d'éliminer efficacement les traces d'oxyde de triphénylphosphine présentes dans le milieu. Le remplacement du palladium tetrakis, par le palladium [1,1'-Bis(diphénylphosphino)ferrocène]dichloropalladium (II) ( $\text{PdCl}_2\text{dppf}$ ), a permis d'augmenter les rendements de synthèse et la pureté des intermédiaires synthétiques. La substitution du phénol par le 1-(2-chloroéthoxy)-2-[2-(2-chloroéthoxy)éthoxy]éthane en excès a permis l'obtention de l'intermédiaire **35a**, puis la substitution nucléophile du chlore par la N-méthylglucamine conduit au composé **35**, avec un rendement de 27% après purification par HPLC préparative (Figure 83).

### Optimisation du kinétophore

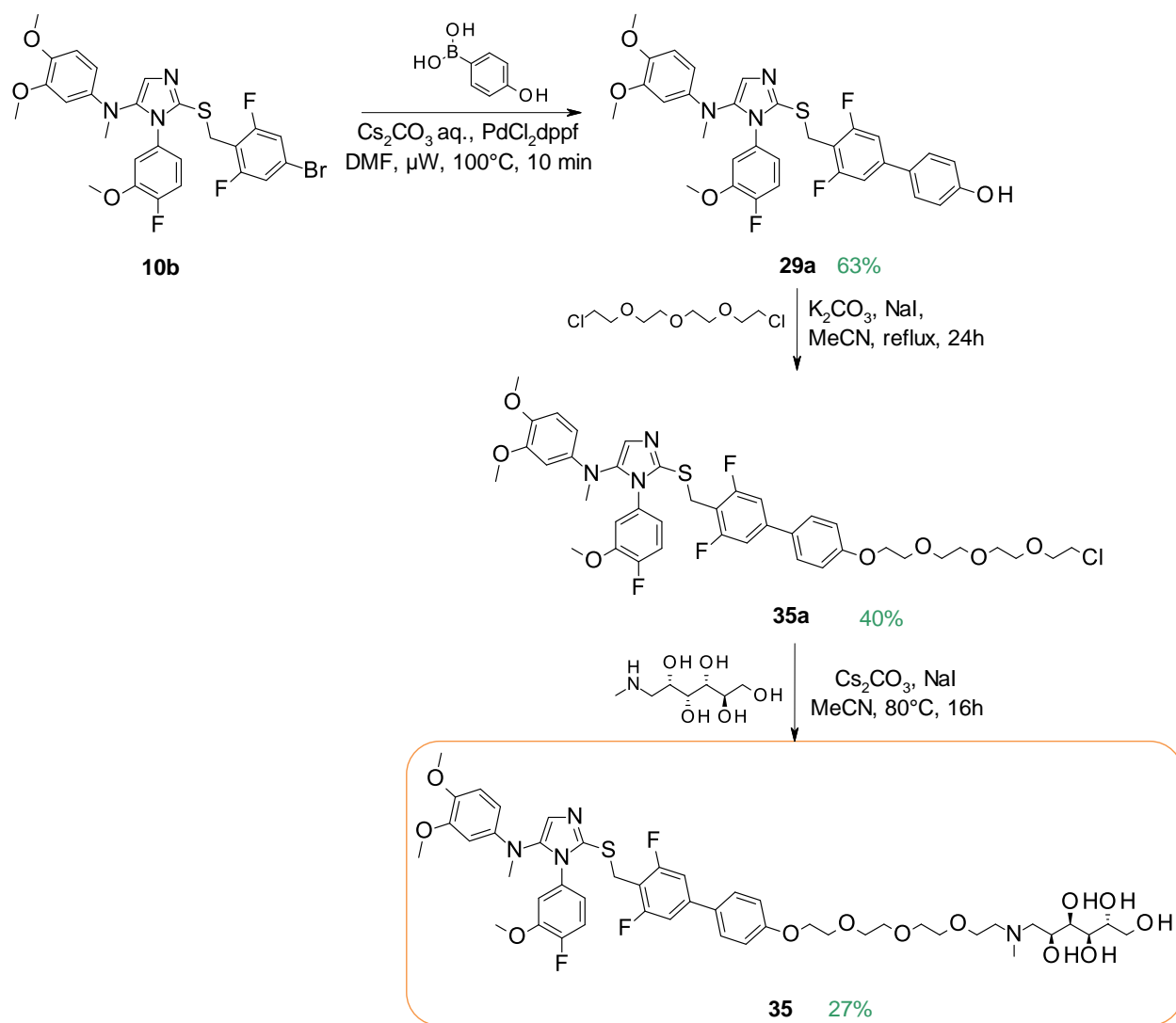


Figure 83 : Synthèse du composé 35

### iii. Composé couplé à un polyol acide

Un dernier composé, combinant un polyol et une fonction acide carboxylique terminale, a été synthétisé. La synthèse du composé **36** a été réalisée comme suit :

- 1) couplage de Suzuki entre l'intermédiaire bromé **10b** et l'acide [4-[(*tert*-butoxycarbonylamino)méthyl]phényl] boronique, conduisant au composé intermédiaire **36a**,
- 2) déprotection de la fonction amine terminale, en présence d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane,
- 3) ouverture d'un précurseur lactone par l'amine, pour obtenir le composé **36**, avec un rendement de 11% après purification par HPLC préparative (Figure 84)<sup>148</sup>.

## Optimisation du kinétophore

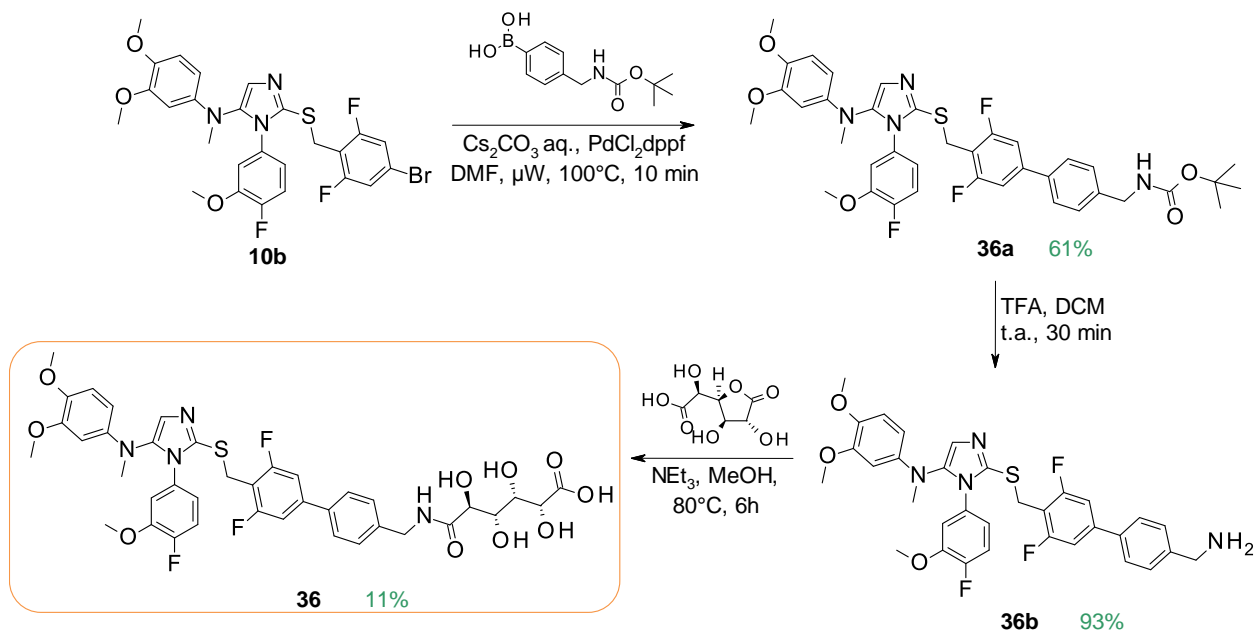


Figure 84 : Synthèse du composé 36

Cinq composés de type polyols ont ainsi été synthétisés. La variation de l'espaceur nous permettra d'étudier les relations structure-activité et structures-propriétés, pour cette nouvelle série de composés à visée topique intestinale.

### 7. Conclusion sur la synthèse des composés

Afin d'étudier l'influence de la nature du kinétophore sur les activités vis-à-vis de TGR5 mais également sur les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques, six kinétophores ont ainsi été envisagés et couplés à notre pharmacophore.

Nous allons également pouvoir comparer certains composés, qui possèdent deux types de kinétophores, et déterminer l'influence de chaque kinétophore sur les activités, ou sur les propriétés physicochimiques. Ainsi, les composés disulfonate et diacide carboxylique, présentant une fonction zwitterionique, pourront être comparés au composé zwitterionique **28**. Le composé polyol acide carboxylique **36** pourra, quant à lui, être comparé aux composés acides. Enfin, les composés PEGylés fonctionnalisés avec une amine protonable à pH physiologique, ainsi que le dimère présentant un espaceur pipérazine, pourront entrer dans l'étude des relations structure-activité de composés chargés positivement à pH physiologique.

Afin d'effectuer cette étude de relations structure-activité, les composés ont été testés dans un test *in vitro* de transactivation pour évaluer leur puissance et leur efficacité sur les récepteurs TGR5 humain et murin.

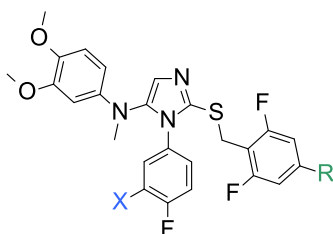
## B. Evaluation *in vitro* des composés synthétisés

Dans cette seconde partie, je vais m'intéresser à l'activité des composés synthétisés sur les récepteurs TGR5 humain et murin. Tous les composés ont été évalués dans le test *in vitro* de transactivation, par nos collaborateurs biologistes (U1011), pour déterminer leur puissance et leur efficacité (Figure 29). Les efficacités étant supérieures à 80% pour tous les composés, seules les puissances de chaque type de composés chimériques seront présentées pour étudier l'influence des modifications chimiques effectuées.

### 1. Evaluation biologique *in vitro* des composés présentant un kinétophore de type polyéthylène glycol (PEG)

Les composés **11** et **14** ont été synthétisés à partir du même PEG commercial. Je ne parlerai, dans la suite de cette étude, que du composé **14**, qui est une resynthèse, ayant servi à toutes les expériences qui vont être détaillées par la suite. Il en est de même pour les composés **12** et **15**, je ne m'intéresserai qu'au second, pour la suite des études.

#### a. Influence du bras espaceur



Composé	X	R	n	hTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)	mTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>1</b>	-H	-H	-	35	0,8
<b>2</b>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-	20	0,8
<b>8</b>	-H		36 - 59	1750	90
<b>10</b>	-OCH <sub>3</sub>		32 - 56	697	28
<b>15</b>	-OCH <sub>3</sub>		31 - 57	520	25

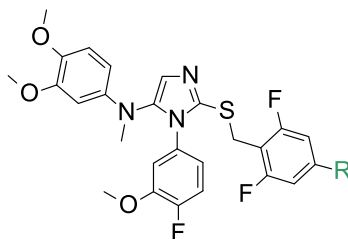
Tableau 6 : Influence du bras espaceur des composés PEGylés

L'encombrement stérique du motif polyéthylène glycol peut potentiellement perturber les interactions entre le pharmacophore et le récepteur, en se « repliant » sur le pharmacophore (Tableau 6).

L'introduction du bras espaceur phényle, dans la position « silencieuse », conduit au composé **10** plus actif que le composé **8**, pour lequel le groupement PEG est directement branché sur le pharmacophore, et ce d'un facteur 2,5 (1750 nM vs 697 nM) et 3,2 (90 nM vs 28 nM) sur les récepteurs humain et murin respectivement. L'introduction de cet espaceur rigide phényle, qui permet d'éloigner le polyéthylène glycol du pharmacophore, a donc un effet positif sur l'activité.

A longueur de chaîne égale (composés **10** et **15**), les liens amide ou éther conduisent à des puissances similaires sur les récepteurs TGR5 humain et murin. Les activités sont diminuées par rapport au composé nu **2**, mais restent satisfaisantes.

*b. Influence de la longueur de chaîne polyéthylène glycol (composés **13** à **16**)*



Composé	R	n	M <sub>w</sub>	hTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)	mTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>2</b>	-H	-	516	20	0,8
<b>13</b>		4 - 13	1086	60	4,6
<b>11</b>		12 - 24	1417	134	12
<b>14</b>		11 - 25	1462	112	13
<b>12</b>		33 - 57	2600	510	23
<b>15</b>		31 - 57	2597	520	25
<b>16</b>		100 - 138	5856	1100	64

Tableau 7 : Influence de la longueur de chaîne PEG sur les activités sur les récepteurs TGR5 humain et murin

Bien que les composés **11** et **14**, ainsi que les composés **12** et **15**, diffèrent légèrement par leur profil de masse, ils conservent des activités identiques sur les deux récepteurs.

Une corrélation, entre la longueur du polyéthylène glycol et l'activité sur les deux récepteurs, est observée (Tableau 7, Figure 85). En effet, l'augmentation de la taille du polyéthylène glycol conduit à une diminution de l'activité, probablement due à une gêne stérique délétère pour l'interaction du pharmacophore avec le récepteur, malgré la présence du bras espaceur phényle. Les activités sur les récepteurs sont tout de même conservées même pour le composé fonctionnalisé avec plus de 100 unités éthylène glycol (composé **16**).

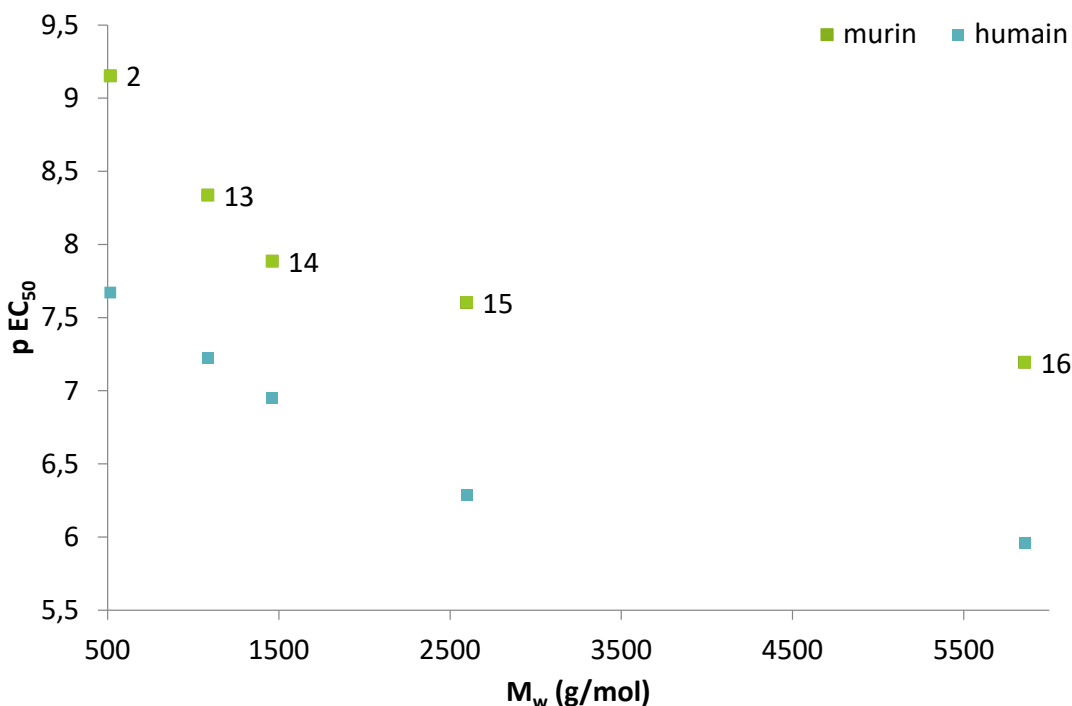
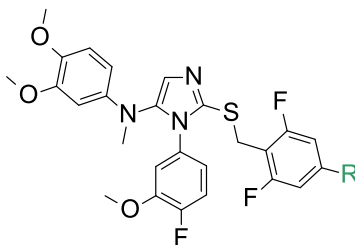


Figure 85 : Activités sur les récepteurs TGR5 humain (bleu) et murin (vert) en fonction de l'augmentation du poids moléculaire des composés fonctionnalisés par une chaîne polyéthylène glycol

### c. Influence du sens de la liaison amide

La synthèse du composé **19** a été réalisée pour comparer l'effet de la liaison amide (composé **16**), versus amide inversée (composé **19**), sur les activités. L'inversion de la liaison amide influence peu l'activité sur les récepteurs TGR5 humain et murin (Tableau 8). De plus, les liaisons anilides étant connues pour être potentiellement instables en milieux biologiques, nous n'avons pas privilégié ce type de composé pour la suite de nos études.





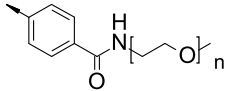
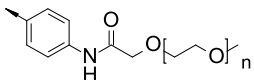
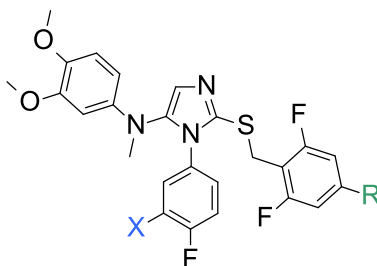
Composé	R	n	hTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)	mTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>2</b>	-H	-	20	0,8
<b>16</b>		100 - 138	1100	64
<b>19</b>		99 - 133	1390	43

Tableau 8 : Influence de la liaison amide versus amide inversés

*d. Impact du lien fonctionnalisé avec une amine ou un ammonium*

A longueur de chaîne PEG équivalente, l'introduction du bras espaceur propylamine (composé **17** et **18**) conduit à une baisse d'activité sur les récepteurs humain (d'un facteur 20) et murin (d'un facteur 10), par rapport au composé neutre à pH physiologique de même longueur de chaîne PEG (composé **14**) (Tableau 9). Il semblerait donc que l'introduction d'une charge positive ne soit pas favorable à l'activité de nos composés. Nous pourrions vérifier cette hypothèse avec les composés cationiques à pH physiologique.



Composé	X	R	n	hTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)	mTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>1</b>	-H	-H	-	35	0,8
<b>2</b>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-	20	0,8
<b>14</b>	-OCH <sub>3</sub>		11 - 25	112	13
<b>17</b>	-H		13 - 20	2414	120
<b>18</b>	-H		12 - 23	2165	135

Tableau 9 : Influence du lien fonctionnalisé avec une amine ou un ammonium

e. Conclusion sur les activités des composés PEGylés

Les activités sont représentées sous forme de pEC<sub>50</sub> dans la Figure 86A. Globalement, les composés PEGylés sont moins actifs que les pharmacophores **1** et **2**, mais conservent des activités sub-micromolaires, même pour les plus longs PEG, validant ainsi la position silencieuse choisie pour l'introduction de ce type de kinétophore très volumineux. L'activité des composés, sur les récepteurs humain et murin, décroît avec l'augmentation du poids moléculaire moyen des composés PEGylés (Figure 86B).

## Optimisation du kinétophore

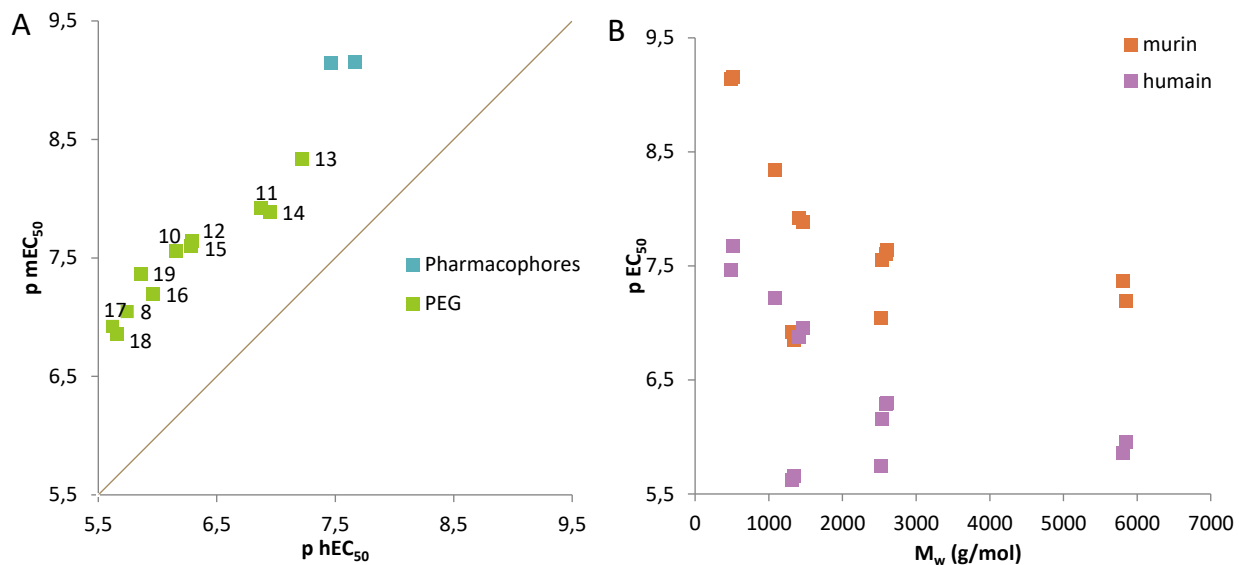
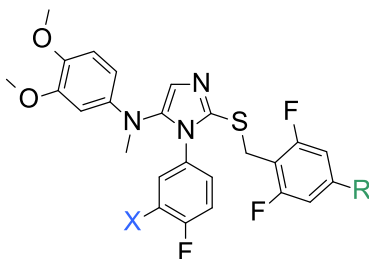


Figure 86 : (A) Graphique des activités des composés PEGylés sur le récepteur murin en fonction des activités sur le récepteur humain (en pEC<sub>50</sub>) ; (B) Activité des composés sur les deux récepteurs en fonction de la masse moléculaire moyenne en masse (M<sub>w</sub>)

L'étude des paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques pourra nous permettre d'établir des relations structure-propriétés fines pour ces composés PEGylés, de faibles poids moléculaires ( $M_n \leq 5\ 000$  g/mol), encore peu décrits dans la littérature.

## 2. Evaluation biologique *in vitro* des composés présentant un kinétophore anionique à pH physiologique

Six composés fonctionnalisés par des fonctions acides ont été synthétisés. Les résultats de leur évaluation, dans le test *in vitro* de transactivation, sont présentés dans le Tableau 10 ci-dessous.



Composé	X	R	hTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)	mTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>1</b>	-H	-H	35	0,8
<b>2</b>	-OCH <sub>3</sub>	-H	20	0,8
<b>20</b>	-H		91	1,2
<b>21</b>	-H		24	0,4
<b>22</b>	-H		35	4,2
<b>23</b>	-H		77	0,3
<b>13a</b>	-OCH <sub>3</sub>		30	0,6
<b>24</b>	-OCH <sub>3</sub>		29	0,8

Tableau 10 : Activités des composés anioniques à pH physiologique

De ces résultats, une conclusion intéressante peut être tirée. Les composés, fonctionnalisés par un acide sulfonique ou un acide carboxylique, conservent des activités sur le récepteur TGR5 très similaires aux composés pharmacophores **1** et **2**.

Plus particulièrement pour les composés sulfonates (**20** à **22** versus **23**), il est intéressant de noter que l'éloignement de la charge est toléré par le récepteur TGR5. L'activité est cependant légèrement abaissée pour les composés **20** et **23** (sur le récepteur humain), **22** (sur le récepteur murin) par rapport au composé **21**.

Enfin pour les composés **13a** et **24**, fonctionnalisés par des acides carboxyliques, les deux analogues ont des activités très similaires au composé pharmacophore **2**. L'introduction du lien phényle et l'éloignement de la charge négative est toléré par le récepteur TGR5, tout comme pour les composés fonctionnalisés avec un acide sulfonique.

Les activités des composés anioniques à pH physiologique sont représentées dans la Figure 87 ci-dessous. L'introduction de la fonction sulfonate, avec trois chaînons méthylènes, permet d'avoir un composé plus actif que le pharmacophore **1** (composé **21**). Les composés **13a** et **24**, présentant des fonctions acides carboxyliques, ont des activités similaires aux composés **1** et **2** sur le récepteur TGR5 murin. Enfin, les trois autres composés, fonctionnalisés par une fonction acide sulfonique, sont légèrement moins actifs que les autres, mais conservent quand même des activités très satisfaisantes.

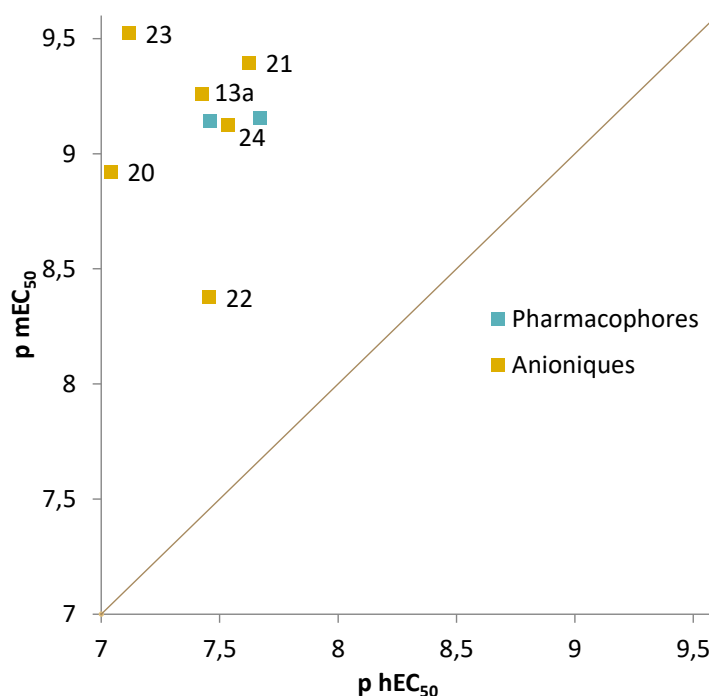
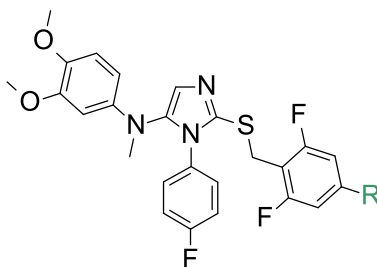


Figure 87 : Activités des composés anioniques à pH physiologique

Tous ces composés, dont la majorité présente des activités sub-nanomolaires sur le récepteur murin, sont prometteurs. L'étude des paramètres ADME pourra nous donner les informations nécessaires pour leur sélection pour de potentielles administrations *in vivo*.

### 3. Evaluation biologique *in vitro* des composés présentant un kinétophore cationique

Les trois nouveaux composés, fonctionnalisés par une amine tertiaire (composé **25**) et par des ammoniums quaternaires (composés **26** et **27**), ont été évalués *in vitro* (Tableau 11). Dans ce tableau, sont également reportées les activités des composés PEGylés **17** et **18**, ainsi que les composés synthétisés par le docteur Lasalle. Le composé **23c**, utilisé lors de la synthèse du composé disulfonate **23**, a également été testé.



Composé	R	hTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)	mTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>1</b>	-H	35	0,8
<b>ML4</b>		71	4
<b>ML6</b>		260	17
<b>23c</b>		300	37
<b>25</b>		190	17
<b>26</b>		240	11
<b>27</b>		240	14
<b>ML7</b>		238	10
<b>17</b>		2414	120
<b>18</b>		2165	135

Tableau 11 : Activités des composés cationiques à pH physiologique

Plusieurs conclusions peuvent être tirées de ces résultats :

- En présence du lien acétylénique, une diminution de l'activité, principalement sur le récepteur humain, est observée lors du passage de l'amine tertiaire à l'ammonium (**ML4** versus **ML6**). Cet effet n'est pas observé en présence de l'espaceur propyle (**25** versus **26**).
- La rigidité de l'espaceur a peu d'influence sur l'activité des composés, puisque les composés **ML6** et **26** ont des activités identiques sur les deux récepteurs.
- L'augmentation de l'encombrement de la fonction amine conduit à une légère augmentation de l'activité sur les deux récepteurs (**23c** versus **25**), et n'a pas d'influence dans le cas des ammoniums (**26**, **27**, **ML7**).
- L'introduction d'une chaîne PEG sur les composés fonctionnalisés, par une amine ou un ammonium (**23c**, **25**, **26**), conduit à une perte d'activité d'un facteur 10 sur les deux récepteurs.

De plus, par comparaison avec les résultats présentés précédemment pour les composés chargés négativement à pH physiologique, la charge positive, en présence d'un bras espaceur de nature équivalente, est moins bien tolérée qu'une charge négative (Figure 88).

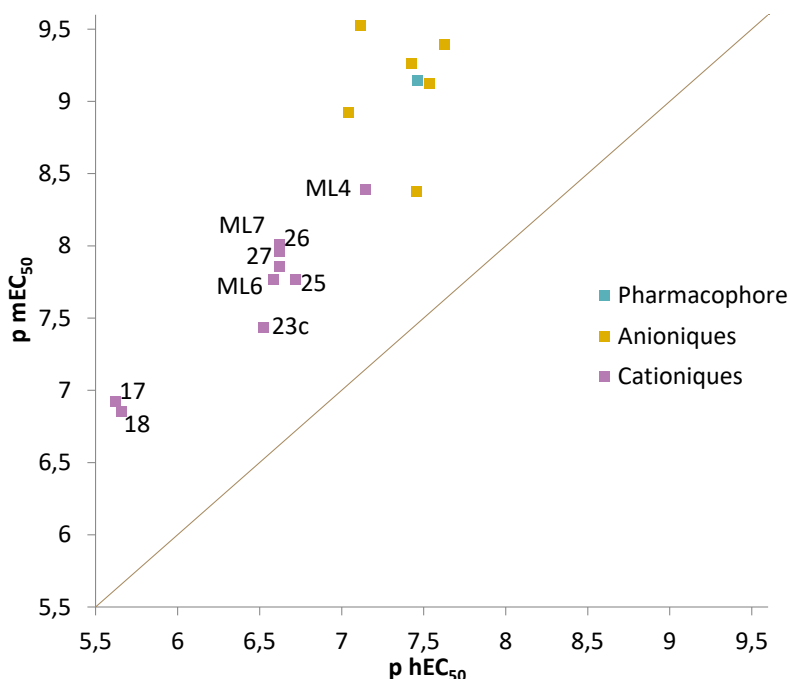
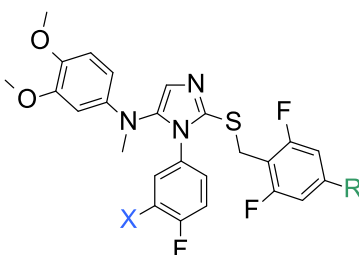


Figure 88 : Activités des composés cationiques et anioniques à pH physiologique

Bien que ces composés soient légèrement moins actifs que les composés chargés négativement, leurs propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques seront mesurées afin de déterminer des relations structure-propriétés pour ce type de composés.

#### 4. Evaluation biologique *in vitro* des composés présentant un kinétophore zwitterionique

Concernant les résultats des activités du composé **28**, la comparaison a été faite avec les composés, anioniques à pH physiologique, **23** et **24**, présentés précédemment, qui présentent également une fonction zwitterionique. Les activités obtenues dans le test primaire *in vitro* sont présentées dans le Tableau 12 ci-dessous.



Composé	X	R	hTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)	mTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>1</b>	-H	-H	35	0,8
<b>2</b>	-OCH <sub>3</sub>	-H	20	0,8
<b>23</b>	-H		76	0,7
<b>24</b>	-OCH <sub>3</sub>		29	0,8
<b>28</b>	-OCH <sub>3</sub>		35	0,9

Tableau 12 : Activités des composés zwitterioniques

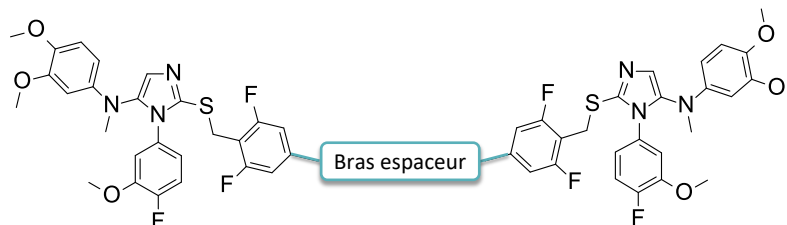
Les composés zwitterioniques présentent des activités similaires aux composés « nus » **1** et **2** sur les deux récepteurs. L'introduction de la fonction zwitterionique est donc tolérée par le récepteur.

Les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques *in vitro* de ces composés, présentant un kinétophore zwitterionique, ont été mesurées afin d'évaluer leur potentielle action topique intestinale.



5. Evaluation biologique *in vitro* des composés dimères

Les composés de type dimériques ont été testés *in vitro* pour évaluer leur capacité à activer le récepteur TGR5. Les résultats sont présentés dans le Tableau 13 ci-dessous.



Composé	Bras espaceur	hTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)	mTGR5 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>2</b>	-	20	0,8
<b>29</b>		97	0,5
<b>30</b>		210	1,7
<b>31</b>		370	15

Tableau 13 : Activités des composés dimériques 29 à 31

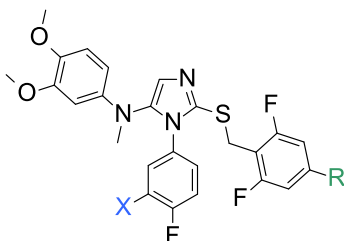
Les composés **29** et **30** présentent une activité similaire au composé **2** sur le récepteur murin. Cependant, une perte plus importante de l'activité est observée sur le récepteur humain, et en particulier pour le composé **30**.

Le composé **31** est quant à lui moins actif sur les deux récepteurs que les composés **29** et **30**. Ce résultat est en adéquation avec les résultats présentés précédemment pour les composés présentant une charge positive à pH physiologique.

Bien que ces composés présentent des activités intéressantes, les problèmes de solubilités, de purification et de rendement rencontrés lors de la synthèse risquent d'être un frein dans le développement de ces composés dimériques. L'étude *in vitro* des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques a néanmoins été réalisée pour ces composés.

6. Evaluation biologique *in vitro* des composés présentant un kinétophore polyol

Cinq composés polyols ont été obtenus et testés *in vitro* sur les récepteurs TGR5 humain et murin (Tableau 14).



Composé	X	R	hTGR5 EC50 (nM)	mTGR5 EC50 (nM)
<b>1</b>	-H	-H	35	0,8
<b>2</b>	-OCH <sub>3</sub>	-H	20	0,8
<b>32</b>	-OCH <sub>3</sub>		20	0,7
<b>33</b>	-OCH <sub>3</sub>		20	1,1
<b>34</b>	-H		370	13
<b>35</b>	-OCH <sub>3</sub>		62	1,7
<b>36</b>	-OCH <sub>3</sub>		10	0,3

Tableau 14 : Activités des composés polyols 32 à 36

Différentes conclusions peuvent être tirées de ces résultats.

Les composés **32** et **33** ont des activités similaires au composé pharmacophore **2**, ce qui montre que le kinétophore polyol ne perturbe pas les interactions du pharmacophore avec le récepteur TGR5.

L'introduction du bras espaceur alkyle et d'une fonction amine tertiaire (composé **34**) conduit à une diminution de l'activité sur les récepteurs TGR5 humain et murin. Tout comme pour les composés chargés positivement à pH physiologique, les composés **34** et **35**, possédant

une fonction amine tertiaire, sont globalement moins bien tolérés que les composés neutres ou chargés négativement.

L'introduction du lien polyéthylène glycol (composé **35**) permet de retrouver des activités semblables aux composés **32** et **33**, malgré la présence de l'amine tertiaire. L'éloignement plus important de l'amine tertiaire, par rapport au pharmacophore dans ce composé, semble donc être plus favorable pour l'activité.

Enfin, le composé **36**, possédant un groupement acide carboxylique terminal, est très bien toléré par la cible, avec une activité sub-nanomolaire sur le récepteur murin et de 10 nM sur le récepteur humain. Ce résultat est en adéquation avec les résultats des composés fonctionnalisés par des acides carboxyliques présentés précédemment. C'est également le seul composé de cette série polyol qui permet une augmentation de l'activité par rapport aux pharmacophores **1** et **2**.

Les cinq composés polyols synthétisés présentent tous des activités intéressantes. L'étude *in vitro* de leurs propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques donnera les informations nécessaires quant à leur potentielle évaluation *in vivo*.

## 7. Conclusion sur les activités *in vitro* des composés sur le récepteur TGR5

Comme nous venons de le voir, tous les composés synthétisés présentent des activités de l'ordre du nanomolaire à la centaine de nanomolaire sur les récepteurs TGR5 humain et murin. L'introduction de kinétophores variés, sur la position para du cycle C, n'influençant que peu l'activité des composés chimériques, nous confirmons bien que cette position est une position relativement silencieuse vis-à-vis des interactions avec le récepteur (Figure 89).

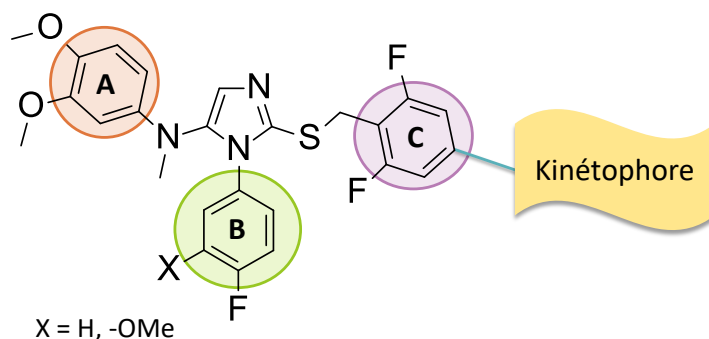


Figure 89 : Structure des composés agonistes de TGR5 synthétisés

Une remarque générale peut être faite au vu de ces résultats. Une différence entre les activités sur le récepteur TGR5 humain et le récepteur TGR5 murin est observée, pour tous les composés. Cette différence d'un facteur 50 à 100, pour tous les composés de cette série,

semble être série-dépendant. En effet, cette différence n'est pas observée dans une autre série chimique actuellement développée au laboratoire.

Nous observons également que les composés chargés négativement sont globalement plus actifs sur les récepteurs TGR5 humain et murin, que les composés neutres ou chargés positivement (Figure 90).

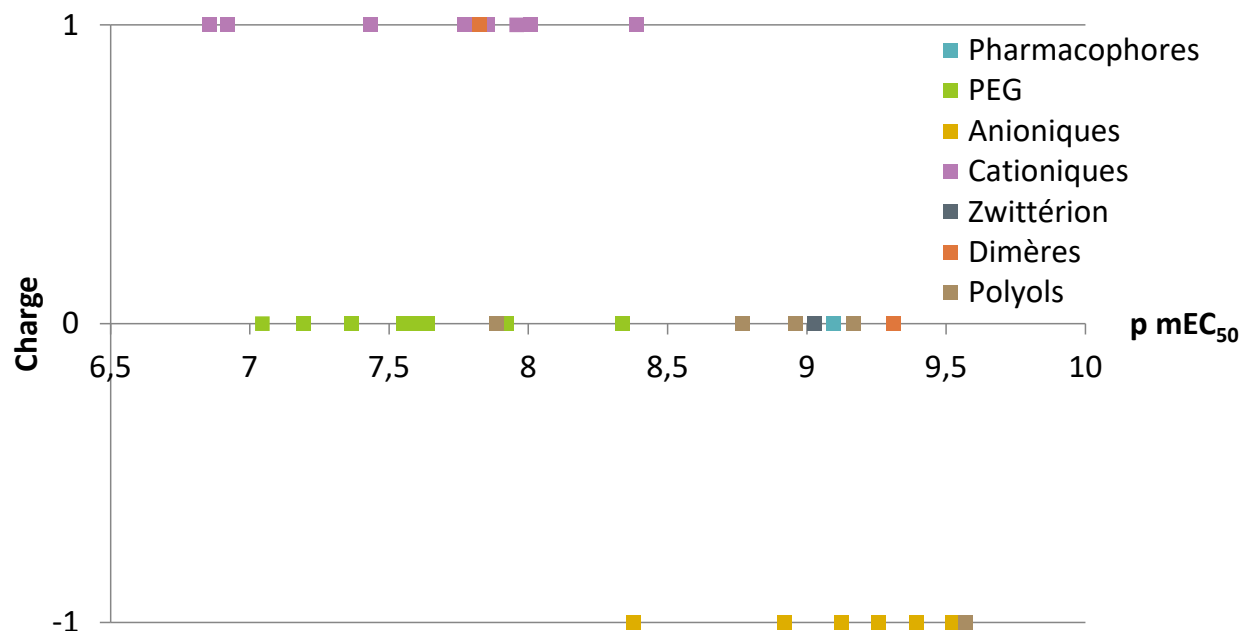


Figure 90 : Charge des composés en fonction des pEC<sub>50</sub> murin

Une trentaine de composés ont donc été synthétisés et testés *in vitro* sur les récepteurs TGR5 humain et murin. Des études *in vitro* et *in vivo* des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques ont ensuite été réalisées, afin de définir des relations structure-propriétés, et choisir les meilleurs composés pour des évaluations pharmacodynamiques chez l'animal.

### C. Etudes des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques *in vitro* et *in vivo*

Les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques *in vitro* sont des paramètres importants, qui nous permettront de juger de la capacité potentielle de nos composés à aller activer TGR5 du côté basolatéral des cellules entéroendocrines L intestinales, sans pour autant exposer la circulation systémique. De plus, ces paramètres pourront nous donner des informations importantes (solubilité, stabilité), pour la conception des protocoles des expériences dans les modèles animaux.

L'étude de ces propriétés nous permettra ainsi d'établir des relations structures-propriétés fines, pour chaque kinétophore utilisé.

Les tests de solubilité, log D, stabilité microsomale et les dosages pour les tests de perméabilité Caco-2 ont été réalisés par l'équipe de la plateforme ADME du laboratoire. Les expériences Caco-2 ont été réalisées par nos collaborateurs du Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique EA2465 (LBHE) de Lens.

#### 1. Etude de la solubilité et de la lipophilie (logD)

La solubilité et le logD sont des paramètres qui caractérisent le comportement du composé dans le milieu biologique. En particulier pour le logD, reflet de la lipophilie d'un composé, il nous donnera un premier aperçu de la capacité de nos composés à traverser les membranes. En effet, si le logD est élevé, le composé sera donc lipophile, et pourra traverser les membranes cellulaires par diffusion. Si le logD est très faible, le composé sera très hydrophile et aura une diffusion passive faible à travers les membranes.

Le logD est mesuré après 24h d'agitation du composé à 10 mM dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), dans un mélange octanol/tampon phosphate salin (PBS) (50/50). Il correspond au logarithme de la concentration du composé dans une phase organique (l'octanol) mimant la lipophilie de la membrane plasmique, divisée par la concentration de ce même composé dans un milieu aqueux tamponné PBS (ici à pH 7,4) mimant les compartiments aqueux de l'organisme selon l'équation suivante :

$$\text{LogD} = \text{Log} \left( \frac{[C]_{\text{octanol}}}{[C]_{\text{tampon pH 7,4}}} \right)$$

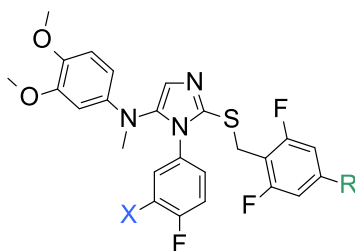
Concernant la solubilité cinétique, elle est mesurée après 24h d'agitation du composé à 10 mM dans du DMSO dilué dans du PBS à pH 7,4. Le calcul de la solubilité du composé dans le PBS à pH 7,4 se fait selon la formule suivante :

$$\text{Solubilité PBS}_{7,4}(\mu\text{M}) = \frac{AUC_{\text{PBS}}}{AUC_{100\% \text{ dissous}}} \times C_{\text{max}}$$

où  $AUC_{\text{PBS}}$  est l'aire sous la courbe du signal de masse du produit dans le PBS pH 7,4 préalablement filtré et  $AUC_{100\% \text{ dissous}}$  est l'aire sous la courbe du signal de masse du produit totalement dissous (dans notre test,  $C_{\text{max}} = 200 \mu\text{M}$ ).

Ainsi, les résultats de solubilité et logD obtenus pour les composés fonctionnalisés par divers kinétophores sont regroupés dans les différents tableaux présentés ci-dessous. Plusieurs remarques peuvent être faites au vu des résultats.

Pour les composés chargés à pH physiologiques, qu'ils soient anioniques ou cationiques, la solubilité de ces composés est élevée (> 150  $\mu\text{M}$  pour la majorité des composés) (Tableau 15). L'introduction des kinétophores permet d'augmenter de façon considérable la solubilité des composés par rapport aux pharmacophores **1** et **2**. Le logD est, quant à lui, compris entre 0 et 3, valeurs acceptables pour l'obtention de composés suffisamment perméables, pour aller activer TGR5 du côté basolatéral des cellules L intestinales. L'introduction des kinétophores permet de diminuer la lipophilie par rapport aux composés pharmacophores **1** et **2**.

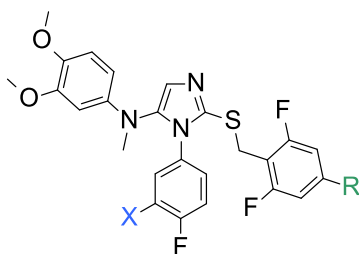


Composé	X	R	Solubilité ( $\mu\text{M}$ )	LogD
<b>1</b>	-H	-H	6,3	3,5
<b>2</b>	-OCH <sub>3</sub>	-H	8,8	4,0
<b>13a</b>	-OCH <sub>3</sub>		43,2	2,3
<b>21</b>	-H		> 200	0,78
<b>24</b>	-OCH <sub>3</sub>		163	0,09
<b>25</b>	-H		173	2,7
<b>26</b>	-H		> 200	1,5
<b>27</b>	-H		> 200	2,0
<b>18</b>	-H		> 245	- 0,5

Tableau 15 : Solubilité et logD des composés agonistes de TGR5 chargés

Le composé zwitterionique **28** possède une faible solubilité de 7,1  $\mu\text{M}$ , tout comme le composé polyol **32** (9,5  $\mu\text{M}$ ) avec un logD compris entre 1,5 et 2. La faible solubilité de ces composés pourra être un frein pour leur formulation pour de potentielles expériences *in vivo*. Les autres composés polyols (**34** - **36**), qui possèdent également une fonction ionisable à pH physiologique, sont très solubles et ont un logD moyen (Tableau 16).

Les composés dimériques sont très peu solubles et très lipophiles, malgré la présence de polyéthylène glycol ou d'amines tertiaires protonables. Ils seront probablement difficiles à formuler pour des administrations *in vivo* (Tableau 16).



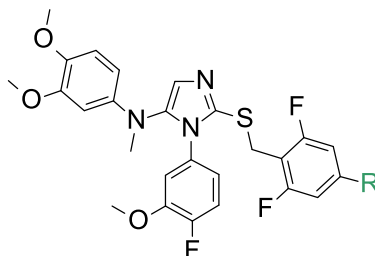
Composé	X	R	Solubilité (μM)	LogD
1	-H	-H	6,3	3,5
2	-OCH <sub>3</sub>	-H	8,8	4
28	-OCH <sub>3</sub>		7,1	1,9
29	-OCH <sub>3</sub>		< 1	> 4
30	-OCH <sub>3</sub>		< 1	> 3,7
31	-OCH <sub>3</sub>		1,3	2,3
32	-OCH <sub>3</sub>		9,5	2,4
34	-H		188	1,4
35	-OCH <sub>3</sub>		172	2,4
36	-OCH <sub>3</sub>		65	0,6

Tableau 16 : Solubilité et logD des composés agonistes de TGR5 zwitterionique, dimériques et polyols

Concernant les composés PEGylés, les résultats montrent que les propriétés physicochimiques sont dépendantes de la longueur de la chaîne PEG (Tableau 17). La solubilité augmente très fortement avec l'introduction de seulement quelques unités PEG. En effet, pour le composé **13** (n = 4 – 13), présentant un PEG de faible poids moléculaire (500 g/mol), une augmentation importante de la solubilité d'un facteur de 17 est observée, malgré une diminution assez faible du logD par rapport au composé **2**. Cette augmentation de la solubilité peut être attribuée au grand nombre de liaisons hydrogène possibles entre la chaîne PEG et les



molécules d'eau. En effet, une unité PEG peut effectuer des liaisons hydrogènes avec 2 ou 3 molécules d'eau<sup>149</sup>. L'hydrophilie croit également avec la longueur de chaîne, également en lien avec l'augmentation du nombre d'unités éthylène glycol (et donc d'accepteurs de liaisons hydrogène) (Tableau 17).



Composé	R	n	Solubilité (μM)	LogD
2	-H	-	8,8	4,0
13		4 - 13	151	3,4
14		11 - 25	> 200	1,6
15		31 - 57	> 200	-1,5
16		100 - 138	> 200	-1,6

Tableau 17 : Solubilité et logD des composés agonistes de TGR5 présentant un kinétophore PEG

Dans la Figure 91 ci-dessous, la lipophilie des différents composés (classés par kinétophores) en fonction de leurs activités sur le récepteur TGR5 murin (p mEC<sub>50</sub>) est représentée. Les résultats sont similaires sur le récepteur humain. Nous avons ainsi pu générer des composés très puissants, présentant une gamme étendue de lipophilie (logD de 0 à 4).

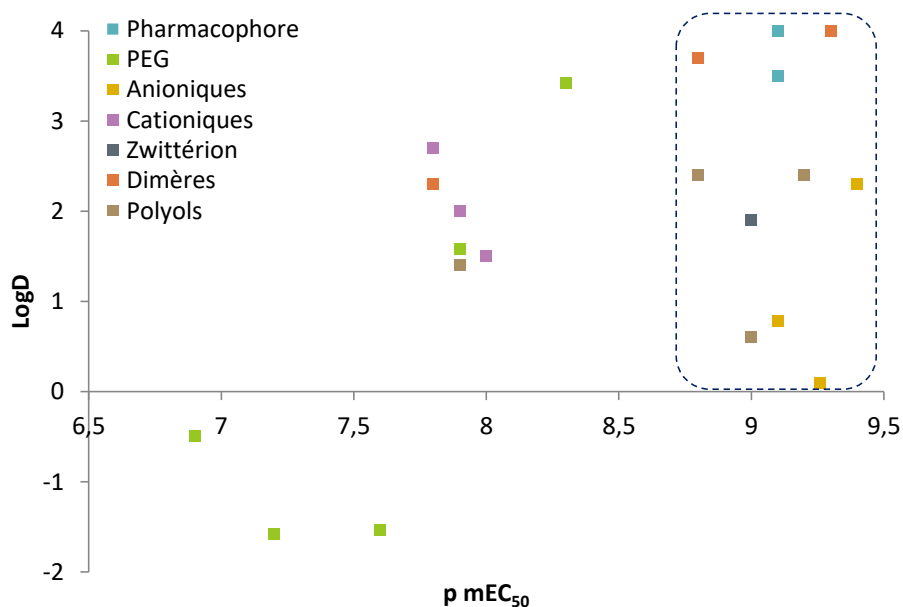


Figure 91 : Lipophilie (logD) des différents composés chimériques en fonction de la pEC<sub>50</sub> (mTGR5)

Grâce à l'étude de la solubilité et de la lipophilie, nous avons pu observer l'influence des divers kinétophores utilisés sur ces deux paramètres physicochimiques. Comme attendu, l'introduction de charges ou de groupements hydrophiles (PEG) permet d'augmenter la solubilité, et de diminuer la lipophilie.

## 2. Etude de la perméabilité

La biodisponibilité orale est limitée par de nombreux facteurs, comme le transport des composés ou encore par le métabolisme hépatique. La perméabilité membranaire a été reconnue comme étant un paramètre prédictif de la biodisponibilité orale<sup>76</sup>.

Le test de perméabilité, dans lequel nos composés ont été évalués, utilise comme modèle cellulaire de la barrière intestinale, une lignée de cellules de cancer colorectal, les cellules Caco-2. Cultivées dans les conditions adéquates, elles se développent en formant une monocouche de cellules (Figure 92). Ces cellules polarisées présentent de nombreuses caractéristiques associées à la barrière physique et métabolique de l'épithélium intestinal<sup>150</sup>. Etant donné que la perméabilité à travers une monocouche de cellules Caco-2 est bien corrélée avec l'absorption chez l'être humain, le modèle est utilisé comme outil prédictif pour l'absorption des composés dans la phase de découverte de médicaments<sup>151,152</sup>.

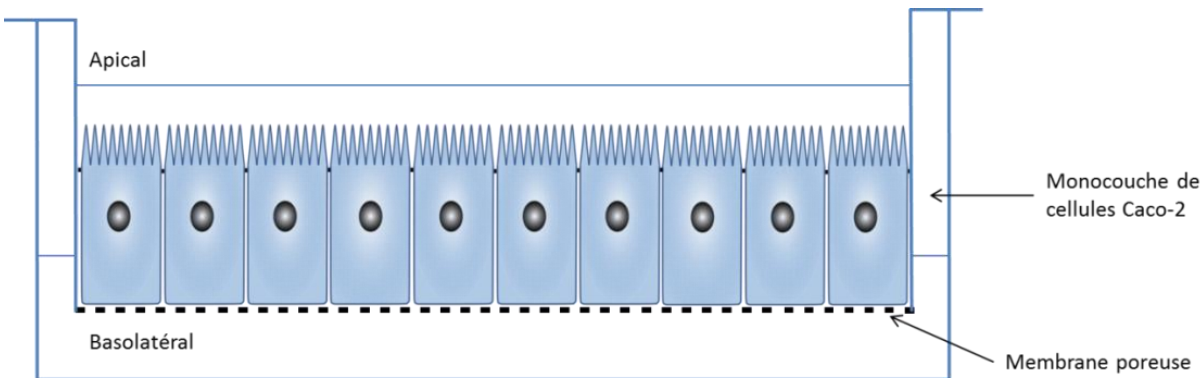


Figure 92 : Schéma du test de perméabilité sur cellules Caco-2

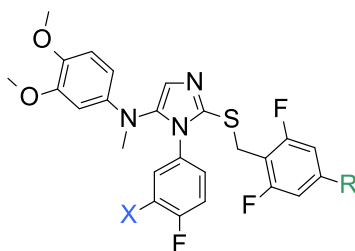
Lors de ce test, réalisé par nos collaborateurs du Laboratoire de la Barrière HématoEncéphalique de Lens (LBHE), le composé en solution est incubé, soit du côté apical (A), soit du côté basolatéral (B) de la monocouche de cellules, pendant 60 minutes. Le composé est ensuite dosé dans les deux compartiments, et trois paramètres sont déterminés<sup>153</sup> : la perméabilité apparente ( $P_{app}$  en cm/s) de A vers B, de B vers A, et l'efflux actif (efflux ratio) correspondant au rapport de la perméabilité apparente de B vers A sur celle de A vers B. La mesure de ces 3 paramètres sera donc importante pour déterminer la capacité de nos composés à activer TGR5 du côté basolatéral des cellules entéroendocrines L. Plus la perméabilité de A vers B, qui correspond au passage transépithélial sera faible, moins les

composés seront biodisponibles. La perméabilité de B vers A, qui renseigne sur le passage membranaire des composés, devra être non négligeable pour permettre aux composés d'aller atteindre la face basolatérale des cellules L. Enfin, un ratio  $P_{app\ B\rightarrow A} / P_{app\ A\rightarrow B}$  (efflux ratio) supérieur à 2 ou inférieur à 0,5 indique la contribution d'un processus de transport actif. Les composés devront idéalement posséder un fort efflux actif leur permettant d'atteindre la partie distale de l'intestin et limitant leur absorption intestinale et donc limiter l'exposition systémique. Nous recherchons ainsi des composés avec un fort efflux actif, avec une perméabilité de A vers B faible, mais une perméabilité de B vers A non négligeable.

De plus, l'augmentation de la surface polaire (PSA), associée à une augmentation du poids moléculaire, est décrite pour avoir un effet négatif sur l'absorption intestinale<sup>76, 154</sup>. Veber *et al.* ont montré qu'une PSA supérieure à 140 Å<sup>2</sup> permettrait d'avoir une biodisponibilité orale inférieure à 20%<sup>76</sup>. Il sera donc intéressant d'étudier l'influence de la PSA sur la perméabilité de nos composés.

La perméabilité apparente sur cellules Caco-2 a été testée pour une sélection de composés, présentant les différents kinétophores explorés. Les surfaces polaires ont été calculées en utilisant le logiciel Pipeline Pilot. Les résultats sont présentés dans le Tableau 18.

## Optimisation du kinétophore



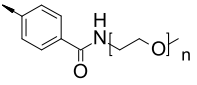
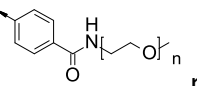
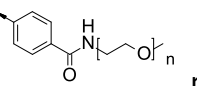
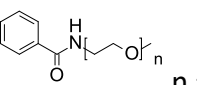
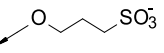
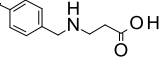
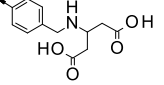
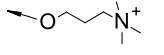
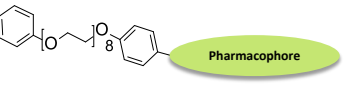
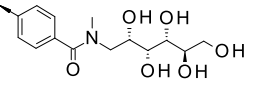
N°	X	R	PSA (Å²)	P <sub>app</sub> A→B (10 <sup>-6</sup> cm/s)	P <sub>app</sub> B→A (10 <sup>-6</sup> cm/s)	Efflux ratio
1	-H	-H	65	5,3	5,5	1,0
2	-OCH <sub>3</sub>	-H	100	9,3	8,5	0,9
13	-OCH <sub>3</sub>	 n = 4 - 13	177	4,9	19,5	<b>4,0</b>
14	-OCH <sub>3</sub>	 n = 11 - 25	269	< 0,02	9,1	> <b>455</b>
15	-OCH <sub>3</sub>	 n = 31 - 57	500	< 0,12	< 0,03	nd
16	-OCH <sub>3</sub>	 n = 100 - 138	1155	nd	nd	nd
21	-H		140	0,03	19	<b>613</b>
28	-OCH <sub>3</sub>		123	0,52	12	<b>23</b>
24	-OCH <sub>3</sub>		161	0,29	0,35	1,2
26	-H		74	0,18	0,24	1,4
29	-OCH <sub>3</sub>		231	< 1,14	0,3	nd
32	-OCH <sub>3</sub>		196	< 0,17	12,4	> <b>73</b>

Tableau 18 : Résultats des tests de perméabilité des composés et surface polaire (PSA) calculée avec le logiciel Pipeline Pilot

De nouveau, plusieurs conclusions peuvent être tirées de ces résultats.

Tous les composés sélectionnés dans cette étude sont peu perméables dans le test sur cellules Caco-2 et donc à priori peu biodisponibles, sauf le composé PEGylé **13** qui a une perméabilité modérée ( $5.10^{-6}$  cm/s).

Au contraire, la perméabilité de B vers A doit être non négligeable pour avoir un efflux actif. Les composés **24** et **26** ne semblent pas être efflués de façon active des cellules Caco-2 (efflux ratio  $\approx 1$ ). L'efflux des composés **15** et **29** n'a pu être mesuré, puisque les limites de détections, lors des dosages par LCMS/MS, ont été atteintes.

On peut également souligner un très fort phénomène d'efflux pour les composés sulfonate **21**, PEGylé **14** et polyol **32**. Ces composés présentent donc un profil de transport très intéressant pour atteindre notre objectif avec :

- une perméabilité membranaire passive non négligeable (perméabilité de B vers A importante) permettant un potentiel accès à la face basolatérale des cellules L pour déclencher la sécrétion de GLP-1,
- un très fort efflux dans les entérocytes limitant très fortement l'absorption intestinale et donc l'exposition systémique, tout en permettant une bonne exposition de la partie distale de l'intestin.

Nous avons également choisi de représenter les résultats de perméabilité de A vers B en fonction de la surface polaire (Figure 93). Comme vu précédemment, un composé est peu absorbé si la surface polaire est supérieure à  $140 \text{ \AA}^2$ , permettant ainsi d'avoir une faible biodisponibilité par voie orale. Cette condition semble être corrélée avec la faible perméabilité de A vers B des composés **13**, **14**, **21**, **28** et **32**. Ces composés sont également tous fortement efflués.

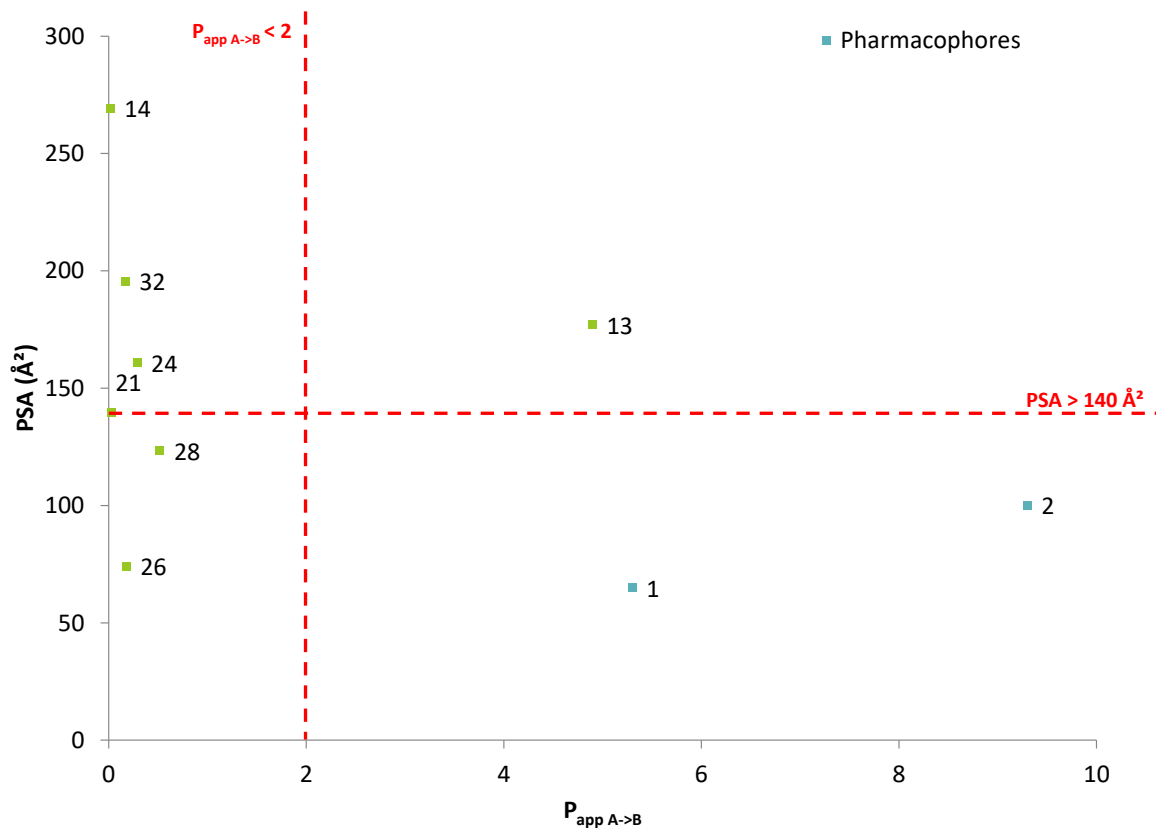


Figure 93 : PSA en fonction de la perméabilité de A vers B des composés

Grâce à l'élaboration de notre plateforme de kinétophores, nous avons pu obtenir des composés présentant des profils de transport très différents qui nous permettront de comprendre et d'établir les profils les plus adaptés pour notre objectif d'obtention de composés topiques intestinaux.

Pour les composés PEGylés, une étude plus approfondie a été réalisée, dans le but d'étudier l'influence de la longueur de chaîne polyéthylène glycol sur la perméabilité. Pour les composés **13** et **14**, la perméabilité a été mesurée sur cellules Caco-2 pour chaque longueur de chaîne dans le mélange. Elle décroît de A vers B en fonction de la longueur de chaîne pour devenir très faible à partir de  $n = 12$  (Figure 94).

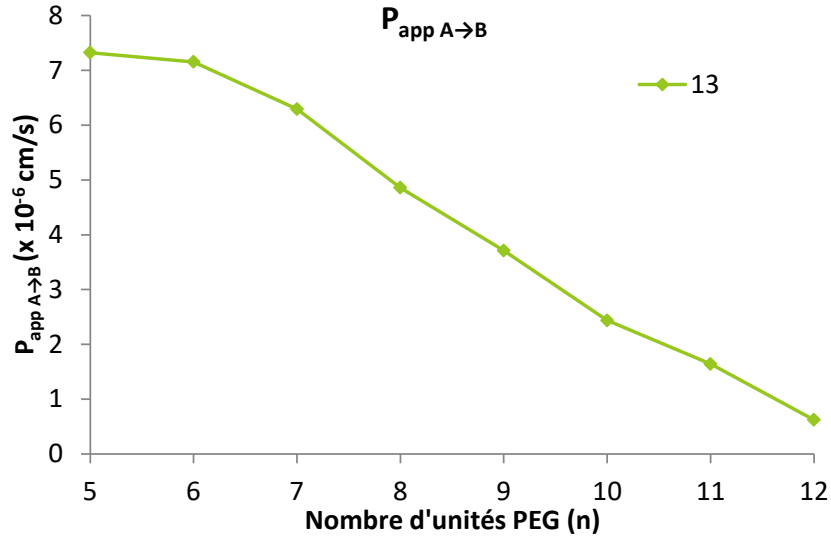


Figure 94 : Influence de la longueur de chaîne PEG du composé 13 sur la perméabilité de A vers B

De façon inexplicée, un effet biphasique (courbe en cloche) de la longueur de chaîne sur la perméabilité de B vers A est observé, signifiant que les courtes longueurs de chaînes ( $n = 5$  à  $7$ ) et les plus grandes longueurs de chaînes ( $n = 12$  à  $23$ ) sont moyennement perméables ( $2 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s} < P_{app B \rightarrow A} < 20 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) tandis que les longueurs de chaînes comprises entre  $8$  et  $11$  sont très perméables ( $P_{app B \rightarrow A} > 20 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) (Figure 95).

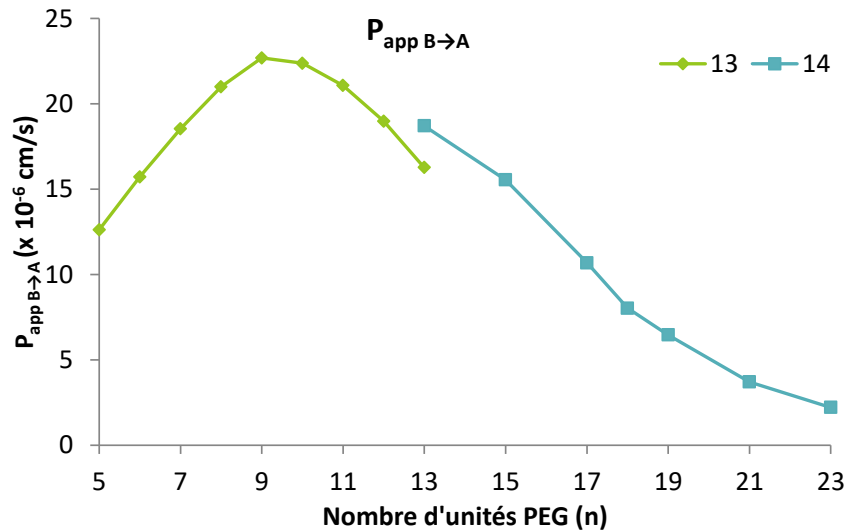


Figure 95 : Influence de la longueur de chaîne PEG des composés 13 et 14 sur la perméabilité de B vers A

L'efflux cellulaire est un mécanisme de transport actif, énergie-dépendant, assuré par des transporteurs ou pompes d'efflux tels que la Glycoprotéine-P (P-gp ou MDR1 – Multi-Drug Resistance protein 1), ou MRP2 (Multidrug Resistance-associated Protein 2)<sup>155</sup>. Une expérience sur cellules Caco-2 ensemencées en fonds de puits, réalisée par nos collaborateurs du LBHE (EA2465), en présence ou non d'inhibiteurs de ces pompes d'efflux, nous a permis d'étudier la capacité d'une sélection de composés à être pris en charge par ces transporteurs. Nous avons choisi quatre composés pour cette étude : le composé PEGylé **13**, le composé sulfonate **21**, le composé amine tertiaire **25** et le composé ammonium quaternaire **26**.

Le transporteur P-gp est significativement impliqué dans l'efflux actif des composés **13** et **25**, puisque l'incubation des cellules Caco-2 avec ces composés entraîne une diminution significative de la vitesse d'efflux du substrat P-gp, la Rhodamine 123 (Rho123) (Figure 96). Le Vérapamil, un inhibiteur de P-gp a été utilisé comme contrôle positif.

La P-gp est connue pour prendre en charge les cations organiques entre autres<sup>155</sup>. Les résultats de la prise en charge du composé **25** amine tertiaire par la P-gp sont donc en accord avec le pharmacophore des substrats de cette pompe. Il semblerait cependant que l'encombrement de l'azote ne permette pas au composé ammonium **26** d'être substrat de cette pompe d'efflux. Le composé sulfonate **21** n'est pas un substrat et/ou un inhibiteur de P-gp au vu des résultats (Figure 96).

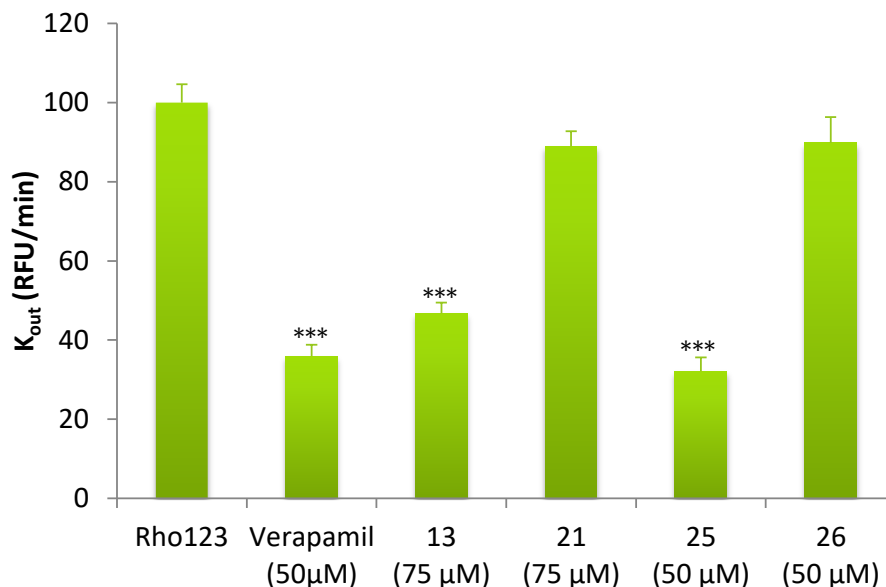


Figure 96 : Vitesse d'efflux cellulaire de la Rhodamine 123 ( $K_{out}$ ), suivie par mesure de fluorescence, en présence ou non des composés (non toxiques sur cellules Caco-2 aux concentrations testées). RFU : Relative Fluorescence Unit. Moyennes +/- écart-type. \*\*\*  $p < 0,001$  (Test de Mann-Whitney)



Le transporteur MRP2 est, quant à lui, uniquement impliqué dans l'efflux actif du composé basique (amine tertiaire) **25** (Figure 97). On observe une diminution de la vitesse d'efflux du substrat chlorométhylfluorecein-diacétate (CMFDA) en présence de composé. L'inhibiteur sélectif de MRP2 (MK571) a été utilisé comme contrôle positif.

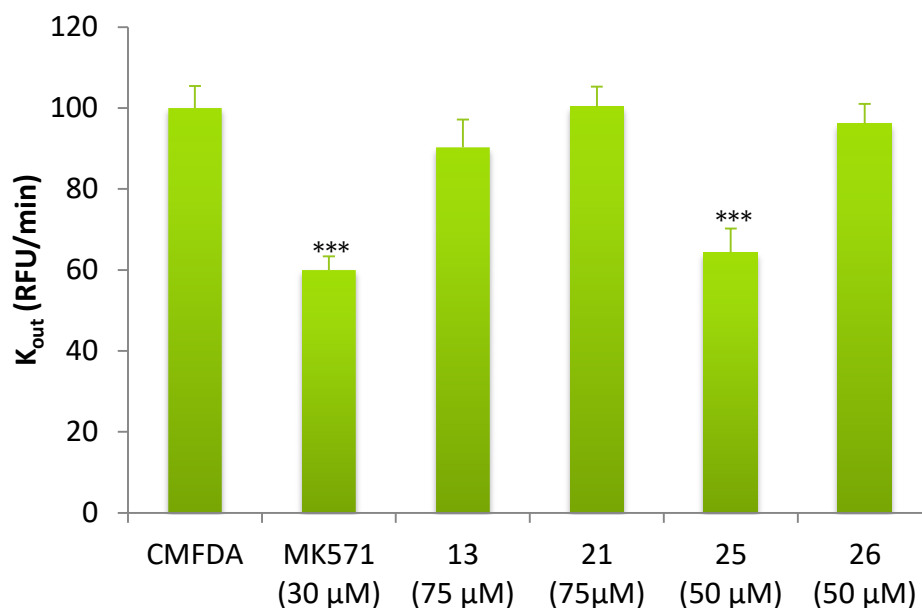


Figure 97 : Vitesse d'efflux cellulaire du CPMFDA ( $K_{out}$ ), suivie par mesure de fluorescence, en présence ou non des composés (non toxiques sur cellules Caco-2 aux concentrations testées). RFU : Relative Fluorescence Unit. Moyennes +/- écart-type. \*\*\*  $p < 0,001$  (Test de Mann-Whitney)

Le composé PEGylé **13** semble donc être un substrat et/ou un inhibiteur de la pompe d'efflux P-gp, tandis que le composé basique **25** semble être un substrat et/ou inhibiteur des deux pompes d'efflux P-gp et MRP2 étudiées. Enfin, les composés sulfonate **21** et ammonium **26** ne semblent pas être pris en charge par ces pompes d'efflux.

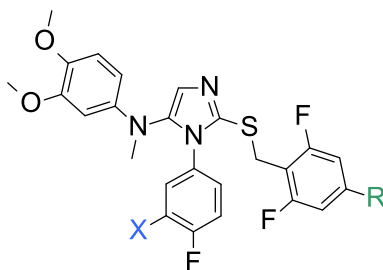
L'étude de la perméabilité membranaire a permis de montrer que l'introduction de groupements kinétophores, de quelque nature qu'il soit, permettait d'obtenir des composés peu perméables laissant espérer une bonne exposition de la partie distale de l'intestin. L'efflux actif, observé pour certains de ces composés, va permettre de diminuer encore l'absorption intestinale. L'étude du transport de nos composés pourra être poursuivie, pour permettre de comprendre les résultats de perméabilité obtenus, et tenter de déterminer les transporteurs impliqués dans l'efflux des composés.

### 3. Stabilité microsomale

Le foie représentant l'organe principal du métabolisme des xénobiotiques, les microsomes de ce dernier représentent le modèle *in vitro* le plus commun, pour évaluer la clairance hépatique. Des tests de stabilité microsomale ont été réalisés sur une sélection de composés. Deux paramètres ont été étudiés : la clairance intrinsèque *in vitro* ( $Cl_{int}$  exprimée en  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ ) et la demi-vie ( $t_{1/2}$  exprimé en minutes).

A travers l'étude du métabolisme oxydatif des composés, nous allons étudier l'influence du kinétophore sur la stabilité des composés dans le foie. Les composés sont incubés sur microsomes de foie de souris mâles, à 37°C pendant 5 à 40 minutes, à une concentration de 1  $\mu\text{M}$ . Les échantillons sont ensuite analysés par LCMS/MS. Les résultats des composés sélectionnés sont présentés ci-après (Tableau 19).

Optimisation du kinétophore



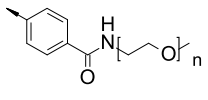
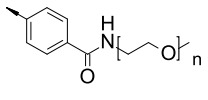
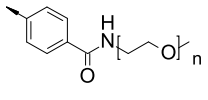
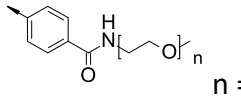
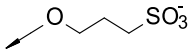
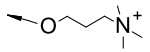
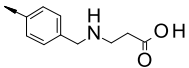
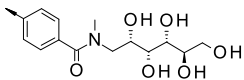
Composé	X	R	Cl <sub>int</sub> (μL/min/mg)	t <sub>1/2</sub> (min)	LogD
1	-H	-H	1254	1,1	3,5
2	-OCH <sub>3</sub>	-H	1287	0,7	4,0
13	-OCH <sub>3</sub>	 n = 4 - 13	524	8	3,4
14	-OCH <sub>3</sub>	 n = 11 - 25	17	145	1,6
15	-OCH <sub>3</sub>	 n = 31 - 57	8	310	-1,5
16	-OCH <sub>3</sub>	 n = 100 - 138	11	231	-1,6
21	-H		1211	1,2	0,8
26	-H		241	8	1,5
28	-OCH <sub>3</sub>		691	4	1,9
32	-OCH <sub>3</sub>		594	4	2,4

Tableau 19 : Résultats des tests de stabilité microsomale des composés

Une première remarque peut être faite au vu de ces résultats. Globalement, la stabilité microsomale des composés croît avec l'augmentation de l'hydrophilie. Le composé sulfonate **21** présente une clairance microsomale équivalente aux analogues sans kinétophore. La fonction sulfonate ne semble donc pas protéger du métabolisme, alors que la fonction ammonium quaternaire (**26**) permet une augmentation de la stabilité. Les composés neutres (zwitterion **28** et polyol **32**) sont, quant à eux, plus stables, avec une clairance microsomale diminuée de moitié par rapport aux composés « nus » **1** et **2**.

La stabilité microsomale a été évaluée de façon plus approfondie pour les composés PEGylés **13** à **16**, afin d'étudier l'influence de chaque longueur de chaîne sur la stabilité microsomale de ce type de composés, fonctionnalisés avec des kinétophores encombrants et très hydrophiles (Figure 98).

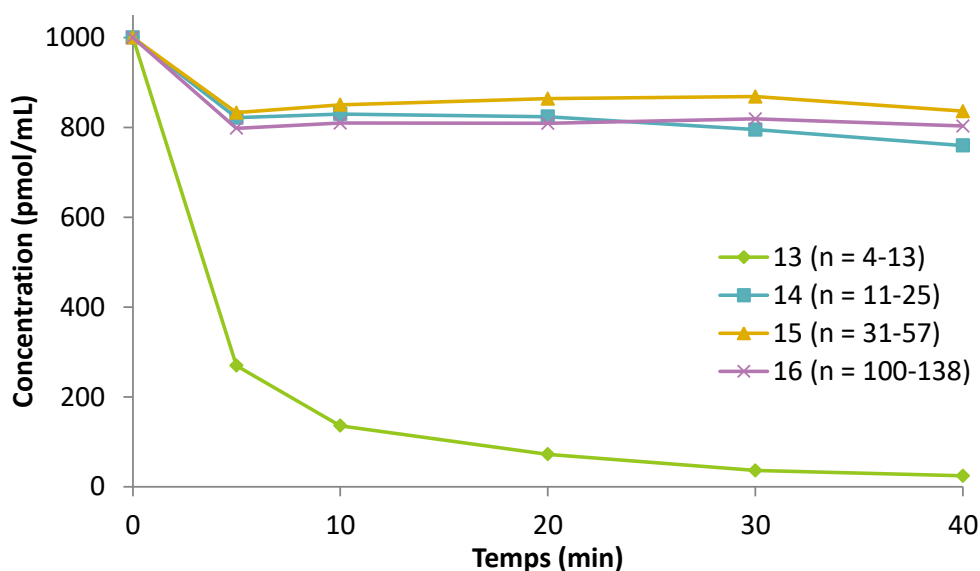


Figure 98 : Stabilité microsomale : Concentration des composés 13 à 16 en fonction du temps

L'ajout d'une chaîne PEG protège le pharmacophore du métabolisme, puisque l'introduction de seulement quelques unités éthylène glycol conduit à une augmentation de la stabilité sur microsomes (clairance microsomale du composé **2** versus composés **13** et **14**) (Figure 99). La clairance microsomale décroît lorsque la longueur de la chaîne PEG augmente. Pour des longueurs de chaîne supérieures à 13 unités polyéthylène glycol (composés **14** à **16**), les composés ont une clairance microsomale très faible (Figure 99, Tableau 19).

### Optimisation du kinétophore

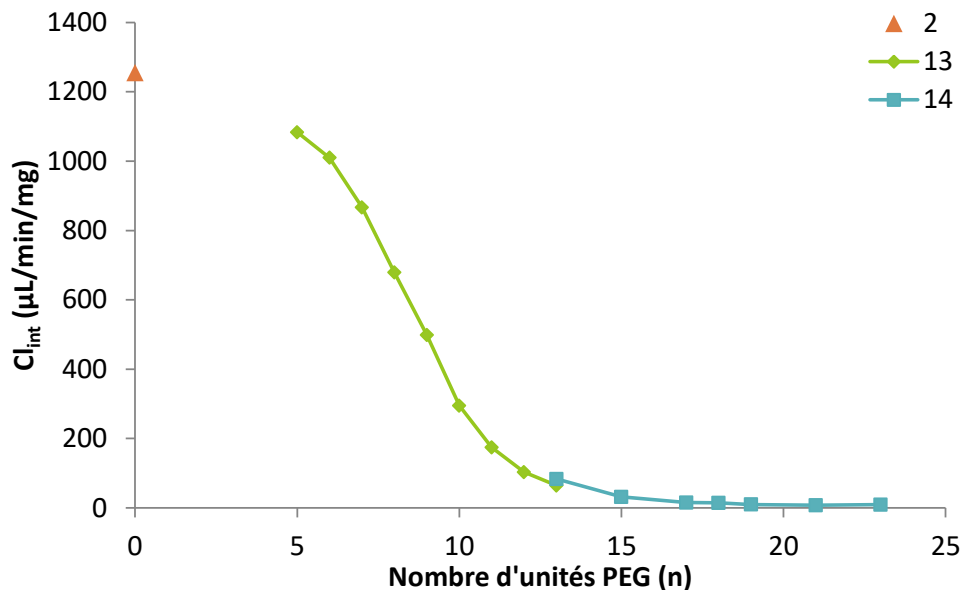


Figure 99 : Clairance microsomale ( $Cl_{int}$ ) des composés 2, 13 et 14 en fonction de la longueur de chaîne PEG

Une expérience *in vitro* sur microsomes, en présence ou non d'un inhibiteur de cytochrome 3A4, a été réalisée pour le composé **13**, et a permis de montrer que ces cytochromes sont impliqués dans la métabolisation du composé **13**. En effet, une très forte diminution de la clairance microsomale est observée en présence d'un inhibiteur de ces cytochromes (Kétoconazole) (Figure 100).

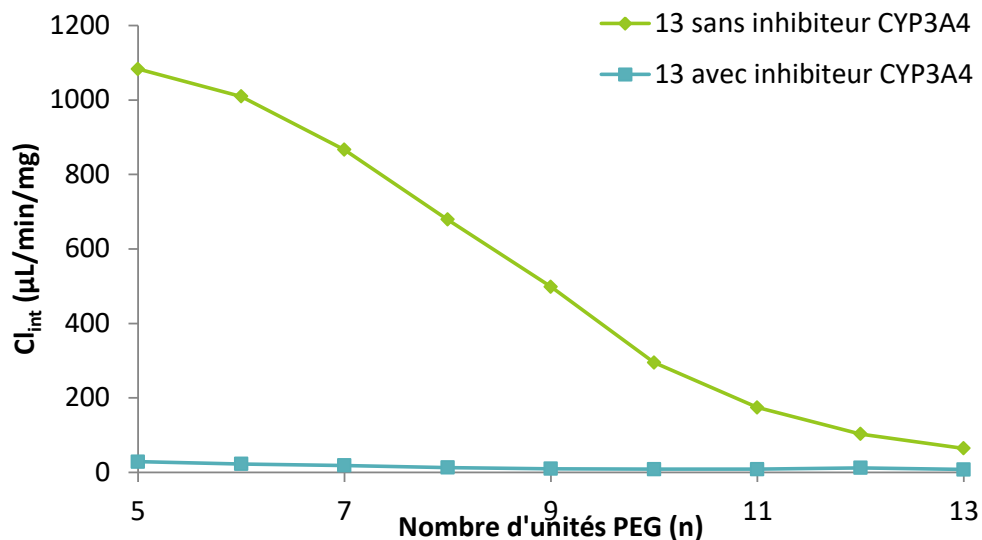


Figure 100 : Clairance microsomale ( $Cl_{int}$ ) du composé 13 en présence ou non d'inhibiteur de CYP3A4 (Kétoconazole)

L'étude de la stabilité sur microsomes des composés a permis de montrer que l'introduction de groupements kinétophores conduisait à des profils de stabilité microsomale variés. En effet, alors que le composé sulfonate **21** est fortement métabolisé sur microsomes murins, les autres composés se sont révélés plus stables. L'étude de la stabilité des composés PEGylés nous a également permis de montrer que l'augmentation de la longueur de chaîne PEG conduit à une diminution de la clairance, et qu'une modulation de la taille du polymère permet donc de contrôler le métabolisme oxydatif.

### **Conclusion sur les études ADME *in vitro* :**

L'aménagement moléculaire de nos pharmacophores par l'utilisation d'une plateforme de kinétophores nous a permis d'obtenir des composés avec des profils physicochimiques et pharmacocinétiques très variés :

- Un LogD compris entre 0 et 4,
- Une solubilité de 1  $\mu\text{M}$  à 10 mM,
- Une perméabilité de A vers B de  $0,03 \cdot 10^{-6}$  cm/s à  $5 \cdot 10^{-6}$  cm/s,
- Un efflux ratio compris entre 1 et 600.

La diversité de profils ADME de ces composés pourra nous permettre de choisir les composés qui possèdent les propriétés les plus adaptées pour notre objectif d'obtention de composés topiques intestinaux.

#### 4. Etude des propriétés pharmacocinétiques *in vivo*

Une sélection de composés a ensuite été engagée dans des études de pharmacocinétique *in vivo*. L'étude de l'exposition des différents organes *in vivo* pour les composés va pouvoir nous permettre de déterminer le devenir de ceux-ci dans l'organisme.

Pour cela, nous avons porté nos efforts sur deux types de kinétophores : les composés fonctionnalisés par des polyéthylènes glycols **13** à **16**, pour étudier l'influence de la longueur de la chaîne PEG sur les propriétés pharmacocinétiques *in vivo*, et le composé sulfonate **21**, qui présente de très bonnes activités et le profil pharmacocinétique recherché pour un potentiel composé topique intestinal.

Toutes ces expériences *in vivo* ont été réalisées au sein du laboratoire (U1177) par la plateforme ADME.

##### a. Composés fonctionnalisés par un groupement PEG

Afin d'évaluer l'influence de la longueur de la chaîne PEG sur le temps de transit des composés PEGylés dans le tube digestif et l'exposition de différents organes, une expérience de pharmacocinétique a été réalisée chez la souris (souche C57Bl6, mâles, 8-10 semaines). Au cours de cette expérience, réalisée sur une durée de 10h, du sang et différents organes ont été prélevés, à différents temps, afin de définir la distribution du composé dans l'animal, après une administration par voie orale à une concentration de 32  $\mu\text{mol/kg}$ .

Dans un premier temps, le dosage des composés dans le plasma et le foie, aux différents temps, a été réalisé. L'exposition plasmatique et hépatique est supérieure pour le PEG intermédiaire **14** par rapport aux autres composés PEGylés (Figure 101). Malgré une perméabilité très faible sur cellules Caco-2 ( $P_{\text{app}} \ll 2.10^{-6} \text{ cm/s}$ ) du composé **14**, inférieure à celle du composé **13** ( $P_{\text{app}} > 2.10^{-6} \text{ cm/s}$ ), il présente une exposition systémique supérieure à celle du composé **13**, à priori plus absorbé au vu de sa perméabilité. Ce résultat pourrait s'expliquer par la meilleure stabilité métabolique du composé **14**, qui compenserait sa plus faible absorption intestinale.

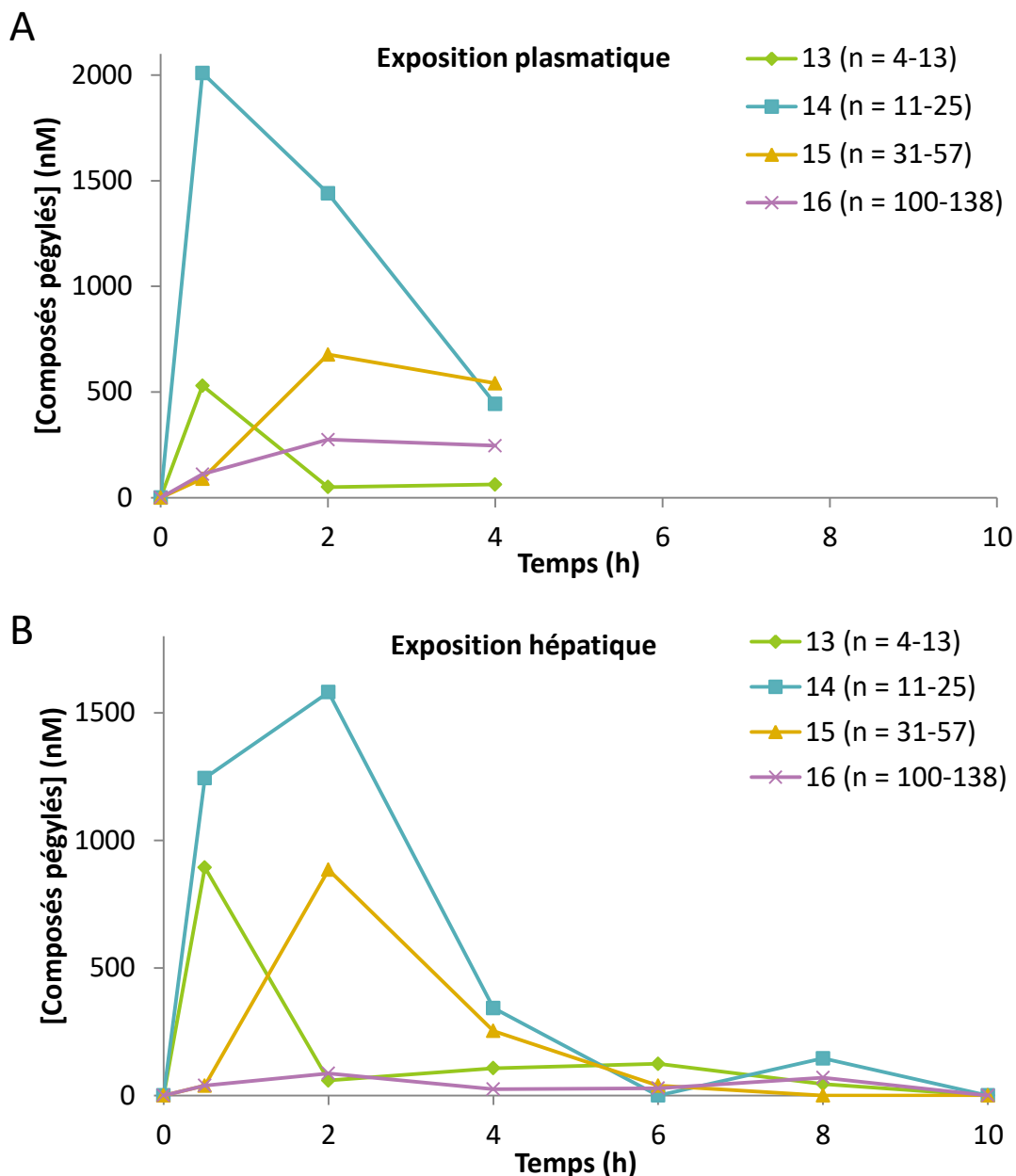


Figure 101 : Exposition plasmatique (A) et hépatique (B) des composés PEGylés 13 à 16

Etant donné les effets secondaires non souhaités reportés pour des agonistes systémiques de TGR5 sur la vésicule biliaire, nous nous sommes également intéressés à l'exposition de cet organe par nos composés. Ainsi, pour les composés PEGylés, seuls les composés présentant les PEGs de plus haut poids moléculaires **15** et **16** n'exposent pas ou peu la vésicule biliaire, résultats corrélés avec la très faible perméabilité membranaire, et donc la très faible absorption intestinale de ces composés (Figure 102A). Plus particulièrement pour les composés de faibles longueurs de chaîne PEG **13** et **14**, on observe une accumulation des composés dans la vésicule biliaire (concentration 10 à 50 fois supérieure à la concentration



plasmatique), reflet d'une excrétion biliaire de ces composés (Figure 102B). Le transporteur P-gp, également présent dans les hépatocytes, et participant à l'efflux actif du composé **13** mesuré sur cellules intestinales Caco-2, pourrait être également responsable de l'excrétion biliaire des composés PEGylés.

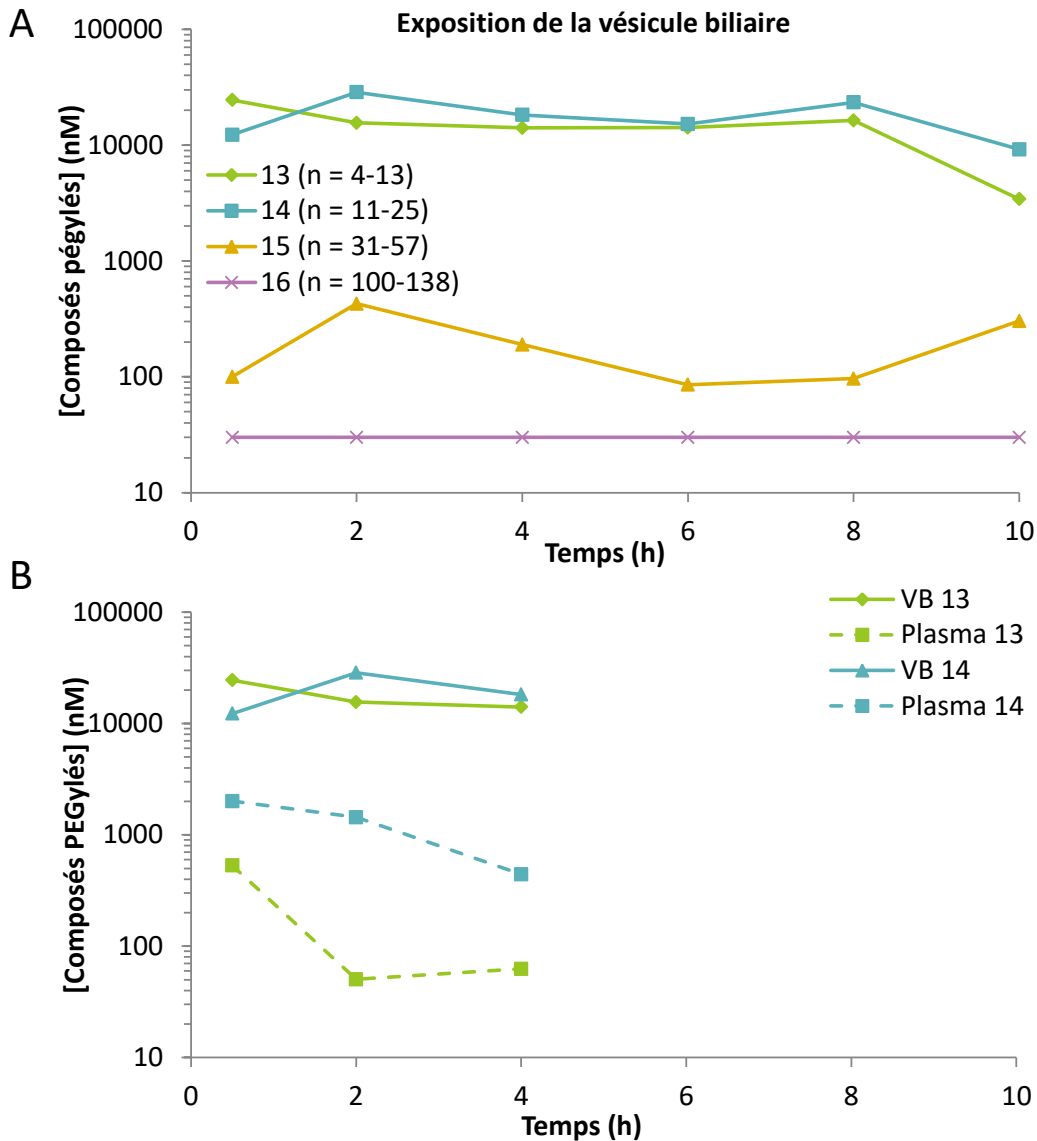


Figure 102 : (A) Exposition de la vésicule biliaire des composés PEGylés 13 à 16. (B) Exposition plasmatique et de la vésicule biliaire pour les composés 13 et 14. VB : Vésicule Biliaire.

Les vésicules biliaires, prélevées 4h après administration du composé, ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse, et les résultats montrent que le composé PEGylé le plus court (**13**) fait augmenter le volume de la vésicule biliaire d'un facteur de 2 par rapport au groupe véhicule. Les PEG intermédiaires (**14**, n = 11 – 25 et **15**, n = 31 – 57) ont un effet non significatif sur le

volume de la vésicule (facteur de 1,4), et le PEG le plus long (**16**, n = 100 – 138) n'a aucun effet (Figure 103).

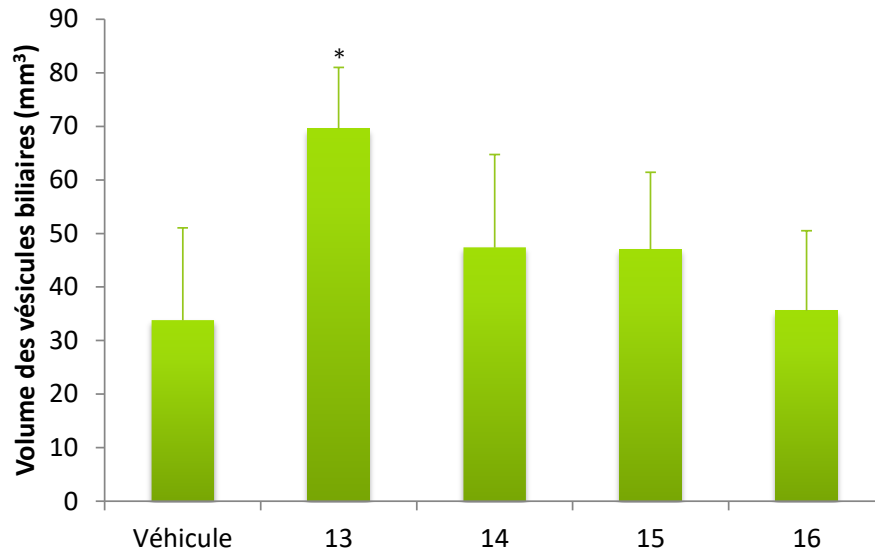


Figure 103 : Effet des composés PEGylés 13 à 16 sur le volume de la vésicule biliaire au temps t+4h. Moyennes +/- écart types.  
\* p < 0.05 (ANOVA – Test de Dunnet)

Les différentes sections de l'intestin ont également été prélevées, pour déterminer le temps de transit de nos composés, et donc avoir une fenêtre de lecture optimisée, permettant l'observation de la sécrétion de GLP-1 par les cellules L intestinales. Ainsi, les graphiques, présentés à la page suivante, représentent la concentration de composé retrouvé aux différents temps dans chaque section de l'intestin : duodénum, jéjunum, iléon et colon (Figure 104). On observe que le composé **13** est retrouvé en concentrations très faibles dans l'intestin par rapport aux autres composés PEGylés, probablement en raison de sa rapide absorption dans la partie proximale de l'intestin. On retrouve, en revanche, des concentrations très élevées pour les composés **14** à **16** dans la partie distale (iléon, colon), montrant que l'objectif d'obtention de composés, présentant une exposition élevée de l'intestin et une faible exposition plasmatique, est atteint pour les composés **15** et **16** en particulier.

Optimisation du kinétophore

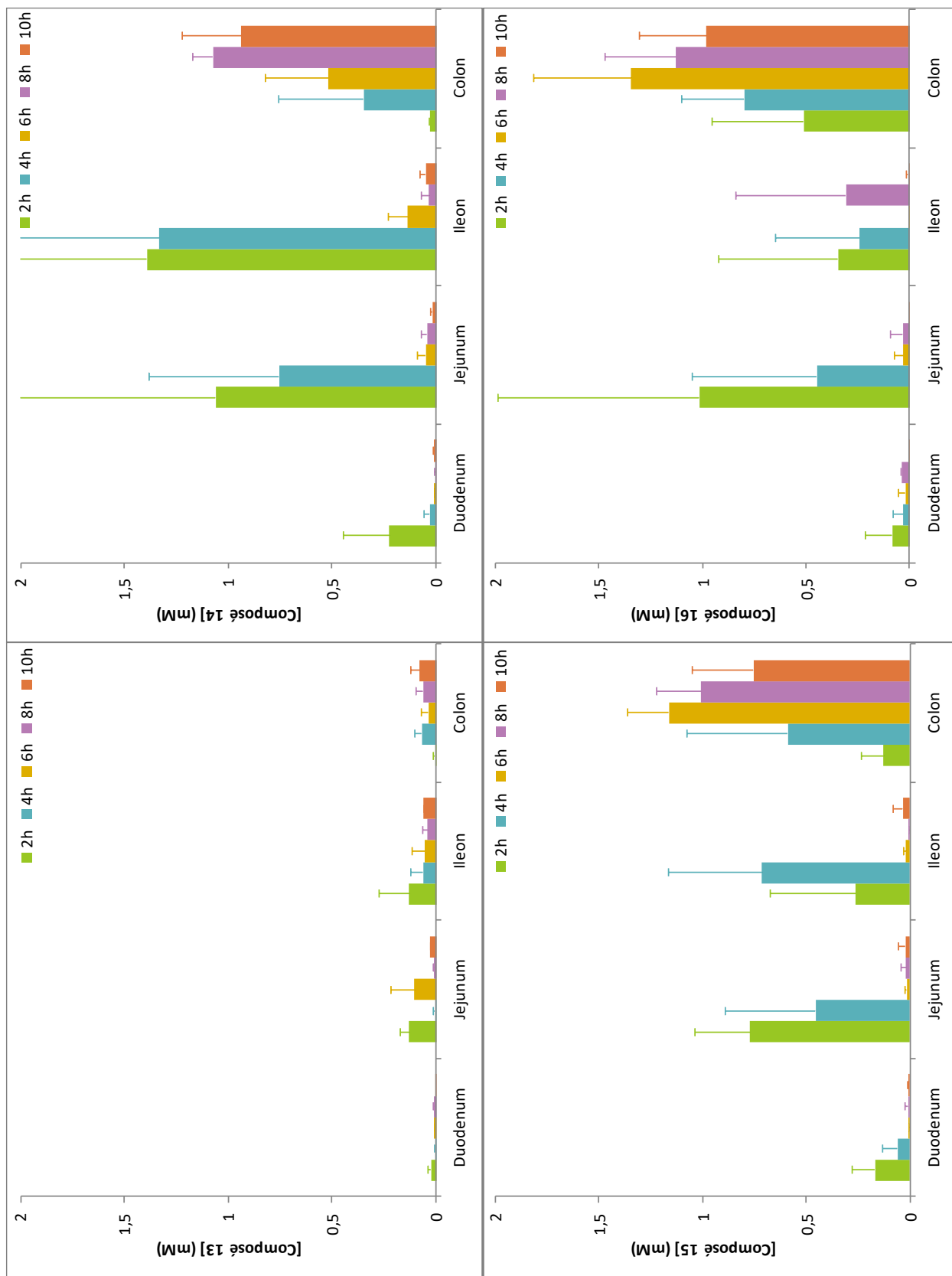


Figure 104 : Concentration des composés PEGylés (13 à 16) dans les différentes sections de l'intestin en fonction du temps

Une autre façon de représenter la quantité de produit retrouvé dans le colon est présentée en Figure 105. On remarque que pour les composés avec plus de 11 unités polyéthylènes glycol (composés **14** à **16**), une fraction importante de la dose administrée est retrouvée dans le colon, reflétant encore une fois, une faible absorption intestinale, en accord avec les résultats de perméabilité Caco-2 *in vitro*. Ce graphique montre que le composé **13** n'a quasiment pas atteint le colon, probablement en raison de sa rapide absorption dans la partie proximale de l'intestin. De plus, pour le composé **14**, la quantité maximale dans le colon est observée aux alentours de 8h après administration du composé. Le temps de transit semble être plus court pour les composés **15** et **16**, puisque le pic de la quantité maximale de composé dans le colon est observé 6h après l'administration des composés.

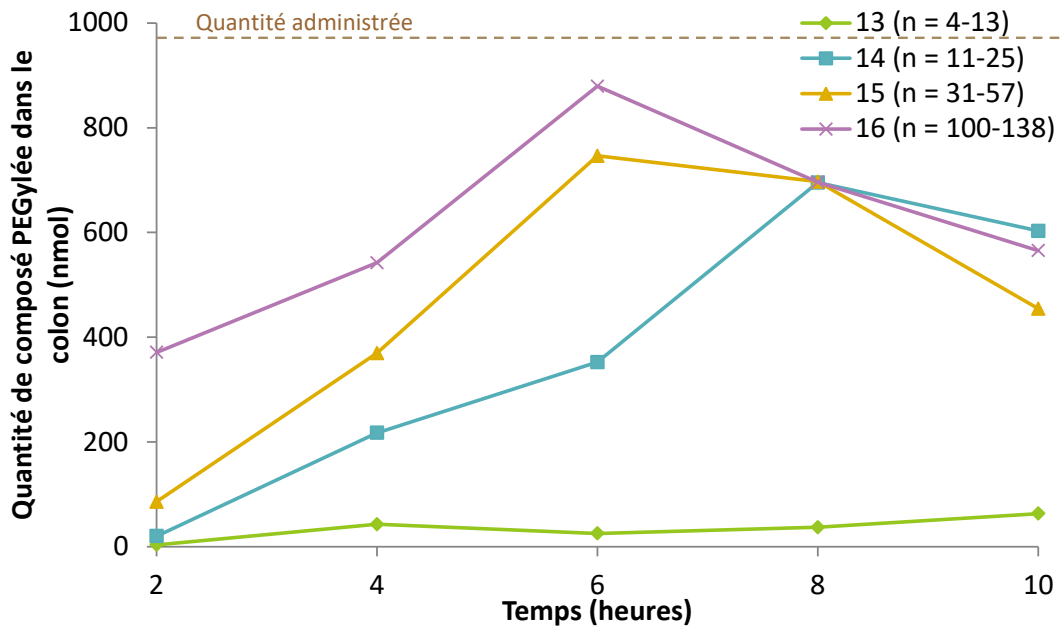


Figure 105 : Quantités de composés PEGylés retrouvées dans le colon

L'étude pharmacocinétique *in vivo* a permis de confirmer les résultats observés *in vitro* concernant la faible perméabilité des composés PEGylés, mais également la faible stabilité métabolique du composé **13**. L'étude du temps de transit dans l'intestin va nous permettre de définir, de façon plus précise, la fenêtre de lecture de l'effet GLP-1 sécrétagogue.

b. Composé **21** fonctionnalisé par un groupement sulfonate

Une expérience de pharmacocinétique *in vivo* a été réalisée sur le composé **21**, lors de la thèse de Mr Lasalle, afin d'évaluer l'exposition systémique du composé suite à l'administration d'une dose de 32  $\mu\text{mol/kg}$ . Lors de cette expérience, réalisée chez la souris (souche C57Bl6, mâles, 8-10 semaines) sur une durée de 8h, ont été prélevés, à différents temps, du sang, la vésicule biliaire, mais aussi les différentes sections de l'intestin, afin de définir la distribution du composé dans l'animal après administration par voie orale.

Le composé **21** présente une exposition plasmatique très faible en accord avec la totalité de la dose retrouvée dans les fèces après 24h (Tableau 20).

Composé	<b>21</b>
<b>[C]<sub>plasma max</sub> (nM)</b>	102
<b>T<sub>max plasma</sub> (min)</b>	45
<b>AUC (ng.min/mL)</b>	5774
<b>C<sub>max foie</sub> (nM)</b>	385
<b>C<sub>max vésicule biliaire (tissu et contenu) (nM)</sub></b>	10980
<b>Quantité excrétée dans les fèces (%)</b>	100

Tableau 20 : Paramètres pharmacocinétiques *in vivo* du composé **21**. n = 3 souris/groupe. Fèces collectés 24h après l'administration du composé.

Une augmentation de la concentration du composé dans la vésicule biliaire est observée durant les quatre premières heures après l'administration du composé (Figure 106). Malgré des concentrations faibles au niveau hépatique et plasmatique ( $C_{\text{max plasma}} = 102 \text{ nM}$  et  $C_{\text{max foie}} = 385 \text{ nM}$ ), une concentration élevée, et 100 fois supérieure à la concentration plasmatique, est retrouvée dans la vésicule biliaire (10  $\mu\text{M}$ ). Bien que n'ayant pas identifié de transporteurs responsables de l'efflux du composé **21**, une pompe d'efflux est probablement responsable de l'excrétion biliaire du composé.

Optimisation du kinétophore

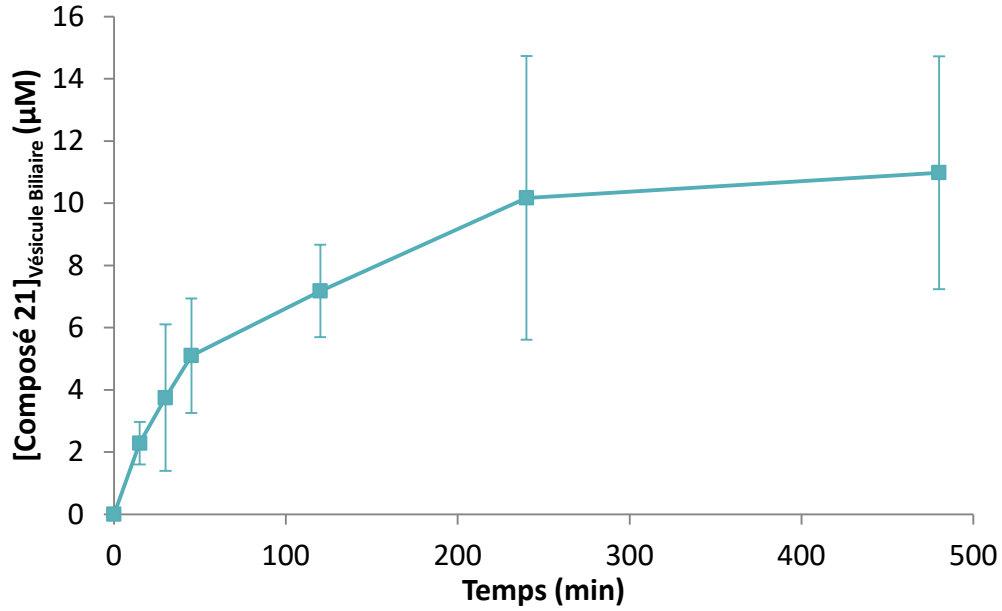


Figure 106 : Concentration en composé 21 en fonction du temps dans la vésicule biliaire lors de l'expérience de pharmacocinétique

De la même façon que pour les composés PEGylés, les différentes sections de l'intestin ont été prélevées, pour déterminer le temps de transit du composé, et donc avoir une fenêtre de lecture optimisée, pour permettre l'observation de la sécrétion de GLP-1 *in vivo*. Concernant l'exposition des différentes fractions de l'intestin, on observe qu'au temps t+2h, l'exposition de l'iléon et du côlon (parties exprimant le plus TGR5) est faible. A t+4h, le composé est majoritairement présent dans le jéjunum et l'iléon. Enfin, à t+8h, le composé est présent majoritairement dans l'iléon et dans le côlon (Figure 107).

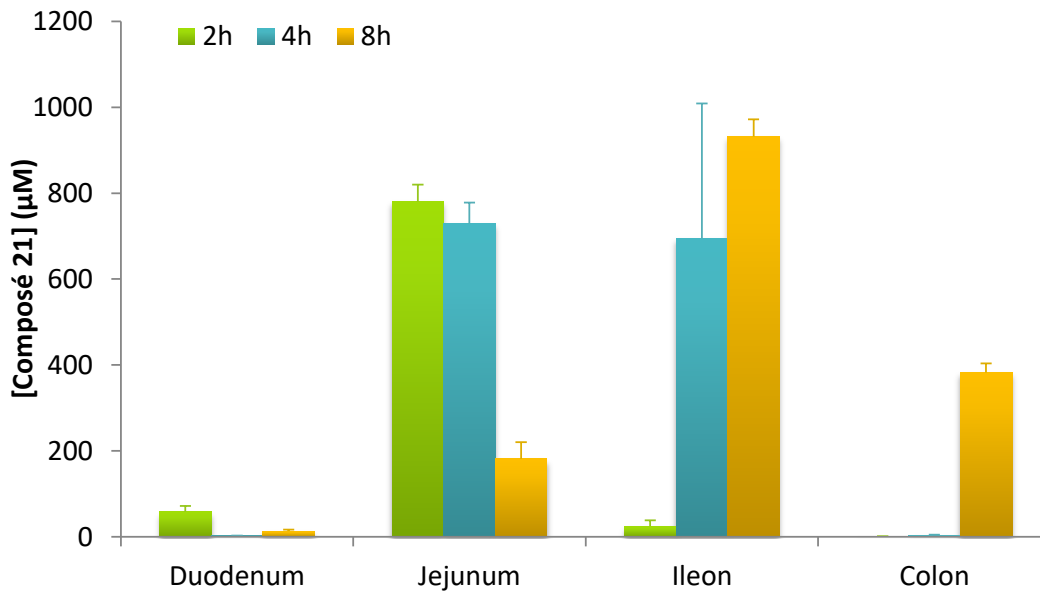


Figure 107 : Pharmacocinétique du composé 21 dans les différentes sections de l'intestin.



Tout d'abord, la solubilité et la lipophilie des composés ont été mesurées. Nous avons pu remarquer que la solubilité était corrélée avec la diminution de la lipophilie (logD). Les composés les plus solubles sont les composés chargés à pH physiologique (anioniques et cationiques), et les composés fonctionnalisés par une chaîne polyéthylène glycol.

La mesure de la perméabilité membranaire sur cellules Caco-2, reflet de la capacité de nos composés à traverser la barrière intestinale, nous a également donné des informations intéressantes vis-à-vis de l'influence des divers kinétophores utilisés. Les composés testés sont globalement peu absorbés, puisqu'ils possèdent tous de faibles perméabilités de A vers B. Les effets des différents kinétophores utilisés diffèrent au niveau de la perméabilité de B vers A. En effet, seuls certains composés présentant des efflux ratio très élevés semblent pris en charge par des pompes d'efflux.

L'influence sur la stabilité métabolique *in vitro* de différents types de kinétophores a également été évaluée, et a montré que certains kinétophores permettaient d'augmenter la stabilité microsomale dans notre série chimique. En effet, l'introduction d'ammonium ou de groupement PEG, conduisant à une diminution importante de la clairance microsomale *in vitro*, semble protéger le pharmacophore du métabolisme oxydatif. Au contraire, le groupement sulfonate n'influence pas la stabilité microsomale par rapport aux composés pharmacophores.

Enfin, deux types de composés chimériques ont été testés *in vivo* pour étudier l'influence du kinétophore sur l'exposition de divers organes, et notamment l'intestin, qui est l'organe ciblé dans ce projet. Les composés sulfonate et certains composés PEGylés, exposant très fortement la partie distale de l'intestin après une administration par voie orale, tout en ayant une exposition plasmatique limitée, présentent ainsi le profil de distribution recherché.

Nous allons maintenant nous intéresser à l'effet de certains des composés fonctionnalisés sur la sécrétion *in vivo* de GLP-1 et sur l'amélioration de la tolérance au glucose.



#### D. Etudes pharmacodynamiques *in vivo*

Afin d'effectuer la preuve de concept *in vivo* de l'intérêt d'utiliser ce type de composés pour le traitement du diabète de type 2, nous avons choisi quatre composés fonctionnalisés par différents kinétophores. La sélection a été faite sur la base de leurs paramètres ADME, puisque tous les composés synthétisés sont très puissants sur le récepteur TGR5 *in vitro*.

L'introduction des différents kinétophores a conduit à l'obtention de composés, présentant des paramètres ADME en accord avec notre cahier des charges. En effet, les composés sélectionnés fonctionnalisés par des PEG, des fonctions acides ou des polyols possèdent une faible perméabilité membranaire, et une stabilité microsomale faible, leur conférant un profil de composés topiques intestinaux.

Ainsi, les composés, qui ont été retenus, pour des études pharmacodynamiques *in vivo*, sont les suivants :

- le composé polyol **32**, qui possède une faible perméabilité membranaire avec un fort efflux actif et une stabilité microsomale moyenne *in vitro*,
- les composés PEGylés **14** et **15**, puisque les résultats obtenus lors de l'expérience de pharmacocinétique *in vivo* nous ont permis de montrer une forte exposition intestinale, après administration par voie orale, et de trouver une potentielle fenêtre de lecture de l'effet GLP-1 sécrétagogue, sans pour autant exposer la circulation systémique,
- le composé sulfonate **21** qui présente le meilleur profil ADME parmi tous les composés testés. En effet, il est très peu perméable et présente un très fort efflux actif qui lui permettrait de pouvoir aller activer TGR5 sur la face basolatérale de la cellule L, sans exposer d'autres organes *via* la circulation systémique. Sa faible stabilité microsomale contribuerait également à sa faible exposition systémique.

Je vais donc, à présent, présenter les expériences *in vivo*, réalisées par nos collaborateurs de l'U1011, ainsi que les résultats obtenus, pour ces différents composés.



ammonium quaternaire. La dose de 32  $\mu\text{mol/kg}$  correspond à une dose 20 mg/kg pour ce composé (PM = 627 g/mol). Cette dernière est généralement utilisée dans la littérature pour l'étude de l'effet GLP-1 sécrétagogue d'agonistes de TGR5<sup>65, 69</sup>.

Les résultats de cette expérience montrent que le composé **32** n'a pas induit de sécrétion de GLP-1, 8h après son administration. De plus, le composé n'induit pas d'augmentation du volume de la vésicule biliaire, et la renutrition des souris a montré une conservation de la motilité de cette dernière (Figure 111).

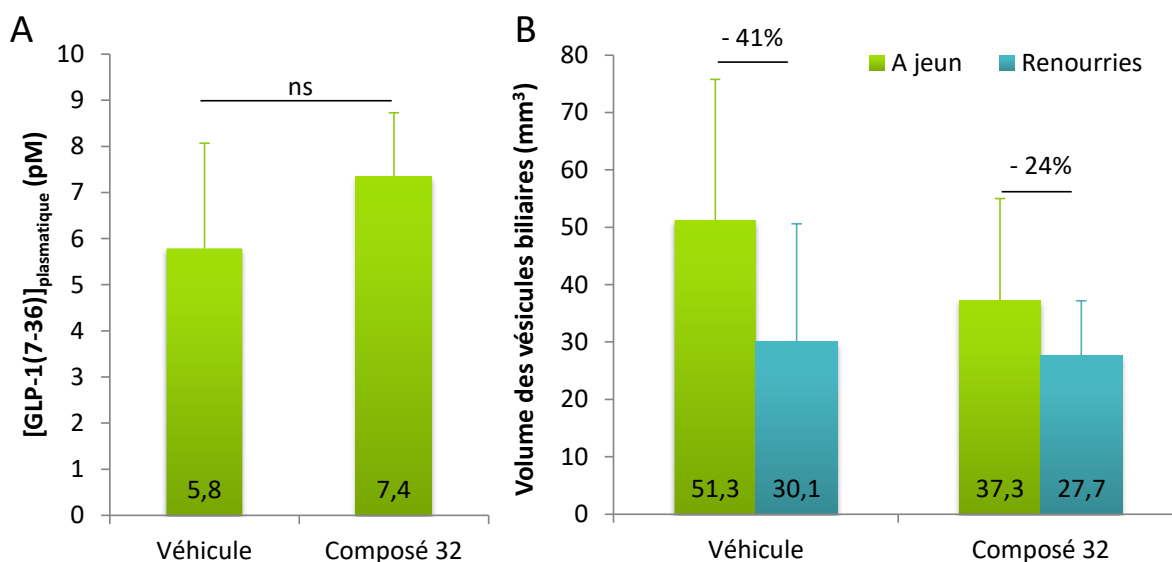


Figure 111 : (A) Effet du composé 32 sur la sécrétion de GLP-1 selon le protocole *in vivo* 1 (décrit Figure 110) à une dose de 32  $\mu\text{mol/kg}$ . Moyennes +/- écart-type (n = 8 souris/groupe). ns : non significatif (test Mann-Whitney) ; (B) Effet du composé 32 sur le volume de la vésicule biliaire selon le protocole *in vivo* 1. Moyennes +/- écart-type (n = 4 souris/groupe).

Comme montré précédemment avec l'étude pharmacocinétique *in vivo* des composés PEGylés **13** à **16**, et du composé sulfonate **21**, le choix de la fenêtre de lecture est important pour observer l'effet GLP-1 sécrétagogue. En l'absence d'information sur l'exposition intestinale du composé **32** en fonction du temps, une seconde expérience dans laquelle le composé a été administré 3 fois à t-6h, t-4h, et t-2h avant le prélèvement rétro-orbital a été réalisée, selon le protocole *in vivo* 2 (Figure 112A). Dans ces conditions, le composé **32** a induit une faible augmentation, non significative, de la sécrétion de GLP-1 d'un facteur 1,7 (Figure 112B).

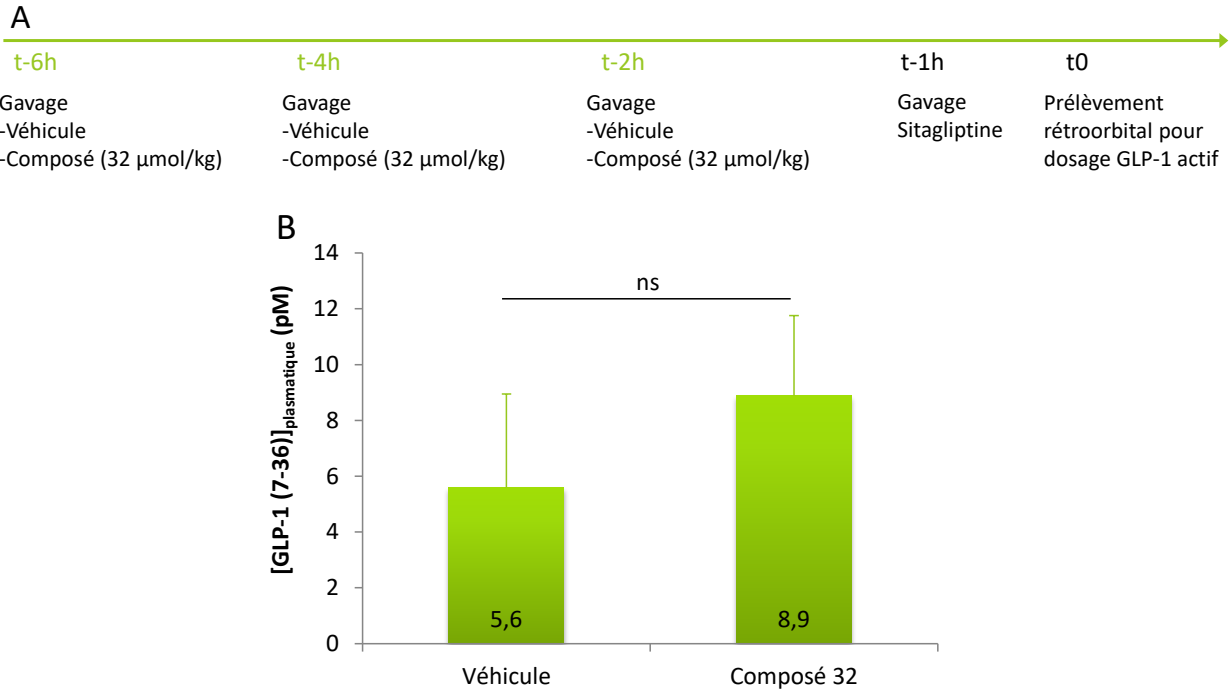


Figure 112 : (A) Protocole *in vivo* 2 : Etude de l'effet GLP-1 sécrétagogue du composé 32 avec 3 administrations successives à t-6h, t-4h et t-2h ; (B) Effet du composé 32 sur la sécrétion de GLP-1 selon le protocole *in vivo* 2 à une dose de 32 µmol/kg. Moyennes +/- écart-types (n = 8 souris/groupe). (test de Mann-Whitney)

Ces résultats semblent confirmer les résultats publiés concernant l'activation de TGR5 du côté basolatéral des cellules entéroendocrines L intestinales, pour provoquer une forte sécrétion de GLP-1<sup>85</sup>. Le composé **32**, bien que peu absorbé et fortement efflué, n'est peut-être pas suffisamment perméable, pour activer TGR5 sur la face basolatérale des cellules entéroendocrines L intestinales.

## 2. Etude pharmacodynamique *in vivo* des composés PEGylés

Concernant les composés PEGylés, nous nous sommes intéressés aux composés **14** (n = 11 – 25) et **15** (n = 31 – 57) (Figure 113). La trop faible exposition colonique et la faible exposition plasmatique du composé PEGylé **13** ne semblent pas en faveur d'une activation du récepteur, dans le colon (soit par voie topique intestinale ou *via* la circulation systémique). Le composé **16**, à priori moins perméable que les composés **14** et **15**, n'a pas non plus été retenu pour ces études *in vivo* en raison de sa plus faible activité *in vitro*.

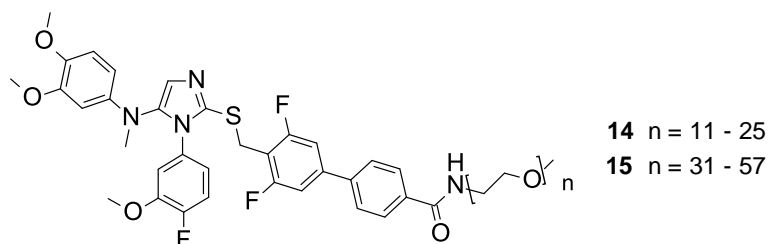


Figure 113 : Structures des composés 14 et 15

### a. Composé 15

Au regard de l'expérience de pharmacocinétique, qui nous a permis d'identifier la fenêtre de lecture potentielle pour l'étude de l'effet GLP-1 sécrétagogue, le composé **15** a une concentration maximale dans le colon à t+6h après administration, par voie orale, du composé. Ainsi, le composé **15** a été engagé dans un test de sécrétion de GLP-1, chez des souris C57Bl6, à une dose de 32  $\mu\text{mol/kg}$ , avec une administration 6h avant le prélèvement sanguin, selon le protocole *in vivo* 3 (Figure 114).



Figure 114 : Protocole *in vivo* 3 : Etude de l'effet sécrétagogue GLP-1 du composé 15 à une dose de 32  $\mu\text{mol/kg}$  avec un temps d'exposition de 6h du composé avant la mesure de GLP-1

Malgré des concentrations élevées ( $\approx 1 \text{ mM}$  soit 40 000 fois l' $\text{EC}_{50}$ ) de composé dans le colon à t+6h (mesurées dans l'expérience de pharmacocinétique), le composé n'a pas permis d'observer un effet GLP-1 sécrétagogue par rapport au groupe véhicule.

Il a ensuite été testé dans une expérience, selon le protocole *in vivo* 4, mais avec des temps d'exposition plus longs (t+8h et t+10h) (Figure 115A). Le composé **15** étant encore fortement présent dans le colon à ces deux temps (plus de 50% de la dose administrée – Figure 105), il nous a paru intéressant d'étudier l'effet GLP-1 sécrétagogue après un temps d'exposition plus long. Ainsi, le composé **15** a été testé à ces deux temps. Les résultats sont présentés, dans la Figure 115B ci-dessous, avec les résultats du temps t+6h. Nous avons observé une augmentation de la sécrétion de GLP-1 d'un facteur 2,2 au temps t+8h, mais pas de stimulation significativement différente du groupe contrôle au temps t+10h.

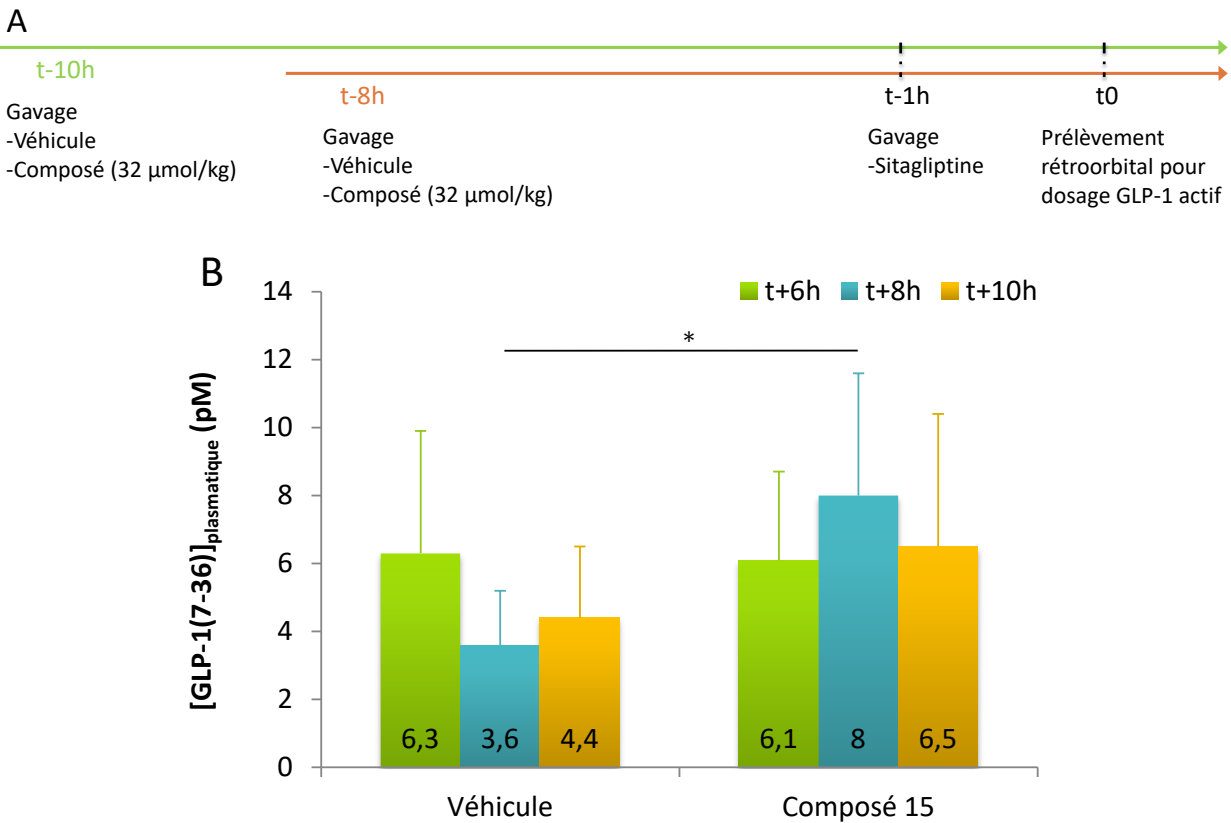


Figure 115 : (A) Protocole *in vivo* 4 : Etude de l'effet sécrétagogue GLP-1 du composé **15** à une dose de 32  $\mu\text{mol/kg}$  avec un temps d'exposition de 8 ou 10h du composé avant la mesure de GLP-1 ; (B) Effet du composé **15** sur la sécrétion de GLP-1 au cours du protocole *in vivo* 3 et 4 aux temps t+6h, t+8h, et t+10h à une dose de 32  $\mu\text{mol/kg}$ . Moyennes +/- écart types (n = 6 souris/groupe). \* :  $p \leq 0.1$  (ANOVA – Test de Dunnet)

Ainsi, malgré l'étude de la sécrétion de GLP-1 à différents temps et une exposition intestinale élevée, nous n'avons pas pu montrer d'effet *in vivo* GLP-1 sécrétagogue important pour ce composé. Le composé **14** a donc été envisagé, pour étudier sa capacité à faire sécréter le GLP-1, au vu de sa perméabilité membranaire légèrement plus élevée.

b. Composé 14

Le composé **14** est moyennement perméable ( $2.10^{-6} \text{ cm/s} < P_{\text{app A}\rightarrow\text{B}} < 20.10^{-6} \text{ cm/s}$ ), et pourrait aller activer le récepteur TGR5 du côté basolatéral des cellules L. Il a donc été testé, dans le même protocole *in vivo* 4 (Figure 115A) que le composé **15**, à t+8h après administration du composé, à une dose de  $32 \mu\text{mol/kg}$ , chez des souris C57Bl6. Ce composé n'a pas induit la sécrétion de GLP-1 *in vivo*, au temps où sa concentration est pourtant maximale dans le colon (Figure 116).

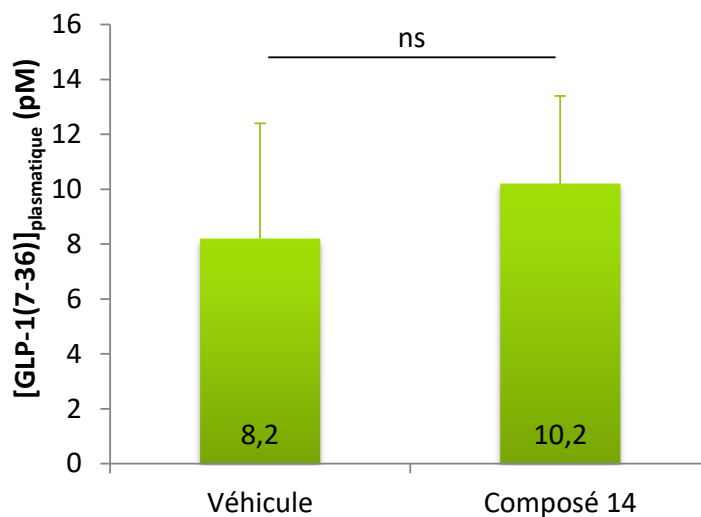


Figure 116 : Effet du composé 14 sur la sécrétion de GLP-1 au cours du protocole *in vivo* 4 au temps t+8h (décrit Figure 115A) à une dose de  $32 \mu\text{mol/kg}$ . Moyennes +/- écart types (n = 8 souris/groupe). ns : non significatif.

Toutes ces données pourraient confirmer les résultats publiés, concernant l'activation de TGR5 du côté basolatéral des cellules entéroendocrines L, pour provoquer la sécrétion de GLP-1<sup>85</sup>. Un trop faible passage transépithélial ou une puissance insuffisante des composés PEGylés **14** et **15**, semblent être un frein pour l'obtention de composés fortement GLP-1 sécrétagogues *in vivo*. Cependant, l'étude de ces composés nous a permis de générer de nombreuses informations sur l'influence de l'introduction de chaîne PEG de faibles longueurs ( $M_n < 5000 \text{ g/mol}$ ) sur les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques *in vitro* et *in vivo*, et fait actuellement l'objet de la rédaction d'un article.

### 3. Etude pharmacodynamique *in vivo* du composé sulfonate **21**

Le composé **21** est un des composés les plus actifs sur le récepteur TGR5 murin ( $EC_{50} = 0,4 \text{ nM}$ ), parmi tous les composés fonctionnalisés par un kinétophore (Figure 117).

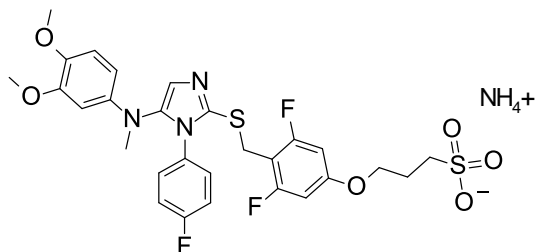


Figure 117 : Structure du composé **21**

#### a. Résultats préliminaires obtenus par le Docteur Lasalle

Au regard de son profil pharmacocinétique *in vitro* et *in vivo*, le composé **21** présente les caractéristiques d'un composé topique intestinal. Des études *in vivo* de sécrétion de GLP-1 avaient été réalisées lors de la thèse du Docteur Lasalle. Ce composé induit une augmentation de la sécrétion de GLP-1, de façon temps-dépendante après une administration par voie orale. En effet, après administration du composé selon le protocole *in vivo* 5 (Figure 118A), une augmentation de la sécrétion de GLP-1, d'un facteur 3,6 par rapport au groupe contrôle, est observée à t+4h. Une augmentation d'un facteur 10 de la sécrétion de GLP-1, à t+7h, est mesurée (Figure 118B)<sup>106</sup>.



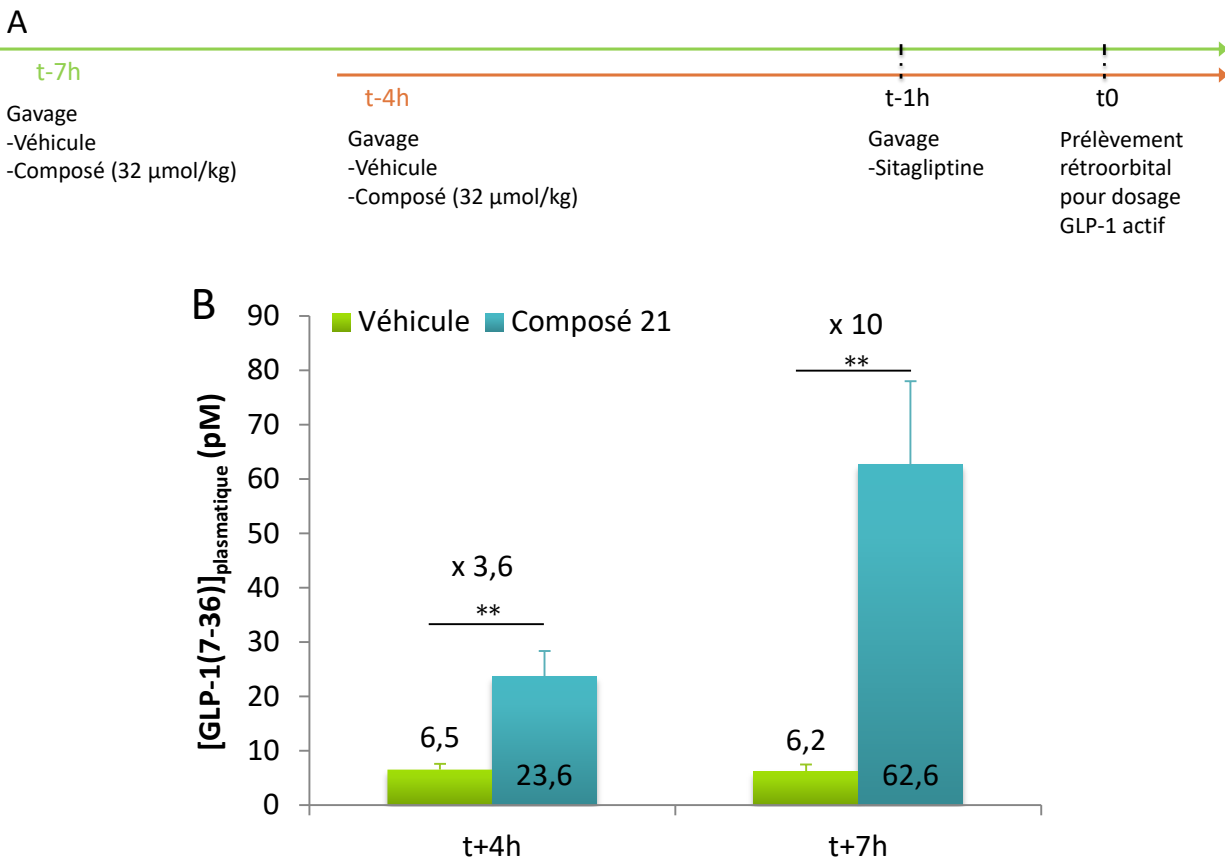


Figure 118 : (A) Protocole *in vivo* 5 : Etude de l'effet sécrétagogue GLP-1 du composé 21 à une dose de 32 µmol/kg avec un temps d'exposition de 4 et 7h du composé avant la mesure de GLP-1 ; (B) Effet temps dépendant de la sécrétion de GLP-1 du composé 21 à une dose de 32µmol/kg chez des souris C57Bl6 selon le protocole *in vivo* 5. Moyennes +/- erreur-type (n = 6 souris/groupe). \*\* : p < 0.01 (Test de Student)

Une étude *in vivo* de sécrétion de GLP-1 a ensuite été envisagée, pour étudier si le composé induit une augmentation de la sécrétion de GLP-1, de façon dose dépendante. Pour cela, le composé a été administré, à différentes doses (1.6, 8, et 32 µmol/kg), 8h avant le prélèvement sanguin, selon le protocole *in vivo* 6 (Figure 119A). On observe une stimulation de la sécrétion de GLP-1 avec des facteurs de 2, 6 et 10, pour les doses de 1.6, 8 et 32 µmol/kg respectivement (Figure 119B).

A



B

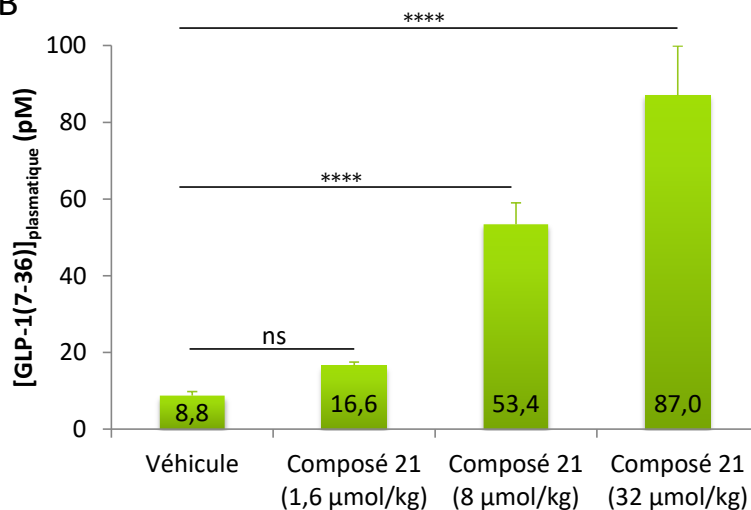


Figure 119 : (A) Protocole *in vivo* 6 : Etude de l'effet sécrétagogue GLP-1 du composé 21 à une dose de 32 µmol/kg avec un temps d'exposition de 8h du composé avant la mesure de GLP-1 ; (B) Effet du composé 21 sur la sécrétion de GLP-1 chez des souris C57Bl6 à 3 doses (1.6, 8, et 32 µmol/kg) selon le protocole *in vivo* 6. Moyennes +/- écart-type (n = 6 souris/groupe). ns : non significatif, \*\*\*\* : p ≤ 0.0001 (ANOVA – test de Dunnet)

L'effet sur le volume de la vésicule biliaire a également été évalué au cours de cette expérience. Après une administration par voie orale de doses croissantes du composé **21**, il a été montré que le composé n'avait un effet significatif sur le volume de la vésicule biliaire qu'à la plus forte dose (facteur 1,6) (Figure 120).

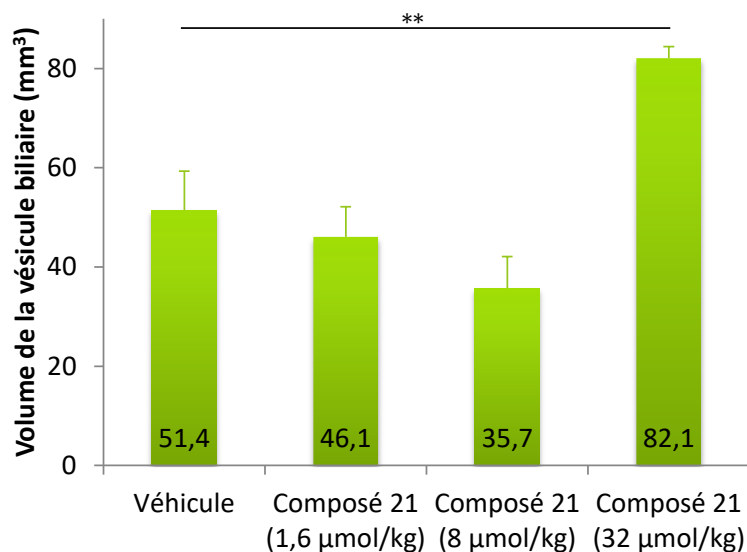


Figure 120 : Effet du composé 21 sur le volume de la vésicule biliaire chez des souris C57Bl6 à 3 doses (1.6, 8, et 32 µmol/kg). Moyennes +/- écart-type (n = 6 souris/groupe). \*\*: p ≤ 0.01 (ANOVA – test de Dunnet)

A la dose de 8 µmol/kg, un effet GLP-1 sécrétagogue est observé, sans effet sur le volume de la vésicule biliaire. Cela suggère que dans ces conditions l'exposition de la vésicule biliaire n'est pas suffisante pour déclencher une réponse pharmacologique dans cet organe. L'effet GLP-1 sécrétagogue peut donc être dissocié de l'effet sur la vésicule biliaire.

La motilité de la vésicule biliaire a ensuite été étudiée, pour évaluer si le composé ne perturbe pas la contraction de cette dernière après une prise alimentaire. Pour cela, la mesure des vésicules biliaires a été faite, après une administration du composé **21** à la plus forte dose (32 µmol/kg), chez des souris C57Bl6 à jeun pendant 6h pour le premier groupe, et à jeun pendant 4h puis renourries pendant 2h pour le second groupe (protocole *in vivo* 7 - Figure 121A). Dans cette expérience, le volume de la vésicule biliaire n'est pas augmenté de façon significative, que ce soit dans le groupe non renourri et renourri (Figure 121B). De plus, le composé **21** n'impacte pas la vidange de la vésicule biliaire, puisque les fractions d'éjections sont respectivement de 30 et 25% pour le groupe véhicule versus groupe composé.

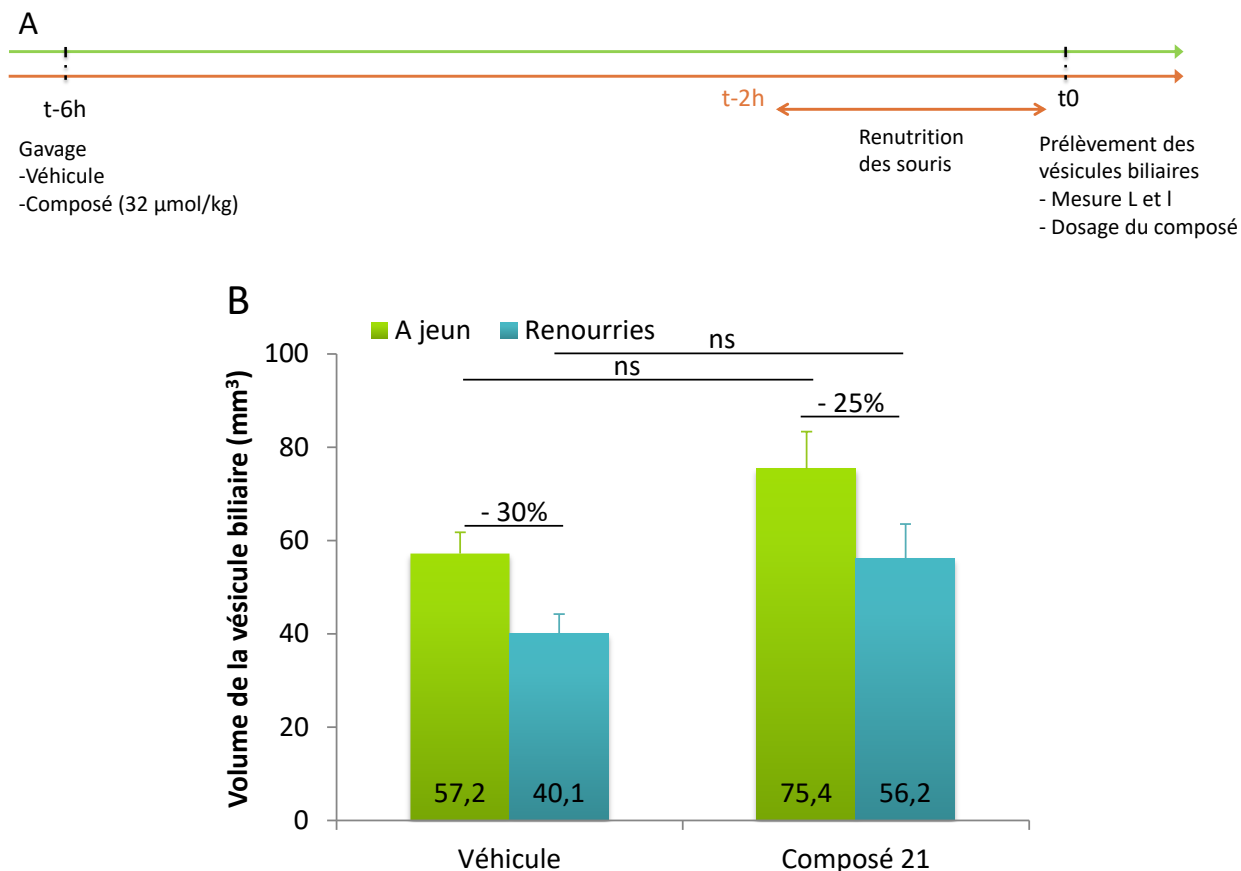


Figure 121 : (A) Protocole *in vivo* 7 : Etude de l'effet du composé 21 à une dose de 32 μmol/kg sur le volume des vésicules biliaires avec un temps d'exposition de 6h du composé avant le prélèvement des vésicules et avec renutrition ou non des souris pendant 2h. (B) Effet du composé 21 sur le volume de la vésicule biliaire selon le protocole *in vivo* 7. Moyennes +/- erreur-type (n = 5 souris/groupe). ns : non significatif (ANOVA – Test de Tukey)

Suite à ces résultats, nous pouvons définir une fenêtre thérapeutique de 4, entre la plus faible dose (8 μmol/kg) et la plus forte dose (32 μmol/kg), où le composé a un effet GLP-1 sécrétagogue, sans avoir d'effet significatif sur le volume de la vésicule biliaire.

Afin de poursuivre les études pharmacodynamiques *in vivo* de ce composé, il m'a fallu resynthétiser ce composé en plus grande quantité. Je vais donc présenter les optimisations effectuées, pour cette synthèse à plus grande échelle.

b. Resynthèse à plus grande échelle du composé 21 pour des études chez l'animal

Dans le but de poursuivre les études pharmacodynamiques *in vivo* de ce composé, j'ai réalisé la resynthèse du composé 21. Lors du changement d'échelle de synthèse (de la centaine de milligrammes à la dizaine de grammes), la difficulté a résidé dans la dernière étape de synthèse, et dans l'étape de purification du produit final. En effet, les six premières étapes de synthèses se sont très bien déroulées, avec un rendement global de 38%, avant ajout du groupement sulfonate (Figure 122).

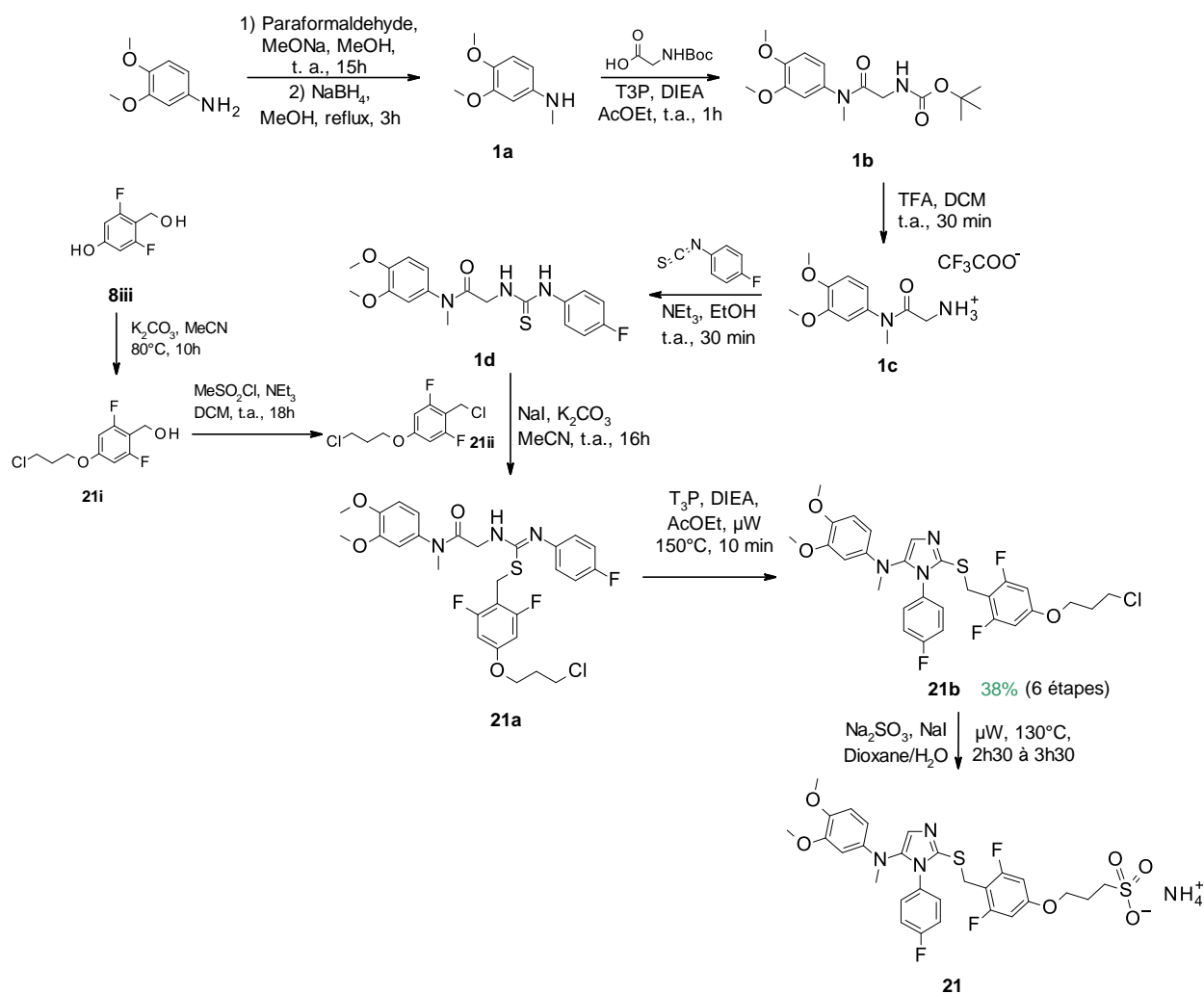


Figure 122 : Schéma de synthèse à plus grande échelle du composé 21

Dans le Tableau 21 ci-dessous sont reportées les quantités obtenues dans chaque étape, ainsi que les rendements associés. Du point de vue du rendement global, la première resynthèse a conduit à un rendement global de 15,5%, et la seconde à un rendement global de 36,7%. La différence a résidé dans plusieurs paramètres : la seconde fois, la synthèse a été initiée à partir de la N-méthyl-3,4-diméthoxyaniline **1a** commerciale, et la thiourée a été obtenue après précipitation dans l'éthanol, par rapport à la première fois, où elle avait été purifiée, par chromatographie flash, faute d'avoir pu la faire précipiter.

Composé	Resynthèse 1		Resynthèse 2	
	Quantité obtenue (g)	Rendement	Quantité obtenue (g)	Rendement
<b>1a</b>	10,8	100%	Produit commercial	
<b>1b</b>	21,3	100%	19,4	100%
<b>1c</b>	11,8	100%	20,2	100%
<b>1d</b>	6,3	71%	11,0	96%
<b>21i</b>	6,1	82%	8,8	93%
<b>21ii</b>	6,4	98%	9,4	98%
<b>21a</b>	11,3	73%	17,0	98%
<b>21b</b>	8,2	75%	12,4	75%
<b>21</b>	3,6	40%	7,2	52%

Tableau 21 : Quantités utilisées et rendements obtenus pour la resynthèse du composé 21

Enfin, la dernière étape de synthèse a été optimisée lors de la première resynthèse, en ajustant les quantités de réactifs, et en optimisant l'étape de purification (Tableau 22)<sup>132</sup>. En effet, une étape de précipitation, dans un mélange dichlorométhane/cyclohexane (essai 3, 4 et 5), a permis d'éliminer une grande partie des sels de la réaction. La purification par HPLC préparative (pH 3,8 – formiate d'ammonium) a donné de meilleurs résultats que la purification par chromatographie en phase inverse sur colonne C<sub>18</sub>.

Ainsi, la synthèse du sulfonate **21** a été réalisée à partir de 8,23 g d'intermédiaire chloré **21b**, et a permis d'obtenir 3,55 g du composé désiré, avec un rendement de 40 %, ainsi que 8% de l'intermédiaire chloré **21b** de départ, et lors de la seconde resynthèse (essai 5), 52 % du produit désiré (7,16 g), et 8 % de l'intermédiaire de départ ont été obtenus.

Optimisation du kinétophore

Essai	1	2	3	4	5
<b>21b</b>	1,87 mmol 1,1 g	5,09 mmol 2,94 g	0,57 mmol 330 mg	14,24 mmol 8,23 g	21,52 mmol 12,44 g
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub></b>	5 éq.	10 éq.	5 éq.	3 éq.	3 éq.
<b>NaI</b>	1 éq.	1 éq.	0,2 éq.	0,2 éq.	0,2 éq.
<b>Réaction <math>\mu</math>W</b>	130°C – 1h	130°C – 2h	140°C – 2h	130°C – 2h30	130°C – 2h30
<b>Purification</b>	HPLC Préparative pH 3,8	Chromatographie en phase inverse et HPLC Préparative pH 3,8	Filtration des sels – HPLC Préparative pH 3,8	Filtration des sels – HPLC Préparative pH 3,8	Filtration des sels – HPLC Préparative pH 3,8
<b>Rendement (21)</b>	20% (240 mg)	9% (300 mg)	30% (100 mg)	40% (3,55 g)	52 % (7,16 g)

Tableau 22 : Optimisation l'étape d'introduction du groupement sulfonate lors de la synthèse du composé 21

Grâce à ces quantités obtenues, des expériences *in vivo* aiguës et chroniques dans un modèle murin de diabète de type 2 pourront être réalisées.

c. Etudes pharmacodynamiques dans un modèle murin de diabète de type 2

Afin d'observer si l'effet GLP-1 sécrétagogue, observé chez des souris C57Bl6, est conservé dans un modèle pathologique de diabète, le composé a été administré en aigu, à des souris DIO (Diet Induced Obesity). Les souris DIO sont des souris rendues obèses et insulino-résistantes, par un régime hyper-lipidique (HFD – High Fat Diet), pendant 10 semaines. Au cours de cette expérience (protocole *in vivo* 6 (présenté en Figure 119A)), une augmentation de la sécrétion de GLP-1 d'un facteur 4,3 par rapport au groupe contrôle a été observée, 8h après le gavage (Figure 123). L'effet GLP-1 sécrétagogue est donc maintenu dans un modèle pathologique de diabète de type 2.

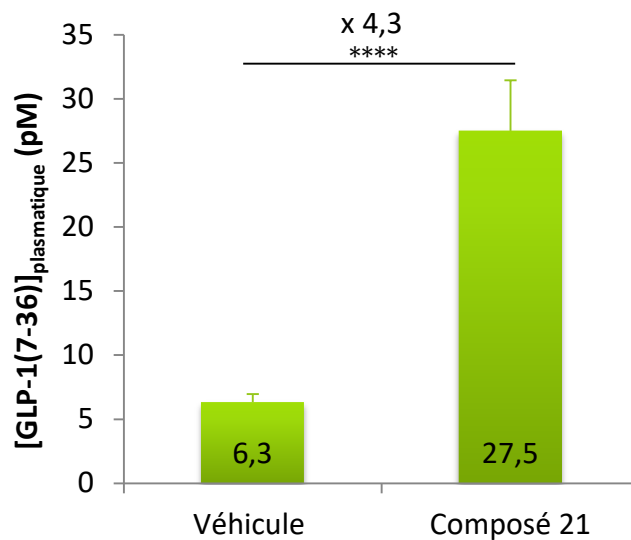


Figure 123 : Effet du composé 21 sur la sécrétion de GLP-1 chez des souris DIO à la dose de 32  $\mu\text{mol/kg}$  selon le protocole *in vivo* 6 (décrit Figure 119A). Moyennes +/- erreur-type (n = 10 souris/groupe). \*\*\*\* : p < 0,0001 (Test de Mann-Whitney)

Cette expérience de sécrétion de GLP-1 a été répétée, en administrant de l'omarigliptine, présentant une demi-vie beaucoup plus longue que la sitagliptine, en même temps que l'administration du composé **21**, selon le protocole *in vivo* 8 présenté en Figure 124.

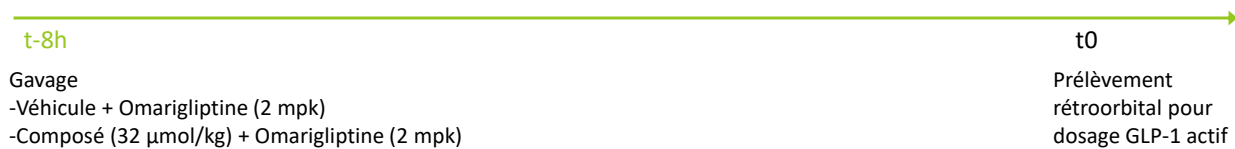


Figure 124 : Protocole *in vivo* 8 : Etude de l'effet du composé 21 à une dose de 32  $\mu\text{mol/kg}$  sur la sécrétion de GLP-1 et sur le volume des vésicules biliaires chez des souris DIO en présence d'omarigliptine (2 mpk)



Lors de cette expérience, chez des souris DIO, nous observons une augmentation de la sécrétion de GLP-1 d'un facteur 5,6 par rapport au groupe véhicule (Figure 125).

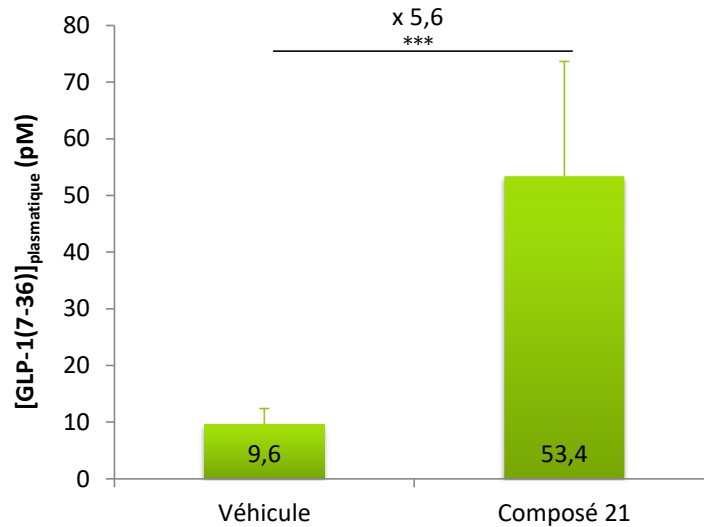


Figure 125 : Effet du composé 21 sur la sécrétion de GLP-1 chez des souris DIO à la dose de 32  $\mu\text{mol/kg}$  en présence d'Omarigliptine (2 mpk) selon le protocole *in vivo* 8 (décrit Figure 124). Moyennes +/- écart-types (n = 7 souris/groupe).  
\*\*\*: p < 0,001 (Test de Mann-Whitney)

Le composé **21** est donc un puissant GLP-1 sécrétagogue *in vivo*. Afin d'évaluer l'effet de cette augmentation de GLP-1 sur la tolérance au glucose, un test de tolérance au glucose par voie orale (Oral Glucose Tolerance Test - OGTT) en aigu a été réalisé, chez ces souris DIO. L'expérience a été réalisée, selon le protocole *in vivo* 9 (Figure 126A), et a montré une diminution significative du glucose sanguin, après administration d'une dose de 4 g/kg de glucose ( $\text{AUC}_{\text{glucose}}$  - 36% pour le groupe traité par rapport au groupe véhicule) (Figure 126B, C).

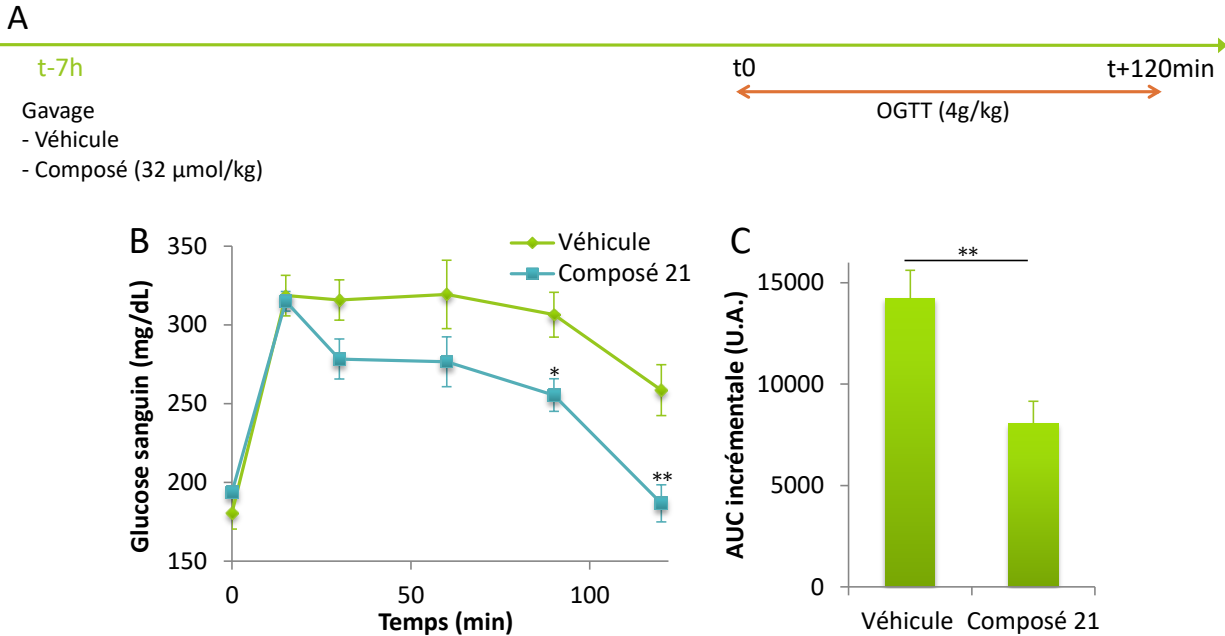


Figure 126 : (A) Protocole *in vivo* 9 : effet du composé 21 en aigu dans un test de tolérance au glucose à la dose de 32  $\mu\text{mol/kg}$  chez des souris DIO ; (B) Courbe du glucose sanguin lors du test OGTT en fonction du temps pour les 2 groupes selon le protocole *in vivo* 9. Moyennes +/- SEM (n = 8 souris/groupe). \* : p < 0.1, \*\* : p < 0.01 (ANOVA – test de Dunnet) ; (C) Histogramme de l’AUC (Unité Arbitraire). Moyennes +/- erreur-type (n = 8 souris/groupe). \*\* : p < 0.01 (Test de Student)

Le composé **21** induit donc une augmentation importante de la sécrétion de GLP-1 de façon temps-dépendant et dose-dépendante chez des souris C57Bl6. Dans un modèle pathologique de diabète de type 2 (souris DIO), le composé induit également une sécrétion de GLP-1, qui se traduit par une amélioration de la tolérance au glucose, lors d’une expérience en aigu (OGTT).

Ces résultats étant très intéressants, une étude pharmacodynamique *in vivo* chronique est actuellement envisagée. Lors de ce traitement chronique, le poids corporel, la prise alimentaire, la glycémie et l’insulinémie seront suivis afin d’étudier l’effet du composé **21** sur l’homéostasie glucidique et énergétique, lors d’un traitement chronique, dans un modèle pathologique murin de diabète de type 2.

#### 4. Conclusion sur les études pharmacodynamiques *in vivo*

Les expériences réalisées *in vivo* montrent que les composés sélectionnés, à puissance équivalente *in vitro* sur le récepteur, n'ont pas le même effet sur la sécrétion de GLP-1. En effet, le composé polyol **32** ainsi que les composés PEGylés **14** et **15**, probablement trop peu perméables, ne déclenchent pas ou peu de sécrétion de GLP-1 *in vivo*, et ne semblent pas être de bons candidats pour effectuer la preuve de concept *in vivo* de l'intérêt d'utiliser ce type de composés, pour le traitement du diabète de type 2.

Le composé **21** est, quant à lui, très puissant, très soluble, et très peu absorbé. Il induit une forte sécrétion de GLP-1 chez des souris normales au temps où il est majoritairement présent dans la partie distale de l'intestin. L'effet GLP-1 sécrétagogue a également été observé dans un modèle pathologique murin de diabète de type 2 et s'est traduit par une amélioration de la tolérance au glucose chez ces souris obèses et insulino-résistantes, lors d'une expérience de tolérance au glucose par voie orale (OGTT) en aigu. Ce composé nous permet donc de valider l'hypothèse, selon laquelle un agoniste topique intestinal de TGR5 peut avoir un effet sur la tolérance au glucose, dans un modèle murin pathologique de diabète de type 2.



## Conclusions et perspectives

L'objectif de cette thèse était de répondre à la problématique suivante : un agoniste topique intestinal du récepteur TGR5 peut-il avoir un effet sur l'homéostasie du glucose, sans déclencher les effets secondaires connus des agonistes systémiques de TGR5 ?

Une étude de la littérature nous a permis d'élaborer une stratégie pour l'obtention d'agonistes de TGR5, GLP-1 sécrétagogues, ayant une action ciblée dans l'intestin, afin d'éviter les effets non souhaités de l'activation de TGR5, dans d'autres tissus et organes. Ainsi, nous avons concentré nos efforts sur l'obtention de composés à visée topique intestinale, par la mise en place d'une stratégie utilisant le concept de kinétophore. Cette stratégie consiste en la conception de molécules présentant un pharmacophore, sur lequel sont réalisés des aménagements chimiques (kinétophores) visant à contrôler les propriétés pharmacocinétiques des composés chimériques ainsi obtenus.

Les phases d'optimisation d'un hit, identifié au cours d'un criblage sur le récepteur TGR5 humain, ont conduit tout d'abord à l'obtention d'un pharmacophore puissant, en série 5-amino-2-thioimidazole. Les relations structure-activité ont permis d'identifier sur ce pharmacophore optimisé une position, dite « silencieuse », sur laquelle des modifications chimiques n'induisaient pas de perte drastique de l'activité. Sur cette position silencieuse, nous avons ainsi pu introduire divers groupements kinétophores, sélectionnés suite à une analyse systématique de la littérature. Six types de kinétophores ont ainsi été incorporés dans nos composés chimériques afin d'étudier leur influence, d'une part sur les activités sur le récepteur TGR5, et d'autre part sur les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques *in vitro* et *in vivo*. Une trentaine de composés ont ainsi été synthétisés avec des kinétophores de différentes natures : des polyéthylènes glycols, des groupements chargés à pH physiologique (positivement et négativement), des zwitterions, des polyols, et des dimères.

Les composés ont été testés *in vitro* sur les récepteurs TGR5, humain et murin, et ont montré des activités de l'ordre du nanomolaire à la centaine de nanomolaires sur les deux récepteurs. L'étude des paramètres ADME *in vitro* et *in vivo* a ensuite été réalisée et a montré que certains composés présentaient un profil en adéquation avec l'objectif d'obtention de composés agissant localement dans l'intestin. Parallèlement, une étude approfondie des composés fonctionnalisés par des polyéthylènes glycols nous a permis d'étudier l'influence de la longueur de la chaîne PEG sur différents paramètres ADME. Les relations structure-propriétés fines générées sur nos composés PEGylés présentent un intérêt pour la communauté scientifique et pourront être utiles pour la recherche de modulateurs d'autres cibles biologiques, présentant une distribution tissulaire contrôlée.

Quatre composés ont ensuite été sélectionnés pour des expériences pharmacodynamiques chez l'animal pour étudier leur capacité à stimuler la sécrétion de GLP-1. Lors de ces expériences *in vivo*, nous avons pu montrer des effets GLP-1 sécrétagogue modérés pour les composés polyol **32** et PEGylé **15**. Le composé sulfonate **21** a, quant à lui, induit une forte stimulation de la sécrétion de GLP-1 chez des souris normales, et dans un modèle pathologique murin de diabète et d'obésité. Cette forte sécrétion s'est traduite par une amélioration de la tolérance au glucose chez les souris DIO, lors d'une expérience en aigu (OGTT). Ces résultats nous permettent donc de valider notre hypothèse selon laquelle un agoniste du récepteur TGR5, agissant localement dans l'intestin sans exposition systémique, peut avoir un effet sur l'homéostasie du glucose.

Les résultats obtenus amènent à diverses perspectives.

L'optimisation du profil pharmacologique (PK/PD) de nos composés ciblant l'intestin apporte des connaissances générales et des lignes directrices pour la conception de nouveaux composés topiques intestinaux qui pourraient être transposables aux modulateurs d'autres cibles intestinales. Le fort atout de ces composés est leur faible exposition systémique qui leur confère un profil de sécurité et un index thérapeutique élevé. Ils permettent en effet d'atteindre une forte concentration au site d'action, permettant un engagement local de cible élevé, tout en minimisant les effets indésirables systémiques « on-target » et/ou « off-target ».

L'étude du composé topique intestinal **21** dans un modèle murin de diabète et d'obésité, lors de traitements chroniques, permettra d'élucider le rôle du récepteur TGR5 intestinal sur le métabolisme glucidique et énergétique, et d'identifier un potentiel candidat médicament pour le traitement du diabète de type 2.

Le composé **21** représente également un outil pharmacologique intéressant pour l'étude du rôle anti-inflammatoire et du potentiel thérapeutique du récepteur TGR5 intestinal. En effet, l'inflammation colonique, en réponse à un régime gras, a récemment été décrite comme étant une cause majeure des désordres métaboliques<sup>156</sup>. Des effets bénéfiques anti-inflammatoires du récepteur TGR5, dans les macrophages coloniques, ont été très récemment montrés avec des ligands dérivés d'acides biliaires<sup>157,158</sup>. Cibler l'activation du récepteur TGR5, au niveau de ces macrophages avec le composé **21** pourrait ainsi permettre d'étudier le rôle de TGR5 dans l'inflammation intestinale et les désordres métaboliques associés (Figure 127).

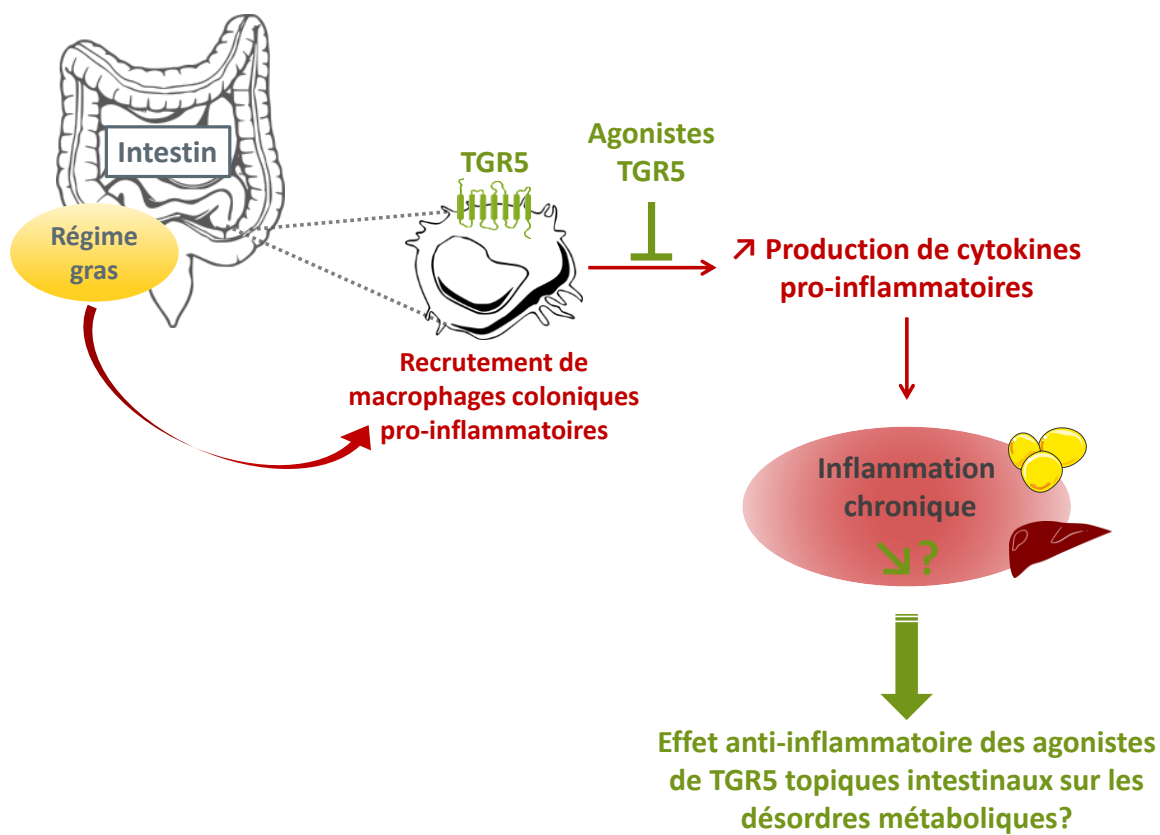


Figure 127 : Rôle anti-inflammatoire et potentiel thérapeutique du récepteur TGR5 intestinal dans l'inflammation colonique





## Bibliographie

1. El-Kaissi, S.; Sherbeeni, S., Pharmacological Management of type 2 Diabetes Mellitus : An Update. *Current Diabetes Reviews* **2011**, 7 (6), 392-405.
2. NCD-RisC, Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *The Lancet* **2016**, 387 (10027), 1513-1530.
3. *IDF Diabetes Atlas - Seventh edition - International Diabetes Federation*. 2015.
4. *Global Report on diabetes - World Health Organisation*. 2016.
5. Polonsky, K. S., The past 200 years in diabetes. *The New England Journal of Medicine* **2012**, 367 (14), 1332-1340.
6. Inzucchi, S. E.; Bergenstal, R. M.; Buse, J. B.; Diamant, M.; Ferrannini, E.; Nauck, M.; Peters, A. L.; Tsapas, A.; Wender, R.; Matthews, D. R., Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015 : A patient-centered approach. *Diabetes Care* **2015**, 38 (1), 140-149.
7. Holst, J. J., The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. *Physiological Reviews* **2007**, 87 (4), 1409.
8. Campbell, Jonathan E.; Drucker, Daniel J., Pharmacology, Physiology, and Mechanisms of Incretin Hormone Action. *Cell Metabolism* **2013**, 17 (6), 819-837.
9. Barre, J. L.; Still, E. U., Studies on the physiology of secretin. *American Journal of Physiology - Legacy Content* **1929**, 91 (2), 649-653.
10. Nauck, M. A.; Homberger, E.; Siegel, E. G.; Allen, R. C.; Eaton, R. P.; Ebert, R.; Creutzfeldt, W., Incretin Effects of Increasing Glucose Loads in Man Calculated from Venous Insulin and C-Peptide Responses. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **1986**, 63 (2), 492-498.
11. Eissele, R.; Göke, R.; Willemer, S.; Harthus, H. P.; Vermeer, H.; Arnold, R.; Göke, B., Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *European Journal of Clinical Investigation* **1992**, 22 (4), 283-291.
12. Drucker, D. J., The biology of incretin hormones. *Cell Metabolism* **2006**, 3 (3), 153-165.
13. Kim, W.; Egan, J. M., The Role of Incretins in Glucose Homeostasis and Diabetes Treatment. *Pharmacological Reviews* **2008**, 60 (4), 470-512.
14. Gunawardene, A. R.; Corfe, B. M.; Staton, C. A., Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *International Journal of Experimental Pathology* **2011**, 92 (4), 219-231.
15. Edwards, C. M.; Todd, J. F.; Mahmoudi, M.; Wang, Z.; Wang, R. M.; Ghatei, M. A.; Bloom, S. R., Glucagon-like peptide 1 has a physiological role in the control of postprandial glucose in humans: studies with the antagonist exendin 9-39. *Diabetes* **1999**, 48 (1), 86-93.
16. Baggio, L. L.; Drucker, D. J., Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* **2007**, 132 (6), 2131-2157.
17. Flint, A.; Raben, A.; Astrup, A.; Holst, J. J., Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *Journal of Clinical Investigation* **1998**, 101 (3), 515-520.
18. Baggio, L. L.; Drucker, D. J., Glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **2004**, 18 (4), 531-554.
19. Kawamata, Y.; Fujii, R.; Hosoya, M.; Harada, M.; Yoshida, H.; Miwa, M.; Fukusumi, S.; Habata, Y.; Itoh, T.; Shintani, Y.; Hinuma, S.; Fujisawa, Y.; Fujino, M., A G Protein-coupled

- Receptor Responsive to Bile Acids. *The Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278 (11), 9435-9440.
20. Maruyama, T.; Miyamoto, Y.; Nakamura, T.; Tamai, Y.; Okada, H.; Sugiyama, E.; Nakamura, T.; Itadani, H.; Tanaka, K., Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, 298 (5), 714-719.
  21. Martinot, E.; Sèdes, L.; Baptissart, M.; Lobaccaro, J.-M.; Caira, F.; Beaudoin, C.; Volle, D. H., Bile acids and their receptors. *Molecular Aspects of Medicine* **2017**, *In press*.
  22. Nguyen, A.; Bouscarel, B., Bile acids and signal transduction: role in glucose homeostasis. *Cell Signal* **2008**, 20 (12), 2180-2197.
  23. Lefebvre, P.; Cariou, B.; Lien, F.; Kuipers, F.; Staels, B., Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiological Review* **2009**, 89 (1), 147-191.
  24. Gloriam, D. E.; Fredriksson, R.; Schiöth, H. B., The G protein-coupled receptor subset of the rat genome. *BMC Genomics* **2007**, 8 (338), 1-17.
  25. Pols, T. W.; Nomura, M.; Harach, T.; Lo Sasso, G.; Oosterveer, M. H.; Thomas, C.; Rizzo, G.; Gioiello, A.; Adorini, L.; Pellicciari, R.; Auwerx, J.; Schoonjans, K., TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading. *Cell Metabolism* **2011**, 14 (6), 747-757.
  26. Keitel, V.; Ullmer, C.; Haussinger, D., The membrane-bound bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) is localized in the primary cilium of cholangiocytes. *Biological Chemistry* **2010**, 391 (7), 785-789.
  27. Alemi, F.; Kwon, E.; Poole, D. P.; Lieu, T.; Lyo, V.; Cattaruzza, F.; Cevikbas, F.; Steinhoff, M.; Nassini, R.; Materazzi, S.; Guerrero-Alba, R.; Valdez-Morales, E.; Cottrell, G. S.; Schoonjans, K.; Geppetti, P.; Vanner, S. J.; Bunnett, N. W.; Corvera, C. U., The TGR5 receptor mediates bile acid-induced itch and analgesia. *Journal of Clinical Investigation* **2013**, 123 (4), 1513-1530.
  28. Keitel, V.; Reinehr, R.; Gatsios, P.; Rupprecht, C.; Gorg, B.; Selbach, O.; Haussinger, D.; Kubitz, R., The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* **2007**, 45 (3), 695-704.
  29. Keitel, V.; Cupisti, K.; Ullmer, C.; Knoefel, W. T.; Kubitz, R.; Häussinger, D., The membrane-bound bile acid receptor TGR5 is localized in the epithelium of human gallbladders. *Hepatology* **2009**, 50 (3), 861-870.
  30. Briere, D. A.; Ruan, X.; Cheng, C. C.; Siesky, A. M.; Fitch, T. E.; Dominguez, C.; Sanfeliciano, S. G.; Montero, C.; Suen, C. S.; Xu, Y.; Coskun, T.; Michael, M. D., Novel Small Molecule Agonist of TGR5 Possesses Anti-Diabetic Effects but Causes Gallbladder Filling in Mice. *Plos One* **2015**, 10 (8), 1-17.
  31. Guo, C.; Chen, W.-D.; Wang, Y.-D., TGR5, Not Only a Metabolic Regulator. *Frontiers in Physiology* **2016**, 7 (646), 1-9.
  32. Pols, Thijs W. H.; Nomura, M.; Harach, T.; Lo Sasso, G.; Oosterveer, Maaïke H.; Thomas, C.; Rizzo, G.; Gioiello, A.; Adorini, L.; Pellicciari, R.; Auwerx, J.; Schoonjans, K., TGR5 Activation Inhibits Atherosclerosis by Reducing Macrophage Inflammation and Lipid Loading. *Cell Metabolism* **2011**, 14 (6), 747.
  33. Poole, D. P.; Godfrey, C.; Cattaruzza, F.; Cottrell, G. S.; Kirkland, J. G.; Pelayo, J. C.; Bunnett, N. W.; Corvera, C. U., Expression and function of the bile acid receptor GPBAR1 (TGR5) in the murine enteric nervous system. *Neurogastroenterology Motility* **2010**, 22 (7), 814-825.

34. Lieu, T.; Jayaweera, G.; Zhao, P.; Poole, D. P.; Jensen, D.; Grace, M.; McIntyre, P.; Bron, R.; Wilson, Y. M.; Krappitz, M.; Haerteis, S.; Korbmacher, C.; Steinhoff, M. S.; Nassini, R.; Materazzi, S.; Geppetti, P.; Corvera, C. U.; Bunnett, N. W., The Bile Acid Receptor TGR5 Activates the TRPA1 Channel to Induce Itch in Mice. *Gastroenterology* **2014**, *147* (6), 1417-1428.
35. Keitel, V.; Häussinger, D., Perspective: TGR5 (Gpbar-1) in liver physiology and disease. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* **2012**, *36* (5), 412-419.
36. Li, T.; Holmstrom, S. R.; Kir, S.; Umetani, M.; Schmidt, D. R.; Kliewer, S. A.; Mangelsdorf, D. J., The G protein-coupled bile acid receptor, TGR5, stimulates gallbladder filling. *Molecular Endocrinology* **2011**, *25* (6), 1066-1071.
37. Reich, M.; Klindt, C.; Deutschmann, K.; Spomer, L.; Häussinger, D.; Keitel, V., Role of the G Protein-Coupled Bile Acid Receptor TGR5 in Liver Damage. *Digestive Diseases* **2017**, *35* (3), 235-240.
38. Watanabe, M.; Houten, S. M.; Matakai, C.; Christoffolete, M. A.; Kim, B. W.; Sato, H.; Messaddeq, N.; Harney, J. W.; Ezaki, O.; Kodama, T.; Schoonjans, K.; Bianco, A. C.; Auwerx, J., Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* **2006**, *439* (7075), 484-489.
39. Katsuma, S.; Hirasawa, A.; Tsujimoto, G., Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *329* (1), 386-390.
40. Baldassano, S.; Amato, A.; Mulè, F., Influence of glucagon-like peptide 2 on energy homeostasis. *Peptides* **2016**, *86*, 1-5.
41. Karra, E.; Chandarana, K.; Batterham, R. L., The role of peptide YY in appetite regulation and obesity. *The Journal of Physiology* **2009**, *587* (Pt 1), 19-25.
42. Pocai, A., Action and therapeutic potential of oxyntomodulin(). *Molecular Metabolism* **2014**, *3* (3), 241-251.
43. Thomas, C.; Gioiello, A.; Noriega, L.; Strehle, A.; Oury, J.; Rizzo, G.; Macchiarulo, A.; Yamamoto, H.; Matakai, C.; Pruzanski, M.; Pellicciari, R.; Auwerx, J.; Schoonjans, K., TGR5-Mediated Bile Acid Sensing Controls Glucose Homeostasis. *Cell Metabolism* **2009**, *10* (3), 167-177.
44. Xu, Y., Recent Progress on Bile Acid Receptor Modulators for Treatment of Metabolic Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59* (14), 6563-6579.
45. Gioiello, A.; Rosatelli, E.; Nuti, R.; Macchiarulo, A.; Pellicciari, R., Patented TGR5 modulators : a review (2006 - present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2012**, *22* (12), 1399-1414.
46. Pellicciari, R.; Gioiello, A.; Macchiarulo, A.; Thomas, C.; Rosatelli, E.; Natalini, B.; Sardella, R.; Pruzanski, M.; Roda, A.; Pastorini, E.; Schoonjans, K.; Auwerx, J., Discovery of 6 $\alpha$ -Ethyl-23(S)-methylcholic Acid (S-EMCA, INT-777) as a Potent and Selective Agonist for the TGR5 Receptor, a Novel Target for Diabesity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52* (24), 7958-7961.
47. Yu, D.; Forman, B.; Huang, W.; Sousa, K. Bile acid analog TGR5 agonists. US2014/0206657-A1. 2014.
48. Katz, L.; Baltz, R. H., Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2016**, *43* (2), 155-176.

49. Sato, H.; Genet, C.; Strehle, A.; Thomas, C.; Lobstein, A.; Wagner, A.; Mioskowski, C.; Auwerx, J.; Saladin, R., Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, *362* (4), 793-798.
50. Genet, C.; Strehle, A.; Schmidt, C.; Boudjelal, G.; Lobstein, A.; Schoonjans, K.; Souchet, M.; Auwerx, J.; Saladin, R.; Wagner, A., Structure–Activity Relationship Study of Betulinic Acid, A Novel and Selective TGR5 Agonist, and Its Synthetic Derivatives: Potential Impact in Diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53* (1), 178-190.
51. Horiba, T.; Katsukawa, M.; Mita, M.; Sato, R., Dietary obacunone supplementation stimulates muscle hypertrophy, and suppresses hyperglycemia and obesity through the TGR5 and PPAR $\gamma$  pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2015**, *463* (4), 846-852.
52. Jafri, L.; Saleem, S.; Calderwood, D.; Gillespie, A.; Mirza, B.; Green, B. D., Naturally-occurring TGR5 agonists modulating glucagon-like peptide-1 biosynthesis and secretion. *Peptides* **2016**, *78*, 51-58.
53. Jacquot, D.; Poeschke, O.; Burger, C. New terpenes and macrocycles. WO2009/146772. 2009.
54. Evans, K. A.; Budzik, B. W.; Ross, S. A.; Wisnoski, D. D.; Jin, J.; Rivero, R. A.; Vimal, M.; Szewczyk, G. R.; Jayawickreme, C.; Moncol, D. L.; Rimele, T. J.; Armour, S. L.; Weaver, S. P.; Griffin, R. J.; Tadepalli, S. M.; Jeune, M. R.; Shearer, T. W.; Chen, Z. B.; Chen, L.; Anderson, D. L.; Becherer, J. D.; De Los Frailes, M.; Colilla, F. J., Discovery of 3-aryl-4-isoxazolecarboxamides as TGR5 receptor agonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52* (24), 7962-7965.
55. Budzik, B. W.; Evans, K. A.; Wisnoski, D. D.; Jin, J.; Rivero, R. A.; Szewczyk, G. R.; Jayawickreme, C.; Moncol, D. L.; Yu, H., Synthesis and structure–activity relationships of a series of 3-aryl-4-isoxazolecarboxamides as a new class of TGR5 agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20* (4), 1363-1367.
56. Herbert, M. R.; Siegel, D. L.; Staszewski, L.; Cayanan, C.; Banerjee, U.; Dhamija, S.; Anderson, J.; Fan, A.; Wang, L.; Rix, P.; Shiau, A. K.; Rao, T. S.; Noble, S. A.; Heyman, R. A.; Bischoff, E.; Guha, M.; Kabakibi, A.; Pinkerton, A. B., Synthesis and SAR of 2-aryl-3-aminomethylquinolines as agonists of the bile acid receptor TGR5. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20* (19), 5718-5721.
57. Martin, R. E.; Bissantz, C.; Gavelle, O.; Kuratli, C.; Dehmlow, H.; Richter, H. G. F.; Sander, U. O.; Erickson, S. D.; Kim, K.; Pietranico-Cole, S. L.; Alvarez-Sánchez, R.; Ullmer, C., 2-Phenoxy-nicotinamides are Potent Agonists at the Bile Acid Receptor GPBAR1 (TGR5). *ChemMedChem Communications* **2013**, *8* (4), 569-576.
58. Zhu, J.; Ye, Y.; Ning, M.; Mándi, A.; Feng, Y.; Zou, Q.; Kurtán, T.; Leng, Y.; Shenn, J., Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationships of 3,4,5-Trisubstituted 4,5-Dihydro-1,2,4-oxadiazoles as TGR5 Agonists. *ChemMedChem* **2013**, *8* (7), 1210-1223.
59. Zhu, J.; Ning, M.; Guo, C.; Zhang, L.; Pan, G.; Leng, Y.; Shen, J., Design, synthesis and biological evaluation of a novel class of potent TGR5 agonists based on a 4-phenyl pyridine scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *69*, 55-68.
60. Dehmlow, H.; Sánchez, R. A.; Bachmann, S.; Bissantz, C.; Bliss, F.; Conde-Knape, K.; Graf, M.; Martin, R. E.; Sander, U. O.; Raab, S.; Richter, H. G. F.; Sewing, S.; Sprecher, U.; Ullmer, C.; Mattei, P., Discovery and optimisation of 1-hydroxyimino-3,3-diphenylpropanes, a new class of

orally active GPBAR1 (TGR5) agonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23* (16), 4627-4632.

61. Piotrowski, D. W.; Futatsugi, K.; Warmus, J. S.; Orr, S. T. M.; Freeman-Cook, K. D.; Londregan, A. T.; Wei, L.; Jennings, S. M.; Herr, M.; Coffey, S. B.; Jiao, W.; Storer, G.; Hepworth, D.; Wang, J.; Lavergne, S. Y.; Chin, J. E.; Hadcock, J. R.; Brenner, M. B.; Wolford, A. C.; Janssen, A. M.; Roush, N. S.; Buxton, J.; Hinchey, T.; Kalgutkar, A. S.; Sharma, R.; Flynn, D. A., Identification of Tetrahydropyrido[4,3-*d*]pyrimidine Amides as a New Class of Orally Bioavailable TGR5 Agonists. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *4* (1), 63-68.

62. Futatsugi, K.; Bahnck, K. B.; Brenner, M. B.; Buxton, J.; Chin, J. E.; Coffey, S. B.; Dubins, J.; Flynn, D.; Gautreau, D.; Guzman-Perez, A.; Hadcock, J. R.; Hepworth, D.; Herr, M.; Hinchey, T.; Janssen, A. M.; Jennings, S. M.; Jiao, W.; Lavergne, S. Y.; Li, B.; Li, M.; Munchhof, M. J.; Orr, S. T. M.; Piotrowski, D. W.; Roush, N. S.; Sammons, M.; Stevens, B. D.; Storer, G.; Wang, J.; Warmus, J. S.; Wei, L.; Wolford, A. C., Optimization of triazole-based TGR5 agonists towards orally available agents. *MedChemComm* **2013**, *4* (1), 205-210.

63. Londregan, A. T.; Piotrowski, D. W.; Futatsugi, K.; Warmus, J. S.; Boehm, M.; Carpino, P. A.; Chin, J. E.; Janssen, A. M.; Roush, N. S.; Buxton, J.; Hinchey, T., Discovery of 5-phenoxy-1,3-dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxamides as potent agonists of TGR5 via sequential combinatorial libraries. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23* (5), 1407-1411.

64. Zambad, S. P.; Tuli, D.; Mathur, A.; Ghalsasi, S. A.; Chaudhary, A. R.; Deshpande, S.; Gupta, R. C.; Chauthaiwale, V.; Dutt, C., TRC210258, a novel TGR5 agonist, reduces glycemc and dyslipidemic cardiovascular risk in animal models of diabetes. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity* **2013**, *21* (7), 1-14.

65. Phillips, D. P.; Gao, W.; Yang, Y.; Zhang, G.; Lerario, I. K.; Lau, T. L.; Jiang, J.; Wang, X.; Nguyen, D. G.; Bhat, B. G.; Trotter, C.; Sullivan, H.; Welzel, G.; Landry, J.; Chen, Y.; Joseph, S. B.; Li, C.; Gordon, W. P.; Richmond, W.; Johnson, K.; Bretz, A.; Bursulaya, B.; Pan, S.; McNamara, P.; Seidel, H. M., Discovery of Trifluoromethyl(pyrimidin-2-yl)azetidione-2-carboxamides as Potent, Orally Bioavailable TGR5 (GPBAR1) Agonists: Structure–Activity Relationships, Lead Optimization, and Chronic In Vivo Efficacy. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57* (8), 3263-3282.

66. Park, E. J.; Ahn, Y. G.; Jung, S. H.; Bang, H. J.; Kim, M.; Hong, D. J.; Kim, J.; Suh, K. H.; Kim, Y. J.; Kim, D.; Kim, E.-Y.; Lee, K.; Min, K. H., Discovery of novel pyrimidine and malonamide derivatives as TGR5 agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24* (17), 4271-4275.

67. Zheng, C.; Zhou, W.; Wang, T.; You, P.; Zhao, Y.; Yang, Y.; Wang, X.; Luo, J.; Chen, Y.; Liu, M.; Chen, H., A Novel TGR5 Activator WB403 Promotes GLP-1 Secretion and Preserves Pancreatic  $\beta$ -Cells in Type 2 Diabetic Mice. *Plos One* **2015**, *10* (7), 1-16.

68. Chen, Z.; Ning, M.; Zou, Q.; Cao, H.; Ye, Y.; Leng, Y.; Shen, J., Discovery and Structure–Activity Relationship Study of 4-Phenoxythiazol-5-carboxamides as Highly Potent TGR5 Agonists. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2016**, *64* (4), 326-339.

69. Zou, Q.; Duan, H.; Ning, M.; Liu, J.; Feng, Y.; Zhang, L.; Zhu, J.; Leng, Y.; Shen, J., 4-Benzofuranyloxynicotinamide derivatives are novel potent and orally available TGR5 agonists. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *82*, 1-15.

70. Dehmlow, H.; Alvarez Sánchez, R.; Bachmann, S.; Bissantz, C.; Bliss, F.; Conde-Knape, K.; Graf, M.; Martin, R. E.; Obst Sander, U.; Raab, S.; Richter, H. G.; Sewing, S.; Sprecher, U.; Ullmer,

- C.; Mattei, P., Discovery and optimisation of 1-hydroxyimino-3,3-diphenylpropanes, a new class of orally active GPBAR1 (TGR5) agonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23* (16), 4627-4632.
71. Fyfe, M. C. T., Chapter 1: Non-systemic intestine-targeted drugs. In *Progress in Medicinal chemistry*, 2016; Vol. 55, pp 1-44.
72. Muller, P. Y.; Milton, M. N., The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nature Review Drug Discovery* **2012**, *11* (10), 751-761.
73. Filipowski, K. J.; Varma, M. V.; El-Kattan, A. F.; Ambler, C. M.; Ruggeri, R. B.; Goosen, T. C.; Cameron, K. O., Intestinal targeting of drugs: rational design approaches and challenges. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2013**, *13* (7), 776-802.
74. Charmot, D., Non-Systemic Drugs: A Critical Review. *Current Pharmaceutical Design* **2012**, *18* (10), 1434-1445.
75. Kevin, J. F.; Manthena, V. V.; Ayman, F. E.-K.; Catherine, M. A.; Roger, B. R.; Theunis, C. G. a. K. O. C., Intestinal Targeting of Drugs: Rational Design Approaches and Challenges. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2013**, *13* (7), 776-802.
76. 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. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45* (12), 2615-2623.
77. Kramer, W.; Glombik, H., Bile Acid Reabsorption Inhibitors (BARI) : Novel Hypolipidemic Drugs. *Current Medicinal Chemistry* **2006**, *13* (9), 997-1016.
78. Wu, Y.; Aquino, C. J.; Cowan, D. J.; Anderson, D. L.; Ambroso, J. L.; Bishop, M. J.; Boros, E. E.; Chen, L.; Cunningham, A.; Dobbins, R. L.; Feldman, P. L.; Harston, L. T.; Kaldor, I. W.; Klein, R.; Liang, X.; McIntyre, M. S.; Merrill, C. L.; Patterson, K. M.; Prescott, J. S.; Ray, J. S.; Roller, S. G.; Yao, X.; Young, A.; Yuen, J.; Collins, J. L., Discovery of a Highly Potent, Nonabsorbable Apical Sodium-Dependent Bile Acid Transporter Inhibitor (GSK2330672) for Treatment of Type 2 Diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56* (12), 5094-5114.
79. Basit, A. W., Advances in Colonic Drug Delivery. *Drugs* **2005**, *65* (14), 1991-2007.
80. Amidon, S.; Brown, J. E.; Dave, V. S., Colon-Targeted Oral Drug Delivery Systems: Design Trends and Approaches. *American Association of Pharmaceuticals Scientists (AAPS PharmSciTech)* **2015**, *16* (4), 731-741.
81. Karrouit, Y.; Dubuquoy, L.; Piveteau, C.; Siepmann, F.; Moussa, E.; Wils, D.; Beghyn, T.; Neut, C.; Flament, M. P.; Guerin-Deremaux, L.; Dubreuil, L.; Deprez, B.; Desreumaux, P.; Siepmann, J., In vivo efficacy of microbiota-sensitive coatings for colon targeting: A promising tool for IBD therapy. *Journal of Controlled Release* **2015**, *197*, 121-130.
82. Naeem, M.; Choi, M.; Cao, J.; Lee, Y.; Ikram, M.; Yoon, S.; Lee, J.; Moon, H. R.; Kim, M.-S.; Jung, Y.; Yoo, J.-W., Colon-targeted delivery of budesonide using dual pH- and time-dependent polymeric nanoparticles for colitis therapy. *Drug Design, Development and Therapy* **2015**, *9*, 3789-3799.
83. Naeem, M.; Kim, W.; Cao, J.; Jung, Y.; Yoo, J.-W., Enzyme/pH dual sensitive polymeric nanoparticles for targeted drug delivery to the inflamed colon. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *123*, 271-278.
84. Casteleyn, C.; Rekecki, A.; Van Der Aa, A.; Simoens, P.; Van Den Broeck, W., Surface area assessment of the murine intestinal tract as a prerequisite for oral dose translation from mouse to man. *Laboratory Animals* **2010**, *44* (3), 176-183.

85. Brighton, C. A.; Rievaj, J.; Kuhre, R. E.; Glass, L. L.; Schoonjans, K.; Holst, J. J.; Gribble, F. M.; Reimann, F., Bile Acids Trigger GLP-1 Release Predominantly by Accessing Basolaterally Located G Protein–Coupled Bile Acid Receptors. *Endocrinology* **2015**, *156* (11), 3961-3970.
86. Bollu, V.; Boren, B., Clayton; Dalgard, J., Eve; Flatt, B., T.; Haq, N.; Hudson, S.; Mohan, R.; Morrissey, M.; Pratt, B.; Wang, T.-l.; Martin, R.; Gu, X.-H. Triazole and imidazole derivatives for use as TGR5 agonists in the treatment of diabetes and obesity. WO2010093845 A1. 2010.
87. Lasalle, M. TGR5: cible thérapeutique pour le traitement du diabète de type 2 et ses complications métaboliques. De la chimie aux effets biologiques. Université de Lille 2, 2015.
88. Teichert, A.; Jantos, K.; Harms, K.; Studer, A., One-Pot Homolytic Aromatic Substitutions/HWE Olefinations under Microwave Conditions for the Formation of a Small Oxindole Library. *Organic Letters* **2004**, *6* (20), 3477-3480.
89. Citerio, L.; Rivera, E.; Saccarello, M. L.; Stradi, R.; Gioia, B., 2-Imidazolines. III (1). 1-Aryl- and 1-acyl-2-amino-(ormethoxy)-4,5-diamino-4,5-dihydroimidazoles. Synthesis and properties. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1980**, *17* (1), 97-101.
90. Lamberth, C.; Dumeunier, R.; Trah, S.; Wendeborn, S.; Godwin, J.; Schneiter, P.; Corran, A., Synthesis and fungicidal activity of tubulin polymerisation promoters. Part 3: Imidazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21* (1), 127-134.
91. Zumpe, F. L.; Flüß, M.; Schmitz, K.; Lender, A., Propane phosphonic acid anhydride: a new promoter for the one-pot Biginelli synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones. *Tetrahedron Letters* **2007**, *48* (8), 1421-1423.
92. Crawforth, J. M.; Paoletti, M., A one-pot synthesis of imidazo[1,5-a]pyridines. *Tetrahedron Letters* **2009**, *50* (34), 4916-4918.
93. Scaravelli, F.; Bacchi, S.; Massari, L.; Curcuruto, O.; Westerduin, P.; Maton, W., Efficient method to prepare diethylphosphonacetamides. *Tetrahedron Letters* **2010**, *51* (39), 5154-5156.
94. Augustine, J. K.; Kumar, R.; Bombrun, A.; Mandal, A. B., An efficient catalytic method for the Beckmann rearrangement of ketoximes to amides and aldoximes to nitriles mediated by propylphosphonic anhydride (T3P®). *Tetrahedron Letters* **2011**, *52* (10), 1074-1077.
95. Augustine, J. K.; Bombrun, A.; Venkatachaliah, S., An efficient catalytic method for the Friedländer annulation mediated by peptide coupling agent propylphosphonic anhydride (T3P®). *Tetrahedron Letters* **2011**, *52* (50), 6814-6818.
96. Desroses, M.; Wieckowski, K.; Stevens, M.; Odell, L. R., A microwave-assisted, propylphosphonic anhydride (T3P®) mediated one-pot Fischer indole synthesis. *Tetrahedron Letters* **2011**, *52* (34), 4417-4420.
97. Augustine, J. K.; Bombrun, A.; Alagarsamy, P.; Jothi, A., Selective synthesis of 5,6-dihydrophenanthridines, 5,6-dihydrobenzo[c][1,8]naphthyridines and their fully aromatized analogues via the Pictet–Spengler reaction mediated by peptide coupling agent propylphosphonic anhydride (T3P). *Tetrahedron Letters* **2012**, *53* (46), 6280-6287.
98. Augustine, J. K.; Bombrun, A.; Ramappa, B.; Boodappa, C., An efficient one-pot synthesis of coumarins mediated by propylphosphonic anhydride (T3P) via the Perkin condensation. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53* (33), 4422-4425.
99. Madhu, C.; Basavaprabhu; Vishwanatha, T. M.; Sureshbabu, V. V., T3P (propylphosphonic anhydride) mediated conversion of N $\alpha$ -protected amino/peptide acids into thioacids. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53* (11), 1406-1409.

100. Nagendra, G.; Madhu, C.; Vishwanatha, T. M.; Sureshbabu, V. V., An expedient route for the reduction of carboxylic acids to alcohols employing 1-propanephosphonic acid cyclic anhydride as acid activator. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53* (38), 5059-5063.
101. Poojari, S.; Parameswar Naik, P.; Krishnamurthy, G., One-pot synthesis of thieno [2,3-d] pyrimidin-4-ol derivatives mediated by polyphosphonic anhydride. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53* (35), 4639-4643.
102. Sharnabai, K. M.; Nagendra, G.; Vishwanatha, T. M.; Sureshbabu, V. V., Efficient synthesis of N-protected amino/peptide Weinreb amides from T3P and DBU. *Tetrahedron Letters* **2013**, *54* (6), 478-482.
103. Wen, X.; Bakali, J. E.; Deprez-Poulain, R.; Deprez, B., Efficient propylphosphonic anhydride (®T3P) mediated synthesis of benzothiazoles, benzoxazoles and benzimidazoles. *Tetrahedron Letters* **2012**, *53* (19), 2440-2443.
104. Augustine, J. K.; Vairaperumal, V.; Narasimhan, S.; Alagarsamy, P.; Radhakrishnan, A., Propylphosphonic anhydride (T3P®): an efficient reagent for the one-pot synthesis of 1,2,4-oxadiazoles, 1,3,4-oxadiazoles, and 1,3,4-thiadiazoles. *Tetrahedron* **2009**, *65* (48), 9989-9996.
105. Lasalle, M.; Picon, S.; Boulahjar, R.; Hoguet, V.; Van Obbergen, J.; Roussel, P.; Deprez, B.; Charton, J., Access to newly functionalized imidazole derivatives: efficient synthesis of novel 5-amino-2-thioimidazoles using propylphosphonic anhydride (®T3P). *Tetrahedron Letters* **2015**, *56* (8), 1011-1014.
106. Lasalle, M.; Hoguet, V.; Hennuyer, N.; Leroux, F.; Piveteau, C.; Belloy, L.; Lestavel, S.; Vallez, E.; Dorchies, E.; Duplan, I.; Sevin, E.; Culot, M.; Gosselet, F.; Boulahjar, R.; Herledan, A.; Staels, B.; Deprez, B.; Tailleux, A.; Charton, J., Topical Intestinal Aminoimidazole Agonists of G-Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1 Promote Glucagon Like Peptide-1 Secretion and Improve Glucose Tolerance. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60* (10), 4185-4211.
107. Charton, J.; Deprez, B.; Leroux, F.; Staels, B.; Hennuyer, N.; Lestavel, S.; Lasalle, M.; Dubanchet, B. Imidazol- or 1,2,4-triazol-derivatives and their use. WO2015/189330 A1. 2015.
108. Wu, S.; Janusz, J. M.; Sheffer, J. B., An efficient one-pot synthesis of 3-aminohydantoin and 3-aminodihydrouracil derivatives. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41* (8), 1159-1163.
109. Harris, J. M.; Chess, R. B., Effect of PEGylation on pharmaceuticals. *Nature Review Drug Discovery* **2003**, *2* (3), 214-221.
110. Veronese, F. M.; Pasut, G., PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today* **2005**, *10* (21), 1451-1458.
111. Kang, J. S.; Deluca, P. P.; Lee, K. C., Emerging PEGylated drugs. *Expert Opinion on Emerging Drugs* **2009**, *14* (2), 363-380.
112. Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S., Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (36), 6288-6308.
113. Swierczewska, M.; Lee, K. C.; Lee, S., What is the future of PEGylated therapies? *Expert Opinion on Emerging Drugs* **2015**, *20* (4), 531-536.
114. Alconcel, S. N. S.; Baas, A. S.; Maynard, H. D., FDA-approved poly(ethylene glycol)-protein conjugate drugs. *Polymer Chemistry* **2011**, *2* (7), 1442-1448.
115. Li, W.; Zhan, P.; De Clercq, E.; Lou, H.; Liu, X., Current drug research on PEGylation with small molecular agents. *Progress in Polymer Science* **2013**, *38*, 421-444.



116. Pepinsky, R. B.; W.-C. Lee, M. C.; Gill, A.; K. Wortham, L. L. C.; Leone, D. R.; Giza, K.; Dolinski, B. M.; Perper, S.; Nickerson-Nutter, C.; Lepage, D.; Chakraborty, A.; Whalley, E. T.; Petter, R. C.; Adams, S. P.; Lobb, R. R.; Scott, D. M., Design, Synthesis, and Analysis of a Polyethylene Glycol-Modified (PEGylated) Small Molecule Inhibitor of Integrin  $\alpha 4\beta 1$  with Improved Pharmaceutical Properties. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2005**, *312* (2), 742-750.
117. Asano, S.; Gavrilyuk, J.; Burton, D. R.; Barbas, C. F., Preparation and Activities of Macromolecule Conjugates of the CCR5 Antagonist Maraviroc. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *5* (2), 133-137.
118. Fishburn, C. S., The pharmacology of PEGylation: balancing PD with PK to generate novel therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2008**, *97* (10), 4167-4183.
119. Knauf, M. J.; Bell, D. P.; Hirtzer, P.; Luo, Z. P.; Young, J. D.; Katre, N. V., Relationship of effective molecular size to systemic clearance in rats of recombinant interleukin-2 chemically modified with water-soluble polymers. *Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263* (29), 15064-15070.
120. Caliceti, P.; Veronese, F. M., Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55* (10), 1261-1277.
121. Greenwald, R. B.; Gilbert, C. W.; Pendri, A.; Conover, C. D.; Xia, J.; Martinez, A., Drug Delivery Systems: Water Soluble Taxol 2'-Poly(ethylene glycol) Ester Prodrugs Design and in Vivo Effectiveness. *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39* (2), 424-431.
122. Bentley, M. D.; Viegas, T. X.; Goodin, R. R.; Cheng, L.; Zhao, X. Chemically modified small molecules. WO2005/058367. 2010.
123. Li, W.; Chang, Y.; Zhan, P.; Zhang, N.; Liu, X.; Pannecouque, C.; Clercq, E. D., Synthesis, In Vitro and In Vivo Release Kinetics, and Anti-HIV Activity of A Sustained-Release Prodrug (mPEG-AZT) of 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT, Zidovudine). *ChemMedChem* **2010**, *5* (11), 1893-1898.
124. Gault, V. A.; Kerr, B. D.; Irwin, N.; Flatt, P. R., C-terminal mini-PEGylation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide exhibits metabolic stability and improved glucose homeostasis in dietary-induced diabetes. *Biochemical Pharmacology* **2008**, *75* (12), 2325-2333.
125. Riley, T.; Riggs-Sauthier, J., The Benefits and Challenges of PEGylating Small Molecules. *Pharmaceutical Technology* **2008**, *32* (7), 1-5.
126. Kang, S. U.; Kim, M. J.; Kang, B. N.; Tan, W.; Gyorkos, A. C.; Cho, S. Y. Cyclohexane analogues as gpr119 agonists. US20120053180 A1. 2012.
127. Hutchins, R. O.; Natale, N. R.; Taffer, I. M., Cyanoborohydride supported on an anion exchange resin as a selective reducing agent. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1978**, (24), 1088-1089.
128. V. Ley, S.; H. Bolli, M.; Hinzen, B.; Gervois, A.-G.; J. Hall, B., Use of polymer supported reagents for clean multi-step organic synthesis: preparation of amines and amine derivatives from alcohols for use in compound library generation. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1998**, (15), 2239-2242.
129. Habermann, J.; V. Ley, S.; S. Scott, J., Clean six-step synthesis of a piperidino-thiomorpholine library using polymer-supported reagents. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1998**, (19), 3127-3130.

130. Huang, L.; Gough, P. C.; DeFelippis, M. R., Characterization of Poly(ethylene glycol) and PEGylated Products by LC/MS with Postcolumn Addition of Amines. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (2), 567-577.
131. Barrere, C. Analyse de polymères synthétiques par Résonance Magnétique Nucléaire et Spectrométrie de Masse. Université de Provence, 2011.
132. Fournie-Zaluski, M.-C.; Llorens-Cortes, C.; Roques, B. P.; Corvol, P. Novel derivatives of 4,4'-dithiobis-(3-aminobutane-1-sulfonates) and compositions containing same. US 2006/0135602. 2006.
133. Singh, N.; Kaur, N.; Dunn, J.; MacKay, M.; Callan, J. F., A new fluorescent chemosensor for iron(III) based on the  $\beta$ -aminobisulfonate receptor. *Tetrahedron Letters* **2009**, *50* (8), 953-956.
134. Roy, S.; Eastman, A.; Gribble, G. W., Synthesis of bisindolylmaleimides related to GF109203x and their efficient conversion to the bioactive indolocarbazoles. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *4* (17), 3228-3234.
135. Johnson, M. R.; Molino, B. F.; Sargent, B.; Zhang, J. New capped pyrazinoylguanidine sodium channel blockers. WO2007018640A1. 2007.
136. Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D., Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures1. *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61* (11), 3849-3862.
137. Ooi, T.; Miki, T.; Taniguchi, M.; Shiraishi, M.; Takeuchi, M.; Maruoka, K., Highly Enantioselective Construction of Quaternary Stereocenters on  $\beta$ -Keto Esters by Phase-Transfer Catalytic Asymmetric Alkylation and Michael Reaction. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42* (32), 3796-3798.
138. Flatt, B. T.; Mohan, R. TGR5 agonists having an imidazole or triazole core with substituent having a quaternary nitrogen. WO2014/100025. 2014.
139. Flatt, B. T.; Mohan, R. TGR5 agonists: Imidazole and triazole compounds containing a quaternary nitrogen. WO2014/100021. 2014.
140. Bollu, V.; Boren, B. C.; Julien, J. D.; Flatt, B. T.; Haq, N.; Hudson, S.; Mohan, R.; Morrissey, M.; Pratt, B. TGR5 agonists. WO2011/071565. 2011.
141. Cao, H.; Chen, Z.-X.; Wang, K.; Ning, M.-M.; Zou, Q.-A.; Feng, Y.; Ye, Y.-L.; Leng, Y.; Shen, J.-H., Intestinally-targeted TGR5 agonists equipped with quaternary ammonium have an improved hypoglycemic effect and reduced gallbladder filling effect. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 28676-28683.
142. Kennedy, J. P.; Brogan, J. T.; Lindsley, C. W., Total Synthesis and Biological Evaluation of the Marine Bromopyrrole Alkaloid Dispyrin: Elucidation of Discrete Molecular Targets with Therapeutic Potential. *Journal of Natural Products* **2008**, *71* (10), 1783-1786.
143. Kane, B. E.; Grant, M. K. O.; El-Fakahany, E. E.; Ferguson, D. M., Synthesis and evaluation of xanomeline analogs—Probing the wash-resistant phenomenon at the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16* (3), 1376-1392.
144. Lewis, J.; Reich, N.; Chen, T. Non systemic TGR5 agonists. WO2013/096771 A1. 2013.
145. Carreras, C.; Charmot, D.; Jacobs, J., W.; Labonte, E.; Lewis, J., G. NHE3-binding compounds and methods for inhibiting phosphate transport. WO2014/169094. 2014.

146. Duan, H.; Ning, M.; Zou, Q.; Ye, Y.; Feng, Y.; Zhang, L.; Leng, Y.; Shen, J., Discovery of intestinal targeted TGR5 agonists for the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58* (8), 3315-3328.
147. Staszewski, M.; Walczyński, K., 1-Phenoxyalkyl-4-[(N,N-disubstitutedamino)alkyl]piperazine derivatives as non-imidazole histamine H3-antagonists. *Medicinal Chemistry Research* **2013**, *22* (3), 1287-1304.
148. Aury, S.; Rubini, P.; Gérardin, C.; Selve, C., Amphiphilic Amide Derivatives of D-Glucaric Acid. Synthesis and Complexing Properties Toward Lanthanide(III) Ions. *European Journal of Organic Chemistry* **2004**, *2004* (9), 2057-2066.
149. Kolate, A.; Baradia, D.; Patil, S.; Vhora, I.; Kore, G.; Misra, A., PEG — A versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* **2014**, *192*, 67-81.
150. Hidalgo, I. J.; Raub, T. J.; Borchardt, R. T., Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **1989**, *96* (3), 736-749.
151. Artursson, P.; Karlsson, J., Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1991**, *175* (3), 880-885.
152. Bohets, H.; Annaert, P.; Mannens, G.; Van Beijsterveldt, L.; Anciaux, K.; Verboven, P.; Meuldermans, W.; Lavrijsen, K., Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2001**, *1* (5), 367-383.
153. Sevin, E.; Dehouck, L.; Fabulas-da Costa, A.; Cecchelli, R.; Dehouck, M. P.; Lundquist, S.; Culot, M., Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2013**, *68* (3), 334-339.
154. Varma, M. V. S.; Obach, R. S.; Rotter, C.; Miller, H. R.; Chang, G.; Steyn, S. J.; El-Kattan, A.; Troutman, M. D., Physicochemical Space for Optimum Oral Bioavailability: Contribution of Human Intestinal Absorption and First-Pass Elimination. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53* (3), 1098-1108.
155. Thomas, C.; Pellicciari, R.; Pruzanski, M.; Auwerx, J.; Schoonjans, K., Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* **2008**, *7*, 678-693.
156. Kawano, Y.; Nakae, J.; Watanabe, N.; Kikuchi, T.; Tateya, S.; Tamori, Y.; Kaneko, M.; Abe, T.; Onodera, M.; Itoh, H., Colonic Pro-inflammatory Macrophages Cause Insulin Resistance in an Intestinal Ccl2/Ccr2-Dependent Manner. *Cell Metabolism* **2016**, *24* (2), 295-310.
157. Biagioli, M.; Carino, A.; Cipriani, S.; Francisci, D.; Marchianò, S.; Scarpelli, P.; Sorcini, D.; Zampella, A.; Fiorucci, S., The Bile Acid Receptor GPBAR1 Regulates the M1/M2 Phenotype of Intestinal Macrophages and Activation of GPBAR1 Rescues Mice from Murine Colitis. *The Journal of Immunology* **2017**.
158. Guo, C.; Xie, S.; Chi, Z.; Zhang, J.; Liu, Y.; Zhang, L.; Zheng, M.; Zhang, X.; Xia, D.; Ke, Y.; Lu, L.; Wang, D., Bile Acids Control Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome. *Immunity* **2016**, *45* (4), 802-816.

## Bibliographie

## Table des illustrations

### Table des figures

Figure 1 : Estimation du nombre de personnes diabétiques à travers le monde en 2015 et les prévisions pour 2040.....	29
Figure 2 : Complications majeures du diabète <sup>3</sup> .....	30
Figure 3 : Algorithme de traitement (SGLT2-i : inhibiteurs de SGLT-2, SU : sulfonyles, TZD : thiazolidinediones, DPP-4-i : inhibiteurs de la DPP-4, GLP-1-RA : Agonistes du récepteur au GLP-1).....	32
Figure 4 : Effets biologiques du GLP-1.....	35
Figure 5 : Biosynthèse des acides biliaires primaires et secondaires .....	37
Figure 6 : (A) Courbe dose réponse de la production d'AMPc induite par les acides biliaires. (B) Production d'AMPc pour les acides biliaires et les dérivés du cholestérol. T, tauro-conjugué; G, glyco-conjugué; F, libre; UDCA, acide ursodeoxycholique; TTNPB, acide (E)-([tetrahydrotetraméthyl-naphthalenyl]propyl)-benzoïque <sup>19</sup> .....	39
Figure 7 : (A) Expression de TGR5 chez l'homme <sup>19</sup> , (B) Expression de TGR5 chez l'homme rapporté à l'iléon <sup>30</sup> , .....	40
Figure 8 : Effets biologiques de TGR5 .....	43
Figure 9 : Structures de dérivés d'acides biliaires .....	45
Figure 10 : GLP-1 plasmatique chez des souris TGR5 <sup>+/+</sup> (A) et TGR5 <sup>-/-</sup> (B) après administration du composé INT-777 (30 mg/kg) seul ou en combinaison avec un inhibiteur de DPP-4 (Sitagliptine, 3 mg/kg) <sup>43</sup> .....	46
Figure 11 : (A) OGTT chez des souris C57Bl6/J mâles (HFD) traitées avec l'INT-777 (30 mg/kg/jour) pendant 8 semaines <sup>43</sup> .....	47
Figure 12 : Structure de l'acide oléanolique et effet du composé sur la tolérance au glucose lors d'un IPGTT après 14 jours de traitement avec les différents régimes <sup>49</sup> .....	48
Figure 13 : Structure de l'acide bétulinique et de l'acide ursolique .....	48
Figure 14 : Structure de l'obacunone et ses effets sur le taux de glucose sanguin (A) et sur la sécrétion de GLP-1 (B) <sup>51</sup> .....	49
Figure 15 : Structures de l'acide quinovique (QA), de l'acide quinovique-3β-O-β-D-glycopyranoside (dQA), de l'ester d'acide quinovique-3β-O-β-D-glycopyranosyl-(28→1)-β-D-glycopyranosyle (EdQA) et leur effet GLP-1 sécrétagogue <i>in vitro</i> dans des cellules STC-1 <sup>52</sup> .....	49
Figure 16 : Structures de composés agonistes de TGR5 synthétiques .....	50
Figure 17 : Action des azoréductases coloniques sur la Sulfasalazine.....	54
Figure 18 : Pro-drogue de la Dexaméthazone.....	54
Figure 19 : Clivage de la fonction acétal du Budenoside par les cytochromes 3A4 .....	54
Figure 20 : Exemples de kinétophores utilisés pour modifier les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques <sup>77</sup> .....	56

Figure 21 : Utilisation de la stratégie kinétophore pour l'obtention d'inhibiteur d'IBAT <sup>78</sup> .....	57
Figure 22 : Structure de l'Ezetimibe et du Canosimibe .....	57
Figure 23 : Structure du Tenapanor .....	58
Figure 24 : Structure de l'Orlistat .....	58
Figure 25 : Exemple d'encapsulation du Budenoside dans des nanoparticules (NPs) et libération du composé en fonction du temps et/ou du pH in vitro <sup>82</sup> .....	59
Figure 26 : Conception des composés topiques intestinaux.....	60
Figure 27 : Evolution d'un composé topique intestinal à travers le tractus gastro-intestinal <sup>84</sup> ....	61
Figure 28 : Activation de TGR5 du côté basolatéral des cellules entéroendocrines L intestinales	62
Figure 29 : Test in vitro de transactivation du récepteur TGR5.....	63
Figure 30 : Courbe dose-réponse .....	64
Figure 31 : Structures et activités de la touche <b>A</b> et du composé <b>Exe1</b> (Exelixis) <sup>86</sup> .....	64
Figure 32 : Remplacement isostérique et changement de cycle conduisant au composé <b>ML1</b> <sup>87</sup> .	65
Figure 33 : Schéma de synthèse générale.....	66
Figure 34 : Structure de l'anhydride d'acide propylphosphonique T3P .....	66
Figure 35 : Relations structure-activité réalisées par le docteur Lasalle <sup>87, 106, 107</sup> .....	67
Figure 36 : Synthèse des composés pharmacophores <b>1</b> et <b>2</b> .....	68
Figure 37 : Modifications sur la position 4 de l'imidazole.....	69
Figure 38 : Schéma de synthèse des composés <b>3</b> à <b>7</b> .....	70
Figure 39 : Structure et activité du composé <b>ML4</b> .....	72
Figure 40 : Structure des composés agonistes de TGR5 envisagés .....	73
Figure 41 : Kinétophores envisagés.....	73
Figure 42 : Structure du polyéthylène glycol .....	74
Figure 43 : Structure du Naloxegol.....	76
Figure 44 : Conception des composés fonctionnalisés par des PEG.....	76
Figure 45 : Structure des types de composés PEGylés envisagés.....	77
Figure 46 : Synthèse du composé <b>8</b> .....	77
Figure 47 : Synthèse de l'intermédiaire <b>8v</b> nécessaire à la synthèse du composé <b>8</b> .....	78
Figure 48 : Synthèse du composé <b>9</b> .....	79
Figure 49 : Synthèse du composé <b>10</b> .....	80
Figure 50 : Synthèse des composés <b>11</b> et <b>12</b> .....	81
Figure 51 : Synthèse des composés <b>13</b> à <b>16</b> .....	82
Figure 52 : Synthèse des composés <b>17</b> et <b>18</b> .....	83
Figure 53 : Synthèse de l'intermédiaire <b>17ii</b> nécessaire à la synthèse des composés <b>17</b> et <b>18</b> .....	83
Figure 54 : Synthèse du composé <b>19</b> .....	84
Figure 55 : Exemple de l'analyse de la répartition des longueurs au sein du composé <b>15</b> . n = nombre d'unités monomériques. A) Chromatogramme MS (ESI+) permettant d'obtenir le spectrogramme de masse. B) Spectrogramme de masse permettant la détermination des	

longueurs de PEG présentes dans le mélange en fonction des différents états d'ionisation. C) Chromatogramme en MS (chaque ligne correspond à une longueur pour un état d'ionisation). D) Histogramme représentant l'intensité relative de chacune des longueurs. ....	86
Figure 56 : Structure des composés <b>Z-1</b> et <b>Z-2</b> , activités sur le récepteur TGR5, perméabilités (A→B, B→A), exposition systémique <sup>69</sup> .....	89
Figure 57 : Structure générale des composés sulfonates .....	89
Figure 58 : Structure du composé <b>21 (ML5)</b> .....	90
Figure 59 : Synthèse des composés <b>20</b> à <b>22</b> .....	91
Figure 60 : Synthèse du composé disulfonate <b>23</b> .....	92
Figure 61 : Synthèse de l'intermédiaire <b>23iii</b> nécessaire à la synthèse du composé <b>23</b> .....	92
Figure 62 : Structure du composé <b>13a</b> .....	93
Figure 63 : Analyse rétro-synthétique du composé <b>24</b> .....	94
Figure 64 : Première voie de synthèse du composé <b>24b</b> infructueuse.....	95
Figure 65 : Seconde voie de synthèse du composé <b>24</b> .....	96
Figure 66 : Structure, activités, perméabilité et concentration plasmatique des composés <b>AM-1</b> et <b>AM-2</b> après une administration orale chez des souris ICR à une dose de 100 mg/kg <sup>141</sup> . nd: non déterminé.....	97
Figure 67 : Structure et activités des composés <b>ML6</b> et <b>ML7</b> obtenus par le docteur Lasalle .....	97
Figure 68 : Structures des composés amines et ammoniums envisagés.....	98
Figure 69 : Essai de synthèse du composé <b>25</b> .....	98
Figure 70 : Synthèse des composés <b>25</b> à <b>27</b> .....	99
Figure 71 : Structure du composé zwitterionique envisagé .....	100
Figure 72 : Réaction d'amination réductrice pour former l'intermédiaire <b>28a</b> et analyse LCMS du milieu réactionnel.....	100
Figure 73 : Synthèse du composé <b>28</b> infructueuse .....	101
Figure 74 : Deuxième essai de synthèse du composé <b>28</b> .....	101
Figure 75 : Troisième essai de la synthèse du composé <b>28</b> .....	102
Figure 76 : Structure des composés <b>D-1</b> et <b>D-2</b> , activités, perméabilité et concentration plasmatique après une administration des composés à une dose de 150 mg/kg chez des souris ICR <sup>146</sup> . nd : non déterminé .....	103
Figure 77 : Synthèse des composés <b>29</b> et <b>30</b> .....	104
Figure 78 : Synthèse des intermédiaires <b>29i</b> et <b>30i</b> nécessaires à la synthèse des dimères <b>29</b> et <b>30</b> .....	104
Figure 79 : Synthèse du composé <b>31</b> .....	105
Figure 80 : Structure des composés <b>S-1</b> et <b>S-2</b> <sup>144</sup> .....	106
Figure 81 : Synthèse des composés <b>32</b> et <b>33</b> .....	106
Figure 82 : Synthèse du composé <b>34</b> .....	107
Figure 83 : Synthèse du composé <b>35</b> .....	108

Figure 84 : Synthèse du composé <b>36</b> .....	109
Figure 85 : Activités sur les récepteurs TGR5 humain (bleu) et murin (vert) en fonction de l'augmentation du poids moléculaire des composés fonctionnalisés par une chaîne polyéthylène glycol.....	112
Figure 86 : (A) Graphique des activités des composés PEGylés sur le récepteur murin en fonction des activités sur le récepteur humain (en pEC <sub>50</sub> ) ; (B) Activité des composés sur les deux récepteurs en fonction de la masse moléculaire moyenne en masse (M <sub>w</sub> ).....	115
Figure 87 : Activités des composés anioniques à pH physiologique.....	117
Figure 88 : Activités des composés cationiques et anioniques à pH physiologique.....	119
Figure 89 : Structure des composés agonistes de TGR5 synthétisés.....	123
Figure 90 : Charge des composés en fonction des pEC <sub>50</sub> murin .....	124
Figure 91 : Lipophilie (logD) des différents composés chimériques en fonction de la pEC <sub>50</sub> (mTGR5).....	129
Figure 92 : Schéma du test de perméabilité sur cellules Caco-2 .....	130
Figure 93 : PSA en fonction de la perméabilité de A vers B des composés .....	134
Figure 94 : Influence de la longueur de chaîne PEG du composé <b>13</b> sur la perméabilité de A vers B.....	135
Figure 95 : Influence de la longueur de chaîne PEG des composés <b>13</b> et <b>14</b> sur la perméabilité de B vers A.....	135
Figure 96 : Vitesse d'efflux cellulaire de la Rhodamine 123 (K <sub>out</sub> ), suivie par mesure de fluorescence, en présence ou non des composés (non toxiques sur cellules Caco-2 aux concentrations testées). RFU : Relative Fluorescence Unit. Moyennes +/- écart-type. *** p < 0,001 (Test de Mann-Whitney).....	136
Figure 97 : Vitesse d'efflux cellulaire du CMFDA (K <sub>out</sub> ), suivie par mesure de fluorescence, en présence ou non des composés (non toxiques sur cellules Caco-2 aux concentrations testées). RFU : Relative Fluorescence Unit. Moyennes +/- écart-type. *** p < 0,001 (Test de Mann-Whitney).....	137
Figure 98 : Stabilité microsomale : Concentration des composés <b>13</b> à <b>16</b> en fonction du temps .....	140
Figure 99 : Clairance microsomale (Cl <sub>int</sub> ) des composés <b>2</b> , <b>13</b> et <b>14</b> en fonction de la longueur de chaîne PEG.....	141
Figure 100 : Clairance microsomale (Cl <sub>int</sub> ) du composé <b>13</b> en présence ou non d'inhibiteur de CYP3A4 (Kétoconazole).....	141
Figure 101 : Exposition plasmatique (A) et hépatique (B) des composés PEGylés <b>13</b> à <b>16</b> .....	144
Figure 102 : (A) Exposition de la vésicule biliaire des composés PEGylés <b>13</b> à <b>16</b> . (B) Exposition plasmatique et de la vésicule biliaire pour les composés <b>13</b> et <b>14</b> . VB : Vésicule Biliaire.....	145
Figure 103 : Effet des composés PEGylés <b>13</b> à <b>16</b> sur le volume de la vésicule biliaire au temps t+4h. Moyennes +/- écart types.* p < 0.05 (ANOVA – Test de Dunnet).....	146



Figure 104 : Concentration des composés PEGylés ( <b>13</b> à <b>16</b> ) dans les différentes sections de l'intestin en fonction du temps .....	147
Figure 105 : Quantités de composés PEGylés retrouvées dans le colon .....	148
Figure 106 : Concentration en composé <b>21</b> en fonction du temps dans la vésicule biliaire lors de l'expérience de pharmacocinétique.....	150
Figure 107 : Pharmacocinétique du composé <b>21</b> dans les différentes sections de l'intestin.....	150
Figure 108 : Passage du composé <b>21</b> à travers la membrane intestinale.....	151
Figure 109 : Structure du composé polyol <b>32</b> .....	154
Figure 110 : Protocole <i>in vivo</i> 1 : Etude de l'effet GLP-1 sécrétagogue et effet sur le volume de la vésicule biliaire du composé <b>32</b> à une dose de 32 µmol/kg chez des souris C57Bl6 .....	154
Figure 111 : (A) Effet du composé <b>32</b> sur la sécrétion de GLP-1 selon le protocole <i>in vivo</i> 1 (décrit Figure 110) à une dose de 32 µmol/kg. Moyennes +/- écart-type (n = 8 souris/groupe). ns : non significatif (test Mann-Whitney) ; (B) Effet du composé <b>32</b> sur le volume de la vésicule biliaire selon le protocole <i>in vivo</i> 1. Moyennes +/- écart-type (n = 4 souris/groupe). .....	155
Figure 112 : (A) Protocole <i>in vivo</i> 2 : Etude de l'effet GLP-1 sécrétagogue du composé <b>32</b> avec 3 administrations successives à t-6h, t-4h et t-2h ; (B) Effet du composé <b>32</b> sur la sécrétion de GLP-1 selon le protocole <i>in vivo</i> 2 à une dose de 32 µmol/kg. Moyennes +/- écart-types (n = 8 souris/groupe). (test de Mann-Whitney).....	156
Figure 113 : Structures des composés <b>14</b> et <b>15</b> .....	157
Figure 114 : Protocole <i>in vivo</i> 3 : Etude de l'effet sécrétagogue GLP-1 du composé <b>15</b> à une dose de 32 µmol/kg avec un temps d'exposition de 6h du composé avant la mesure de GLP-1.....	157
Figure 115 : (A) Protocole <i>in vivo</i> 4 : Etude de l'effet sécrétagogue GLP-1 du composé <b>15</b> à une dose de 32 µmol/kg avec un temps d'exposition de 8 ou 10h du composé avant la mesure de GLP-1 ; (B) Effet du composé <b>15</b> sur la sécrétion de GLP-1 au cours du protocole <i>in vivo</i> 3 et 4 aux temps t+6h, t+8h, et t+10h à une dose de 32 µmol/kg.....	158
Figure 116 : Effet du composé <b>14</b> sur la sécrétion de GLP-1 au cours du protocole <i>in vivo</i> 4 au temps t+8h (décrit Figure 115A) à une dose de 32 µmol/kg. Moyennes +/- écart types (n = 8 souris/groupe). ns : non significatif.....	159
Figure 117 : Structure du composé <b>21</b> .....	160
Figure 118 : (A) Protocole <i>in vivo</i> 5 : Etude de l'effet sécrétagogue GLP-1 du composé <b>21</b> à une dose de 32 µmol/kg avec un temps d'exposition de 4 et 7h du composé avant la mesure de GLP-1 ; (B) Effet temps dépendant de la sécrétion de GLP-1 du composé <b>21</b> à une dose de 32µmol/kg chez des souris C57Bl6 selon le protocole <i>in vivo</i> 5.....	161
Figure 119 : (A) Protocole <i>in vivo</i> 6 : Etude de l'effet sécrétagogue GLP-1 du composé <b>21</b> à une dose de 32 µmol/kg avec un temps d'exposition de 8h du composé avant la mesure de GLP-1 ; (B) Effet du composé <b>21</b> sur la sécrétion de GLP-1 chez des souris C57Bl6 à 3 doses (1.6, 8, et 32 µmol/kg) selon le protocole <i>in vivo</i> 6. Moyennes +/- écart-type (n = 6 souris/groupe). .....	162

Figure 120 : Effet du composé <b>21</b> sur le volume de la vésicule biliaire chez des souris C57Bl6 à 3 doses (1.6, 8, et 32 $\mu\text{mol/kg}$ ). Moyennes +/- écart-type (n = 6 souris/groupe). ** : $p \leq 0.01$ (ANOVA – test de Dunnet) .....	163
Figure 121 : (A) Protocole <i>in vivo</i> 7 : Etude de l'effet du composé <b>21</b> à une dose de 32 $\mu\text{mol/kg}$ sur le volume des vésicules biliaires avec un temps d'exposition de 6h du composé avant le prélèvement des vésicules et avec renutrition ou non des souris pendant 2h. (B) Effet du composé <b>21</b> sur le volume de la vésicule biliaire selon le protocole <i>in vivo</i> 7. Moyennes +/- erreur-type (n = 5 souris/groupe). ns : non significatif (ANOVA – Test de Tukey) .....	164
Figure 122 : Schéma de synthèse à plus grande échelle du composé <b>21</b> .....	165
Figure 123 : Effet du composé <b>21</b> sur la sécrétion de GLP-1 chez des souris DIO à la dose de 32 $\mu\text{mol/kg}$ selon le protocole <i>in vivo</i> 6 (décrit Figure 119A). Moyennes +/- erreur-type (n = 10 souris/groupe). **** : $p < 0,0001$ (Test de Mann-Whitney) .....	168
Figure 124 : Protocole <i>in vivo</i> 8 : Etude de l'effet du composé <b>21</b> à une dose de 32 $\mu\text{mol/kg}$ sur la sécrétion de GLP-1 et sur le volume des vésicules biliaires chez des souris DIO en présence d'omarigliptine (2 mpk).....	168
Figure 125 : Effet du composé <b>21</b> sur la sécrétion de GLP-1 chez des souris DIO à la dose de 32 $\mu\text{mol/kg}$ en présence d'Omarigliptine (2 mpk) selon le protocole <i>in vivo</i> 8 (décrit Figure 124). Moyennes +/- écart-types (n = 7 souris/groupe).....	169
Figure 126 : (A) Protocole <i>in vivo</i> 9 : effet du composé <b>21</b> en aigu dans un test de tolérance au glucose à la dose de 32 $\mu\text{mol/kg}$ chez des souris DIO ; (B) Courbe du glucose sanguin lors du test OGTT en fonction du temps pour les 2 groupes selon le protocole <i>in vivo</i> 9. Moyennes +/- SEM (n = 8 souris/groupe). * : $p < 0.1$ , ** : $p < 0.01$ (ANOVA – test de Dunnet) ; (C) Histogramme de l'AUC (Unité Arbitraire). Moyennes +/- erreur-type (n = 8 souris/groupe). ** : $p < 0.01$ (Test de Student).....	170
Figure 127 : Rôle anti-inflammatoire et potentiel thérapeutique du récepteur TGR5 intestinal dans l'inflammation colonique.....	175

**Table des tableaux**

Tableau 1 : Résultats des activités des composés 3 à 7 pour la modification du cycle imidazole	71
Tableau 2 : Exemples de médicaments (macromolécules) fonctionnalisés par des PEGs de haut poids moléculaire .....	75
Tableau 3 : Optimisation de la réaction pallado-catalysée de Suzuki pour l'obtention du composé <b>9</b> .....	79
Tableau 4 : Composés avec espaceur phényle-amide envisagés.....	81
Tableau 5 : Caractérisation des composés PEGylés synthétisés .....	87
Tableau 6 : Influence du bras espaceur des composés PEGylés .....	110
Tableau 7 : Influence de la longueur de chaîne PEG sur les activités sur les récepteurs TGR5 humain et murin.....	111
Tableau 8 : Influence de la liaison amide versus amide inversés .....	113
Tableau 9 : Influence du lien fonctionnalisé avec une amine ou un ammonium .....	114
Tableau 10 : Activités des composés anioniques à pH physiologique .....	116
Tableau 11 : Activités des composés cationiques à pH physiologique .....	118
Tableau 12 : Activités des composés zwitterioniques .....	120
Tableau 13 : Activités des composés dimériques <b>29</b> à <b>31</b> .....	121
Tableau 14 : Activités des composés polyols <b>32</b> à <b>36</b> .....	122
Tableau 15 : Solubilité et logD des composés agonistes de TGR5 chargés .....	127
Tableau 16 : Solubilité et logD des composés agonistes de TGR5 zwitterionique, dimériques et polyols .....	128
Tableau 17 : Solubilité et logD des composés agonistes de TGR5 présentant un kinétophore PEG .....	129
Tableau 18 : Résultats des tests de perméabilité des composés et surface polaire (PSA) calculée avec le logiciel Pipeline Pilot .....	132
Tableau 19 : Résultats des tests de stabilité microsomale des composés .....	139
Tableau 20 : Paramètres pharmacocinétiques in vivo du composé <b>21</b> . n = 3 souris/groupe. Fèces collectés 24h après l'administration du composé. ....	149
Tableau 21 : Quantités utilisées et rendements obtenus pour la resynthèse du composé <b>21</b> ...	166
Tableau 22 : Optimisation l'étape d'introduction du groupement sulfonate lors de la synthèse du composé <b>21</b> .....	167

Table des illustrations

## Partie expérimentale

A. Chemistry1. Molecules table

N°	Pages	N°	Pages	N°	Pages	N°	Pages
<b>1</b>	203 - 205	<b>11i</b>	228 - 229	<b>19i</b>	243 - 244	<b>26</b>	262
<b>2</b>	206 - 207	<b>11</b>	229 - 230	<b>19</b>	244 - 245	<b>27</b>	263
<b>3</b>	208 - 211	<b>12i</b>	230	<b>20ii</b>	246 - 247	<b>28</b>	264
<b>4</b>	212 - 214	<b>12</b>	231 - 232	<b>20</b>	247 - 249	<b>29i</b>	265
<b>5</b>	215	<b>13a</b>	232 - 233	<b>21</b>	249 - 250	<b>29</b>	265 - 267
<b>6</b>	216	<b>13</b>	233 - 234	<b>22ii</b>	250 - 251	<b>30i</b>	267
<b>7</b>	217	<b>14</b>	234 - 235	<b>22</b>	251 - 253	<b>30</b>	268 - 269
<b>8v</b>	218 - 220	<b>15</b>	235 - 236	<b>23iii</b>	253 - 254	<b>31</b>	269 - 270
<b>8</b>	220 - 222	<b>16</b>	237 - 238	<b>23c</b>	255 - 256	<b>32</b>	271
<b>9i</b>	222	<b>17ii</b>	238 - 239	<b>23</b>	257	<b>33</b>	272
<b>9</b>	223 - 225	<b>17</b>	239 - 241	<b>24i</b>	257 - 258	<b>34</b>	273
<b>10i</b>	225	<b>18i</b>	242	<b>24</b>	258 - 260	<b>35</b>	274 - 275
<b>10</b>	226 - 228	<b>18</b>	242 - 243	<b>25</b>	261	<b>36</b>	275 - 277

2. Abbreviations

brs	Broad singlet	MW	Molecular Weight
COSY	Correlation spectroscopy	ppm	Parts per million
d	Doublet	q	Quartet
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation	quint	Quintet
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation	s	Singlet
$\delta$	Chemical shift	t	Triplet
$J$	Coupling constant	TLC	Thin layer chromatography
m	Multiplet	$t_R$	Retention time
MRM	Multiple reaction monitoring		

3. General informationsa. Synthesis

All commercial reagents and solvents were used without further purification. Microwave-assisted chemical reactions were conducted on a Biotage Initiator+ microwave synthesizer. Progress of all reactions was routinely monitored by thin layer chromatography (TLC) and/or by High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrum (HPLC-MS). TLC was performed using Merck commercial aluminum sheets coated with silica gel 60 F254. Visualization was achieved by fluorescence quenching under UV light at 254 nm.

b. Analysis

HPLC-MS analysis was performed on two different HPLC-MS system:

- LC-MS Waters Alliance Micromass ZQ 2000 system was equipped with a Waters 2747 sample manager, a Waters 2695 separations module, a Waters 2996 photodiode array detector (200 - 800 nm) and a Waters Micromass ZQ 2000 detector (scan 100 - 800).
- LC-MS Waters 3100 Mass Detectors system was equipped with a Waters 2767 sample manager, a Waters 515 HPLC pump, a Waters Systems Fluidics Organizer, a Waters 2545 Binary Gradient Module, a Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance (215 nm and 254 nm) detector and a Waters 3100 Mass detectors.

LCMS analysis was performed on a Waters Alliance Micromass ZQ 2000, using an XBridge C18 column (3.5  $\mu\text{m}$  particle size, dimensions 50 mm x 4.6 mm). The injection volume is 20  $\mu\text{L}$ . A mixture of water and acetonitrile was used as mobile phase in gradient-elution. pH of mobile phase was adjusted with HCOOH and  $\text{NH}_4\text{OH}$  to form a buffer solution at pH 3.8. The analysis time is 5 minutes (at a flow rate at 2 mL/min). Purity (%) was determined by reversed phase HPLC, using UV detection (215 nm), and all compound showed purity greater than 95%.

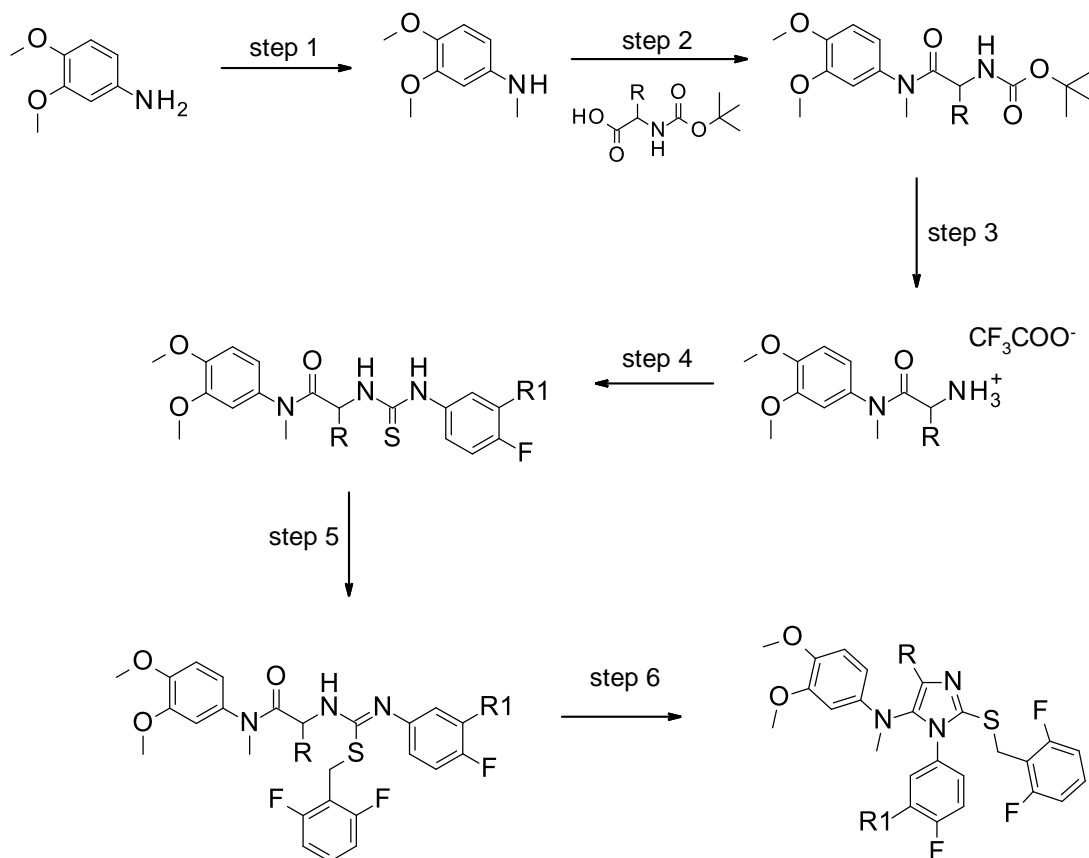
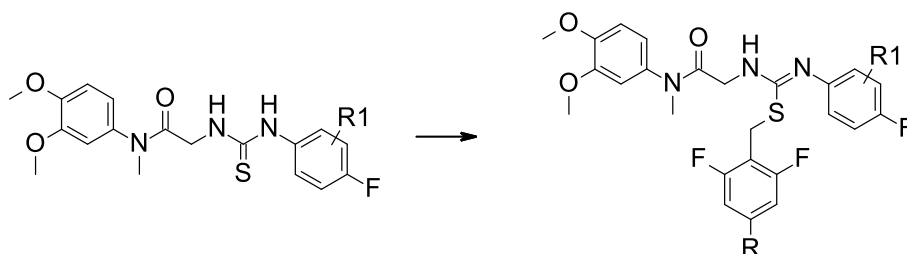
NMR spectra were recorded on a Bruker DRX-300 spectrometer. Chemical shifts are in parts per million (ppm). The assignments were made using one-dimensional (1D)  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra and two-dimensional (2D) HSQC, HMBC and COSY spectra.

c. Purifications

Flash column chromatography was performed on prepacked columns (Grace Resolv™ flash cartridges, Grace®).

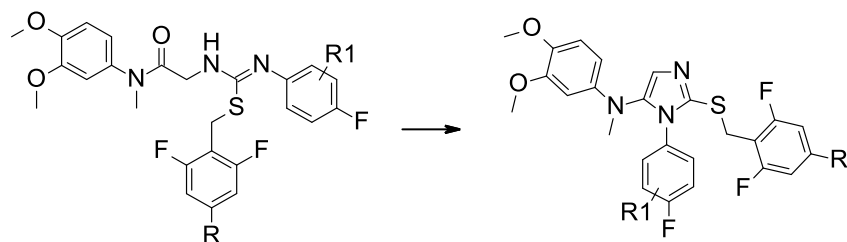
Preparative HPLC were performed using a Varian ProStar system using an Omnisphere 10 C18 column (250 mm x 41.4 mm) Dynamax from Varian, Inc. or a Waters-2 system using a XBridge™ Prep C18 5 $\mu\text{m}$  OBD (250 mm x 50 mm or 150 x 30 mm). A gradient starting from  $\text{CH}_3\text{CN}$  -  $\text{H}_2\text{O}$  and formic acid (20 - 80 - 0.1%) and reaching 100%  $\text{CH}_3\text{CN}$ /0.1% formic acid at a flow rate of 80 mL/minutes was used on the Varian ProStar system. Products were detected by UV absorption at 215 nm and/or 254 nm. A gradient mixture of  $\text{CH}_3\text{CN}$  and water in ammonium formate buffer at pH 9.2 or pH 3.8 and a flow rate at 40 or 80 mL/min was used on Waters-2 system. Products were detected by UV absorption and/or by MS.

Purification yields were not optimized. Final compounds were isolated as amorphous solids without collection of melting point data.

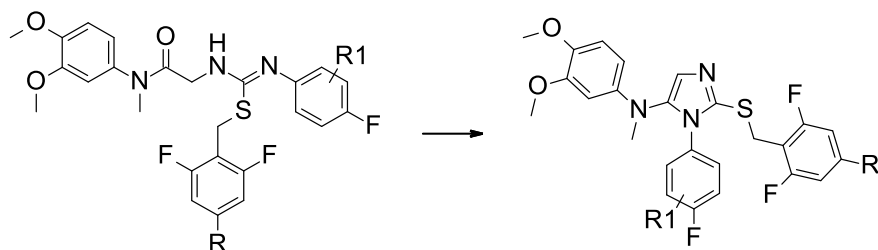
4. General ProceduresGeneral route toward 5-amino-2-thioimidazole derivatives:Procedure A.

In a round bottom flask was added the isothioureido-derivative (1 equiv), potassium carbonate (1 equiv), sodium iodide (0.5 equiv), and acetonitrile (QS 0.2M). The suspension was stirred at room temperature for 10 min; benzyl halide (1 equiv) was then added. The suspension was stirred at room temperature overnight. Reaction mixture was then evaporated; residue was dissolved in EtOAc, washed with water and brine. Organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. Residue was purified by flash chromatography (cyclohexane/EtOAc).

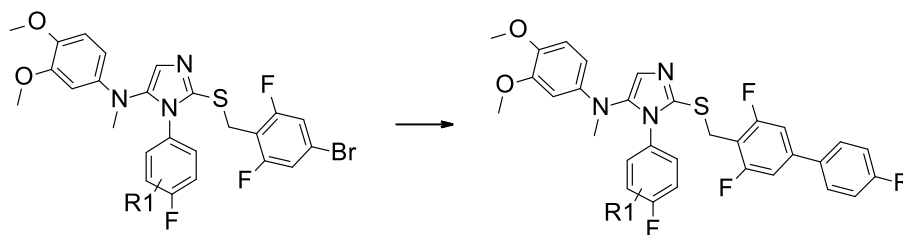


**Procedure B.**

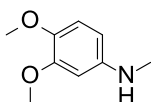
In a microwave tube were introduced the isothioureido-acetamide derivative (1 equiv), EtOAc (QS 0.1M), diisopropylethylamine (6 equiv), and T3P® (3 equiv). Reaction mixture was heated under microwave irradiation at 150°C for 10 min. Reaction mixture was then diluted with EtOAc, washed with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and brine. Organic phase was then dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. Residue was purified by flash chromatography or preparative HPLC.

**Procedure C.**

In a round bottom flask were introduced the isothioureido-acetamide derivative (1 equiv), EtOAc (QS 0.1M), diisopropylethylamine (6 equiv), and T3P® (3 equiv). Reaction mixture was heated at reflux for 24h. After several hours, diisopropylethylamine and T3P® were added several times, until completion. Reaction mixture was then diluted in EtOAc, washed with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and brine. Organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. Residue was purified by flash chromatography or preparative HPLC.

**Procedure D.**

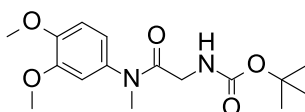
In a microwave tube were added 5-amino-2-thio-imidazole derivative (1 equiv), phenylboronic derivative (1 equiv), cesium carbonate (1.75 equiv), Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> (0.175 equiv). A mixture of water (QS 0.8M), dimethoxyethane (QS 0.3M), and ethanol (QS 0.5M) was prepared and poured into the microwave tube. The reaction mixture was heated under microwave irradiation at 100°C for 10 min. The reaction mixture was then evaporated to dryness, diluted in EtOAc, filtered on Celite, washed with water, with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. Residue was purified by flash chromatography or preparative HPLC.

5. Pharmacophore optimizationCompound 1:Step 1: (3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**1a**)

In a 250 mL flask were added 3,4-dimethoxyaniline (3.0 g, 19.58 mmol) and sodium methoxide (5.29 g, 97.92 mmol) in 35 mL of methanol (dried over  $\text{MgSO}_4$ ). Then, paraformaldehyde (1.18 g, 39.17 mmol) and 15 mL of methanol (dried over  $\text{MgSO}_4$ ) were added. Molecular sieve (4 Å) was then added and the mixture was stirred overnight at room temperature. Sodium borohydride (0.74 g, 19.58 mmol) was then added, and the mixture was heated under reflux for 1 hour. The mixture was then evaporated, dissolved in EtOAc and water, the two phases were separated. The aqueous phase was then basified by addition of a saturated aqueous solution of  $\text{NaHCO}_3$ , and extracted by EtOAc. The organic phases were washed with a saturated aqueous solution of  $\text{NaHCO}_3$ , brine, dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated to dryness to give 2.67 g of the titled product as an oily residue, leading to a 77% yield, which was used without further purification in the next step of the synthesis.

LC-MS:  $t_R = 1.34$  min, MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 168.0$ .

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 2.62 (d,  $J = 5.0$  Hz, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 5.20 (quint,  $J = 4.9$  Hz, 1H), 5.99 (dd,  $J = 8.5, 2.5$  Hz, 1H), 6.22, (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 6.71 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H).

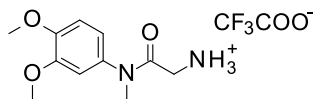
Step 2: *tert*-butyl N-[2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]carbamate (**1b**)

In a 100 mL flask were added 3,4-dimethoxy-N-methyl-aniline (**1a**) (11 g, 65.79 mmol), 132 mL of EtOAc, 2-(*tert*-butoxycarbonylamino)acetic acid (13.83 g, 78.94 mmol), T3P® (58.15 mL, 98.68 mmol) and diisopropylethylamine (34.47 mL, 197.36 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour. The mixture was washed with water and brine. The organic phase was dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated to dryness to give 21.34 g of the titled product as a brown powder, leading to a 100% yield.

LC-MS:  $t_R = 2.35$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 325.1$ .

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 1.35 (s, 9H), 3.13 (s, 3H), 3.43 (d,  $J = 5.0$  Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 6.64-6.70 (m, 1H), 6.80-6.90 (m, 1H), 6.95-7.02 (m, 2H).

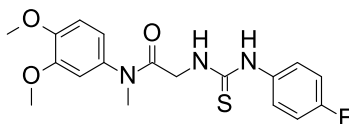
**Step 3:** [2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]ammonium;2,2,2-trifluoroacetate (**1c**)



In a 100 mL flask was diluted *tert*-butyl *tert*-butyl N-[2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]carbamate (**1b**) (5 g, 15.41 mmol) in 12 mL of DCM. 5 mL of TFA was added at the reaction mixture and it was stirred at room temperature for 30 min. The reaction mixture was evaporated to dryness to give 5.21 g of the titled product as dark oil, leading to a 100 % yield.

LC-MS:  $t_R = 1.47$  min (+ injection peak), MS  $[M+H]^+ m/z = 225.1$ .

**Step 4:** N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**1d**)

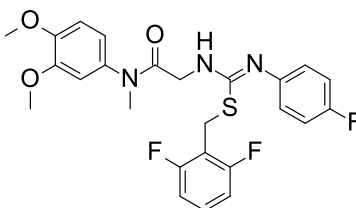


4-fluorophenylisothiocyanate (1.5 g, 9.83 mmol) and  $NEt_3$  (1.59 mL, 11.79 mmol) were added in a 250 mL flask in 15 mL of ethanol. [2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]ammonium formate (**1c**) (3.2 g, 9.83 mmol) was dissolved in 115 mL of ethanol,  $NEt_3$  (1.33 mL, 9.83 mmol) was added, and the mixture was added dropwise at room temperature. After the addition, the reaction was over. Reaction mixture was evaporated to dryness and purified by flash chromatography using as eluent a mixture of cyclohexane/EtOAc to give 2.8 g of the titled product as a yellowish powder, leading to a 76 % yield.

LC-MS:  $t_R = 2.35$  min, MS  $[M-H]^- m/z = 244.1$ .

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 2.49 (s, 3H), 3.78 (m, 6H), 4.00 (d,  $J = 4.1$  Hz, 2H), 6.92 (dd,  $J = 8.4, 1.8$  Hz, 1H), 7.01-7.03 (m, 2H), 7.15 (m, 2H), 7.45 (m, 2H), 7.73 (m, 1H), 9.90 (s, 1H).

**Step 5:** 2-[2-(2,6-Difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**1e**)

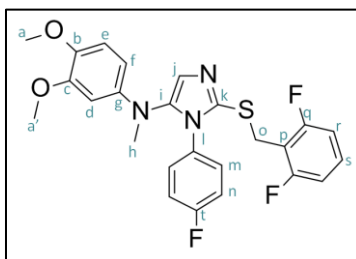


The titled product was obtained without purification as an oily residue (1.15 g, 91%), following Procedure A, using N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**1d**) (940 mg) and 2-Bromomethyl-1,3-difluoro-benzene (518 mg).

LC-MS:  $t_R = 3.57$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 504.0$ .

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 3.16 (s, 3H), 3.69-3.76 (m, 8H), 4.19 (s, 2H), 6.61 (m, 2H), 6.79-6.89 (m, 2H), 6.95-7.00 (m, 4H), 7.05-7.13 (m, 3H), 7.38 (m, 1H).

**Step 6:** [2-(2,6-Difluoro-benzylsulfanyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-(3,4-dimethoxy-phenyl)-methyl-amine (**1**)



The titled compound was obtained as an oily residue (160 mg, 33%), following procedure C, using 2-[2-(2,6-difluoro-benzyl)-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**1e**) (500 mg).

LC-MS:  $t_R = 3.13$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 486.3$ .

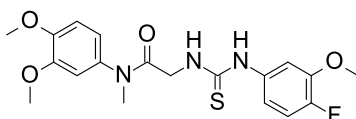
$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.92 (s, 3H, **h**), 3.80 (s, 3H, **a'**), 3.82 (s, 3H, **a**), 4.16 (s, 2H, **o**), 6.16 (dd,  $J = 8.7, 2.7$  Hz, 1H, **f**), 6.30 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, **d**), 6.72 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, **e**), 6.78 (m, 2H, **r**), 6.83-6.85 (m, 4H, **m & n**), 6.92 (s, 1H, **j**), 7.19 (m, 1H, **s**).

$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 25.9 (**o**), 40.1 (**h**), 55.9 (**a'**), 56.4 (**a**), 99.9 (**d**), 105.5 (**f**), 111.2 (m, **r**), 112.4 (**e**), 113.6 (t,  $J = 19.3$  Hz, **p**), 115.9 (d,  $J = 22.9$  Hz, **n**), 124.4 (**j**), 129.1-129.2 (m, **m &**

s), 130.8 (l), 138.1 (k), 139.6 (i), 142.7 (g), 143.2 (b), 149.6 (c), 161.1 (dd,  $J = 250.0, 7.7$  Hz, q), 162.2 (d,  $J = 249.0$  Hz, t).

### **Compound 2:**

**Step 4:** N-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-[(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)carbamothioylamino]-N-methyl-acetamide (**2d**)

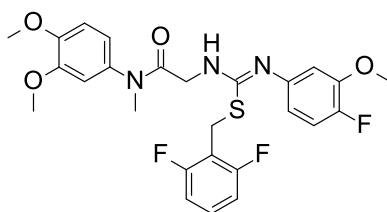


In a 250 mL flask, TCDI (3.02 g, 16.95 mmol) and 54 mL of dioxane were added. ([2-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]ammonium;2,2,2-trifluoroacetate (**1c**) (5.21 g, 15.41 mmol) was dissolved in 100 mL of dioxane. The acidic solution was then neutralized by addition of  $\text{NEt}_3$  (6.44 mL, 46.24 mmol), and then added dropwise in the flask. The solution was then stirred at room temperature for 1.5 hours. Then 4-fluoro-3-methoxy-aniline (2.18 g, 15.41 mmol) and  $\text{NEt}_3$  (6.44 mL, 46.24 mmol) were added to the solution. Reaction mixture was stirred at 60°C overnight. Reaction being completed, dioxane was removed. After evaporation, precipitation of the crude material in EtOH and purification of the filtrate by flash chromatography using a mixture of DCM/Acetone (96/4) gave 2.6 g of the titled product as a yellow powder, leading to a 41% yield.

LC-MS:  $t_R = 2.52$  min, MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 408.1$ .

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 3.23 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 4.14 (d,  $J = 3.9$  Hz, 2H), 6.75-6.80 (m, 3H), 6.89 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.99 (dd,  $J = 7.6, 2.3$  Hz, 1H), 7.08 (dd,  $J = 10.9, 8.6$  Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 8.13 (s, 1H).

**Step 5:** 2-[[*(Z)*-C-[(2,6-difluorophenyl)methylsulfanyl]-N-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)carbonimidoyl]amino]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methyl-acetamide (**2e**)

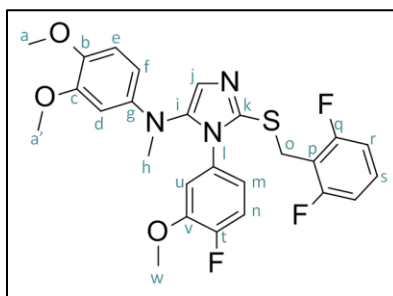


In a 5 mL flask were added N-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-[[*Z*]-N-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-C-sulfanyl-carbonimidoyl]amino]-N-methyl-acetamide (**2d**) (0.1 g, 0.236 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.033 g, 0.236 mmol), NaI (0.018 g, 0.118 mmol), and 1.1 mL of acetonitrile. The suspension was stirred at room temperature for 10 min, and 2-(chloromethyl)-1,3-difluoro-benzene (0.038 g, 0.24 mmol) was then added. The suspension was stirred at room temperature overnight. 2-(chloromethyl)-1,3-difluoro-benzene (0.008 g, 0.047 mmol) was added at the reaction mixture and it was stirred at room temperature for 4 hours. The crude material was then evaporated, residue was dissolved in EtOAc, washed with water and brine, organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to give 120 mg of the titled product as yellowish oil, leading to a 96% yield.

LC-MS:  $t_R = 3.08$  min, MS [M+H]<sup>+</sup>  $m/z = 534.1$ .

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 3.29 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.85 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 6.31 (s, 1H), 6.45 (d,  $J = 6.99$  Hz, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.69-6.70 (m, 1H), 6.75-6.76 (m, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.85-6.86 (m, 2H), 6.88 (s, 1H).

**Step 6:** 2-[(2,6-difluorophenyl)methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxyphenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**2**)



The titled product was obtained as a yellowish oil (40 mg, 35%), following procedure B, using 2-[[*Z*]-C-[(2,6-difluorophenyl)methylsulfanyl]-N-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)carbonimidoyl]amino]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methyl-acetamide (**2e**) (0.12 g, 0.22 mmol).

LC-MS:  $t_R = 3.10$  min, MS [M+H]<sup>+</sup>  $m/z = 516.2$ .

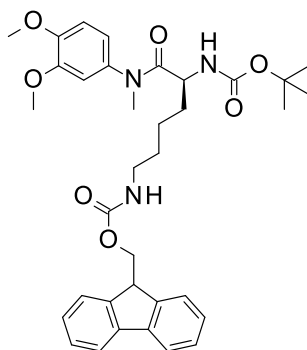
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 2.88 (s, 3H, **h**), 3.52 (s, 3H, **w**), 3.80 (s, 6H, **a** & **a'**), 4.17 (s, 2H, **o**), 6.15 (dd,  $J = 8.7, 2.8$  Hz, 1H, **f**), 6.31 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H, **d**), 6.52 (dd,  $J = 7.5, 2.4$  Hz, 1H, **u**), 6.59-6.64 (m, 1H, **m**), 6.73 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, **e**), 6.79 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H, **r**), 6.96 (dd,  $J = 10.9, 8.5$  Hz, 1H, **n**), 7.03 (s, 1H, **j**), 7.14-7.24 (m, 1H, **s**).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 25.9 (**o**), 40.1 (**h**), 55.9 (**a'**), 56.0 (**a**), 56.6 (**w**), 100.1 (**d**), 105.8 (**f**), 111.1-111.4 (m, **r**), 112.6 (**e**), 112.7 (d,  $J = 2.5$  Hz, **p**), 113.4 (t,  $J = 19.2$  Hz, **u**), 115.9 (d,  $J = 19.2$

Hz, **n**), 119.7 (d,  $J = 7.3$  Hz, **m**), 123.7 (**j**), 129.3 (t,  $J = 10.2$  Hz, **l**), 130.6 (d,  $J = 3.6$  Hz, **s**), 138.6 (**k**), 139.3 (**i**), 142.9 (**g**), 143.2 (**c**), 147.6 (d,  $J = 12.0$  Hz, **v**), 149.8 (**b**), 152.1 (d,  $J = 249.3$  Hz, **t**), 161.2 (dd,  $J = 250.3$  Hz,  $J = 7.7$  Hz, **q**).

### **Compound 3:**

**Step 2:** 9H-fluoren-9-ylmethyl N-[(5S)-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)-6-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-6-oxo-hexyl]carbamate (**3b**)

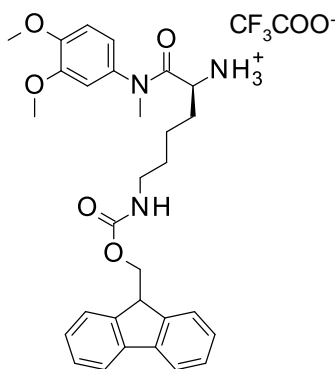


In a 50 mL flask were added 3,4-dimethoxy-N-methyl-aniline (**1a**) (500 mg, 2.99 mmol), 6 mL of EtOAc, (2R)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-6-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino) hexanoic acid (1681.33 mg, 3.59 mmol), diisopropylethylamine (1.57 mL, 8.97 mmol) and T3P® (2.64 mL, 4.49 mmol). The reaction mixture was then stirred at 50°C for 1 hour. The reaction mixture was diluted in EtOAc, washed with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and with brine, and the organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness to give 1.85 g of the titled product as dark red oil, leading to a 100% yield. It was used without further purification in the next step of the synthesis.

LC-MS:  $t_R = 3.33$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 618.3$ .

**Step 3:** [(1S)-1-[(3,4-dimethoxyphenyl)-methyl-carbamoyl]-5-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)pentyl]ammonium;2,2,2-trifluoroacetate (**3c**)

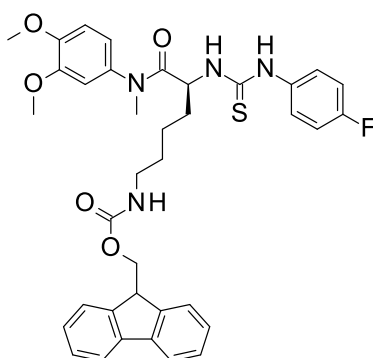




9H-fluorene-9-ylmethyl N-[(5S)-5-(*tert*-butoxycarbonylamino)-6-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-6-oxo-hexyl]carbamate (**3b**) (1.85 g, 2.99 mmol) and TFA (2.56 mL, 33.42 mmol) were dissolved in 5 mL of DCM. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1h. 1 mL of TFA was added again at the reaction mixture and it was stirred at room temperature for 30 minutes. The reaction mixture was evaporated to dryness to give the titled product as purple oil, leading to a 100% yield. It was used without further purification in the next step of the synthesis.

LC-MS:  $t_R = 2.63$  min, MS  $[M+H]^+$   $m/z = 518.3$ .

**Step 4:** 9H-fluorene-9-ylmethyl N-[(5S)-6-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-5-[[*Z*]-N-(4-fluorophenyl)-C-sulfanyl-carbonimidoyl]amino]-6-oxo-hexyl]carbamate (**3d**)



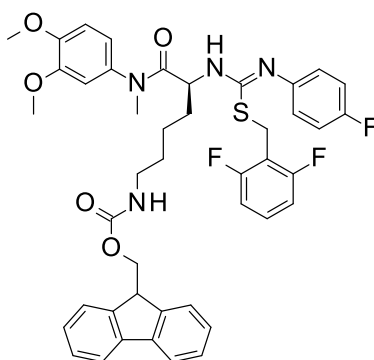
1-fluoro-4-isothiocyanato-benzene (0.46 g, 2.99 mmol) and  $NEt_3$  (0.4 mL, 2.99 mmol) were added in a 500 mL flask in 20 mL of ethanol. [(1S)-1-[(3,4-dimethoxyphenyl)-methyl-carbamoyl]-5-(9H-fluorene-9-ylmethoxycarbonylamino)pentyl]ammonium;2,2,2-trifluoroacetate (**3c**) (1.89 g, 2.99 mmol) was dissolved in 20 mL of ethanol,  $NEt_3$  (0.47 mL, 3.47 mmol) were added, and the mixture was added dropwise at room temperature. Then 1 mL of  $NEt_3$  was added to reach pH 10. After 30 min of reaction, the conversion was complete. The reaction mixture was

evaporated to dryness. Purification of the crude material by flash chromatography using as eluent a mixture of cyclohexane/EtOAc (50/50) gave 1.58 g of the titled product as yellowish oil, leading to a 79% yield.

LC-MS:  $t_R = 3.30$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 671.3$ .

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 1.09-1.36 (m, 4H), 1.46-1.70 (m, 2H), 3.00 (s, 2H), 3.20 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 4.18 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 4.36 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 4.91 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 6.88 (s, 2H), 6.99 (t,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.12 (s, 1H), 7.20-7.42 (m, 6H), 7.57 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.67 (s, 1H), 7.74 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 8.51 (s, 1H).

Step 5: 9H-fluoren-9-ylmethyl N-[(5S)-5-[[[Z]-C-[(2,6-difluorophenyl)methylsulfanyl]-N-(4-fluorophenyl)carbonimidoyl]amino]-6-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-6-oxo-hexyl]carbamate  
**(3e)**

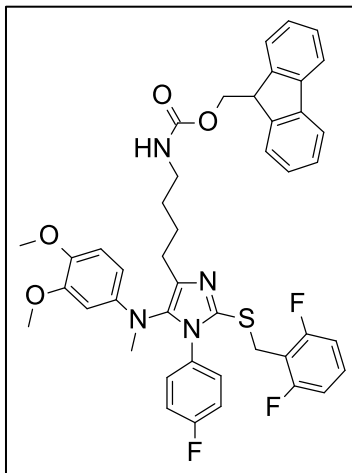


In a 25 mL flask were added 2-(bromomethyl)-1,3-difluoro-benzene (486.14 mg, 2.348 mmol),  $K_2CO_3$  (357.02 mg, 2.583 mmol) and 11.74 mL of acetonitrile. The suspension was stirred at room temperature for 10 minutes and 9H-fluoren-9-ylmethyl N-[(5S)-6-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-5-[[[4-fluoroanilino)-sulfanyl-methyl]amino]-6-oxo-hexyl]carbamate (**3d**) (1.58 g, 2.35 mmol) was then added. The suspension was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was then evaporated, residue was dissolved in EtOAc, washed with water and brine, organic phase was dried over  $MgSO_4$  and evaporated to dryness to give 1.87 g of the titled product as dark oil, leading to a 89% yield.

LC-MS:  $t_R = 3.73$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 797.6$ .

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 1.30 (brs, 4H), 1.62 (brs, 3H), 3.08 (brs, 2H), 3.27 (brs, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 4.08 (brs, 2H), 4.19 (m, 1H), 4.39 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 4.70 (brs, 1H), 5.24 (brs, 1H), 6.74 (brs, 1H), 6.75-6.95 (m, 8H), 7.15-7.23 (m, 1H), 7.30 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.39 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.57 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.76 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H).

**Step 6:** 9H-fluoren-9-ylmethyl N-[4-[2-[(2,6-difluorophenyl)methylsulfanyl]-5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-4-yl]butyl]carbamate (**3**)



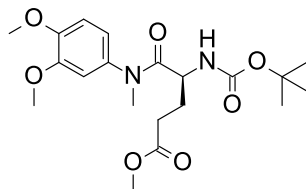
The titled compound was obtained as a yellow solid (507 mg, 32%), following procedure C, using 9H-fluoren-9-ylmethyl N-[(5S)-5-[[Z]-C-[(2,6-difluorophenyl)methylsulfanyl]-N-(4-fluorophenyl)carbonimidoyl]amino]-6-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-6-oxo-hexyl]carbamate (**3e**) (1.625 g, 2.039 mmol).

LC-MS:  $t_R = 3.71$  min, MS  $[M+H]^+$   $m/z = 779.3$ .

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 1.47-1.60 (m, 2H), 1.61-1.74 (m, 2H), 2.43 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 2.83 (s, 3H), 3.15-3.22 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 4.07 (s, 2H), 4.21 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 4.38 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 5.03 (brs, 1H), 6.04 (dd,  $J = 8.7, 2.8$  Hz, 1H), 6.18 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 6.70-6.81 (m, 3H), 6.88-6.94 (m, 4H), 7.09-7.20 (m, 1H), 7.30 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.38 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.60 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.75 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H).

**Compound 4:**

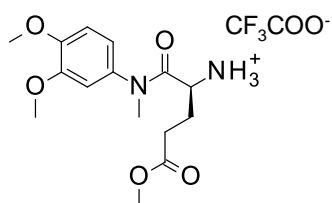
Step 2: Methyl (4S)-4-(*tert*-butoxycarbonylamino)-5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-5-oxo-pentanoate (**4b**)



In a 50 mL flask were added 3,4-dimethoxy-N-methyl-aniline (**1a**) (500 mg, 2.99 mmol), 6 mL of EtOAc, (2R)-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)-5-methoxy-5-oxo-pentanoic acid (937.55 mg, 3.59 mmol), T3P® (2.64 mL, 4.49 mmol) and diisopropylethylamine (1.57 mL, 8.97 mmol). The reaction mixture was then stirred at 50°C for 1 hour. The reaction mixture was diluted in EtOAc, washed with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and with brine, and the organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness to give 1.19 g of the titled product as brown oil, leading to a 97% yield. It was used without further purification in the next step of the synthesis.

LC-MS:  $t_R = 2.53$  min, MS [M+H]<sup>+</sup>  $m/z = 411.2$ .

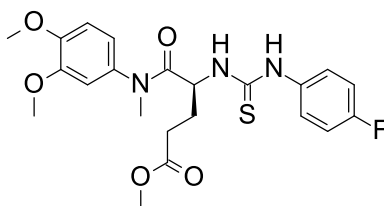
Step 3: [(1S)-1-[(3,4-dimethoxyphenyl)-methyl-carbamoyl]-4-methoxy-4-oxo-butyl]ammonium;2,2,2-trifluoroacetate (**4c**)



Methyl (4S)-4-(*tert*-butoxycarbonylamino)-5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-5-oxo-pentanoate (**4b**) (1.19 g, 2.89 mmol) and TFA (1.5 mL, 19.6 mmol) were dissolved in 5 mL of DCM and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1h. The reaction mixture was evaporated to dryness. The product will be used in the next step of the synthesis without further purification (yield was considered to be 100%).

LC-MS:  $t_R = 1.65$  min, MS [M+H]<sup>+</sup>  $m/z = 311.1$ .

**Step 4:** Methyl (4S)-5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-4-[[[Z]-N-(4-fluorophenyl)-C-sulfanyl-carbonimidoyl]amino]-5-oxo-pentanoate (**4d**)



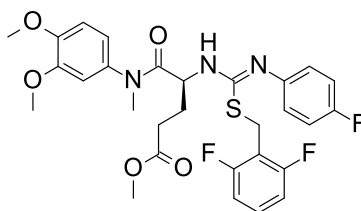
4-fluorophenylisothiocyanate (0.44 g, 2.89 mmol) and  $\text{NEt}_3$  (0.39 mL, 2.89 mmol) were added in a 500 mL flask in 20 mL of ethanol. (1S)-1-[(3,4-dimethoxyphenyl)-methyl-carbamoyl]-4-methoxy-4-oxo-butyl]ammonium;2,2,2-trifluoroacetate (**4c**) (1.23 g, 2.89 mmol) was dissolved in 20 mL of ethanol,  $\text{NEt}_3$  (0.47 mL, 3.47 mmol) were added, and the mixture was added dropwise at room temperature. Then 1 mL of  $\text{NEt}_3$  was added to reach pH 10. After 30 min of reaction, the conversion was complete. The reaction mixture was evaporated to dryness. Purification of the crude material by flash chromatography using as eluent a mixture of cyclohexane/EtOAc (50/50) gave 940 mg of the titled product as yellowish oil, leading to a 70% yield.

LC-MS:  $t_R = 2.65$  min, MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 464.1$ .

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 1.73-1.89 (m, 1H), 1.89-2.03 (m, 2H), 2.10-2.37 (m, 2H), 3.22 (s, 3H), 3.57 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 6.91 (s, 2H), 7.00-7.12 (m, 3H), 7.27 (s, 2H), 7.28 (m, 1H), 8.26 (s, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 27.2, 29.9, 38.2, 51.7, 55.0, 56.0, 56.3, 110.9, 111.4, 116.4 (d,  $J = 22.7$  Hz), 119.1, 127.2 (d,  $J = 8.4$  Hz), 132.9, 134.7, 149.0, 161.0 (d,  $J = 246.9$  Hz), 172.2, 173.1, 181.2.

**Step 5:** Methyl (4S)-4-[[[Z]-C-[(2,6-difluorophenyl)methylsulfanyl]-N-(4-fluorophenyl)carbonimidoyl]amino]-5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-5-oxo-pentanoate (**4e**)

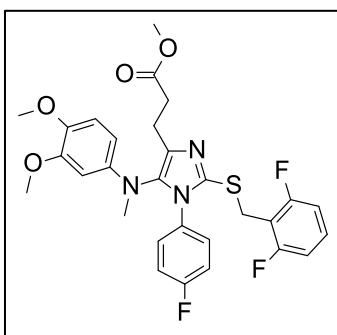


The titled product was obtained without purification as a dark oil (1.05 g, 87%), following procedure A, using methyl (4S)-5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-4-[(4-fluorophenyl)carbamothioylamino]-5-oxo-pentanoate (**4d**) (940 mg, 2.03 mmol).

LC-MS:  $t_R = 3.25$  min, MS  $[M+H]^+$   $m/z = 590.3$ .

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 1.93 (brs, 2H), 2.29 (brs, 2H), 3.27 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.88 (s, 4H), 4.10 (brs, 2H), 4.70 (brs, 1H), 5.40 (brs, 1H), 6.72 (brs, 2H), 6.83-6.94 (m, 8H).

**Step 6: Methyl 3-[2-[(2,6-difluorophenyl)methylsulfanyl]-5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-4-yl]propanoate (**4**)**



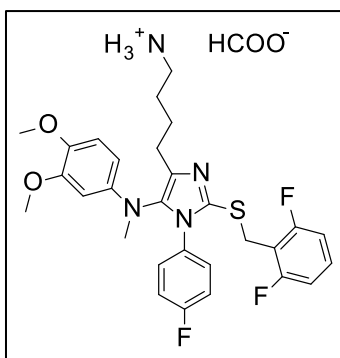
In a 100 mL flask were added methyl (4S)-4-[[[*Z*]-C-[(2,6-difluorophenyl)methylsulfanyl]-N-(4-fluorophenyl)carbonimidoyl]amino]-5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-5-oxo-pentanoate (**4e**) (1 g, 1.7 mmol), T3P® (3.01 mL, 5.1 mmol), diisopropylethylamine (1.88 mL, 10.21 mmol), and 17 mL of EtOAc. The reaction mixture was stirred at 80°C for 24 hours. The reaction mixture was diluted in EtOAc and washed with water, brine, and dried over  $MgSO_4$  and evaporated to dryness. The residue was dissolved again in 17 mL of EtOAc. T3P® (3.01 mL, 5.1 mmol), diisopropylethylamine (1.88 mL, 10.21 mmol) were added at the reaction mixture and it was stirred at 80°C for 24h. The reaction mixture was diluted in EtOAc, washed with water and brine. Organic phase was dried over  $MgSO_4$  and evaporated. The crude material was purified by flash chromatography using as eluent a mixture of cyclohexane/EtOAc (70/30) to give 265 mg of the titled product not clean. The crude material was dissolved in EtOAc and T3P® (0.6 mL, 1.018 mmol), diisopropylethylamine (0.376 mL, 2.035 mmol) were added and the reaction mixture was stirred at 80°C for 24 hours. The reaction mixture was diluted in EtOAc, washed with water and brine. Organic phase was dried over  $MgSO_4$  and evaporated. The crude material was then purified by flash chromatography using as eluent a mixture of cyclohexane/EtOAc (70/30) to give 104 mg of the titled product as yellowish oil, leading to a 11% yield.

LC-MS:  $t_R = 3.55$  min, MS  $[M+H]^+$   $m/z = 572.2$ .

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.67-2.72 (m, 4H), 2.85 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 4.07 (s, 2H), 6.04 (dd,  $J = 8.7, 2.8$  Hz, 1H), 6.17 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 6.72 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.77 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 6.87-6.92 (m, 4H), 7.01-7.21 (m, 1H).

### **Compound 5:**

4-[2-[(2,6-difluorophenyl)methylsulfanyl]-5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-4-yl]butylammonium;formate (**5**)



To a solution of 9H-fluoren-9-ylmethyl N-[4-[2-[(2,6-difluorophenyl)methylsulfanyl]-5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-4-yl]butyl]carbamate (**3**) (0.24 g, 0.31 mmol) in EtOAc (1.45 mL) was added piperidine (0.06 mL, 0.62 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was then evaporated under reduced pressure. Purification of the crude material by preparative HPLC gave 100 mg of the titled product as yellowish oil, leading to a 60% yield.

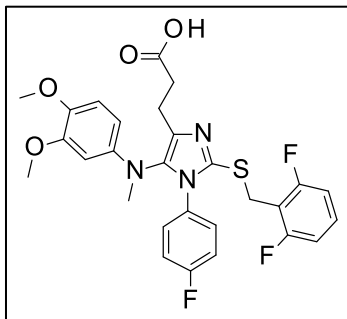
LC-MS:  $t_R = 2.99$  min, MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 557.3$ .

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 1.60-1.80 (m, 4H), 2.32-2.50 (m, 2H), 2.82 (s, 3H), 2.90-3.00 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.94 (s, 2H), 6.03 (dd,  $J = 8.7, 2.4$  Hz, 1H), 6.17 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 5.50-6.50 (m, 3H), 6.70-6.82 (m, 3H), 6.83-6.95 (m, 4H), 7.10-7.21 (m, 1H), 8.46 (brs, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 25.8, 25.9, 26.9, 27.6, 39.0, 56.0, 56.6, 70.6, 98.2, 103.8, 111.1-111.5 (m), 112.9, 114.0 (t,  $J = 19.3$  Hz), 115.9 (d,  $J = 22.8$  Hz), 129.2 (d,  $J = 9.0$  Hz), 129.3 (t,  $J = 9.2$  Hz), 131.1 (d,  $J = 3.1$  Hz), 134.7, 136.4, 137.2, 142.2, 142.9, 149.9, 161.1 (dd,  $J = 249.7, 7.8$  Hz), 162.3 (d,  $J = 249.1$  Hz), 168.6.

**Compound 6:**

3-[2-[(2,6-difluorophenyl)methylsulfanyl]-5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-4-yl]propanoic acid (**6**)



methyl 3-[2-[(2,6-difluorophenyl)methylsulfanyl]-5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-4-yl]propanoate (**4**) (104.6 mg, 0.18 mmol) was dissolved in MeOH (1.83 mL) and NaOH 1N (640  $\mu$ L, 0.64 mmol) was added. The mixture was stirred overnight at room temperature and evaporated to dryness. The residue was dissolved in DCM and washed with HCl 1N, water and brine. The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness to give 95 mg of the titled product as yellowish oil, leading to a 93% yield.

LC-MS:  $t_R$  = 3.30 min, MS [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 558.3.

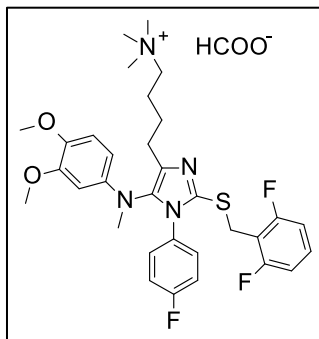
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 2.73 (s, 4H), 2.84 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 4.09 (s, 2H), 6.03 (dd,  $J$  = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 6.16 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H), 6.73 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 6.78 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 2H), 6.85-6.98 (m, 4H), 7.11-7.23 (m, 1H), 8.75 (brs, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 21.1, 26.7, 33.5, 38.9, 56.1, 56.5, 98.4, 104.1, 111.2-111.6 (m), 112.9, 113.4 (t,  $J$  = 19.2 Hz), 116.2 (d,  $J$  = 23.0 Hz), 129.1 (d,  $J$  = 8.9 Hz), 129.6 (t,  $J$  = 10.2 Hz), 130.4 (d,  $J$  = 3.2 Hz), 134.6, 135.2, 137.1, 142.5, 150.0, 161.1 (dd,  $J$  = 250.0, 7.6 Hz), 162.5 (d,  $J$  = 250.0 Hz), 175.8.



**Compound 7:**

4-[2-[(2,6-difluorophenyl)methylsulfanyl]-5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-4-yl]butyl-trimethyl-ammonium;iodide (**7**)

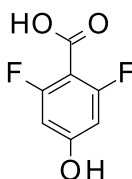


In a 5 mL flask was diluted 4-[2-[(2,6-difluorophenyl)methylsulfanyl]-5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-4-yl]butylammonium;formate (**5**) (45 mg, 0,07 mmol) in 400  $\mu$ L of a mixture of Et<sub>2</sub>O/THF (1/1). Iodomethane (18.59  $\mu$ L, 0.3 mmol) and diisopropylethylamine (13.01  $\mu$ L, 0.07 mmol) were added at the reaction mixture and it was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was evaporated to dryness. The crude material was diluted in EtOAc and washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. Purification of the crude material by preparative HPLC gave 7.3 mg of the titled product as yellowish oil, leading to a 20% yield.

LC-MS:  $t_R$  = 2.98 min, MS [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  = 599.4.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 1.69 (brs, 2H), 1.82 (brs, 2H), 2.45 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 2.87 (s, 3H), 3.31 (brs, 9H), 3.45 (brs, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.03 (s, 2H), 6.06 (dd,  $J$  = 8.6, 2.6 Hz, 1H), 6.18 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 6.76 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 6.81 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 2H), 6.90-6.98 (m, 4H), 7.15-7.25 (m, 1H), 8.61 (s, 1H).

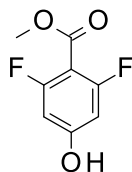
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 22.6, 25.3, 25.6, 26.6, 29.8, 34.1, 39.2, 53.5, 56.2, 56.7, 66.9, 98.5, 104.1, 111.5 (m), 113.0, 114.1 (t,  $J$  = 19.2 Hz), 116.1 (d,  $J$  = 22.9 Hz), 129.1 (d,  $J$  = 8.4 Hz), 129.4 (t,  $J$  = 10.2 Hz), 131.1 (d,  $J$  = 3.1 Hz), 134.9, 136.3, 136.9, 142.3, 143.0, 149.9, 161.2 (dd,  $J$  = 249.3, 7.8 Hz), 162.4 (d,  $J$  = 249.3 Hz).

6. Compounds with PEGylated kinetophoresIntermediate 8v :2,6-difluoro-4-hydroxy-benzoic acid (**8i**)

2,6-Difluoro-4-hydroxy-benzonitrile (1.5 g, 9.67 mmol) was dissolved in 7 mL distilled water and a solution of NaOH (1.35g, 33.85 mmol) in 4 mL water was then added. Reaction mixture was then heated at reflux for 4 days. Heating was then stopped, and reaction mixture was acidified by adding concentrated HCl, and extracted with Et<sub>2</sub>O. Organic phase was then extracted and washed with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub>. This aqueous solution was then acidified by adding concentrated HCl, and then extracted by Et<sub>2</sub>O. Organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated, to give 1.58 g of the titled product as a white solid, leading to a 94% yield.

LC-MS:  $t_R = 0.94$  min (+ injection peak), MS [M-H]<sup>-</sup> m/z = 172.9.

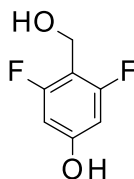
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) 6.47-6.51 (m, 2H), 10.96 (brs, 1H), 13.20 (brs, 1H).

2,6-Difluoro-4-hydroxy-benzoic acid methyl ester (**8ii**)

2,6-difluoro-4-hydroxy-benzoic acid (**8i**) (1.58 g, 9.08 mmol) was dissolved in 18 mL of methanol, concentrated sulphuric acid (257  $\mu$ L, 4.81 mmol) was then added and reaction mixture was heated at reflux overnight. Reaction mixture was then evaporated, and residue was dissolved in EtOAc, washed twice with water, brine, and dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to give 1.48 g of the titled product as a white powder, leading to a 87 % yield.

LC-MS:  $t_R = 2.63$  min, MS [M-H]<sup>-</sup> m/z = 187.1.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) 3.80 (s, 3H), 6.52-6.56 (m, 2H), 11.12 (s, 1H).

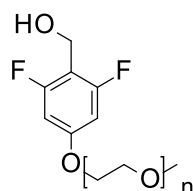
3,5-Difluoro-4-hydroxymethyl-phenol (**8iii**).

In a 100 mL flask were added 2,6-Difluoro-4-hydroxy-benzoic acid methyl ester (**8ii**) (1.48 g, 7.87 mmol), 26 mL anhydrous THF, and 1M solution of diisobutylaluminum hydride (DIBAL-H) (34 mL, 32.83 mmol) in cyclohexane at 0-5°C. Reaction mixture was then stirred at this temperature for 1.5 h, and then poured into a 250 mL flask containing cold (0-5°C) 1M aqueous potassium sodium L-tartrate solution (27 mL, 26.75 mmol). Reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. Aqueous phase was extracted by EtOAc, and combined organic phases were then washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated. Aqueous phase was acidified to pH 5, and extracted by EtOAc. Organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness to give 1.0 g of the titled product as a yellowish powder, leading to a 80% yield.

LC-MS:  $t_R = 2.22$  min, MS [M-H]<sup>-</sup> m/z = 159.0.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) 4.36 (d,  $J = 5.2$  Hz, 2H), 5.00 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H), 6.40-6.42 (m, 2H), 10.28 (s, 1H).

[2,6-difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-phenyl]-methanol (average MW = 2160 g/mol)  
(**8iv**)

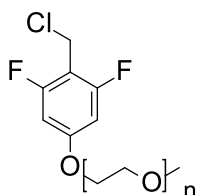


Poly(ethylene glycol) methyl ether tosylate (average MW = 2 000 g/mol) (1.7 mmol, 3694 mg) was dissolved in acetonitrile (6.3 mL), 3,5-Difluoro-4-hydroxymethyl-phenol (**8iii**) (1.87 mmol, 300 mg) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.7 mmol, 236 mg) were added. The reaction mixture was stirred overnight under reflux. The reaction mixture was then cooled down, and filtered. The filtrate was concentrated under vacuum. Then residue was partially solubilize in a mixture of DCM/MeOH (99/1), and Et<sub>2</sub>O was then added, leading to the formation of a precipitate (mainly corresponding to the tosylate), which was filtered. Filtrate was evaporated to dryness to give

3.6 g of a white solid corresponding to the titled product, leading to a 89% yield. It was used without further purification in the next step.

LC-MS:  $t_R = 2.33$  min, MS  $[M+2H_3O]^{2+}$   $m/z = 1096.0$  ( $n = 45$ ).

2-(chloromethyl)-1,3-difluoro-5-(2-methoxypolyethyleneglycoxy)benzene (average MW = 2178 g/mol) (**8v**)

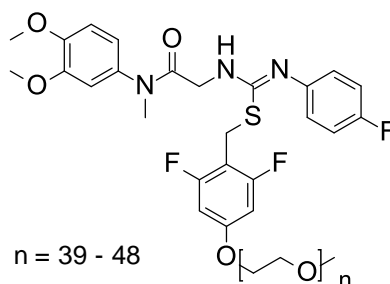


[2,6-difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-phenyl]-methanol (**8iv**) (3.6 g, 1.67 mmol) and  $NEt_3$  (281  $\mu$ L, 2.08 mmol) were dissolved in 4 mL dry DCM at 0°C. Mesylchloride (130  $\mu$ L, 1.67 mmol) was then added dropwise, and the mixture was stirred at room temperature overnight. Reaction mixture was evaporated to dryness. Conversion was considered to be total regarding the NMR analysis. Yield was not calculated, and estimated to be 100%.

LC-MS:  $t_R = 2.65$  min, MS  $[M+2H_3O]^{2+}$   $m/z = 1105.2$  ( $n = 45$ ).

### Compound 8:

Step 5: 2-[2-[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzyl]-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**8a**) (average MW = 2467 g/mol –  $n = 39-48$ )

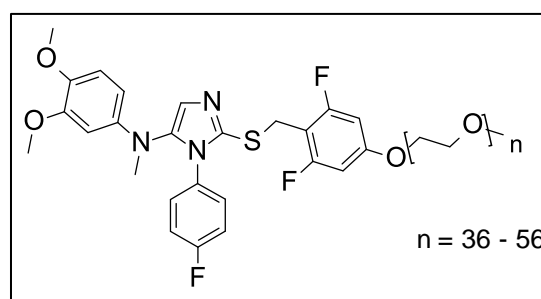


In a 50 mL flask were added 2-(chloromethyl)-1,3-difluoro-5-(2-methoxypolyethyleneglycoxy)benzene (**8v**) (3.46 g, 1.59 mmol),  $K_2CO_3$  (330 mg, 2.380 mmol), and 8 mL of acetonitrile. The suspension was stirred at room temperature for 10 min, and N-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-[[[Z]-N-(4-fluorophenyl)-C-sulfanyl-carbonimidoyl]amino]-N-methyl-acetamide (**1d**) (0,6 g, 1,59 mmol)

was then added. The suspension was stirred at room temperature for 24 hours. The solvent was then evaporated. Residue was then purified by flash chromatography using as eluent a mixture of DCM/MeOH (90/10) to give 2.19 g of the titled compound as a yellow solid, leading to a 55% yield.

LC-MS:  $t_R = 2.75$  min, MS  $[M+H+H_3O]^{2+}$   $m/z = 1267.4$  ( $n = 45$ ).

**Step 6:** [2-[2,6-Difluoro-4-(2-methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzylsulfanyl]-3-(4-fluoro-phenyl)-3H-imidazol-4-yl]-[3,4-dimethoxy-phenyl]-methyl-amine (average MW = 2502 g/mol –  $n = 36 - 56$ ) (**8**)

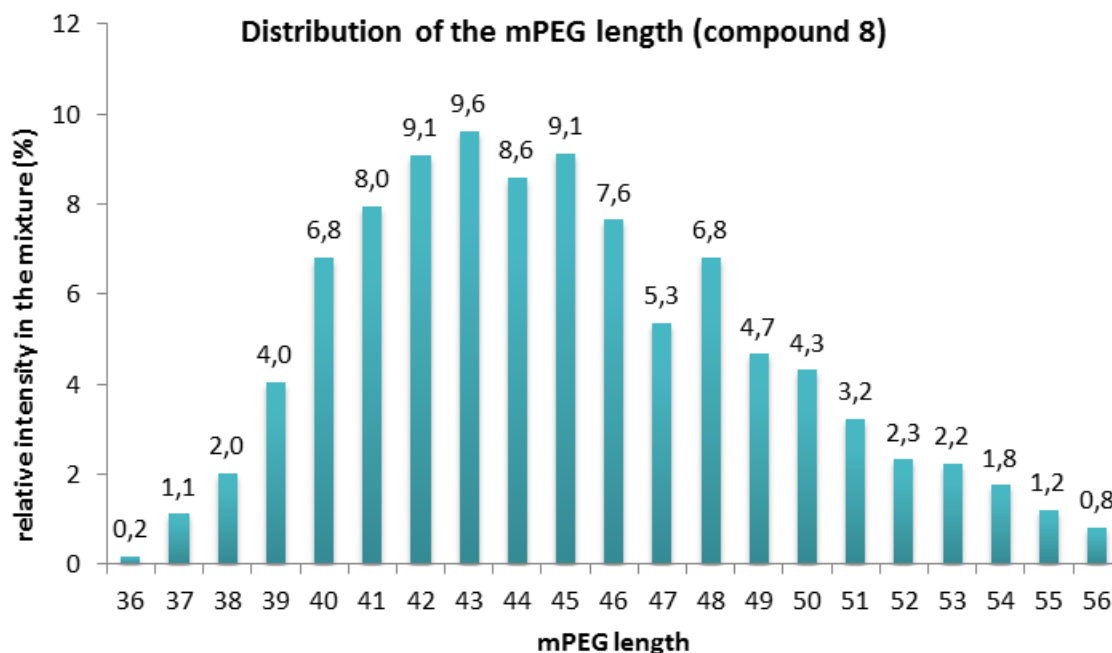
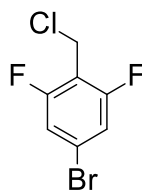


2-[2-[2,6-Difluoro-4-(methoxy-polyethyleneglycoxy)-benzyl]-3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-(3,4-dimethoxy-phenyl)-N-methyl-acetamide (**8a**) (2.1 g, 0.84 mmol) was dissolved in 2.9 mL of EtOAc. Diisopropylethylamine (875  $\mu$ L, 5.0 mmol), and T3P® (1.48 mL, 2.5 mmol) were then added. The mixture was heated under microwave irradiation at 150°C for 10 min. The reaction mixture was evaporated to dryness. Residue was then purified by flash chromatography using as eluent a mixture of DCM/MeOH (90/10), and then by preparative HPLC to give 445 mg of the titled product as a yellowish oil, leading to a 21% yield.

LC-MS:  $t_R = 2.79$  min, MS  $[M+H+H_3O]^{2+}$   $m/z = 1258.2$  ( $n = 45$ ).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) 2.93 (s, 3H), 3.33 (s, 3H), 3.45-3.69 (m, 180H), 3.72 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.76-3.87 (m, 5H), 4.03-4.09 (m, 3H), 4.05 (s, 2H), 6.10-6.15 (dd,  $J = 8.5, 2.6$ , 1H), 6.25 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 6.43 (d,  $J = 9.4$  Hz, 2H), 6.78 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.99 (s, 2H), 7.02 (s, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) 25.8, 40.1, 55.8, 56.4, 58.6, 68.3, 69.2, 70.5, 70.8, 71.9, 98.1-98.6 (m), 100.1, 105.4, 105.8 (t,  $J = 20.0$  Hz), 112.9, 115.7 (d,  $J = 22.8$  Hz), 124.2, 129.3, 129.4, 138.0, 139.7, 142.8, 143.3, 149.8, 159.7 (t,  $J = 13.0$  Hz), 161.1 (dd,  $J = 248.0, 11.6$  Hz), 162.2 (d,  $J = 248.0$  Hz).

**Intermediate 9i:**5-bromo-2-(chloromethyl)-1,3-difluoro-benzene (**9i**)

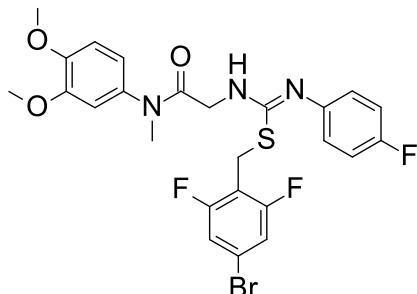
(4-Bromo-2,6-difluoro-phenyl)-methanol (2.5 g, 11.21 mmol) and  $\text{NEt}_3$  (1.67 mL, 12.33 mmol) were dissolved in 23 mL of dry DCM at  $0^\circ\text{C}$ . Mesylchloride (870  $\mu\text{L}$ , 11.21 mmol) was then added dropwise, and the mixture was stirred at room temperature overnight. Water was then added to quench the reaction. The organic phase was then washed with water and brine, and dried over  $\text{MgSO}_4$ , and then was evaporated to give 2.7 g of the titled product as a yellow oil, and was used without further purification in the next step of the synthesis (Yield was considered to be 100%).

LC-MS:  $t_R = 3.08$  min.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 4.61 (s, 2H), 7.10-7.16 (m, 2H).

**Compound 9:**

**Step 5:** 2-[[*Z*]-C-[(4-bromo-2,6-difluoro-phenyl)methylsulfanyl]-N-(4-fluorophenyl)carbonimidoyl]amino]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methyl-acetamide (**9a**)

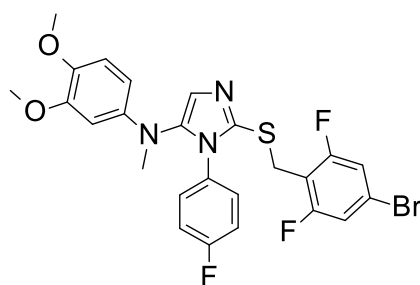


In a 50 mL flask were added N-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-2-[3-(4-fluoro-phenyl)-isothioureido]-N-methyl-acetamide (**1d**) (1 g, 2.54 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (352 mg, 2.54 mmol), NaI (191 mg, 1.27 mmol), and 13 mL of acetonitrile. The suspension was stirred at room temperature for 10 min, and 5-bromo-2-(chloromethyl)-1,3-difluoro-benzene (**9i**) (614 mg, 2.54 mmol) was then added. The suspension was stirred at room temperature overnight. 5-bromo-2-(chloromethyl)-1,3-difluoro-benzene (**9i**) (120 mg) was added at the reaction mixture and it was stirred at room temperature for 24h. The crude material was then evaporated, residue was dissolved in EtOAc, washed with water and brine, organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated. Purification of the crude material by flash chromatography using as eluent a mixture of DCM/Acetone (98/2) gave 1.05 g of the titled product as a yellowish oil, leading to a 62% yield.

LC-MS:  $t_R = 3.50$  min, MS [M+H]<sup>+</sup>  $m/z = 584.0$ .

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 3.29 (s, 3H), 3.87 (m, 8H), 4.02 (s, 2H), 5.78 (s, 1H), 6.68-6.77 (m, 4H), 6.84-6.93 (m, 4H), 7.02-7.08 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H).

**Step 6:** 2-[(4-bromo-2,6-difluoro-phenyl)methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**9b**)

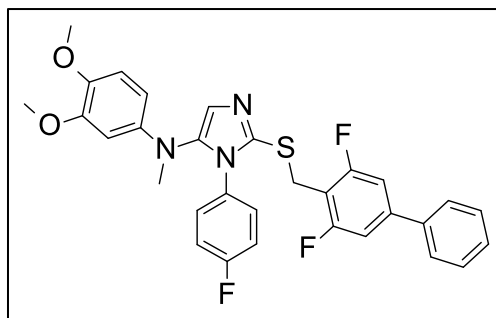


In a microwave tube were added 500 mg of 2-[[[Z]-C-[(4-bromo-2,6-difluoro-phenyl)methylsulfanyl]-N-(4-fluorophenyl)carbonimidoyl]amino]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methyl-acetamide (**9a**) (500 mg, 0.86 mmol), 9 mL of EtOAc, T3P® (1.52 mL, 2.56 mmol) and diisopropylethylamine (950  $\mu$ L, 5.15 mmol). The reaction mixture was heated under microwave irradiation at 150°C for 10 min. The crude material was diluted in EtOAc and was then washed with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and with brine. Organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. The crude material was recrystallized in a mixture of cyclohexane/ethanol and gave 174 mg of brown crystals, leading to a 36 % yield. Purification of the crude material by flash chromatography using as eluent a mixture of DCM/MeOH (99/1) gave 25 mg of the titled product as a yellow oil, leading to a 5% yield.

LC-MS:  $t_R = 3.42$  min, MS [M+H]<sup>+</sup>  $m/z = 565.8$ .

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 2.92 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 4.06 (s, 2H), 6.15 (dd,  $J = 8.7, 2.7$  Hz, 1H), 6.26 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.72 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.96-7.01 (m, 7H).

**Step 7:** 2-[(2,6-difluoro-4-phenyl-phenyl)methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**9**)





The titled product was obtained after purification (70 mg, 70%), following procedure D, using 2-[(4-bromo-2,6-difluoro-phenyl)methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**9b**) (50 mg, 0.18 mmol) and phenylboronic acid (13 mg, 0.21 mmol).

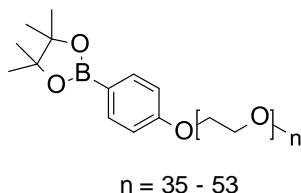
LC-MS:  $t_R = 3.53$  min, MS  $[M+H]^+$   $m/z = 562.2$ .

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.91 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 4.17 (s, 2H), 6.15 (dd,  $J = 8.9, 2.8$  Hz, 1H), 6.29 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 6.68 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 6.87-6.97 (m, 4H), 6.98-7.05 (m, 3H), 7.38-7.49 (m, 5H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 26.9, 40.1, 55.9, 56.4, 100.0, 105.7, 109.5-110.0 (m), 112.1 (t,  $J = 19.8$  Hz), 112.3, 115.8 (d,  $J = 22.8$  Hz), 124.4, 126.8, 128.6, 129.1, 129.2 (d,  $J = 9.0$  Hz), 130.8 (d,  $J = 2.9$  Hz), 138.1, 138.4 (t,  $J = 2.4$  Hz), 139.7, 142.8, 143.0 (t,  $J = 10.0$  Hz), 143.1, 149.6, 161.3 (dd,  $J = 249.3, 8.8$  Hz), 162.2 (d,  $J = 249.3$  Hz).

### **Intermediate 10i:**

2-[4-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]phenyl]-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane (average MW = 2175 g/mol –  $n = 35 - 53$ ) (**10i**)

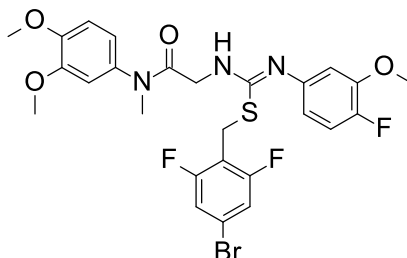


Poly(ethylene glycol) methyl ether tosylate (average MW = 2 000 g/mol) (160 mg, 0.07 mmol) was dissolved in acetonitrile (250  $\mu$ L), 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenol (17.86 mg, 0.08 mmol) and  $K_2CO_3$  (12.24 mg, 0.09 mmol) were added. The reaction mixture was stirred overnight under reflux. The reaction mixture was then cooled down, and filtered. The filtrate was concentrated under vacuum and purified by preparative HPLC to give 51 mg of the titled product, leading to a 31% yield.

LC-MS:  $t_R = 2.95$  min. MS  $[M+2H_3O]^{2+}$   $m/z = 1126.1$  ( $n = 45$ ).

**Compound 10:**

**Step 5:** 2-[[*Z*]-C-[(4-bromo-2,6-difluoro-phenyl)methylsulfanyl]-N-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)carbonimidoyl]amino]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methyl-acetamide (**10a**)

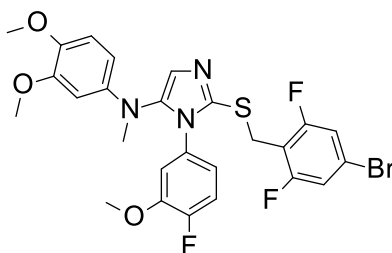


In a 100 mL flask were added N-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-[[*Z*]-N-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-C-sulfanyl-carbonimidoyl]amino]-N-methyl-acetamide (**2d**) (2.4 g, 5.89 mmol),  $K_2CO_3$  (0.81 g, 5.89 mmol), NaI (0.44 g, 2.95 mmol), and 30 mL of acetonitrile. 5-bromo-2-(chloromethyl)-1,3-difluoro-benzene (Intermediate **9i**) (1.42 g, 5.89 mmol) was then added. The suspension was stirred at room temperature overnight. 5-bromo-2-(chloromethyl)-1,3-difluoro-benzene (Intermediate **9i**) (0.630 g, 2.60 mmol) was added at the reaction mixture and it was stirred at room temperature for 4 hours. The crude material was then evaporated, residue was dissolved in EtOAc, washed with water and brine, organic phase was dried over  $MgSO_4$  and evaporated to give 3.4 g of titled product as yellowish oil, leading to a 95% yield.

LC-MS:  $t_R = 3.35$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 614.0$ .

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 3.30 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 4.06 (s, 2H), 5.80 (s, 1H), 6.31 (s, 1H), 6.44 (d,  $J = 6.6$  Hz, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.75-6.81 (m, 1H), 6.86-6.94 (m, 2H), 7.03-7.13 (m, 2H).

**Step 6:** 2-[(4-bromo-2,6-difluoro-phenyl)methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**10b**)



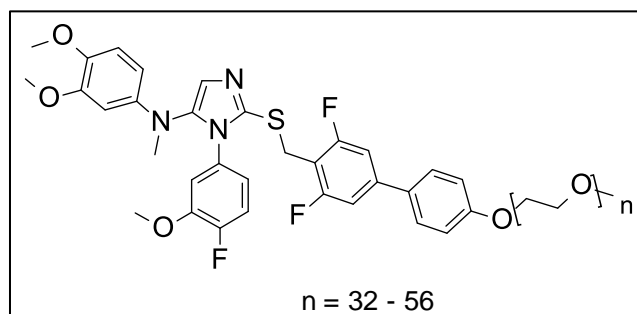
The titled product was obtained without purification as dark oil (3.1 g, 93%), following procedure B, using 2-[[[Z]-C-[(4-bromo-2,6-difluoro-phenyl)methylsulfanyl]-N-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)carbonimidoyl]amino]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methyl-acetamide (**10a**) (3.44 g, 5.62 mmol).

LC-MS:  $t_R = 3.28$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 596.0$ .

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.91 (s, 3H), 3.55 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 4.16 (s, 2H), 6.15 (dd,  $J = 8.7, 2.7$  Hz, 1H), 6.30 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.50 (dd,  $J = 7.5, 2.4$  Hz, 1H), 6.55-6.60 (m, 1H), 6.73 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.95-7.05 (m, 3H), 7.05 (s, 1H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 25.7, 40.1, 56.1, 56.2, 56.7, 99.9, 105.6, 112.6, 112.7 (d,  $J = 2.6$  Hz), 113.2 (t,  $J = 19.5$  Hz), 115.1-115.5 (m), 115.3 (d,  $J = 9.8$  Hz), 116.0 (d,  $J = 19.7$  Hz), 119.6 (d,  $J = 7.2$  Hz), 121.2 (t,  $J = 12.2$  Hz), 124.9, 130.9 (d,  $J = 3.8$  Hz), 138.0, 139.3, 142.7, 143.4, 147.6 (d,  $J = 11.6$  Hz), 149.8, 152.0 (d,  $J = 249.2$  Hz), 161.0 (dd,  $J = 253.7, 8.9$  Hz).

Step 7: 4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]-N-[2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethyl]benzamide (**10**) (average MW = 2514 g/mol,  $n = 32 - 56$ )

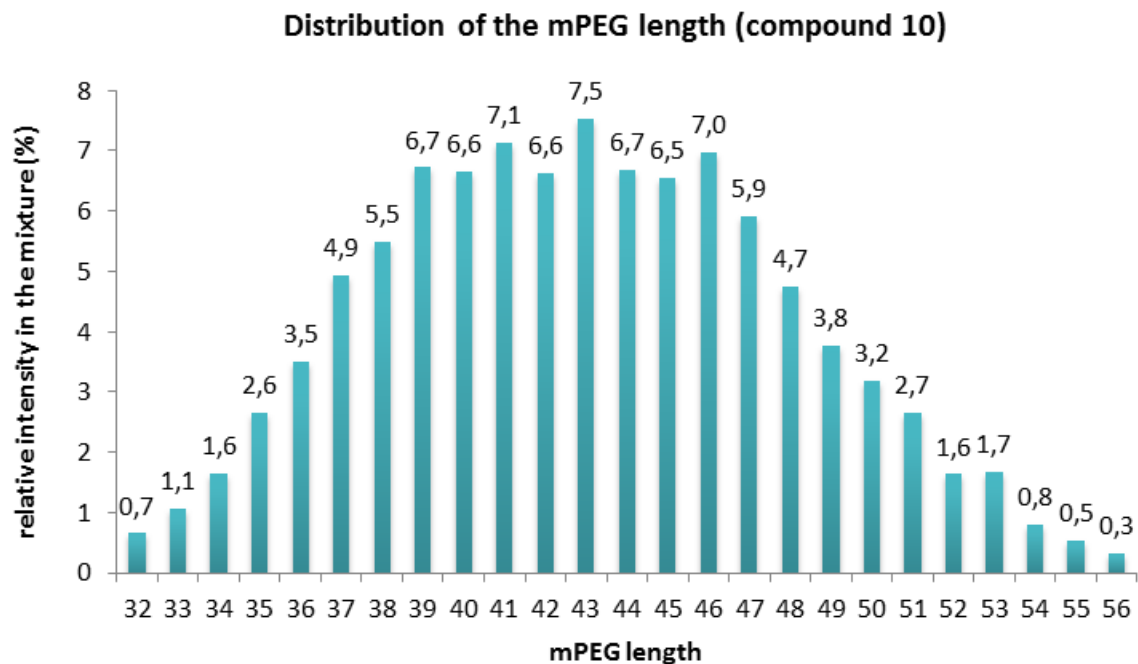


The titled product was obtained after purification by preparative HPLC as a yellow oil (28 mg, 46%), following procedure D, using 2-[(4-bromo-2,6-difluoro-phenyl)methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**10b**) (14 mg, 0.02 mmol) and 2-[4-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]phenyl]-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane (Intermediate **10i**) (52.2 mg, 0.02 mmol).

LC-MS:  $t_R = 3.06$  min, MS  $[M+H+H_3O]^{2+} m/z = 1289.3$  ( $n = 44$ ).

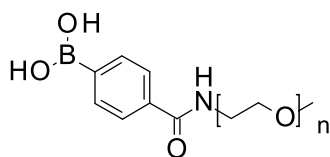
$^1H$  NMR (300 MHz,  $CD_2Cl_2$ ):  $\delta$  (ppm) 2.91 (s, 3H), 3.33 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.49-3.70 (m, 170H), 3.72 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.82-3.87 (m, 4H), 4.16 (m, 4H), 6.12-6.16 (dd,  $J = 8.5, 2.7$  Hz, 1H), 6.29 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.53-6.57 (dd,  $J = 7.6, 2.2$  Hz, 1H), 6.57-6.62 (m, 1H), 6.70 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 6.93-7.02 (m, 4H), 7.05 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.48 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) 29.7, 39.9, 55.9, 56.5, 58.6, 67.7, 69.9, 70.5, 70.8, 71.9, 100.0, 105.4, 109.0 (d,  $J = 24.6$  Hz), 111.6 (t,  $J = 18.5$  Hz), 113.1, 115.0, 115.7 (d,  $J = 19.5$  Hz), 119.8, 124.8, 127.8, 130.7, 131.2, 138.1, 139.3, 142.5, 142.7, 143.6, 147.5, 147.7, 150.0, 151.9 (d,  $J = 249.6$  Hz), 159.4, 161.4 (dd,  $J = 249.6, 11.0$  Hz).



### **Intermediate 11i:**

[4-[2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethylcarbamoyl]phenyl]boronic acid (**11i**) (average MW = 1009 g/mol,  $n = 15 - 21$ ).



$n = 15-21$

In a 25 mL flask were added 4-boronobenzoic acid (30 mg, 0.18 mmol), 2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethanamine (average MW = 750 g/mol) (141.01 mg, 0.18 mmol), HOBt (24.5 mg, 0.18 mmol), DCC (37.3 mg, 0.18 mmol) and  $\text{NEt}_3$  (25  $\mu\text{L}$ , 0.18 mmol) in 400  $\mu\text{L}$  of DCM. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, and the residue was diluted in EtOAc and washed with water. The aqueous layer was extracted with DCM, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and

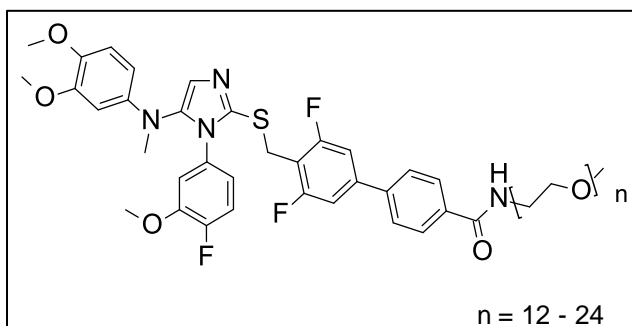
concentrated under reduced pressure to give 110 mg of the titled product as colorless oil, leading to a 66% yield. It was used without further purification in the next step of the synthesis.

LC-MS :  $t_R = 2.40$  min, MS  $[M+H_3O]^+ m/z = 989.6$  ( $n = 18$ ).

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*6):  $\delta$  (ppm) 3.23 (s, 3H), 3.32 (s, 4H), 3.40-3.44 (m, 4H), 3.45-3.60 (m, 62H), 7.78 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.84 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 8.17 (s, 1H).

### **Compound 11:**

4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]-N-[2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethyl]benzamide (**11**) (average MW = 1394 g/mol,  $n = 12 - 24$ ).

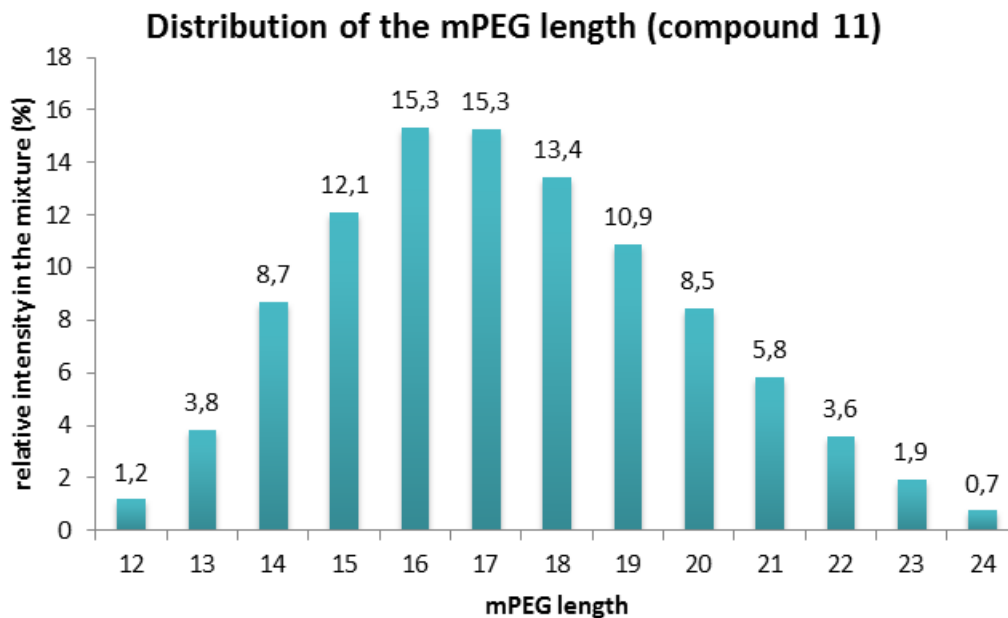


The titled product was obtained as an oily residue, after purification by preparative HPLC (40 mg, 43%), following Procedure D, using 2-[(4-bromo-2,6-difluoro-phenyl)methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**10b**) (40 mg, 67  $\mu$ mol) and [4-[2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethylcarbamoyl]phenyl]boronic acid (**11i**) (62.4 mg, 67  $\mu$ mol).

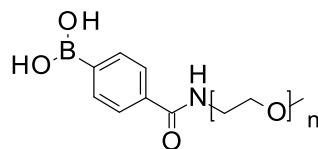
LC-MS :  $t_R = 3.02$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 1353.8$  ( $n = 16$ ).

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CD_2Cl_2$ ):  $\delta$  (ppm) 2.91 (s, 3H), 3.33 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 3.48-3.51 (m, 2H), 3.53-3.70 (m, 72H), 3.72 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 4.17 (s, 2H), 6.13-6.17 (dd,  $J = 8.7, 2.8$  Hz, 1H), 6.29 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 6.57-6.60 (dd,  $J = 7.9, 2.4$  Hz, 1H), 6.61-6.60 (m, 1H), 6.71 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.96 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.99 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.13 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.61 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.90 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CD_2Cl_2$ ):  $\delta$  (ppm) 26.2, 40.3, 56.2, 56.3, 56.9, 59.0, 70.1, 70.7, 70.8, 70.9, 72.3, 100.4, 105.8, 109.8-110.5 (m), 113.4 (d,  $J = 2.6$  Hz), 113.5, 113.5 (t,  $J = 19.7$  Hz), 116.1 (d,  $J = 19.8$  Hz), 120.1 (d,  $J = 7.2$  Hz), 125.1, 127.2, 128.3, 131.6 (d,  $J = 3.5$  Hz), 135.2, 138.3, 139.8, 141.2 (t,  $J = 1.7$  Hz), 142.1 (t,  $J = 9.8$  Hz), 143.2, 144.0, 148.0 (d,  $J = 11.5$  Hz), 150.4, 152.4 (d,  $J = 247.9$  Hz), 161.8 (dd,  $J = 248.9, 8.6$  Hz), 166.8.

**Intermediate 12i:**

[4-[2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethylcarbamoyl]phenyl]boronic acid (**12i**) (average MW = 2164 g/mol, n = 36 - 53).



n = 36 - 53

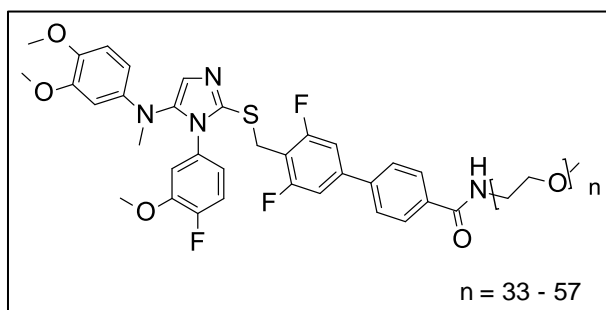
In a 25 mL flask were added 4-boronobenzoic acid (20 mg, 0.12 mmol), 2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethanamine (average MW = 2 000 g/mol) (243 mg, 0.12 mmol), HOBt (17 mg, 0.12 mmol), DCC (25 mg, 0.12 mmol) and NEt<sub>3</sub> (16.26 μL, 0.12 mmol) in 400 μL of DCM. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. HOBt (17 mg, 0.12 mmol), DCC (25 mg, 0.12 mmol) and NEt<sub>3</sub> (16.26 μL, 0.12 mmol) were added again at the reaction mixture and it was stirred at room temperature for 24h at 40°C. The reaction mixture was filtered and concentrated under reduced pressure. Purification of the crude material by preparative HPLC gave 166 mg of the titled product as a white powder, leading to a 64% yield.

LC-MS: t<sub>r</sub> = 2.55 min, MS [M+2H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup> m/z = 1098.5 (n = 45).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ (ppm) 3.36 (s, 3H), 3.47-3.75 (m, 176H), 6.27(s, 2H), 7.04 (s, 1H), 7.79 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.91 (d, J = 7.6 Hz, 2H).

**Compound 12:**

4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]-N-[2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethyl]benzamide  
**(12)** (average MW = 2608 g/mol, n = 33 - 57).



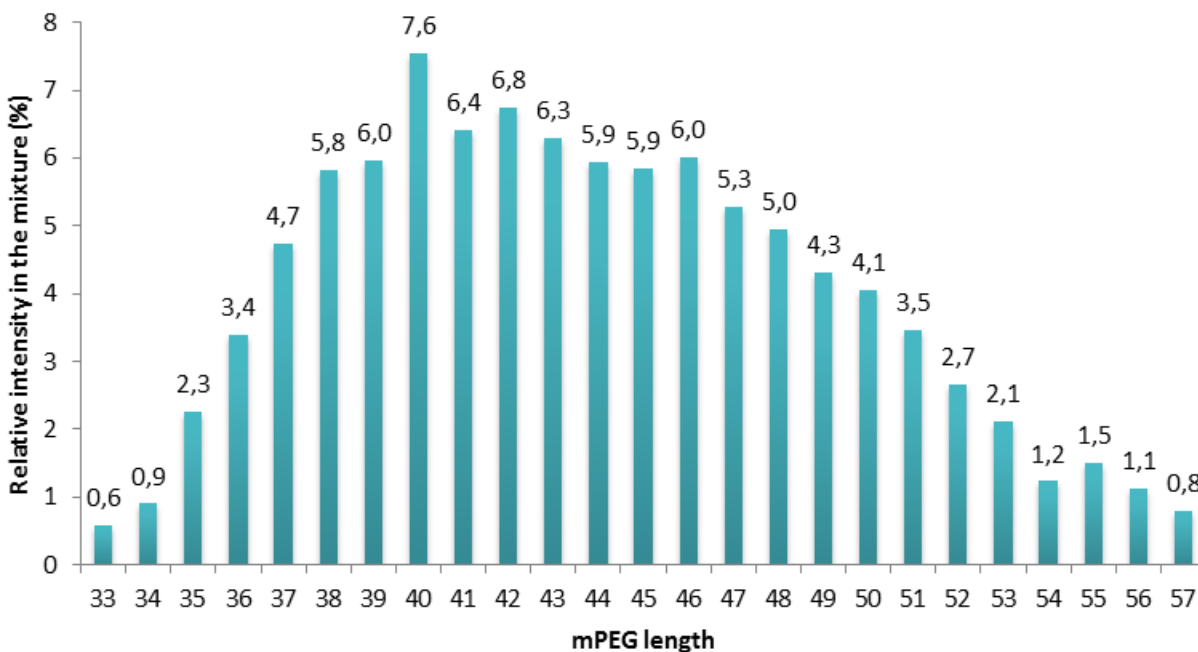
The titled product was obtained as an oily residue after a purification by preparative HPLC (93 mg, 47%), following Procedure D, using 2-[(4-bromo-2,6-difluoro-phenyl)methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**10b**) (45 mg, 76  $\mu$ mol) and [4-[2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethylcarbamoyl]phenyl]boronic acid (**12i**) (average MW = 2164 g/mol, m = 36-53) (163.6 mg, 76  $\mu$ mol).

LC-MS:  $t_R = 2.93$  min, MS  $[M+H+H_3O]^{2+}$   $m/z = 1346.8$  (n = 46).

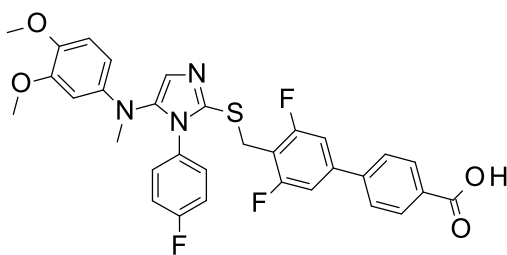
$^1H$  NMR (300 MHz,  $CD_2Cl_2$ ):  $\delta$  (ppm) 3.33 (s, 3H), 3.49 (s, 3H), 3.51-3.66 (m, 180H), 3.71 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 4.16 (s, 2H), 6.12-6.16 (dd,  $J = 8.6, 2.7$  Hz, 1H), 6.29 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.55-6.64 (m, 2H), 6.69 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.94-7.00 (dd,  $J = 10.8, 8.4$  Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 7.10-7.14 (m, 1H), 7.13 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.59 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.89 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H).

$^{13}C$  NMR (300 MHz,  $CD_2Cl_2$ ):  $\delta$  (ppm) 25.9, 39.9, 55.8, 55.9, 56.5, 58.6, 69.7, 70.3, 70.4, 70.5, 71.8, 100.1, 105.5, 109.5-110.0 (m), 113.0 (d,  $J = 3.0$  Hz), 113.1 (t,  $J = 19.6$  Hz), 113.1, 115.7 (d,  $J = 19.2$  Hz), 119.8 (d,  $J = 7.3$  Hz), 124.7, 126.8, 127.9, 131.1 (d,  $J = 3.5$  Hz), 134.8, 137.9, 139.4, 140.8 (t,  $J = 2.3$  Hz), 141.8 (t,  $J = 9.9$  Hz), 142.8, 143.5, 147.6 (d,  $J = 11.7$  Hz), 150.0, 152.0 (d,  $J = 248.1$  Hz), 161.4 (dd,  $J = 249.2, 8.8$  Hz), 166.4.

## Distribution of the mPEG length (compound 12)

**Compound 13:**

Step 7: 4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]benzoic acid (**13a**).



The titled product was obtained as a white powder, after precipitation in EtOH and purification by preparative HPLC (528 mg, 52%), following Procedure D, using 2-[(4-bromo-2,6-difluorophenyl)methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methylimidazol-4-amine (**10b**) (950 mg, 1.6 mmol) and 4-boronobenzoic acid (265 mg, 1.6 mmol).

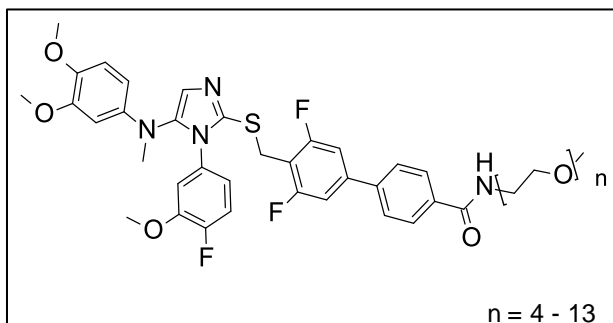
LC-MS:  $t_R = 2.97$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 636.1$ .

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 2.92 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 4.13 (s, 2H), 6.06 (dd,  $J = 8.8, 2.8$  Hz, 1H), 6.24 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 6.61-6.67 (m, 1H), 6.75 (d,  $J = 8.8$  Hz,



1H), 6.78 (dd,  $J = 7.9, 2.5$  Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.17 (dd,  $J = 11.4, 8.4$  Hz, 1H), 7.52 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 7.87 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 8.01 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 13.08 (s, 1H).

**Step 8:** 4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]-N-[2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethyl]benzamide (**13**) (average MW = 1081 g/mol,  $n = 4 - 13$ ).

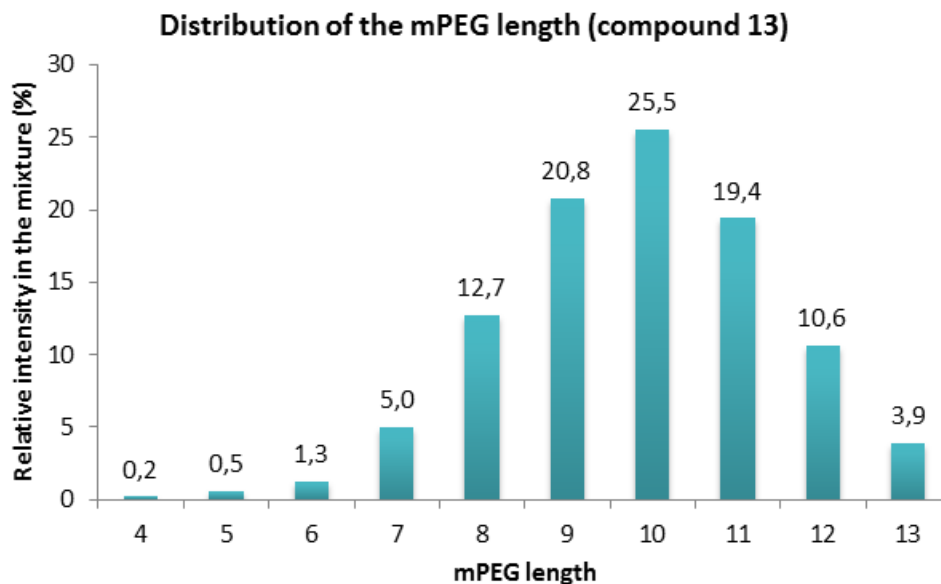


In a 5 mL flask were added 4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]benzoic acid (**13a**) (100 mg, 0.16 mmol), NEt<sub>3</sub> (21.23  $\mu$ L, 0.16 mmol), DCC (32.46 mg, 0.16 mmol), HOBT (21.26 mg, 0.16 mmol), and 2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethanamine (average MW = 500 g/mol) (74.19 mg, 0.16 mmol) in 1 mL of DCM. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was evaporated and purified by preparative HPLC to give 106 mg of the titled product as a white powder, leading to a 62% yield.

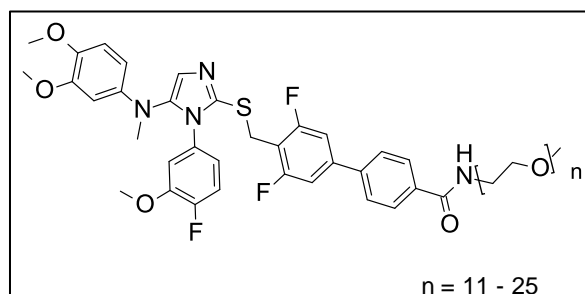
LC-MS:  $t_R = 2.88$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 1089.5$  ( $n = 10$ ).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) 2.94 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.53 (s, 3H), 3.56-3.64 (m, 24H), 3.65-3.68 (m, 8H), 3.75 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 4.20 (s, 2H), 6.18 (dd,  $J = 8.7, 2.8$  Hz, 1H), 6.32 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 6.61 (dd,  $J = 7.7, 2.6$  Hz, 1H), 6.63-6.69 (m, 1H), 6.73 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.00 (d,  $J = 10.9, 8.5$  Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.16 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.63 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.92 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) 25.4, 34.3, 40.3, 56.2, 56.3, 56.9, 70.2, 70.9, 72.2, 100.5, 105.8, 110.2 (m), 113.4 (t,  $J = 9.3$  Hz), 113.5, 116.1 (d,  $J = 19.5$  Hz), 120.1 (d,  $J = 7.0$  Hz), 125.1, 127.1, 128.3, 131.5 (d,  $J = 4.2$  Hz), 135.2, 138.3, 139.8, 141.2, 142.2, 143.2, 143.9, 148.1 (d,  $J = 12.5$  Hz), 150.3, 152.4 (d,  $J = 248.1$  Hz), 161.8 (dd,  $J = 248.1, 8.9$  Hz), 166.8.

**Compound 14:**

4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]-N-[2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethyl]benzamide (**14**) (average MW = 1452 g/mol, n = 11 - 25).



In a 5 mL flask were added 4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]benzoic acid (**13a**) (80 mg, 0.13 mmol), 2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethanamine (average MW = 750 g/mol) (98 mg, 0.13 mmol), HOBt (17 mg, 0.13 mmol), DCC (19 mg, 0.13 mmol) and NEt<sub>3</sub> (18  $\mu$ L, 0.13 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 48 hours. The reaction mixture was evaporated to dryness. The crude material was purified by preparative HPLC to give 127 mg of the titled product as colorless oil, leading to a 72% yield.

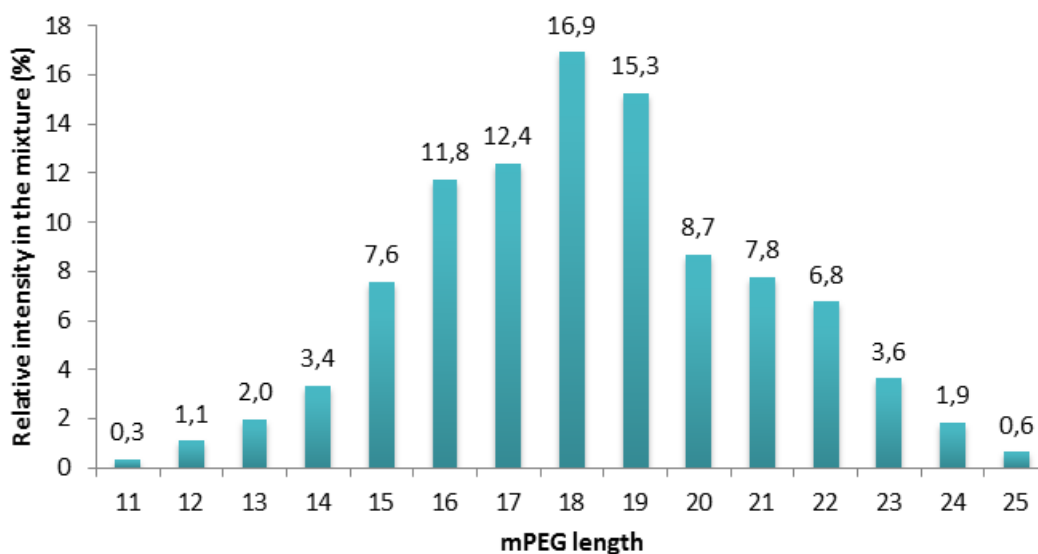
LC-MS:  $t_R$  = 2.73 min, MS  $[M+H]^+$   $m/z$  = 1398.9 (n = 17).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) 2.90 (s, 3H), 3.31 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.50-3.65 (m, 68H), 3.70 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 4.15 (s, 2H), 6.13 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 6.56-6.63 (m, 2H), 6.68

(d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.94 (d,  $J = 11.0$  Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 7.10 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.58 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.90 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H).

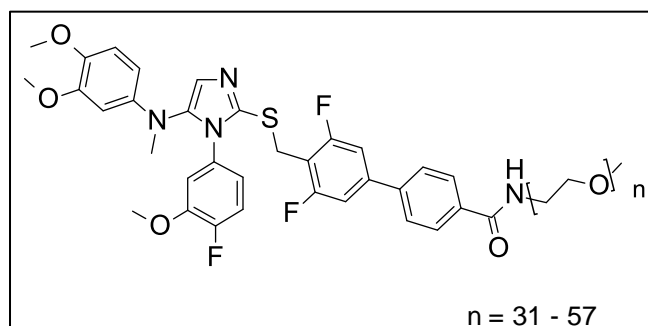
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) 26.2, 40.2, 56.1, 56.2, 56.8, 58.9, 70.1, 70.5, 70.6, 70.8, 72.2, 100.4, 105.8, 110.1 (d,  $J = 25.6$  Hz), 113.3 (d,  $J = 2.9$  Hz), 113.4, 113.4 (t,  $J = 20.0$  Hz), 116.0 (d,  $J = 19.8$  Hz), 120.1 (d,  $J = 7.2$  Hz), 125.0, 127.0, 128.3, 131.5 (d,  $J = 3.6$  Hz), 135.1, 138.2, 139.7, 141.0, 142.1 (t,  $J = 10.2$  Hz), 143.1, 143.9, 147.9 (d,  $J = 11.4$  Hz), 150.3, 152.3 (d,  $J = 248.1$  Hz), 161.7 (dd,  $J = 249.0, 8.9$  Hz), 166.7.

### Distribution of the mPEG chain length (compound 14)



### Compound 15:

4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]-N-[2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethyl]benzamide  
(**15**) (average MW = 2574 g/mol,  $n = 31 - 57$ ).



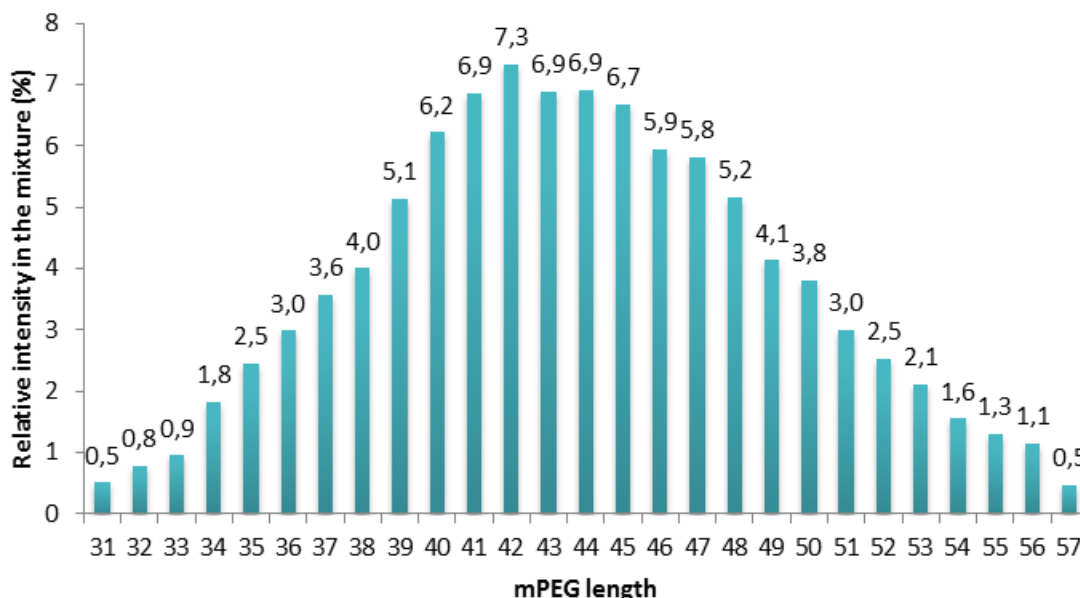
In a 5 mL flask were added 4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]benzoic acid (**13a**) (150 mg, 0.24 mmol), 2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethanamine (average MW = 2 000 g/mol) (486 mg, 0.24 mmol), HOBt (32 mg, 0.24 mmol), DCC (49 mg, 0.24 mmol) and NEt<sub>3</sub> (33 μL, 0.24 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was evaporated to dryness. The crude material was purified by preparative HPLC to give 263 mg of the titled product as a yellow powder, leading to a 42% yield.

LC-MS:  $t_R = 2.76$  min, MS  $[M+H+H_3O]^{2+}$   $m/z = 1346.7$  ( $n = 46$ ).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) 2.89 (s, 3H), 3.31 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.50-3.65 (m, 182H), 3.70 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 4.14 (s, 2H), 6.11-6.15 (dd,  $J = 8.7, 2.8$  Hz, 1H), 6.27 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 6.54 (dd,  $J = 7.6, 2.4$  Hz, 1H), 6.58-6.63 (m, 1H), 6.68 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.93-7.00 (dd,  $J = 10.9, 8.5$  Hz, 1H), 6.98 (s, 1H), 7.10 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.14 (s, 1H), 7.58 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.88 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H).

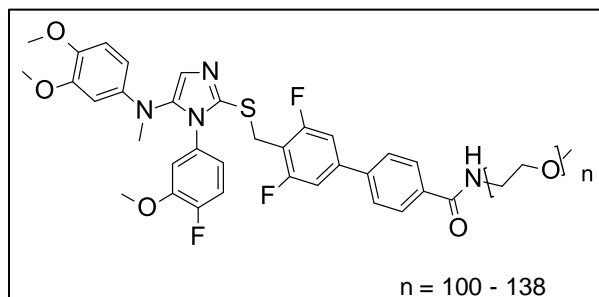
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) 25.9, 39.9, 55.8, 55.9, 56.5, 58.6, 69.7, 70.3, 70.4, 70.5, 71.8, 100.1, 105.5, 109.5-110.0 (m), 113.0 (d,  $J = 3.0$  Hz), 113.1 (t,  $J = 19.6$  Hz), 113.1, 115.7 (d,  $J = 19.2$  Hz), 119.8 (d,  $J = 7.3$  Hz), 124.7, 126.8, 127.9, 131.1 (d,  $J = 3.5$  Hz), 134.8, 137.9, 139.4, 140.8 (t,  $J = 2.3$  Hz), 141.8 (t,  $J = 9.9$  Hz), 142.8, 143.5, 147.6 (d,  $J = 11.7$  Hz), 150.0, 152.0 (d,  $J = 248.1$  Hz), 161.4 (dd,  $J = 248.2, 8.8$  Hz), 166.4.

**Distribution of the mPEG chain length (compound 15)**



**Compound 16:**

4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]-N-[2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethyl]benzamide (**16**) (average MW = 5831 g/mol, n = 100 - 138).

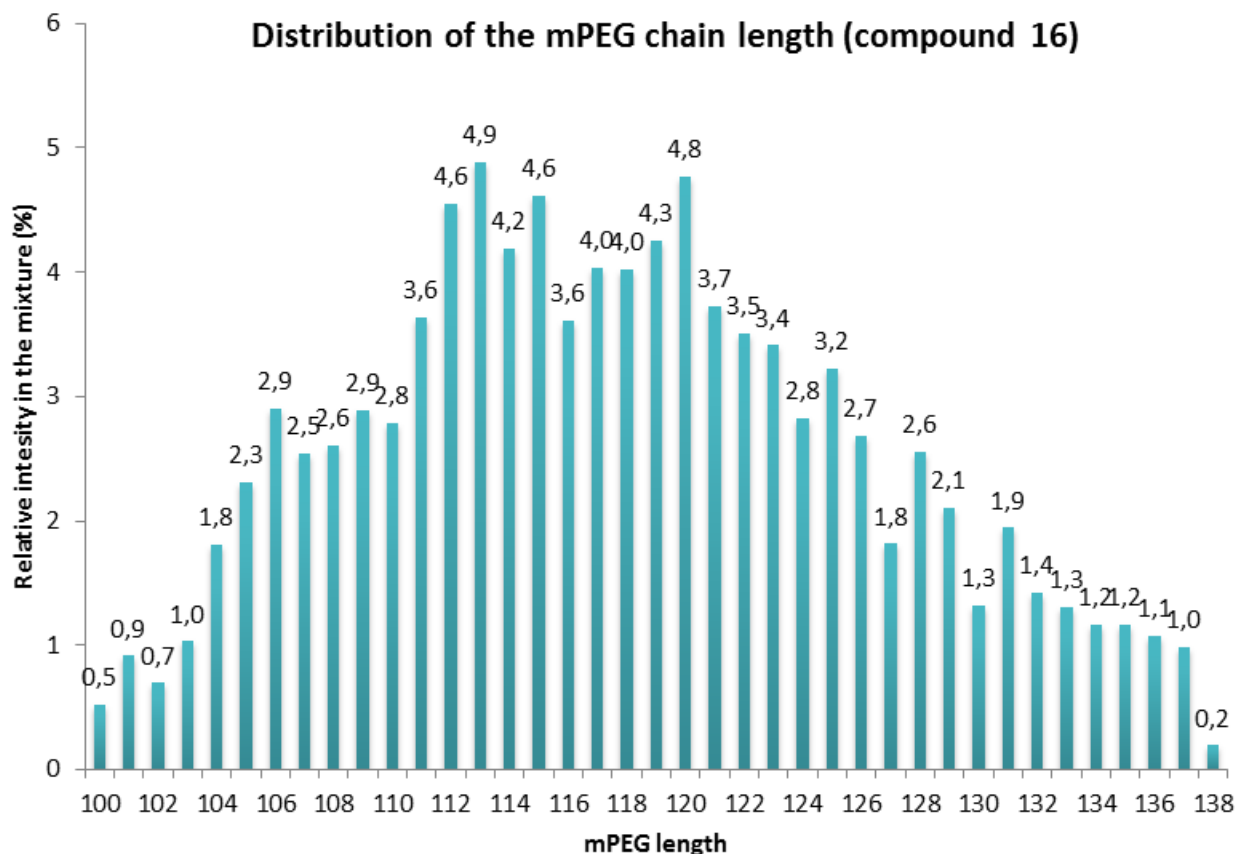
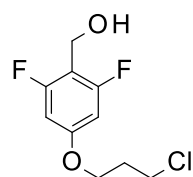


In a 5 mL flask were added 4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]benzoic acid (**13a**) (80 mg, 0.13 mmol), NEt<sub>3</sub> (17  $\mu$ L, 0.13 mmol), DCC (26 mg, 0.13 mmol), HOBT (17 mg, 0.13 mmol), and 2-[2-methoxypolyethyleneglycoxy]ethanamine (average MW = 5 000 g/mol) (614 mg, 0.13 mmol) in 1 mL of DCM. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was evaporated and purified by preparative HPLC to give 465 mg of the titled product as a white powder, leading to a 67% yield.

LC-MS: t<sub>R</sub> = 2.65 min. MS [M+3H+H<sub>3</sub>O]<sup>4+</sup> m/z = 1377.5 (n = 110).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) 2.93 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.50-3.80 (m, 480H), 3.68 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 4.22 (brs, 2H), 6.17 (dd, J = 8.8, 2.8 Hz, 1H), 6.30 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.55 (brs, 1H), 6.71 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.93 (brs, 1H), 7.00-7.27 (m, 4H), 7.60 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.93 (d, J = 8.3 Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) 25.5, 34.3, 40.4, 56.5, 56.7, 56.9, 70.1, 70.8, 72.2, 100.6, 105.7, 110.3 (m), 113.4 (t, J = 9.3 Hz), 113.6, 116.3 (d, J = 19.5 Hz), 120.5 (d, J = 7.0 Hz), 125.2, 127.1, 128.3, 131.4 (d, J = 4.2 Hz), 135.2, 138.2, 139.9, 141.3, 142.2, 143.1, 143.9, 148.4 (d, J = 12.5 Hz), 150.3, 152.6 (d, J = 248.1 Hz), 161.7 (dd, J = 248.1, 8.9 Hz), 166.6.

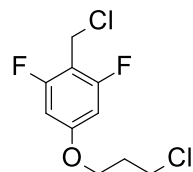
**Intermediate 17ii:**[4-(3-chloropropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methanol (**17i**)

1-bromo-3-chloro-propane (18.44 mL, 187.36 mmol), 3,5-difluoro-4-(hydroxymethyl)phenol (**17i**) (6 g, 37.47 mmol) and  $K_2CO_3$  (5.18 g, 37.47 mmol) were added in acetonitrile (125 mL) and the reaction mixture was stirred at reflux for 10 hours. The solvent was removed under reduced pressure. The crude material was dissolved in EtOAc and washed by water. The aqueous phase was extracted by EtOAc and washed with brine, dried over  $MgSO_4$ . The solvents were removed under reduced pressure to give 8.23 g of the titled product as orange oil, leading to a 93% yield. It was used without further purification in the next step of the synthesis.

LC-MS:  $t_R$  = 2.52 min.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.23 (quint,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.72 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 4.09 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 4.70 (s, 2H), 6.41-6.51 (m, 2H).

2-(chloromethyl)-5-(3-chloropropoxy)-1,3-difluoro-benzene (**17ii**)

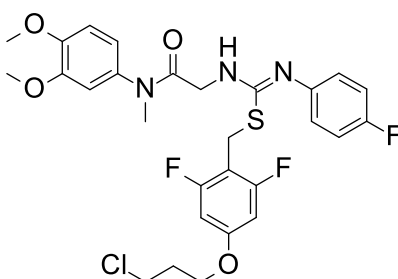


4-(3-chloropropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methanol (**17i**) (6.9 g, 29.16 mmol) and  $\text{NEt}_3$  (4.9 mL, 36.32 mmol) were dissolved in 56 mL dry DCM at  $0^\circ\text{C}$ . Mesylchloride (2.26 mL, 29.16 mmol) was then added dropwise, and the mixture was stirred at room temperature overnight. Water was then added to quench the reaction. The organic phase was then washed with water and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and then evaporated to give 9.37 g of the titled product as yellow oil, leading to a 99% yield. It will be used in the next step without further purification.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.21-2.30 (m, 2H), 3.72 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 4.09 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 4.62 (s, 2H), 6.41-6.50 (m, 2H).

**Compound 17:**

**Step 5:** 2-[[*Z*]-C-[[4-(3-chloropropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(4-fluorophenyl)carbonimidoyl]amino]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methyl-acetamide (**17a**)



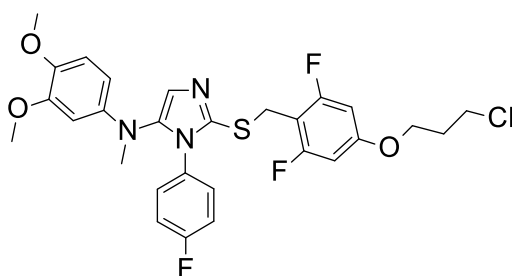
In a 50 mL flask were added N-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-[[*Z*]-N-(4-fluorophenyl)-C-sulfanyl-carbonimidoyl]amino]-N-methyl-acetamide (**1d**) (11 g, 29.14 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (4.43 g, 32.06 mmol), NaI (0.87 g, 5.83 mmol) and 100 mL of acetonitrile. The suspension was stirred at room temperature for 10 min, and 2-(chloromethyl)-5-(3-chloropropoxy)-1,3-difluoro-benzene (**17ii**) (8.18 g, 32.06 mmol) was then added. The suspension was stirred at room temperature 6h. 2-(chloromethyl)-5-(3-chloropropoxy)-1,3-difluoro-benzene (**17ii**) (0.74 g, 2.91 mmol) was added

and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16h. The medium was then evaporated, residue was dissolved in EtOAc, washed with water and brine, organic phase was dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated to dryness. Residue was then purified by flash chromatography using as eluent a mixture of cyclohexane/EtOAc (50/50) to give 17 g of the titled product as a yellowish solid, leading to a 98% yield.

LC-MS:  $t_R = 3.25$  min, MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 596.2$ .

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 2.13 (quint,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 3.16 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.74 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 4.10 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 4.11 (s, 2H), 6.58-6.66 (m, 2H), 6.72-6.79 (m, 2H), 6.84-6.91 (m, 2H), 6.94-7.02 (m, 2H).

**Step 6:** 2-[[4-(3-chloropropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**17b**)



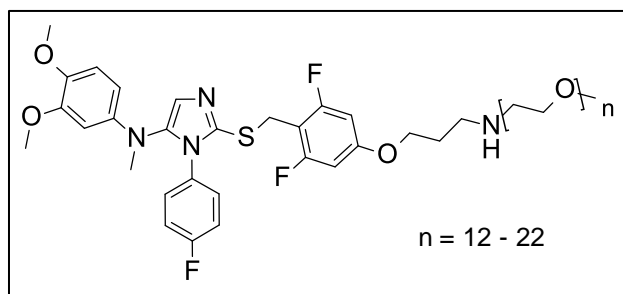
The titled product was obtained as a dark oil (12.44 g, 75% yield), following procedure B, using 2-[[[*Z*]-C-[[4-(3-chloropropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(4-fluorophenyl) carbonimidoyl]amino]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methyl-acetamide (**17a**) (16.2 g, 27.18 mmol).

LC-MS:  $t_R = 3.22$  min, MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 578.1$ .

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.21 (quint,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 2.91 (s, 3H), 3.71 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 4.04 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 4.13 (s, 2H), 6.15 (dd,  $J = 8.7, 2.8$  Hz, 1H), 6.28 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 6.36 (d,  $J = 9.4$  Hz, 2H), 6.70 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.95 (d,  $J = 1.6$  Hz, 2H), 6.97 (s, 2H), 7.04 (s, 1H).

**Step 7:** 2-[[2,6-difluoro-4-[3-[(polyethyleneglycoxy)ethylamino]propoxy]phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**17**) (average MW = 1305 g/mol - n = 12 - 22)



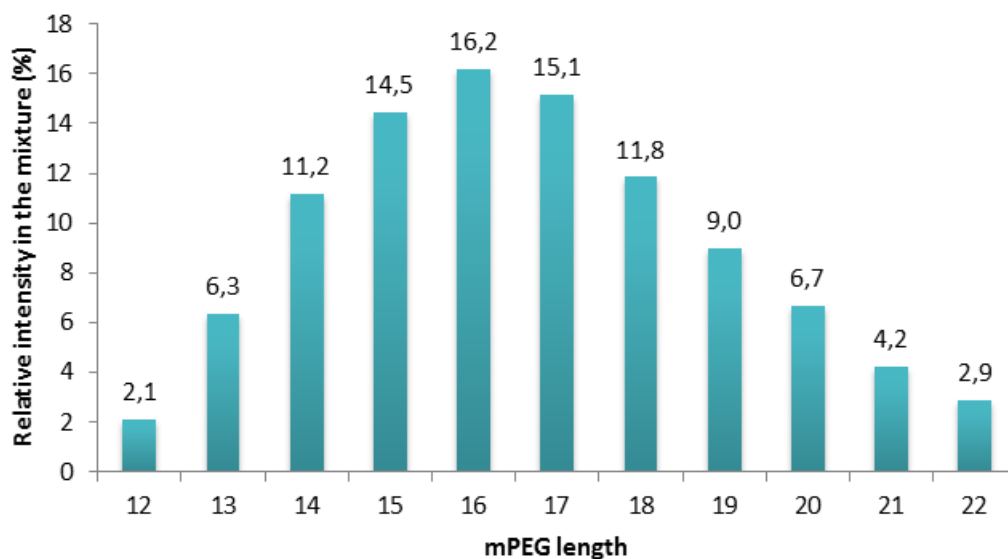


In a microwave tube were added 2-[[4-(3-chloropropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**17b**) (37 mg, 64  $\mu\text{mol}$ ), methoxypolyethylene glycol amine (average MW = 750 g/mol) (50 mg, 64  $\mu\text{mol}$ ), cesium carbonate (21 mg, 64  $\mu\text{mol}$ ), NaI (5 mg, 32  $\mu\text{mol}$ ) and DMF (640  $\mu\text{L}$ ). The reaction mixture was heated under microwave irradiation at 150°C for 1h. The reaction mixture was evaporated to dryness and purified by preparative HPLC to give 15 mg of the titled product as a yellowish oil, corresponding to a 18 % yield.

LC-MS:  $t_R = 2.90$  min, MS  $[M+H]^+$   $m/z = 1277.7$  ( $n = 16$ ).

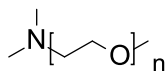
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO):  $\delta$  (ppm) 1.81 (quint,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 2.60-2.65 (m, 4H), 2.92 (s, 3H), 3.23 (s, 3H), 3.40-3.46 (m, 2H), 3.48-3.56 (m, 68H), 3.63 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.99 (s, 2H), 4.02 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 6.06 (dd,  $J = 8.7, 2.8$  Hz, 1H), 6.21 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 6.66 (d,  $J = 9.8$  Hz, 2H), 6.75 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.06-7.23 (m, 4H).

**Distribution of the mPEG chain length (compound 17)**



**Intermediate 18i :**

(Polyethyleneglycoxy)-N,N-dimethyl-ethanamine (average MW = 855 g/mol – n = 13 - 24) (**18i**)



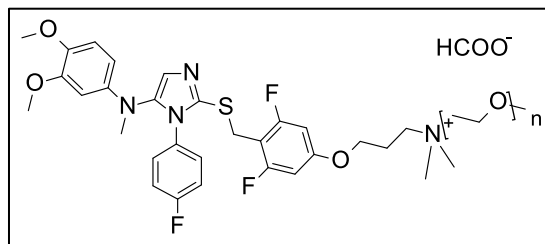
$$n = 13 - 24$$

Methoxypolyethylene glycol amine (average MW = 750 g/mol) (100 mg, 0.13 mmol) was dissolved in a mixture of DCM/Acetic acid (10/1 - 0.1M). Paraformaldehyde (7.7 mg, 0.26 mmol) and (polystyrylmethyl)trimethylammonium cyanoborohydride (4 mmol/g) (102.34 mg, 0.26 mmol) were added at the reaction mixture and it was stirred at room temperature for 24h. 4 mg of paraformaldehyde and 64 mg of (polystyrylmethyl)trimethylammonium cyanoborohydride (4mmol/g) were added at the reaction mixture and it was stirred at 30°C for 7h and then at room temperature over the week end. The reaction mixture was stopped by adding 5 mL of MeOH. The reaction mixture was filtered to remove the resin. The solvent were removed. The residue was dissolved in DCM, dried over MgSO<sub>4</sub>, evaporated to dryness to give 66 mg of the titled product as colorless oil, leading to a 64% yield. It was used without further purification in the next step of the synthesis.

LC-MS:  $t_R = 2.32$  min, MS  $[M+H]^+$   $m/z = 808.1$  (n = 17).

**Compound 18:**

3-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-2-yl]sulfonylmethyl]-3,5-difluoro-phenoxy]propyl-[(polyethyleneglycoxy)ethyl]-dimethyl-ammonium;formate (average MW = 1328 g/mol – n =12 - 23) (**18**)



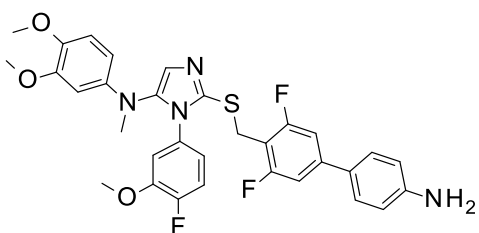
In a microwave tube were added 2-[[4-(3-chloropropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfonyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**17b**) (48 mg, 0.08 mmol), (polyethyleneglycoxy)-N,N-dimethyl-ethanamine (average MW = 855 g/mol – m = 13-24) (**18i**) (67.1 mg, 0.08 mmol), cesium carbonate (27.05 mg, 0.08 mmol), NaI (6.22 mg, 0.04 mmol)



was used without further purification in the next step of the synthesis (Yield was considered to be 100%).

**Compound 19:**

Step 7: 2-[[4-(4-aminophenyl)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**19a**)

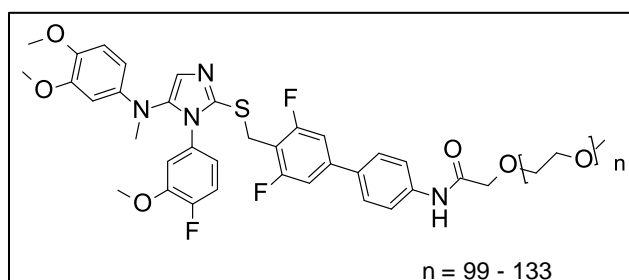


The titled product was obtained after purification by flash chromatography as a yellow oil (51 mg, 50%), following procedure D, using 2-[[4-(4-bromo-2,6-difluoro-phenyl)methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**10b**) (30 mg, 0.05 mmol) and 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline (11.06 mg, 0.05 mmol).

LC-MS:  $t_R = 3.08$  min, MS  $[M+H]^+$   $m/z = 607.3$ .

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.89 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.85 (s, 2H), 4.20 (s, 2H), 6.13-6.19 (dd,  $J = 8.7, 2.7$  Hz, 1H), 6.33 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.52 (dd,  $J = 7.5, 2.4$  Hz, 1H), 6.56-6.62 (m, 1H), 6.72 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.72 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 6.93 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.96 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.31 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H).

Step 8: N-[4-[3,5-difluoro-4-[[1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-5-(3-hydroxy-4-methoxy-N-methyl-anilino)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]phenyl]phenyl]-2-[polyethyleneglycoxy]acetamide (**19**) (average MW = 5782 g/mol,  $n = 99 - 133$ ).



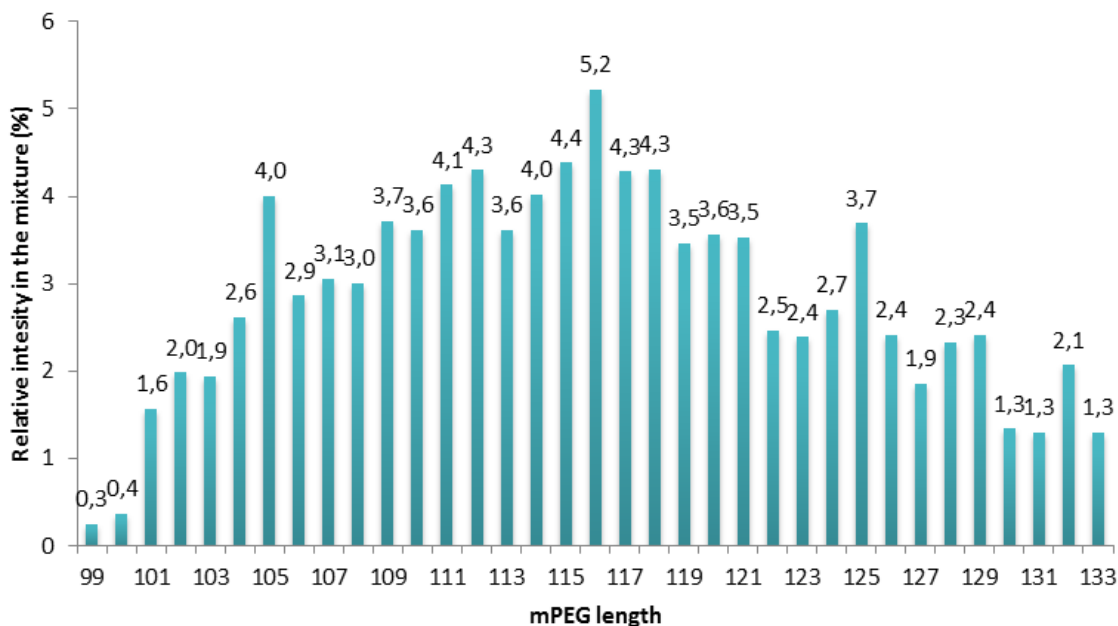
In a 10 mL flask were added 2-[[4-(4-aminophenyl)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**19a**) (51.96  $\mu$ L, 0.09 mmol), [polyethyleneglycoxy]acetyl chloride (**19i**) (389.54 mg, 0.08 mmol), diisopropylethylamine (18.26  $\mu$ L, 0.1 mmol) in 1 mL of DCM. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was evaporated to dryness. The crude material was dissolved in acetone and Et<sub>2</sub>O was added to precipitate the compound. The precipitate was purified by preparative HPLC to give 138 mg of the titled product as a yellowish oil, leading to a 29% yield.

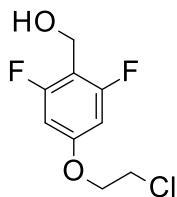
LC-MS:  $t_R = 2.70$  min, MS  $[M+4H_3O+H]^{5+}$   $m/z = 1155.4$  ( $n = 114$ ).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  (ppm) 3.35 (s, 3H), 3.36-3.40 (m, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.52-3.55 (m, 4H), 3.55-3.66 (m, 580H), 3.66-3.70 (m, 6H), 3.73 (s, 3H), 3.72-3.78 (m, 6H), 3.76 (s, 3H), 3.77-3.82 (m, 3H), 3.83-3.87 (m, 3H), 4.12 (s, 2H), 4.18 (s, 2H), 6.16 (dd,  $J = 8.7, 2.7$  Hz, 1H), 6.31 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.59 (dd,  $J = 7.6, 2.5$  Hz, 1H), 6.60-6.66 (m, 1H), 6.72 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.00 (dd,  $J = 11.0, 2.5$  Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.10 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.54 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.75 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 8.96 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta$  25.9, 39.9, 51.9, 55.8, 55.9, 56.5, 58.6, 58.9, 61.2, 62.1, 63.4, 65.8, 70.5 (m), 71.3, 71.9, 72.8, 75.1, 77.5, 82.2, 89.0, 100.0, 105.4, 109.0-109.6 (m), 112.1 (d,  $J = 19.8$  Hz), 113.1, 115.7 (d,  $J = 19.6$  Hz), 119.8 (d,  $J = 7.2$  Hz), 120.3, 124.7, 127.2, 131.2, 133.7, 138.0, 138.4, 139.3, 142.2, 142.7, 143.6, 147.6 (d,  $J = 11.6$  Hz), 150.0, 151.9 (d,  $J = 248.0$  Hz), 161.4 (dd,  $J = 248.0, 8.8$  Hz), 168.4.

Distribution of mPEG chain length (compound 19)

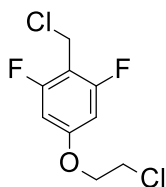


7. Compounds with anionic kinetophores**Intermediate 20ii:**[4-(2-chloroethoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methanol (**20i**)

3,5-difluoro-4-(hydroxymethyl)phenol (**8iii**) (300 mg, 1.87 mmol), 1-bromo-2-chloro-ethane (1.87 mL, 22.48 mmol) and  $K_2CO_3$  (258.94 mg, 1.87 mmol) were added in 6 mL of acetonitrile. The reaction mixture was stirred for 72h at 80°C. The solvent was removed under reduced pressure. The crude material was diluted in EtOAc, washed with brine and dried over  $MgSO_4$  and evaporated to dryness. The crude material was diluted in 6 mL of acetonitrile and 1-bromo-2-chloro-ethane (1.87 mL, 22.48 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at 80°C for 18h. The solvent was removed under reduced pressure. The crude material was diluted in EtOAc, washed with brine and dried over  $MgSO_4$  and evaporated to dryness. Purification of the crude material by flash chromatography using as eluent a mixture of cyclohexane/EtOAc (70/30) gave 200 mg of the titled product as a colorless oil, leading to a 48% yield.

LC-MS:  $t_R = 2.30$  min.

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 3.80 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 4.19 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 4.71 (s, 2H), 6.47-6.50 (m, 2H).

5-(2-chloroethoxy)-2-(chloromethyl)-1,3-difluoro-benzene (**20ii**)

[4-(2-chloroethoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methanol (**20i**) (0.2 g, 0.9 mmol) were dissolved in 1.8 mL of dry DCM at 0°C. Then mesylchloride (0.08 mL, 1.08 mmol) was added dropwise, and the mixture was stirred at room temperature for 24h. Then mesylchloride (0.08 mL, 1.08 mmol) was added again to the reaction mixture. Water was added to quench the reaction. Organic phase

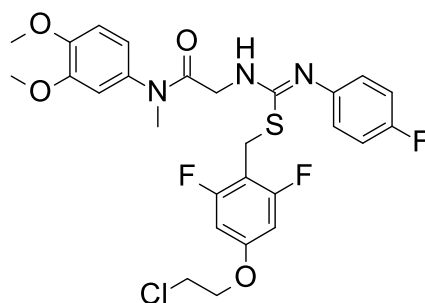
was washed with water and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated to dryness to give 200 mg of the titled product as a colorless oil, leading to a 92% yield.

LC-MS:  $t_R = 3.02$  min.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 3.81 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 4.20 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 4.62 (s, 2H), 6.46-6.53 (m, 2H).

### **Compound 20:**

**Step 5:** 2-[[*Z*]-C-[[4-(2-chloroethoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(4-fluorophenyl)carbonimidoyl]amino]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methyl-acetamide (**20a**)

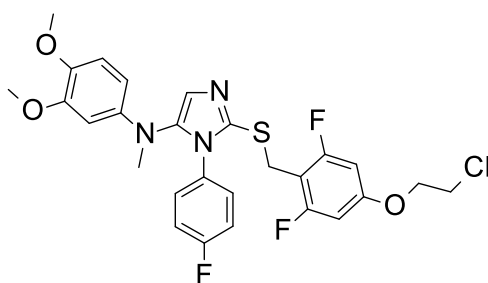


In a 50 mL flask were added 5-(2-chloroethoxy)-2-(chloromethyl)-1,3-difluoro-benzene (**20ii**) (0.2 g, 0.83 mmol), N-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-[[*Z*]-N-(4-fluorophenyl)-C-sulfanyl-carbonimidoyl]amino]-N-methyl-acetamide (**1d**) (250 mg, 0.66 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (100.7 mg, 0.73 mmol) and NaI (19.86 mg, 0.13 mmol) and 3.3 mL of acetonitrile. The reaction mixture was stirred at room temperature for 16h. The solvent was then removed and the residue was dissolved in EtOAc, washed with water and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated to dryness. Residue was then purified by flash chromatography using as eluent a mixture of cyclohexane/EtOAc (60/40) to give 182 mg of the titled product as a yellowish solid, leading to a 47% yield.

LC-MS:  $t_R = 3.08$  min, MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 582.1$ .

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 3.27 (s, 3H), 3.75 (t,  $J = 5.70$  Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.85-3.88 (m, 5H), 4.06 (s, 2H), 4.12 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 6.37-6.45 (m, 2H), 6.69-6.76 (m, 4H), 6.83-6.90 (m, 3H).

**Step 6:** 2-[[4-(2-chloroethoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**20b**)

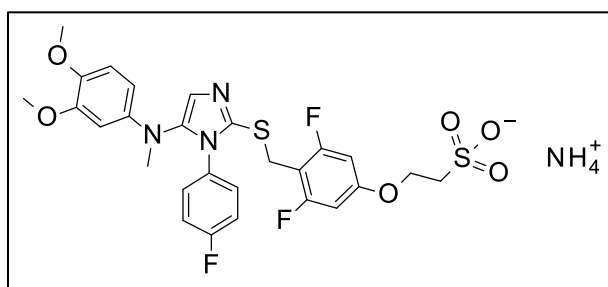


In a microwave tube, 2-[[*Z*]-C-[[4-(2-chloroethoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(4-fluorophenyl)carbonimidoyl]amino]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methyl-acetamide (**20a**) (182 mg, 0.31 mmol) was dissolved in 1.6 mL of EtOAc (0.2M). Diisopropylethylamine (0.33 mL, 1.88 mmol) and T3P® (0.55 mL, 0.94 mmol) were then added. The mixture was heated under microwave irradiation at 150°C for 10 min. The reaction mixture was diluted in EtOAc, washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness to give 182 mg of the titled product as a dark oil, leading to a 100% yield. It was used without further purification in the next step of the synthesis.

LC-MS:  $t_R = 3.08$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 564.1$ .

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 2.91 (s, 3H), 3.78 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 4.09 (s, 2H), 4.14 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 6.15 (dd,  $J = 8.7, 2.6$  Hz, 1H), 6.28 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.35-6.40 (m, 2H), 6.70 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.95-6.97 (m, 4H), 7.02 (s, 1H).

**Step 7:** ammonium;2-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenoxy]ethanesulfonate (**20**)



In a microwave tube, 2-[[4-(2-chloroethoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (0.18 g, 0.32 mmol) was dissolved in 1.1 mL of dioxane. Sodium sulfite (0.12 g, 0.97 mmol) and NaI (0.01 g, 0.06 mmol) were then added. Finally, 1.1 mL of water was added to the mixture and the reaction mixture was heated under microwave irradiation at 130°C for 2h30. 2 more equiv. of sodium sulfite



were added at the reaction mixture. The reaction mixture was then heated under microwave irradiation at 130°C for 1h30 and two more times (during 1h for each heating). Purification of the crude material by preparative HPLC gave 41 mg of the titled product as a brown oil, leading to a 21 % yield.

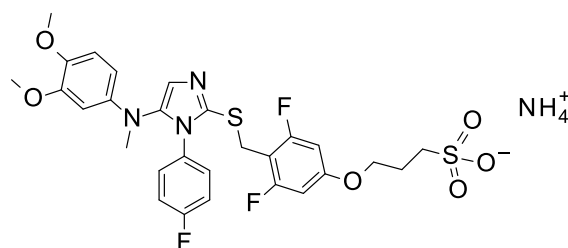
LC-MS:  $t_R = 2.27$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 610.0$ .

$^1H$  NMR (300 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm) 2.97 (s, 3H), 3.25 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.91 (s, 2H), 4.34 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 6.14 (dd,  $J = 8.7, 2.8$  Hz, 1H), 6.28 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.51-6.59 (m, 2H), 6.77 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.91-6.96 (m, 2H), 7.00 (s, 1H), 7.00-7.06 (m, 2H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm) 27.9, 41.0, 51.4, 56.5, 57.2, 65.7, 99.4-99,8 (m), 102.3, 107.2 (t,  $J = 20.1$  Hz), 108.2, 114.6, 116.6 (d,  $J = 23.3$  Hz), 124.1, 131.0 (d,  $J = 9.0$  Hz), 132.2 (d,  $J = 2.9$  Hz), 138.7, 142.2, 144.5, 144.5, 151.1, 161.1 (t,  $J = 14.1$  Hz), 162.2, 162.9 (dd,  $J = 246.8, 11.0$  Hz), 165.5.

### **Compound 21:**

Step 7: ammonium;3-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-2-yl]sulfonylmethyl]-3,5-difluoro-phenoxy]propane-1-sulfonate (**21**)



In 8 microwave tubes, 2-[[4-(3-chloropropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfonyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**17b**) (12.44 g, 21.52 mmol) was dissolved in 145 mL of a mixture of Dioxane and water (1/1, V/V, 0.15M). Sodium sulfite (8.14 g, 64.56 mmol) and NaI (0.65 g, 4.3 mmol) were then added. The reaction mixture was heated under microwave irradiation at 130°C for 2h30. The reaction mixture was filtered and evaporated to dryness. The crude material was dissolved in a mixture of DCM/cyclohexane in order to precipitate salts, and it was evaporated to dryness. Purification of the crude material by preparative HPLC to give 7.16 g of the titled product as a yellowish solid, leading to a 52% yield.

LC-MS:  $t_R = 2.28$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 624.1$ .

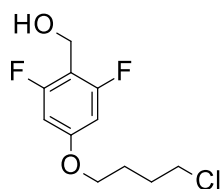
$^1H$  NMR (300 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm) 2.23 (quint,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 2.96 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.97 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.92 (s, 2H), 4.09 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 6.15 (dd,  $J = 8.7, 2.9$  Hz, 1H),

6.29 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1H), 6.51 (d,  $J = 9.8$  Hz, 2H), 6.77 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.88-6.96 (m, 1H), 6.97-7.05 (m, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm) 26.0, 27.9, 41.0, 49.1, 56.6, 57.2, 68.6, 99.2-99.8 (m), 102.7, 106.8 (t,  $J = 20.4$  Hz), 108.5, 114.6, 116.6 (d,  $J = 23.4$  Hz), 123.7, 131.0 (d,  $J = 9.0$  Hz), 132.1 (d,  $J = 3.2$  Hz), 138.7, 142.5, 144.5, 144.7, 151.1, 161.5 (t,  $J = 14.2$  Hz), 162.9 (dd,  $J = 246.4, 11.0$ ), 163.9 (d,  $J = 247.8$  Hz).

### **Intermediate 22ii:**

[4-(4-chlorobutoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methanol (**22i**)

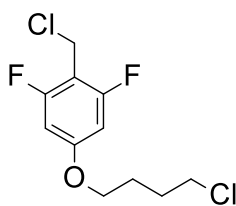


3,5-difluoro-4-(hydroxymethyl)phenol (**8iii**) (500 mg, 3.12 mmol), 1-bromo-4-chloro-butane (1.8 mL, 15.61 mmol) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (431.57 mg, 3.12 mmol) were added in 10 mL of acetonitrile. The reaction mixture was stirred at  $80^\circ\text{C}$  for 18h. The solvent was removed. The crude material was diluted in EtOAc, washed with water, brine, dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated to dryness. Purification of the crude material by flash chromatography using as eluent a mixture of cyclohexane/EtOAc (70/30) to give 548 mg of the titled product as a white powder, leading to a 70% yield.

LC-MS:  $t_R = 2.67$  min.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 1.92-1.96 (m, 4H), 3.61 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 3.96 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 4.70 (s, 2H), 6.40-6.48 (m, 2H).

5-(4-chlorobutoxy)-2-(chloromethyl)-1,3-difluoro-benzene (**22ii**)



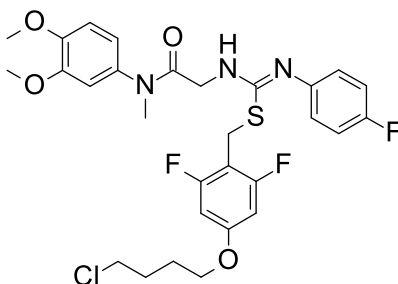
[4-(4-chlorobutoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methanol (**22i**) (548 mg, 2.19 mmol) and  $\text{NEt}_3$  (0.4 mL, 2.84 mmol) were dissolved in 4.4 mL dry DCM at 0°C. Then mesylchloride (0.2 mL, 2.62 mmol) was added dropwise, and the mixture was stirred at room temperature for 24h. Mesylchloride (0.2 mL, 2.62 mmol) was added again to the reaction mixture and it was stirred at room temperature for 24h. Water was added to quench the reaction and organic phase was washed with water and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated to dryness to give 528 mg of the titled product as an orange oil, leading to a 90% yield.

LC-MS:  $t_R = 3.28$  min.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 1.94-1.98 (m, 4H), 3.61 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 3.97 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 4.62 (s, 2H), 6.42-6.49 (m, 2H).

### **Compound 22:**

**Step 5:** 2-[[*Z*]-C-[[4-(4-chlorobutoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(4-fluorophenyl)carbonimidoyl]amino]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methyl-acetamide (**22a**)

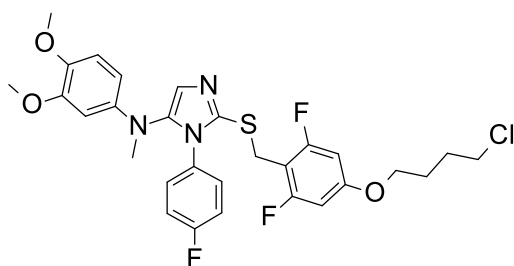


In a 50 mL flask were added N-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-[[*Z*]-N-(4-fluorophenyl)-C-sulfanyl-carbonimidoyl]amino]-N-methyl-acetamide (**1d**) (257 mg, 0.68 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (103.52 mg, 0.75 mmol),  $\text{NaI}$  (20.41 mg, 0.14 mmol), 5-(4-chlorobutoxy)-2-(chloromethyl)-1,3-difluoro-benzene (**22ii**) (205.6 mg, 0.76 mmol) and 7.5 mL of acetonitrile. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. The solvent was then evaporated and the residue was dissolved in EtOAc, washed with water and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated to dryness. Purification of the crude material by flash chromatography using as eluent a mixture of cyclohexane/EtOAc (70/30) gave 415 mg of the titled product as a yellowish oil, leading to a 64% yield.

LC-MS:  $t_R = 3.35$  min, MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 610.1$ .

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 1.90-1.94 (m, 4H), 3.29 (s, 3H), 3.59 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 3.85-3.93 (m, 10H), 4.07 (s, 2H), 6.35-6.43 (m, 2H), 6.70-6.92 (m, 7H).

**Step 6:** 2-[[4-(4-chlorobutoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**22b**)

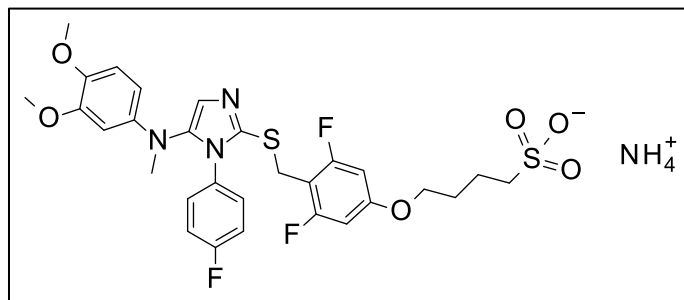


The titled product was obtained as a dark oil without further purification (273 mg), following procedure B, using 2-[[[Z]-C-[[4-(4-chlorobutoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(4-fluorophenyl)carbonimidoyl]amino]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methyl-acetamide (**22a**) (265 mg, 0.43 mmol).

LC-MS:  $t_R = 3.30$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 592.0$ .

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 1.91-1.94 (m, 4H), 2.91 (s, 3H), 3.60 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.91 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 4.08 (s, 2H), 6.15 (dd,  $J = 8.7, 2.7$  Hz, 1H), 6.28 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.30-6.38 (m, 2H), 6.70 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.92-7.02 (m, 5H).

**Step 7:** ammonium;4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenoxy]butane-1-sulfonate (**22**)



In a microwave tube, 2-[[4-(4-chlorobutoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**22b**) (0.26 g, 0.43 mmol) was dissolved in 1.45 mL of dioxane. Sodium sulfite (0.16 g, 1.3 mmol) and NaI (0.01 g, 0.09 mmol) were then added. Finally, 1.45 mL of water was added to the mixture and the reaction mixture was heated under microwave irradiation at 130°C for 2h30. The reaction mixture was filtered and evaporated to dryness. Purification of the crude material by preparative HPLC gave 89 mg of the titled product as a yellowish solid, leading to a 31 % yield.

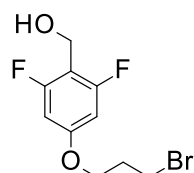
LC-MS:  $t_R = 2.32$  min, MS  $[M+H]^+$   $m/z = 638.4$ .

$^1H$  NMR (300 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm) 1.90-1.94 (m, 4H), 2.87 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 2.97 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.91 (s, 2H), 3.98 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 6.15 (dd,  $J = 8.8, 2.7$  Hz, 1H), 6.29 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.46-6.53 (m, 2H), 6.77 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.90-7.04 (m, 5H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm) 22.8, 28.0, 29.1, 41.0, 52.2, 56.6, 57.2, 69.6, 99.3-99.6 (m), 102.7, 106.7 (t,  $J = 20.4$  Hz), 108.5, 114.6, 116.6 (d,  $J = 23.3$  Hz), 123.6, 131.0 (d,  $J = 9.0$  Hz), 132.1 (d,  $J = 3.1$  Hz), 138.7, 142.2, 144.5, 144.7, 151.1, 161.7 (t,  $J = 14.4$  Hz), 162.9 (dd,  $J = 246.5, 11.2$  Hz), 163.9 (d,  $J = 247.5$  Hz).

### Intermediate 23iii:

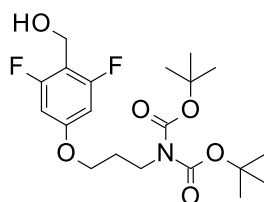
#### [4-(3-Bromopropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methanol (**23i**)



1,3-dibromopropane (950.87  $\mu$ L, 9.37 mmol), 3,5-difluoro-4-(hydroxymethyl)phenol (**8iii**) (300 mg, 1.87 mmol) and  $K_2CO_3$  (258.95 mg, 1.87 mmol) were added in acetonitrile (6 mL) and the reaction mixture was stirred at reflux for 3 hours. The solvent was removed under reduced pressure. The crude material was dissolved in EtOAc and washed with water. The aqueous phase was extracted with EtOAc and washed with brine, dried over  $MgSO_4$ . The solvent was removed under reduced pressure, and the crude material was purified by flash chromatography using as eluent a mixture of cyclohexane/EtOAc (80/20) to give 400 mg of the titled product as a colorless oil, leading to a 76% yield.

LC-MS:  $t_R = 2.73$  min, MS  $[M+H]^+$   $m/z = 264.8$ .

#### *tert*-Butyl *N-tert*-butoxycarbonyl-*N*-[3-[3,5-difluoro-4-(hydroxymethyl)-phenoxy]propyl]-carbamate (**23ii**)

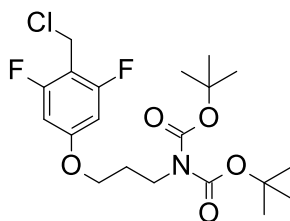


[4-(3-bromopropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methanol (**23i**) (320 mg, 1.14 mmol) was dissolved in 11 mL of dry DMF. *tert*-butyl *N-tert*-butoxycarbonylcarbamate (247.33 mg, 1.14 mmol) and cesium carbonate (370.91 mg, 1.14 mmol) were added and the reaction mixture was stirred at 70°C for 30 min. The solvent was removed. The crude material was dissolved in EtOAc, washed with water, dried over MgSO<sub>4</sub>. The solvent was removed. The crude material was purified by flash chromatography using as eluent a mixture of cyclohexane/EtOAc (90/10) to give 500 mg of the titled product as a colorless oil, leading to a 95 % yield.

LC-MS:  $t_R = 3.28$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 344.0$ .

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) 1.41 (s, 18H), 1.87-1.96 (q,  $J = 12.6, 6.1$  Hz, 2H), 3.64 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 3.99 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 4.39 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 5.08 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H), 6.59-6.68 (m, 2H).

*tert*-Butyl *N-tert*-butoxycarbonyl-*N*-[3-[4-(chloromethyl)-3,5-difluoro-phenoxy]propyl]carbamate (**23iii**)

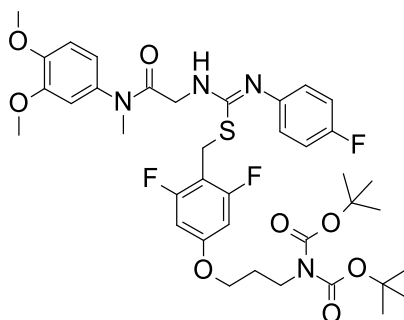


*Tert*-butyl *N-tert*-butoxycarbonyl-*N*-[3-[3,5-difluoro-4-(hydroxymethyl)phenoxy]propyl]carbamate (**23ii**) (520 mg, 1.25 mmol) and NEt<sub>3</sub> (420.17  $\mu$ L, 3.11 mmol) were dissolved in dry DCM at 0°C. Mesylchloride (144.91  $\mu$ L, 1.87 mmol) was then added dropwise, and the mixture was stirred at room temperature overnight. Water was then added to quench the reaction. The organic phase was then washed with water and brine, and dried over MgSO<sub>4</sub>, and then evaporated to give 475 mg of the titled compound as colorless oil, leading to a 87% yield. It will be used without further purification in the next step of the synthesis.

LC-MS:  $t_R = 4.07$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 453.0$ .

**Compound 23:**

**Step 5:** *tert*-Butyl *N-tert*-butoxycarbonyl-*N*-[3-[4-[[*Z*]-*N*-[2-(3,4-dimethoxy-*N*-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]-*N'*-(4-fluorophenyl)carbamiidoyl]sulfanylmethyl]-3,5-difluorophenoxy]propyl]carbamate (**23a**)

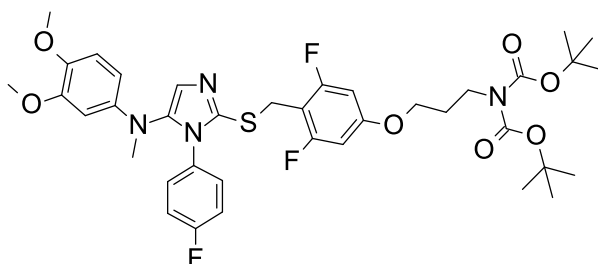


The titled product was obtained as a yellowish oil after purification by flash chromatography (300 mg, 35% yield), following Procedure B, using *N*-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-[[*Z*]-*N*-(4-fluorophenyl)-*C*-sulfanyl-carbonimidoyl]amino]-*N*-methyl-acetamide (**1d**) (411.3 mg, 1.09 mmol) and *tert*-butyl *N-tert*-butoxycarbonyl-*N*-[3-[4-(chloromethyl)-3,5-difluorophenoxy]propyl]carbamate (**23iii**) (475 mg, 1.09 mmol).

LC-MS:  $t_R = 3.76$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 777.2$ .

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO-*d*6):  $\delta$  (ppm) 1.37 (s, 18H), 1.89 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 3.16 (s, 3H), 3.61 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.71-3.74 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.98 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H), 4.10 (s, 2H), 6.58-6.63 (m, 2H), 6.66 (d,  $J = 9.6$  Hz, 2H), 6.88 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 6.90-7.01 (m, 4H).

**Step 6:** *tert*-Butyl *N-tert*-butoxycarbonyl-*N*-[3-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-*N*-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluorophenoxy]propyl]carbamate (**23b**)



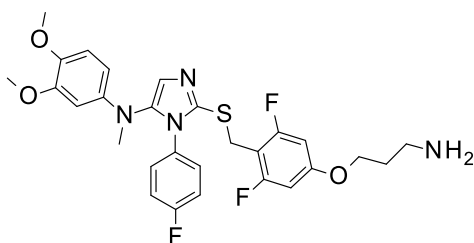
The titled product was obtained as an orange oil after purification by flash chromatography (183 mg, 62%), following Procedure C, using *tert*-butyl *N-tert*-butoxycarbonyl-*N*-[3-[4-[[*Z*]-*N*-[2-(3,4-

dimethoxy-N-methyl-anilino)-2-oxo-ethyl]-N'-(4-fluorophenyl)carbamiimidoyl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenoxy]propyl]carbamate (**23a**) (300 mg, 0,39 mmol).

LC-MS:  $t_R = 3.78$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 759.1$ .

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 1.40 (s, 18H), 1.91 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 2.92 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.63 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 3.98 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2H), 3.98 (s, 2H), 6.03-6.07 (dd,  $J = 8.7, 2.8$  Hz, 1H), 6.20 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 6.63 (d,  $J = 9.8$  Hz, 2H), 6.73 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 7.10-7.23 (m, 4H).

**Step 7:** 2-[[4-(3-aminopropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**23c**)



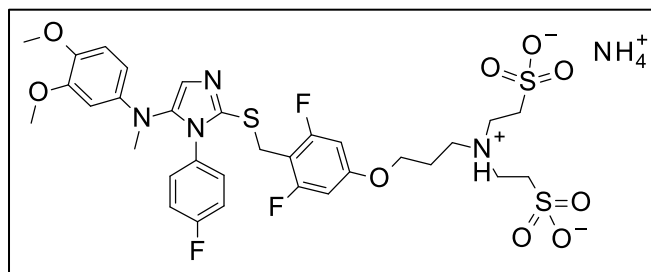
*Tert*-butyl *N*-*tert*-butoxycarbonyl-*N*-[3-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-*N*-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenoxy]propyl]carbamate (**23b**) (180 mg, 0.24 mmol) was diluted in 4 mL of dry DCM and 400  $\mu$ L of TFA were added. The reaction mixture was stirred at 0°C during 30 min and at room temperature during 5h. The crude material was diluted in DCM, washed with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$ , dried over  $MgSO_4$ . The solvent was removed to give 130 mg of the titled product as yellow oil, leading as a 98% yield. It was used without further purification in the next step of the synthesis.

LC-MS:  $t_R = 2.78$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 559.0$ .

$^1H$  NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 1.74-1.79 (m, 2H), 2.68 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 2.92 (s, 3H), 3.32 (s, 2H), 3.63 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.98 (s, 2H), 4.03 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 6.03-6.07 (dd,  $J = 8.8, 2.8$  Hz, 1H), 6.20 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 6.67 (d,  $J = 9.8$  Hz, 2H), 6.73 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.09-7.23 (m, 4H).



**Step 8:** 2-[3-[4-[[5-(3,4-Dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenoxy]propyl-(2-sulfonatoethyl)amino]ethanesulfonate; diammonium (**23**)



In a microwave tube were added 2-[[4-(3-aminopropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**23c**) (92 mg, 0.16 mmol), 2-chloroethylsulfonyloxysodium (219.44 mg, 1.32 mmol), NaI (24.69 mg, 0.16 mmol) and diisopropylethylamine (114.75  $\mu$ L, 0.66 mmol) in 900  $\mu$ L of DMF. The reaction mixture was heated under microwave irradiation at 100°C for 2h. The reaction mixture was evaporated to dryness. Purification of the crude material by preparative HPLC gave 22 mg of the title compound as a colorless oil, leading to a 16% yield.

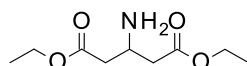
LC-MS:  $t_R = 2.65$  min, MS  $[M+2H]^{2+} m/z = 775.2$ .

$^1H$  NMR (300 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm) 2.26-2.32 (m, 2H), 2.98 (s, 3H), 3.26 (t,  $J = 6.7$  Hz, 4H), 3.48 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 3.65 (t,  $J = 6.7$  Hz, 4H), 3.74 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.91 (s, 2H), 4.11 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 6.14-6.18 (dd,  $J = 8.6, 2.8$  Hz, 1H), 6.29 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 6.58 (d,  $J = 9.5$  Hz, 2H), 6.78 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.92-7.07 (m, 5H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm) 23.7, 26.5, 39.6, 44.8, 50.3, 51.4, 55.2, 56.0, 65.7, 98.0-98.6 (m), 101.0, 106.0 (t,  $J = 20.1$  Hz), 106.8, 113.3, 115.3 (d,  $J = 23.4$  Hz), 122.8, 129.6, 129.7, 130.8, 137.4, 140.7, 143.1, 143.2, 149.8, 159.6 (t,  $J = 14.0$  Hz), 161.5 (dd,  $J = 246.7, 10.9$  Hz), 162.5 (d,  $J = 247.9$  Hz).

**Intermediate 24i:**

Diethyl 3-aminopentanedioate (**24i**)



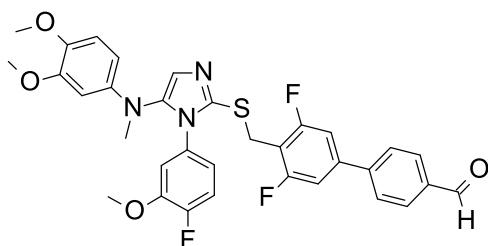
In little flask was added, 3-aminopentanedioic acid (75 mg, 0.510 mmol) in EtOH (1.5 mL) solution, and add dropwise a thionyl chloride (0.148 mL, 2.039 mmol). The reaction mixture was

stirred at room temperature overnight and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted in DCM and washed with a saturated aqueous solution of  $\text{NaHCO}_3$ , brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated under reduced pressure to give 100 mg of the titled product as a colorless oil, leading to a 97 % yield.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 1.21 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H), 1.80 (s, 2H), 2.30-2.49 (m, 4H), 3.57-3.59 (m, 1H), 4.11 (quint,  $J = 7.1$  Hz, 4H).

### **Compound 24:**

Step 7: 4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]benzaldehyde (**24a'**)

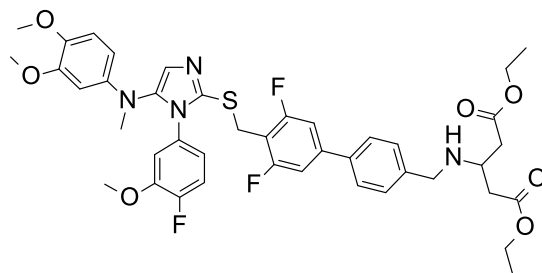


In a microwave tubes were added 2-[[4-(4-bromo-2,6-difluoro-phenyl)methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**10b**) (250 mg, 0.421 mmol), (4-formylphenyl)boronic acid (63.03 mg, 0.421 mmol), 1M  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (841  $\mu\text{L}$ , 0.841 mmol), and  $\text{PdCl}_2\text{dppf}$  (34.32mg, 0.042 mmol). 4.21 mL of DMF were flushed with argon, added to the reaction mixture, which was also flushed with argon. The reaction mixture was heated under microwave irradiation at  $100^\circ\text{C}$  for 20 min, and 10 min, and in the same microwave tubes were added  $\text{PdCl}_2\text{dppf}$  (34.32mg, 0.042 mmol) and heated under microwave irradiation at  $100^\circ\text{C}$  for 10 min. The reaction mixture was filtrated and evaporated to dryness. The crude material was diluted in DCM and filtrated (salts). Purification of the crude material by flash chromatography using as eluent a mixture of DCM/MeOH (95/5) gave 200 mg of the titled product not clean as a yellow oil, leading to a 77% yield. It was used without further purification in the next step of the synthesis.

LC-MS:  $t_R = 3.27$  min, MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 620.1$ .

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.96 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 4.21 (s, 2H), 6.18 (dd,  $J = 8.6, 2.6$  Hz, 1H), 6.32 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 6.55 (dd,  $J = 7.3, 2.4$  Hz, 1H), 6.59-6.64 (m, 1H), 6.72 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.97 (dd,  $J = 10.6, 8.5$  Hz, 1H), 7.06-7.15 (m, 3H), 7.67 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.97 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 10.07 (s, 1H).

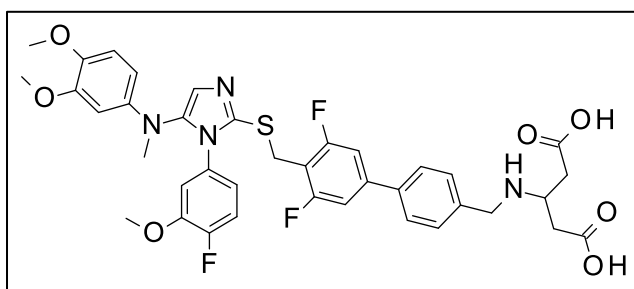
**Step 8:** diethyl 3-[[4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]phenyl]methylamino]pentanedioate (**24b**)



In a 10 mL flask were added 4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]benzaldehyde (**24a'**) (183 mg, 0,3 mmol) in solution of DCE (3 mL), diethyl 3-aminopentanedioate (**24i**) (90.03 mg, 0.443 mmol) and acetic acid (0.17 mL, 2.95 mmol). The reaction mixture was stirred at 25°C overnight, treated with NaHB(OAc)<sub>3</sub> (157 mg, 0.741 mmol) and stirred at room temperature for 1h. The reaction mixture was treated with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and extracted with DCM, the organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness to give 90 mg of the titled product as a yellow oil, leading to a 38% yield. It will be used in the next step without further purification.

LC-MS:  $t_R = 2.98$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 808.1$ .

**Step 9:** 3-[[4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]phenyl]methylamino]pentanedioic acid (**24**)



In a 5 mL flask were added diethyl 3-[[4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]phenyl]methylamino]pentanedioate (**24b**) (90 mg, 0.112 mmol) with 1 mL a solution of MeOH/THF/H<sub>2</sub>O (1/1/1), and LiOH, H<sub>2</sub>O (4.680 mg, 0.112 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. LiOH, H<sub>2</sub>O (4.68 mg, 0.112 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at

40°C during 1 hour. The crude material was evaporated and purified by preparative HPLC to give 34 mg of the titled product, leading to a 40% yield.

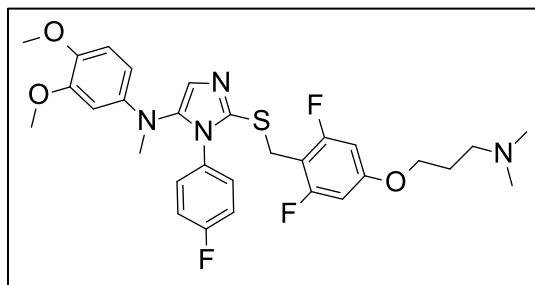
LC-MS:  $t_R = 2.43$  min, MS  $[M+H]^+$   $m/z = 751.3$ .

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.37-2.53 (m, 5H), 2.91 (s, 3H), 3.31 (quint,  $J = 6.2$  Hz, 1H), 3.46 (s, 3H), 3.58 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 3.92 (s, 2H), 4.11 (s, 2H), 6.05 (dd,  $J = 8.7, 2.8$  Hz, 1H), 6.23 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 6.61-6.65 (m, 1H), 6.72-6.68 (m, 1H), 7.01 (s, 1H), 7.15 (dd,  $J = 11.2, 8.6$  Hz, 1H), 7.44 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 7.60 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 26.3, 37.8, 48.5, 51.4, 56.1, 56.3, 56.6, 100.2, 105.8, 109.8 (d,  $J = 25.3$  Hz), 112.8 (t,  $J = 19.9$  Hz), 113.9, 116.2 (d,  $J = 19.5$  Hz), 120.5 (d,  $J = 7.2$  Hz), 124.7, 127.1, 129.6, 131.6 (d,  $J = 3.1$  Hz), 136.6, 137.3, 139.1, 139.8, 142.0 (t,  $J = 10.3$  Hz), 142.5, 143.7, 147.2 (d,  $J = 11.7$  Hz), 149.9, 151.6 (d,  $J = 246.5$  Hz), 161.34 (dd,  $J = 247.3, 8.9$  Hz), 173.2.

8. Compounds with cationic kinetophores**Compound 25:**

N-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-[[4-[3-(dimethylamino)propoxy]-2,6-difluorophenyl]methylsulfanyl]-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**25**)



In a microwave tube was added 2-[[4-(3-chloropropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**17b**) (50 mg, 0.09 mmol), N-methylmethanamine (58.2  $\mu$ L, 0.86 mmol),  $K_2CO_3$  (179.31 mg, 1.3 mmol), NaI (12.97 mg, 0.09 mmol) in 1.73 mL of acetonitrile. The reaction mixture was stirred at 80°C for 24h. In a second microwave tube was added 2-[[4-(3-chloropropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**17b**) (50 mg, 0.09 mmol), N-methylmethanamine (58.2  $\mu$ L, 0.86 mmol),  $K_2CO_3$  (179.31 mg, 1.3 mmol), NaI (12.97 mg, 0.09 mmol) in 1.73 mL of acetonitrile. The reaction mixture was stirred at 80°C for 24h. The reaction mixture were pooled and evaporated to dryness. Purification of the crude material by preparative HPLC gave 47 mg of the titled product as a colorless oil, leading to a 46% yield.

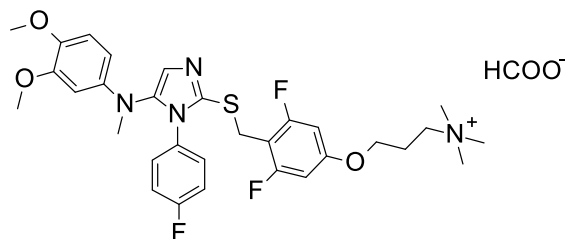
LC-MS:  $t_R = 2.48$  min, MS  $[M+H]^+$   $m/z = 587.2$ .

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.20 (quint,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.64 (s, 6H), 2.90 (s, 3H), 2.99 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.99 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H), 4.00 (s, 2H), 6.14 (dd,  $J = 8.7, 2.7$  Hz, 1H), 6.26 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.35 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 6.69 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.92-7.05 (m, 5H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 25.3, 25.8, 40.3, 43.9, 55.6, 56.0, 56.6, 66.0, 98.3-98.7 (m), 100.2, 105.8, 105.8 (t,  $J = 20.2$  Hz), 112.5, 116.0 (d,  $J = 22.8$  Hz), 124.1, 129.3 (d,  $J = 9.0$  Hz), 131.0 (d,  $J = 3.1$  Hz), 138.3, 139.9, 142.8, 143.2, 149.6, 159.3 (t,  $J = 14.1$  Hz), 161.7 (dd,  $J = 248.1, 11.0$  Hz), 162.4 (d,  $J = 249.2$  Hz).

**Compound 26:**

3-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-2-yl]sulfonylmethyl]-3,5-difluoro-phenoxy]propyl-trimethyl-ammonium;formate (**26**)



In a microwave tube was added 2-[[4-(3-chloropropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfonyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**17b**) (100 mg, 0.17 mmol), N,N-dimethylmethanamine;hydrochloride (246.77  $\mu$ L, 1.73 mmol),  $K_2CO_3$  (358.63 mg, 2.59 mmol), NaI (25.93 mg, 0.17 mmol) in 1.73 mL of acetonitrile. The reaction mixture was stirred at 80°C for 24h, over the week end at room temperature and 24h at 80°C again. The reaction mixture was filtrated and evaporated to dryness. Purification of the crude material by preparative HPLC gave 9 mg of the titled product as a colorless oil, leading to a 8% yield.

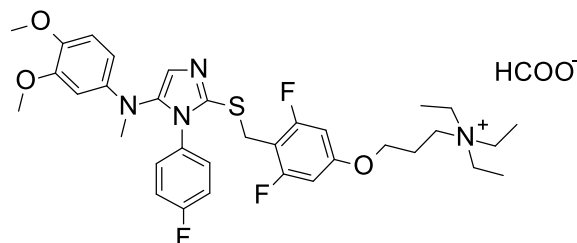
LC-MS:  $t_R$  = 2.48 min, MS  $[M+H]^+$   $m/z$  = 601.2.

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.30 (brs, 2H), 2.92 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.81-3.87 (m, 2H), 3.95 (s, 2H), 4.07 (brs, 2H), 6.15 (dd,  $J$  = 8.7, 2.8 Hz, 1H), 6.27 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H), 6.41 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 2H), 6.70 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.95-7.10 (m, 4H), 8.80 (s, 1H).

$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 23.4, 25.8, 40.4, 53.7, 56.1, 56.6, 64.1, 65.1, 98.4-98.8 (m), 100.3, 106.0, 106.2 (t,  $J$  = 20.1 Hz), 112.6, 116.1 (d,  $J$  = 22.9 Hz), 124.1, 129.4 (d,  $J$  = 8.6 Hz), 131.1 (d,  $J$  = 3.2 Hz), 137.9, 140.2, 142.9, 143.3, 149.7, 159.0 (t,  $J$  = 14.1 Hz), 161.7 (dd,  $J$  = 248.1, 10.9 Hz), 162.4 (d,  $J$  = 249.3 Hz), 168.5.

**Compound 27 :**

3-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenoxy]propyl-triethyl-ammonium;formate (**27**)



In a microwave tube was added 2-[[4-(3-chloropropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**17b**) (100 mg, 0.17 mmol), NEt<sub>3</sub> (241.12  $\mu$ L, 1.73 mmol) in 1.73 mL of acetonitrile. The reaction mixture was heated at 80°C overnight, 72h at room temperature and at 80°C for 24h. The reaction mixture was evaporated to dryness and purified by preparative HPLC to give 45.7 mg of the titled product as a colorless oil, leading to a 38% yield.

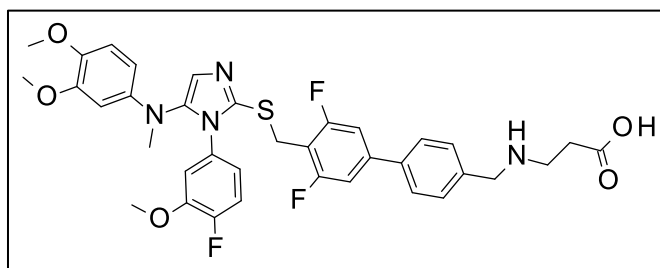
LC-MS:  $t_R = 2.60$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 643.2$ .

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 1.37 (s, 9H), 2.27 (brs, 2H), 2.91 (s, 3H), 3.47 (brs, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.98 (s, 2H), 4.08 (brs, 2H), 6.13 (dd,  $J = 8.7, 2.7$  Hz, 1H), 6.24 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.36 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 6.68 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.93-7.05 (m, 4H), 8.62 (s, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 7.93, 22.3, 25.6, 40.3, 53.6, 54.8, 55.9, 56.5, 65.1, 98.3-98.7 (m), 100.0, 105.8, 106.0 (t,  $J = 20.7$  Hz), 112.5, 116.0 (d,  $J = 22.8$  Hz), 124.0, 129.2 (d,  $J = 8.8$  Hz), 130.9 (d,  $J = 3.0$  Hz), 138.1, 139.8, 142.7, 143.1, 149.5, 158.9 (t,  $J = 14.0$  Hz), 161.6 (dd,  $J = 248.4, 11.0$  Hz), 162.3 (d,  $J = 249.2$  Hz), 167.3.

9. Compounds with zwitterionic kinetophores**Compound 28:**

3-[[4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]phenyl]methylamino]propanoic acid (**28**)



In a 25 mL flask was added 4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]benzaldehyde (**24a'**) (100 mg, 0.16 mmol) in 1.7 mL of dichloroethane. Ethyl 3-aminopropanoate (28.36 mg, 0.24 mmol), NaHB(OAc)<sub>3</sub> (102.61 mg, 0.48 mmol) and acetic acid (92.3  $\mu$ L, 1.61 mmol) were then added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 5h. The reaction mixture was filtrated and evaporated to dryness. Purification of the crude material by preparative HPLC gave 10 mg of the titled product as a white powder, leading to a 9% yield.

LC-MS:  $t_R = 2.58$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 693.2$ .

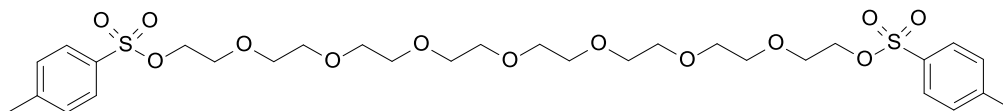
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 2.47 (brs, 2H), 2.91 (s, 3H), 3.08 (brs, 2H), 3.51 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 4.11 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 6.17 (dd,  $J = 8.7, 2.7$  Hz, 1H), 6.31 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.58 (dd,  $J = 7.5, 2.4$  Hz, 1H), 6.62-6.67 (m, 1H), 6.72 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 6.92-7.00 (m, 3H), 7.03 (s, 1H), 7.44-7.54 (m, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 25.9, 32.4, 40.2, 43.7, 50.9, 56.1, 56.7, 100.1, 105.8, 108.7-110.0 (m), 112.6, 112.7 (t,  $J = 10.3$  Hz), 113.0 (d,  $J = 3.5$  Hz), 116.1 (d,  $J = 20.3$  Hz), 119.9 (d,  $J = 5.6$  Hz), 124.6, 127.5, 130.9, 131.1 (d,  $J = 3.2$  Hz), 131.5, 138.2, 139.4, 139.7, 142.0, 142.9, 143.5, 147.8 (d,  $J = 11.4$  Hz), 149.8, 152.2 (d,  $J = 248.9$  Hz), 161.5 (dd,  $J = 248.7, 8.2$  Hz).



10. Dimers**Intermediate 29i:**

2-[2-[2-[2-[2-[2-(p-tolylsulfonyloxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy] ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**29i**)



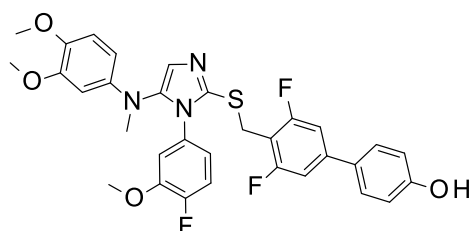
In a 5 mL flask were added  $\text{NEt}_3$  (0.85 mL, 6.07 mmol), 4-toluenesulfonyl chloride (1029.31 mg, 5.4 mmol) and 4-Diméthylaminopyridine (32.98 mg, 0.27 mmol) in DCM (3.5 mL) at  $0^\circ\text{C}$ . 2-[2-[2-[2-[2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol (500 mg, 1.35 mmol) was added at the reaction mixture and it was stirred for 3h and was then concentrated under reduced pressure. Purification of the crude material by flash chromatography using as eluent a mixture of DCM/MeOH (96/4) gave 833 mg of the titled product as a colorless oil, leading to a 91% yield.

LC-MS:  $t_R = 3.03$  min, MS  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+ m/z = 696.3$ .

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta$  (ppm) 2.44 (s, 6H), 3.54 (s, 8H), 3.57 (s, 8H), 3.58 (s, 8H), 3.64 (t,  $J = 4.7$  Hz, 4H), 4.12 (t,  $J = 4.7$  Hz, 4H), 7.37 (d,  $J = 8.3$  Hz, 4H), 7.78 (d,  $J = 8.3$  Hz, 4H).

**Compound 29:**

Step 7: 4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfonylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]phenol (**29a**)

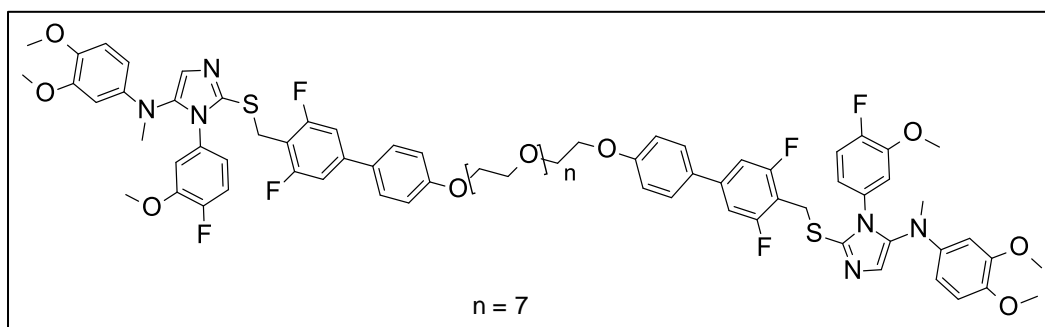


The titled product was obtained as a yellow oil, after purification by flash chromatography (150 mg, 73%), following Procedure D, using 2-[(4-bromo-2,6-difluoro-phenyl)methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**10b**) (200 mg) and 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenol (74.04 mg).

LC-MS:  $t_R = 3.06$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 608.1$ .

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.97 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.81 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 6.23 (dd,  $J = 8.5, 2.7$  Hz, 1H), 6.36 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.70 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 6.73 (s, 1H), 6.76 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.87 (d,  $J = 9.5$  Hz, 2H), 7.01 (s, 1H), 7.09 (dd,  $J = 10.6, 8.5$  Hz, 1H), 7.13 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.27 (s, 1H).

**Step 8:** 2-[[4-[4-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]phenoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]phenyl]-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**29**)



In a microwave tube were added 4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]phenol (**29a**) (250 mg, 0.41 mmol),  $K_2CO_3$  (68.24 mg, 0.49 mmol), and 1.30 mL of acetonitrile. 2-[2-[2-[2-[2-[2-(p-tolylsulfonyloxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy] ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**29i**) (125.68 mg, 0.19 mmol) and it was stirred under microwave irradiation at  $100^\circ C$  for 1h and then 30 min at  $110^\circ C$ . The reaction mixture was evaporated to dryness, diluted in EtOAc, washed with water, brine, dried over  $MgSO_4$  and evaporated to dryness. Purification of the crude material by flash chromatography using as eluent a mixture of DCM/MeOH (97/3) gave 50 mg of the titled product not clean. Purification by CCE using as eluent a mixture of DCM/MeOH (95/5) gave 17.5 mg of the titled product as a yellowish oil, leading to a 3% yield.

LC-MS:  $t_R = 3.72$  min, MS  $[M+2H]^{2+} m/z = 776.1$ .

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CD_2Cl_2$ ):  $\delta$  (ppm) 2.93 (s, 6H), 3.51 (s, 6H), 3.58-3.63 (m, 16H), 3.63-3.67 (m, 4H), 3.68-3.72 (m, 4H), 3.74 (s, 6H), 3.77 (s, 6H), 3.84-3.89 (m, 4H), 4.18 (s, 4H), 4.15-4.20 (m, 4H), 6.17 (dd,  $J = 8.8, 2.8$  Hz, 2H), 6.32 (d,  $J = 2.8$  Hz, 2H), 6.58 (dd,  $J = 7.6, 2.4$  Hz, 2H), 6.60-6.66 (m, 2H), 6.73 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.95-7.11 (m, 6H), 7.03 (s, 2H), 7.07 (d,  $J = 8.9$  Hz, 4H), 7.50 (d,  $J = 8.9$  Hz, 4H).

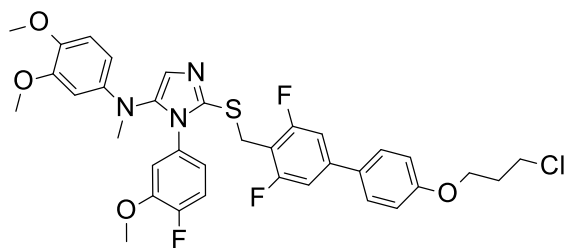




= 7.3 Hz), 123.6, 127.8, 129.3 (d,  $J = 8.8$  Hz), 130.7 (d,  $J = 16.3$  Hz), 137.9, 139.6, 143.0, 143.3, 147.6 (d,  $J = 11.6$  Hz), 150.0, 152.1 (d,  $J = 248.2$  Hz), 159.4, 161.3 (dd,  $J = 248.2, 9.1$  Hz).

### **Compound 31:**

**Step 8:** 2-[[4-[4-(3-chloropropoxy)phenyl]-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**31a**)

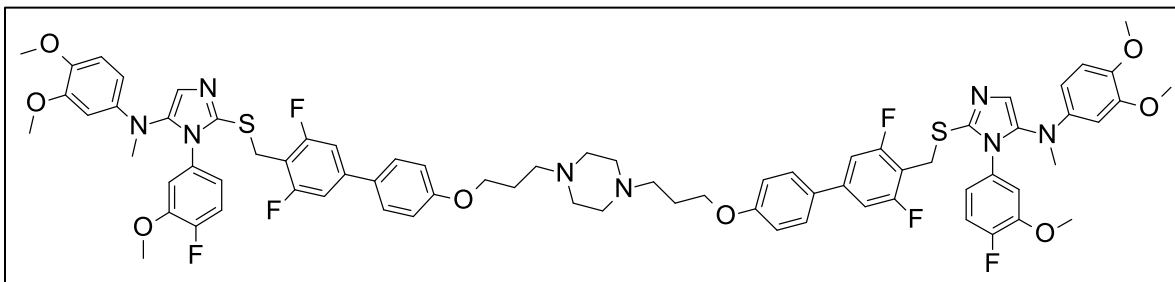


1-bromo-3-chloro-propane (114.97  $\mu\text{L}$ , 1.17 mmol), 4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]phenol (**29a**) (142 mg, 0.23 mmol) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (64.59 mg, 0.47 mmol) were added in acetonitrile (800  $\mu\text{L}$ ) and the reaction mixture was stirred at reflux for 3 hours. The solvent was removed under reduced pressure. The crude material was dissolved in EtOAc and washed by water. The aqueous phase was extracted by EtOAc and washed with brine, dried under  $\text{MgSO}_4$ . The solvents were removed under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography using as eluent a mixture of cyclohexane/EtOAc (50/50) to give 150 mg of the titled product as a yellow oil, leading to a 94% yield.

LC-MS:  $t_R = 3.73$  min, MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 684.1$ .

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.25 (quint,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 2.90 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 3.76 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 4.15 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 4.22 (s, 2H), 6.16 (dd,  $J = 8.7, 2.7$  Hz, 1H), 6.31 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 6.51 (dd,  $J = 7.5, 2.2$  Hz, 1H), 6.54-6.61 (m, 1H), 6.71 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.92-7.00 (m, 3H), 6.96 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.07 (s, 1H), 7.42 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H).

**Step 9:** 2-[[4-[4-[3-[4-[3-[4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]phenoxy]propyl]piperazin-1-yl]propoxy]phenyl]-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**31**)



In a 5mL flask were added 2-[[4-[4-(4-bromobutoxy)phenyl]-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**31a**) (60.35 mg, 0.08 mmol), piperazine (3.5 mg, 0.04 mmol), NEt<sub>3</sub> (11.27  $\mu$ L, 0.08 mmol) in 270  $\mu$ L of MeOH. The reaction mixture was stirred at 40°C overnight, at room temperature for 72h. The reaction mixture was evaporated to dryness and washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. The crude material was diluted in 700  $\mu$ L of DMF. Piperazine (9 mg, 0.1 mmol) and NEt<sub>3</sub> (28.97  $\mu$ L, 0.21 mmol) were added at the reaction mixture and it was heated at 40°C overnight, at 60°C for 12 days. The reaction mixture was evaporated to dryness, diluted in EtOAc, washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. Purification of the crude material by flash chromatography using as eluent a mixture of DCM/MeOH (96/4) gave 8 mg of the titled product as a yellow oil, leading to a 5% yield.

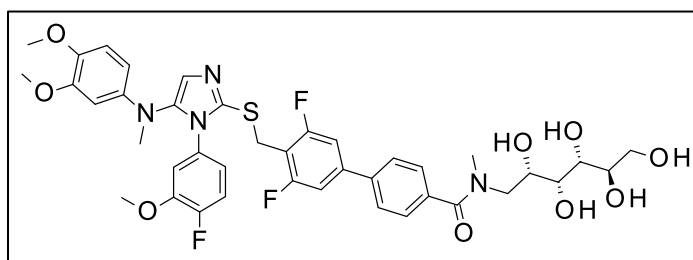
LC-MS:  $t_R$  = 3.57 min, MS [M+2H]<sup>2+</sup>  $m/z$  = 691.6.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm) 2.10-2.22 (m, 4H), 2.92 (s, 6H), 2.95-3.13 (m, 6H), 3.35 (s, 6H), 3.68 (s, 6H), 3.75 (s, 6H), 4.03 (s, 4H), 4.10-4.20 (m, 4H), 6.16 (dd,  $J$  = 8.7, 2.7 Hz, 2H), 6.34 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 2H), 6.42 (dd,  $J$  = 7.6, 2.4 Hz, 2H), 6.45-6.60 (m, 2H), 6.77 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 6.96 (dd,  $J$  = 10.9, 8.6 Hz, 2H), 7.00-7.07 (m, 6H), 7.15 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 4H), 7.58 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm) 26.5, 28.2, 40.6, 52.4, 55.4, 56.6, 56.7, 57.3, 66.5, 102.4, 108.2, 109.7-110.0 (m), 113.3, 114.6-114.7 (m), 114.8, 116.1, 116.6 (d,  $J$  = 19.7 Hz), 121.7 (d,  $J$  = 7.8 Hz), 125.1, 129.0, 131.9, 132.3 (d,  $J$  = 4.2 Hz), 138.8, 141.6, 143.8, 144.4, 145.1, 148.8 (d,  $J$  = 10.8 Hz), 151.3, 153.5 (d,  $J$  = 248.1 Hz), 160.8, 162.7 (dd,  $J$  = 248.2, 8.5 Hz).

11. Compounds with polyol kinetophores**Compound 32:**

4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]-N-methyl-N-[(2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl]benzamide (**32**)



In a 5 mL flask were added 4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]benzoic acid (**13a**) (194 mg, 0.31 mmol),  $\text{NEt}_3$  (41.18  $\mu\text{L}$ , 0.31 mmol), DCC (62.97 mg, 0.31 mmol), HOBT (41.24 mg, 0.31 mmol), and (2R,3R,4R,5S)-6-(methylamino)hexane-1,2,3,4,5-pentol (59.58 mg, 0.31 mmol) in 1 mL of DCM. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was evaporated to dryness and purified by preparative HPLC to give 100 mg of the titled product as a yellowish oil, leading to a 40% yield.

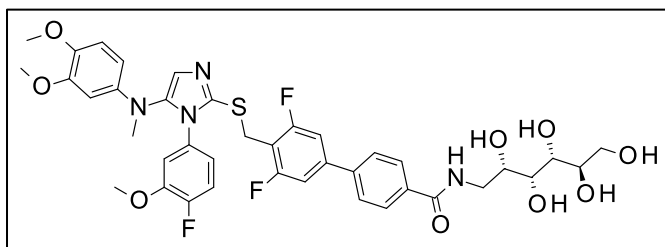
LC-MS:  $t_r = 2.53$  min, MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 813.3$ .

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm) 2.92 (s, 3H), 3.12 (s, 1.7H), 3.17 (s, 1.3H), 3.37 (s, 3H), 3.48-3.83 (m, 7H), 3.70 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.97-4.09 (m, 0.5H), 4.04 (s, 2H), 4.16-4.20 (m, 0.5H), 6.18 (dd,  $J = 8.7, 2.8$  Hz, 1H), 6.34 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 6.46 (dd,  $J = 7.2, 2.6$  Hz, 1H), 6.48-6.54 (m, 1H), 6.80 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.97 (dd,  $J = 10.9, 8.7$  Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 7.26 (dd,  $J = 8.5, 3.1$  Hz, 2H), 7.58 (t,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 7.71 (t,  $J = 8.1$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm) 26.8, 32.5, 38.6, 39.2, 51.0, 55.3, 55.9, 63.3, 70.1, 71.2, 71.6, 72.2, 101.1, 106.8, 109.4 (d,  $J = 25.3$  Hz), 113.3, 113.4, 113.4 (t,  $J = 7.4$  Hz), 115.2 (d,  $J = 19.9$  Hz), 120.3 (d,  $J = 7.8$  Hz), 123.7, 126.4, 126.6, 127.5, 128.0, 130.9 (d,  $J = 3.6$  Hz), 136.5 (d,  $J = 16.8$  Hz), 137.3, 140.3, 143.1, 143.6, 147.4 (d,  $J = 11.4$  Hz), 149.9, 152.1 (d,  $J = 248.5$  Hz), 161.3 (dd,  $J = 248.5, 8.6$  Hz), 172.3.

**Compound 33:**

4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]-N-[(2S,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl]benzamide (**33**)



In a 5 mL flask were added 4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]benzoic acid (**13a**) (63 mg, 0.1 mmol),  $\text{NEt}_3$  (13.37  $\mu\text{L}$ , 0.1 mmol), EDCI (15.39 mg, 0.1 mmol), HOBt (13.39 mg, 0.1 mmol), and D-glucamine (17.96 mg, 0.1 mmol) in 500  $\mu\text{L}$  of DCM. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was evaporated to dryness. The crude material was purified by preparative HPLC to give 17 mg of the titled product as a white solid, leading to a 21% yield.

LC-MS:  $t_R = 2.52$  min, MS  $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 799.3$ .

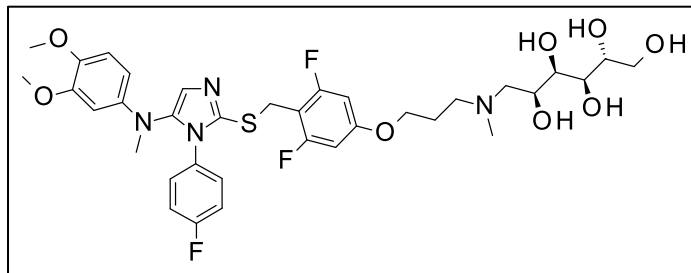
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm) 2.92 (s, 3H), 3.36 (d,  $J = 4.3$  Hz, 6H), 3.46-3.54 (m, 1H), 3.59-3.87 (m, 6H), 3.68 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.98-4.01 (m, 1H), 4.04 (s, 2H), 6.16 (dd,  $J = 8.7, 2.8$  Hz, 1H), 6.33 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 6.45 (dd,  $J = 7.6, 2.5$  Hz, 1H), 6.48-6.53 (m, 1H), 6.77 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.96 (dd,  $J = 11.0, 8.5$  Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 7.27 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.73 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.94 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm) 26.8, 39.2, 42.8, 55.2, 55.4, 55.9, 63.4, 70.0, 71.6, 71.9, 72.5, 101.1, 106.8, 190.4 (m), 113.4, 113.6 (t,  $J = 19.5$  Hz), 113.5, 115.2 (d,  $J = 19.9$  Hz), 120.3 (d,  $J = 7.1$  Hz), 123.7, 126.5, 127.8, 130.9 (d,  $J = 3.8$  Hz), 134.2, 137.3, 140.3, 140.9, 141.6 (t,  $J = 10.2$  Hz), 143.1, 143.6, 147.4 (d,  $J = 11.4$  Hz), 149.9, 152.1 (d,  $J = 248.6$  Hz), 161.3 (dd,  $J = 248.5, 8.7$  Hz), 168.5.



**Compound 34:**

(2R,3R,4R,5S)-6-[3-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluorophenyl)imidazol-2-yl]sulfonylmethyl]-3,5-difluoro-phenoxy]propyl-methyl-amino]hexane-1,2,3,4,5-pentol (**34**)



To a solution of 2-[[4-(3-chloropropoxy)-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**17b**) (100 mg, 0.18 mmol) in DMF (1.6 mL) were added (2R,3R,4R,5S)-6-(methylamino)hexane-1,2,3,4,5-pentol (101.31 mg, 0.52 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (56.37 mg, 0.17 mmol), NaI (25.93 mg, 0.17 mmol), the mixture was stirred at 75°C overnight. Purification of the crude material by preparative HPLC gave 24 mg of the titled product as a yellowish oil, leading to a 19% yield.

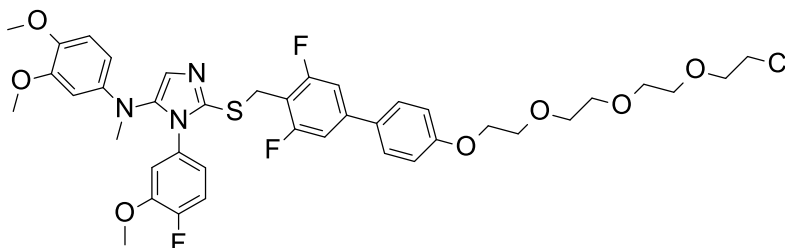
LC-MS:  $t_R = 2.40$  min, MS  $[M+H]^+$   $m/z = 737.3$ .

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 2.07 (s, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.90 (s, 3H), 3.03 (s, 4H), 3.75 (s, 3H), 3.74-3.78 (m, 6H), 3.77 (s, 3H), 3.86 (s, 2H), 3.94 (s, 2H), 6.12 (dd,  $J = 8.7, 2.6$  Hz, 1H), 6.23 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 6.36-6.39 (m, 2H), 6.72 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.93-7.07 (m, 5H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 25.1, 25.8, 40.4, 41.8, 54.5, 55.9, 56.5, 59.4, 63.8, 66.2, 68.9, 71.1, 71.9, 72.3, 98.4-98.7 (m), 100.3, 105.4 (t,  $J = 20.1$  Hz), 106.1, 112.5, 115.9 (d,  $J = 22.9$  Hz), 123.7, 129.3 (d,  $J = 8.7$  Hz), 130.9 (d,  $J = 3.1$  Hz), 137.8, 140.3, 142.9, 143.1, 149.6, 159.6 (t,  $J = 14.1$  Hz), 161.7 (dd,  $J = 247.1, 11.0$  Hz), 162.4 (d,  $J = 249.2$  Hz).

**Compound 35:**

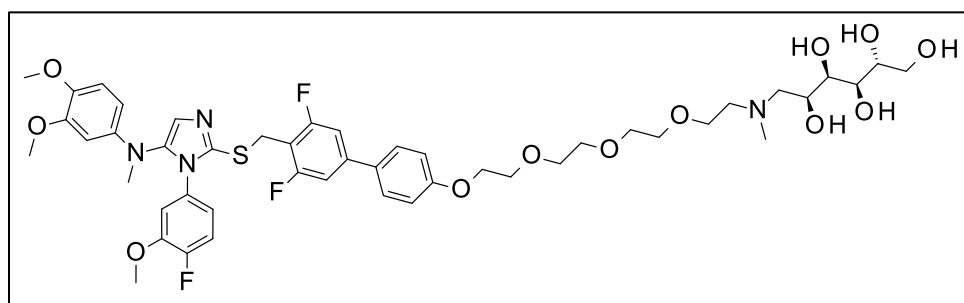
**Step 8:** 2-[[4-[4-[2-[2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]phenyl]-2,6-difluorophenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methylimidazol-4-amine (**35a**)



In 25 mL flask were added 4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]phenol (**29a**) (254 mg, 0.42 mmol), 1-(2-chloroethoxy)-2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethane (966.08 mg, 4.18 mmol), NaI (62.65 mg, 0.42 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (115.54 mg, 0.84 mmol) in acetonitrile (1.40 mL). The reaction mixture was stirred at reflux for 24h. The crude material was then evaporated, residue was dissolved in DCM, washed with water and brine, organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>. Purification of the crude material by flash chromatography using as eluent a mixture of DCM/MeOH (99/1) to give 140 mg of the titled product not clean as a yellowish oil, leading to a 42% yield. It was used without further purification in the next step of the synthesis.

LC-MS: t<sub>R</sub> = 3.38 min, MS [M+H]<sup>+</sup> m/z = 803.3.

**Step 9:** (2R,3R,4R,5S)-6-[2-[2-[2-[2-[4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]phenoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl-methyl-amino]hexane-1,2,3,4,5-pentol (**35**)



To a solution of 2-[[4-[4-[2-[2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]phenyl]-2,6-difluorophenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-

imidazol-4-amine (**35a**) (110 mg, 0.14 mmol) in acetonitrile (2 mL) were added Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (44.67 mg, 0.14 mmol), NaI (20.55 mg, 0.14 mmol) and (2R,3R,4R,5S)-6-(methylamino)hexane-1,2,3,4,5-pentol (53.53 mg, 0.27 mmol). The reaction mixture was stirred at 75°C overnight. The crude material was purified by preparative HPLC and gave 35 mg of the titled product as a yellowish oil, leading to a 27% yield.

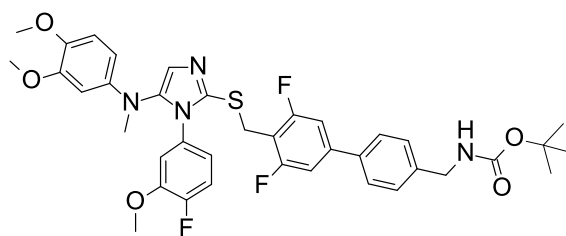
LC-MS: t<sub>R</sub> = 2.67 min, MS [M+H]<sup>+</sup> m/z = 962.2.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 2.67-2.74 (m, 1H), 2.80-2.84 (m, 1H), 2.91 (s, 3H), 3.05 (s, 3H), 3.36-3.99 (m, 34H), 4.14 (s, 4H), 6.16 (dd, *J* = 8.7, 2.7 Hz), 6.31 (d, *J* = 2.7 Hz), 6.55 (dd, *J* = 7.5, 2.3 Hz), 6.60-6.65 (m, 1H), 6.71 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.92-6.99 (m, 5H), 7.05 (s, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 25.9, 40.1, 41.9, 55.9, 56.0, 56.5, 64.8, 67.6, 69.5, 70.2 (m, peg), 70.6, 100.0, 105.8, 109.1 (d, *J* = 26.7 Hz), 111.3 (d, *J* = 19.6 Hz), 112.7 (d, *J* = 20.9 Hz), 115.1, 115.9 (d, *J* = 19.9 Hz), 119.7 (d, *J* = 6.9 Hz), 124.3, 127.9, 130.7, 138.3, 139.4, 142.5 (t, *J* = 11.1 Hz), 142.7, 143.3, 147.6 (d, *J* = 11.9 Hz), 152.0 (d, *J* = 249.1 Hz), 159.1, 161.3 (dd, *J* = 248.9, 8.9 Hz).

### **Compound 36:**

**Step 7:** *tert*-butyl N-[[4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-*N*-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfonylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]phenyl]methyl]carbamate (**36a**)

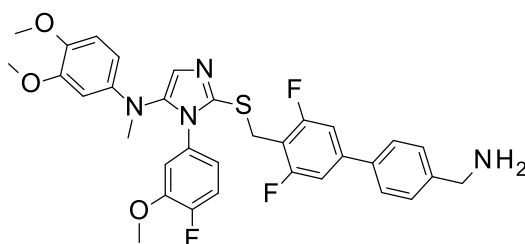


In a microwave tubes were added 2-[[4-bromo-2,6-difluoro-phenyl)methylsulfonyl]-*N*-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-*N*-methyl-imidazol-4-amine (**10b**) (1000 mg, 1.682 mmol), [4-[[*tert*-butoxycarbonylamino)methyl]phenyl]boronic acid (422.39 mg, 1.68 mmol), 1M Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5.047 mL, 5.05 mmol), and Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (274.54 mg, 0.34 mmol). 8.4 mL of DMF was added to the reaction mixture and it was heated under microwave irradiation at 100°C for 10 min. The reaction mixture was filtrated and evaporated to dryness. The crude material was diluted in EtOAc and washed with 1N HCl solution, brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated to dryness. Purification of the crude material by flash chromatography using as eluent a mixture of DCM/MeOH gave 740 mg of the titled product as a yellow oil, leading to a 61% yield.

LC-MS:  $t_R = 3.42$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 721.3$ .

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 1.48 (s, 9H), 2.90 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 4.20 (s, 2H), 4.32 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 4.95 (brs, 1H), 6.17 (dd,  $J = 8.7, 2.7$  Hz, 1H), 6.32 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 6.55 (dd,  $J = 7.6, 2.5$  Hz, 1H), 6.57-6.63 (m, 1H), 6.72 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.95 (dd,  $J = 10.7, 8.5$  Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 7.30 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.39 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H).

**Step 8:** 2-[[4-[4-(aminomethyl)phenyl]-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**36b**)

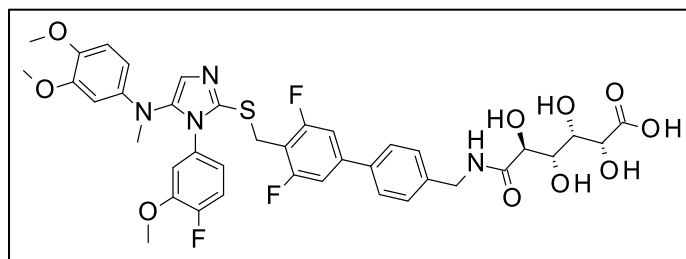


In a 25 mL flask was diluted *tert*-butyl *tert*-butyl N-[[4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]phenyl]methyl] carbamate (**36a**) (740 mg, 1.03 mmol) in 4 mL of DCM, 1.2 mL of TFA was added at the reaction mixture and it was stirred at room temperature for 30 min. The reaction mixture was dissolved in DCM and washed with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$ , with brine and evaporated to dryness to give 590 mg of the titled product as a yellow solid, leading to 93% yield.

LC-MS:  $t_R = 2.62$  min (+ injection peak), MS  $[M+H]^+ m/z = 621.2$ .

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.88 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.91 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 6.15 (dd,  $J = 8.7, 2.7$  Hz, 1H), 6.31 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 6.53 (dd,  $J = 7.5, 2.4$  Hz, 1H), 6.55-6.61 (m, 1H), 6.67 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.89-7.01 (m, 3H), 7.03 (s, 1H), 7.37-7.46 (m, 4H).

**Step 9:** (2R,3S,4S,5S)-6-[[4-[4-[[5-(3,4-dimethoxy-N-methyl-anilino)-1-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)imidazol-2-yl]sulfanylmethyl]-3,5-difluoro-phenyl]phenyl]methylamino]-2,3,4,5-tetrahydroxy-6-oxo-hexanoic acid (**36**)



To a solution of 2-[[4-[4-(aminomethyl)phenyl]-2,6-difluoro-phenyl]methylsulfanyl]-N-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluoro-3-methoxy-phenyl)-N-methyl-imidazol-4-amine (**36b**) (100 mg, 0.16 mmol) in 0.4 mL of methanol were added D-glucaric acid-1,4-lactone (37.14 mg, 0.19 mmol),  $\text{NEt}_3$  (0.04 mL, 0.32 mmol). The suspension was stirred at 75°C for 6h. D-glucaric acid-1,4-lactone (6.19 mg, 0.03 mmol) was added again and the reaction mixture was stirred at 75°C for 2h. The crude material was purified by preparative HPLC to give 14 mg of the titled product as a yellowish oil, leading to a 11% yield.

LC-MS:  $t_R = 2.45$  min, MS  $[M+H]^+ m/z = 813.3$ .

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 2.91 (s, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.58 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.68-3.72 (m, 1H), 3.87-3.89 (m, 1H), 3.93 (t,  $J = 3.2$  Hz, 1H), 4.09-4.10 (m, 1H), 4.11 (s, 2H), 6.05 (dd,  $J = 8.7, 2.6$  Hz, 1H), 6.23 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 6.60-6.65 (m, 1H), 6.73 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.77 (dd,  $J = 7.9, 2.5$  Hz, 1H), 7.01 (s, 1H), 7.16 (dd,  $J = 11.3, 8.5$  Hz, 1H), 7.36-7.43 (m, 4H), 7.65-7.68 (m, 2H), 8.23 (t,  $J = 6.2$  Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 26.3, 40.2, 41.9, 55.0, 56.3, 56.6, 68.6, 70.7, 71.7, 73.9 (d,  $J = 11.7$  Hz), 100.2, 105.8, 109.7 (d,  $J = 25.4$  Hz), 112.6, 113.9, 114.0, 116.2 (d,  $J = 19.5$  Hz), 120.5 (d,  $J = 6.8$  Hz), 124.7, 126.9, 128.3, 131.6, 135.8, 137.3, 139.8, 140.9, 142.2 (t,  $J = 9.9$  Hz), 142.5, 143.6, 147.2 (d,  $J = 11.4$  Hz), 149.8, 151.5 (d,  $J = 246.3$  Hz), 161.3 (dd,  $J = 247.2, 8.8$  Hz), 173.0, 175.3.

**B. Compound evaluation**1. Sample analysis – LCMS/MS Method

Samples analysis were performed using a UPLC system (Aquity I Class, Waters®, Les Ulis, France) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (Xevo TQD, Waters®, Les Ulis, France). Chromatographic separations were carried out using an Acquity BEH C18, 1.7 µm, 50 x 2.1 mm column (Waters®, les Ulis, France). The autosampler and column oven temperatures were 10°C and 40°C respectively and the sample injection volume was 1 µL. The eluting conditions consisted of a gradient of 0.1% Formic Acid in LC-MS grade water (solvent A) and 0.1% Formic Acid in LC-MS grade acetonitrile (Solvent B) with a flow rate of 600 µL/min, as follows : 0 - 0.2 min (2% B); 0.2 - 2 min : linear gradient from 2 to 98% B; 2 to 2.5 min : isocratic at 98% B; 2.5-2.6 min : from 98 to 2% B and 2.6 to 4 min : isocratic at 98% A (equilibration under the initial conditions before the next injection). Mass spectrometer was equipped with an electrospray ionization source (ESI). The desolvation and cone gas flow were respectively 1200 and 50 L/h and the source temperature was 600°C. The capillary and cone voltages, the collision energy and the observed MRM transitions were optimized for each compound. The detection of analytes was achieved with the appropriate MRM transition. The LC-MS/MS instrument was controlled by MassLynx software (Waters®) and the peaks areas were quantified using TargetLynx software (Waters®).

2. Physicochemical properties*a. Solubility*

10 µL of a 10 mM solution of the compound in DMSO are diluted either in 490 µL of PBS pH 7.4 or in an organic solvent (MeOH) (in triplicate). The tubes are gently shaken 24 h at room temperature, then centrifuged for 5 minutes at 4000 rpm. The mixtures are filtered over 0.45 µm filters (Millex-LH Millipore). 10 µL of each sample are diluted in 490 µL of MeOH. The solubility is determined by the ratio of mass signal area PBS/organic solvent.

*b. Log D*

40 µL of a 10 mM solution of the compound in DMSO were diluted in 1.960 mL of a 1/1 octanol/PBS at pH 7.4 mixture. The mixture was gently shaken 2h at room temperature. 10 µL of each phase was diluted in 490 µL of MeOH and analyzed by LC-MS/MS. Each compound is tested in triplicate. Log D was determined as the logarithm of the ratio of concentration of product in octanol and PBS respectively, determined by mass signals.

### 3. In vitro TGR5 assay

TGR5 activation by compounds and subsequent increase in intracellular cAMP were evaluated using a luciferase reporter gene assay. Human embryonic kidney (HEK) 293 cells were transiently co-transfected with pCMV tag4b-TGR5h (to determine hTGR5 activation) or pCMV AC6-TGR5m (to determine mTGR5 activation) expression plasmids and the pCRE TA-Luciferase reporter plasmid using the JET PEI reagent (Polyplus transfection). Transfected cells were seeded in 96-well plates and incubated overnight with the compounds at increasing concentrations in duplicate. Lithocholic acid (LCA) at 10  $\mu\text{M}$  was used as a positive reference compound. The cAMP-dependent luciferase expression was followed using the BrightGlo reagent according to the manufacturer (Promega) instructions. Luminescence was measured with a Mithras plate reader (Berthold). Data were expressed as percentage of the 10 $\mu\text{M}$  LCA value and  $\text{EC}_{50}$  values were calculated using XL fit 5 software or GraphPad Prism 5. Concentration-response curves were fitted by a nonlinear regression analysis to a 4 parameters logistic equation.

### 4. ADME

#### a. Caco-2 experiment

0.4 x 10<sup>5</sup> Caco-2 Cells (ATCC No. HTB-37), at passage 28, were seeded on 25 cm<sup>2</sup> plastic flask and changed every second days with complete medium containing high glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with L-glutamine supplemented by 10% of Foetal Calf/Bovine Serum, 1% of non-essential amino acids without L-glutamine. The paracellular barrier characteristics of Caco-2 cells monolayer was monitored using measurement of the permeability to the non-permeant fluorescent molecule, Lucifer Yellow (LY). The permeability to Lucifer yellow values (< 1 x 10<sup>-6</sup> cm/s) attested of the restriction of the paracellular permeability in Caco-2 cultures in the absence of compound. Caco-2 cells were trypsinized after 3 days of incubation while they cover 80-90% of the flask and seeded at a density of 5 x 10<sup>5</sup> in 75 cm<sup>2</sup> flasks in complete medium supplemented with 73 nM (around 0.04  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of the antibacterial puromycin (3'-[ $\alpha$ -Amino-p-methoxyhydrocinnamamido]-3'-deoxy-N,N-dimethyladenosine dihydrochloride). After 5 to 6 days, Caco2 cells reach high cells density (> 0.5 x 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>) and are then passage into cell HTS 24-well plates with 0.4  $\mu\text{m}$  Polycarbonate membrane inserts. Cells were seeded at 600 000 cells/cm<sup>2</sup> (200 000 cells/insert) and cultivated for 6 days in complete medium with puromycin. Media was replaced every second days. Compound solutions were prepared in HEPES-buffered Ringer's (RH) solution (NaCl 150 mM, KCl 5.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 6 mM, Glucose 2.8 mM, HEPES 5 mM, water for injection), pH = 7.4 at a final concentration of 1 to 10  $\mu\text{M}$  for tested drugs. For A→B transport experiment, 0.2 mL of the compound solution was placed on the apical side of the cells and

samples were taken from the basolateral compartment. For B→A transport experiment 0.8 mL of the solution was placed on the basolateral side of the cells and samples were taken from apical side. Transport studies were done in Transwell polycarbonate: HTS 24 well plate inserts (surface area: 0.33 cm<sup>2</sup> - 0.4 μm pore size). Cells were equilibrated for 10 minutes in transport buffer prior to the transport experiment, and then incubations with compounds were performed at 37 °C under agitation. After 1 hour aliquots were taken from each compartment and sampled in 96-well plates with glass insert. Permeations are calculated using the formulas below:

$$P_{appA \rightarrow B} = \frac{V_B \times AUC_{B(T)}}{T \times S \times AUC_{B(T_0)}} \quad P_{appB \rightarrow A} = \frac{V_A \times AUC_{A(T)}}{T \times S \times AUC_{B(T_0)}}$$

V is the volume of solution in apical side (A) or basolateral side (B), AUC is the area of the LC-MS/MS signal for the compound measured in A or B side at initial time (T<sub>0</sub>) or at the end of the incubation (T), T is the incubation time and S is the surface area of the insert membrane.

#### **b. Microsomal stability experiment**

Male mouse (CD-1) liver microsomes (BD Gentest) were used. All incubations were performed in duplicate in a shaking water bath at 37 °C. The incubation mixtures contained 1 μM compound with 1% methanol used as a vehicle, mouse male liver microsomes (0.3 mg of microsomal protein per mL), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NADP, 5 mM glucose 6-phosphate, 0.4 U.mL<sup>-1</sup> glucose 6-phosphate dehydrogenase, and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) in a final volume of 0.5 mL. Aliquots were removed at 5, 10, 20, 30, and 40 min after microsomes addition, and the reaction was stopped by adding four volumes of ice-cold acetonitrile containing 200 nM of internal standard. The samples were centrifuged for 10 min at 10000 rpm and the supernatants were transferred in matrix tubes for LC-MS/MS analysis. Each compound was quantified by converting the corresponding analyte/internal standard peak area ratios to percentage drug remaining, using the initial ratio values in control incubations as 100%. Propranolol, known as a high hepatic clearance drug in rodents, was used as a quality-control compound for the microsomal incubations. In vitro intrinsic clearance (Cl<sub>int</sub> expressed as μL/min/mg) was calculated according to: the following formula : Cl<sub>int</sub> = dose/AUC<sub>∞</sub>, where dose is the initial amount of drug in the incubation mixture (1 μM) and AUC<sub>∞</sub> is the area under the concentration versus time curve extrapolated to infinity. The slope of the linear regression from log percentage remaining versus incubation time relationships (-k) was used in the conversion to *in vitro* t<sub>1/2</sub> values by: t<sub>1/2</sub> = -ln(2)/k.



c. In vivo pharmacokinetics experiments

Compound **13** to **16** and **21** were dissolved in distilled water 0.1% tween and administered per os at 32  $\mu\text{mol/kg}$  to 10 week old, male, C57Bl6 mice (approx. 25-30 g) (Charles River). Three mice per time point were anesthetized with isoflurane and aliquots taken from the retro-orbital sinus using sampling heparinated tubes (4°C) at 15 min, 30 min, 45 min, 1h, 2h, 4h and 8h after administration of a single dose of ligands. The blood samples were centrifuged (5000 g, 15 min) for plasma separation and stored at - 80°C before compound measurement. Plasma samples were thawed on ice. Aliquots were precipitated with ice cold acetonitrile (1 to 10 ratio) containing compound **1** (0.2  $\mu\text{M}$ ) as internal standard. The samples were vigorously mixed with a vortex and centrifuged for 10 min at 10 000 rpm, 4°C, and the supernatants were transferred into Matrix tubes for LC-MS/MS analysis. Spiked standard solutions (1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10 000 and 30 000 nM) were prepared the same way. After rodent sacrifice, gallbladders, livers and intestines were removed. Gallbladders were immediately measured using a vernier caliper. Intestine was cut to isolate duodenum, jejunum, ileum and colon. All tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at - 80°C. Compound in tissues was extracted with a MeOH/CH<sub>3</sub>CN, 50:50 mixture (using a vortex for feces or a Tissue Lyzer II from Qiagen for tissues). After centrifugation (10000 rpm, 10 min, 4°C) of the homogenate samples, supernatants were diluted (1 to 10) with ice acetonitrile containing compound **1** (0.2  $\mu\text{M}$ ) as internal standard. After a last centrifugation, the supernatants were transferred into Matrix tubes for LC-MS/MS analysis.

5. In vivo experimentsa. Animals and diets

10-12 old week male C57Bl6 mice were purchased from Charles River (France) and fed *ad libitum* with a standard diet (UAR A04, Villemoisson/Orge, France). For high fat diet (HFD) experiments, 10-12 old week male C57Bl6 mice were fed a HFD (D12492; Research Diets; 60% kcal fat) for 8-10 weeks to induce obesity and insulin-resistance. Experiments were performed in mice with a 30% increase in body weight. All animals were maintained in standard animal cages under conventional laboratory conditions (12h/12h light/dark cycle, 22°C) with *ad libitum* access to food and water. The animals were maintained in compliance with European standards for the care and use of laboratory animals and experimental protocols approved by the local Animal Ethical Committee (agreements N°CEEA 07430, 01134.01 and 01134.03).

*b. GLP-1 secretion*

Mice were fasted from the time of gavage with vehicle or compound as indicated in figure legend, and gavaged with sitagliptin (25 mpk) 1 hour or with Omarigliptine (2 mpk) before blood (250 µL) was sampled by retro-orbital venipuncture under isoflurane anaesthesia in EDTA-coated tubes containing DPP-4 inhibitors diprotin A (Sigma-Aldrich). Active GLP-1 plasma concentration was measured by ELISA (Millipore).

*c. Gallbladder volume measurement*

Mice were killed by cervical dislocation. Gallbladder volume (length x width x width) was evaluated using a vernier caliper and removed to measure compound content.

*d. OGTT*

After an overnight fasting, mice were gavaged with vehicle or compound and fasted for 7 hours. A bolus of glucose was administrated by gavage and glycemia were measured at 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min by glucometer (Roche).