

UNIVERSITE DE LILLE
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
JPArC INSERM UMR S-1172

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE
Spécialité : Sciences du médicament

Présentée et soutenue le 27 Septembre 2019

Par

Manon STURBAUT

**Conception, synthèse et évaluation de
ligands de TEAD pour le traitement des
cancers**

Membres du Jury

Rapporteurs : **Pr. Sandrine Onger**, Professeur, Université de Paris-Sud
Pr. Anne-Sophie Voisin-Chiret, Professeur, Université de Caen

Examineurs : **Dr. Fanny Roussi**, Directrice de Recherche, ICSN Gif-sur-Yvette
Pr. Jean-François Guichou, Professeur, Université de Montpellier

Directeur de thèse : **Pr Philippe Cotelle**, Professeur, ENSC Lille

Co-encadrant : **Dr Fabrice Bailly**, Maître de Conférences, Université de Lille

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier le **Pr Philippe Cotelle**, mon directeur de thèse, pour votre encadrement, votre disponibilité et la confiance que vous m'avez accordé durant ces trois ans. Merci pour vos relectures, votre patience et votre optimisme. Je vous remercie également pour tous les gâteaux que vous nous avez ramenés aussi bien les tartes rhubarbes que les tiramisus et les cookies. J'aimerais remercier également le **Dr Fabrice Bailly** pour votre encadrement aussi bien au labo que dans le déroulement du projet. Merci également pour les corrections de ce manuscrit, pour les conseils en chimie depuis le master.

Je souhaite remercier le **Pr Patricia Melnyk**, directrice du laboratoire, de m'avoir accueillie au sein de l'équipe et pour vos conseils lors des différentes réunions.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Le **Pr Anne-Sophie Voisin-Chiret** et le **Pr Sandrine Onger**, pour leur suivi et conseils avisés lors des deux comités de suivi de thèse ainsi que d'avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit. Je vous remercie par avance pour le temps précieux accordé à la lecture de cette thèse. Je remercie également le **Dr Fanny Roussi** et le **Pr Jean-François Guichou** d'avoir accepté le rôle d'examineur de ce travail de thèse.

Je remercie tous les membres de l'équipe Onco et NeuroChimie. Je commencerais par Le **Dr Laurence Agouridas** alias La Poulpa pour ta gentillesse et ta sérénité, le partage des bons plans, tes mosaïques et l'énergie que tu as dépensée pour m'initier aux mots fléchés le midi. Merci également à son acolyte le **Dr Severine Ravez** pour ta bonne humeur, ton aide si précieuse lors des analyses des données biophysiques, et ton enthousiasme à chaque résultat qui met du baume au cœur. Le **Dr Jamal El Bakali** ou Jamal le roi du footballe ! (et de la MedChem), merci pour tes conseils aussi bien footballistiques que chimiques ! Merci pour ton écoute attentive, tes relectures en anglais, et tes discussions qui n'en finissent jamais... ton regard critique et ta culture en chimie médicinale que j'admire. Go arsenal ! Go gunners ! Merci à **Florian** mon collègue de bureau, mon binôme, pour nos discussions et ton soutien. Merci pour tes connaissances en chimie et tes noms de réactions, le temps que tu nous consacres pour essayer de résoudre les problèmes de chimie ou à l'analyse des RMN. Je continuerais par **Florine**, qui a partagé le bureau avec nous pendant un an, merci de poursuivre ces travaux de thèse et je te souhaite bon courage pour la suite de cette aventure qu'est la thèse.

Je poursuivrais avec le **Dr Nicolas Lebegue**, merci de nous challenger à chaque réunion et préparation aux oraux. Merci pour ta disponibilité et ton regard critique sur le projet, et merci pour

l'ambiance que tu sais mettre lors des repas de Noël. Je remercie également le **Dr Saïd You** pour sa culture en chimie et les pauses café au premier. Maxime, Polo et Raphaël de m'accueillir au premier (le bunker), pour votre joie de vivre et tous ces fous rires et moments d'égarement. **Polo**, pour ton « Salut les filles » tous les matins et ton « vendu », merci pour les bonbons et les cookies maison et merci pour ton aide en chimie, tes distillations de THF et DMF et le temps que tu nous consacres à la paillasse. **Maxime**, je te remercie pour ton aide en biologie cellulaire, en thermophorèse et pour les brainstorming. Je te remercie également pour toutes les discussions chimiques ou non, les framboises et groseilles du jardin et ton calme admirable. Tu auras gagné pas mal de paris... Quant à remercier **Raphaël**, « non je ne crois pas non »... Team Chocolatine éternel vainqueur de kicktipp, merci pour tes blagues quotidiennes et ta bonne humeur, les moments de décompressions le midi et les nombreuses notifications qui m'ont fait bien rire. Et surtout merci pour ce cours de ski mémorable.

Je tiens à remercier **Mathilde Coevoet** pour ton implication et tout ce temps consacré à l'obtention des résultats bio du projet. Merci pour tous ces screenings et western blot. Merci pour tes statistiques et surtout merci pour ta rapidité, ta disponibilité et ta gentillesse. Je continuerais avec le **Dr Catherine Baud**, merci pour tes conseils et tes explications en biologie. Un merci également aux RMNistes le **Pr Stéphanie Delbaere** et le **Dr Jérôme Berthet** pour votre aide et les soirées KickTipp.

Quelle entente dans cette équipe ! Ce sont les gens du Nord ... (Laurence et Jamal, vous êtes comme des Ch'timi maintenant ...)

Je remercie le **Dr Laurence Goossens** de m'avoir fait confiance lors de mon stage de master 1, de m'avoir initié à la chimie et de m'avoir appris énormément. Merci également pour votre écoute et votre gentillesse qui m'ont été chères durant cette année.

Je pense forcément au **Dr Floriane Gibault**, je pourrais en dire énormément sur toi mais je commencerais simplement par merci de m'avoir légué le flambeau YAP-TEAD. Mais surtout merci pour ton amitié, les fous rires, les moments de décompression, les week-ends à Londres, ton oreille attentive, tes conseils et tous ces bons moments passés avec toi. Le **Dr Mélanie Bollier** pour tous ces moments de décompression le midi, les sorties vélo, de m'avoir initié à Lille-Hardelot, merci pour ta bonne humeur et ton rire communicatif. Merci à son acolyte, le **Dr Baptiste Villemagne** pour ta gentillesse et ta simplicité, ton aide et tes conseils dans la recherche de post-doc.

J'aimerais remercier également les différents collaborateurs. Je remercie le reste de l'équipe de RMN, le **Pr Nathalie Azaroual**, le **Dr Vincent Ultré**, **Alexandre Rech** pour leur aide en RMN et les diverses expériences NOESY et les résolutions de structures des composés. J'ajouterais le **Dr Xavier**

Thuru et **Mr Romain Magnez**, pour la construction du TEAD-GFP, l'initiation à la culture cellulaire et les expériences en thermophorèse à micro-échelle.

J'ajouterais le **Dr Vangelis Agouridas** de m'avoir fait confiance et d'avoir accepté ma candidature pour le monitorat. Sans oublier, le **Dr Jean-François Dechezelle** et **Mr Patrick Daubias**. Ce fût une expérience très enrichissante et j'ai vraiment apprécié la partager avec vous.

Un grand merci au **Pr Jean-François Guichou** et au **Dr Frédéric Allemand**, pour leur accueil chaleureux sur Montpellier et leur accent du sud. Merci pour le temps consacré sur ce projet, à la production et la cristallisation de la protéine. Merci pour tout ce que vous m'avez appris durant ces quelques semaines en Occitanie et votre bienveillance. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

Que dire sur toi Marie, merci pour ton soutien infailible et ton amitié qui m'est indispensable. Merci d'être toujours là dans les bons comme dans les mauvais moments depuis des années maintenant. Mon héroïne qui ne porte pas de cape... Sans oublier, Margaux, merci de nous faire rêver avec tes voyages et tous ces bons moments passés avec toi. Merci pour cette fête de la musique inoubliable et ton amitié sincère et intemporel malgré la distance parfois. Mes PJT. J'ajouterais Dimitri, merci d'être un si bon ami sur qui l'on peut compter, merci pour toutes les séances de sport-papotage, et les sorties inoubliables (ou presque). Je remercie tous mes amis pour tous ces bons moments passés ensemble qui sont très importants pour moi.

Le meilleur pour la fin, Seb, je ne te remercierais jamais assez pour tout ce que tu fais pour moi. Mon pilier. Que de moments et de voyages avec toi. Le meilleur reste à venir. Parcourons le monde ensemble.

Enfin, un grand merci à toute ma famille, d'être toujours présente et unie. Merci à papi, mamie pour les bons plats du mardi midi qui redonne du boost pour l'après-midi. Tous ces repas de famille que j'aime tant et ce voyage magnifique. Merci à Anthony et Cécile, pour ce voyage à New-York et ces vacances en Corse mais surtout merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir choisi comme marraine de cette magnifique petite fille. Ma Charlie. Ma sœur Romane. Mon frère Joshuan et la famille Sturbaut avec ce lien particulier qui nous unit maintenant. Pour finir, Maman, je pourrais en dire tellement, tu rythmes nos vies. Merci de m'avoir soutenu jusqu'ici dans toutes ces épreuves de la vie. Je vous aime tellement.

« Tu n'es plus là où tu étais, mais tu es partout là où je suis. »

Victor Hugo

PUBLICATIONS

Gibault, F. and **Sturbaut, M.** (co-first author); Bailly, F.; Melnyk, P.; Cotelle, P. Targeting Transcriptional Enhanced Associate Domains (TEADs). *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *61*, 5057–5072

Gibault, F.; Coevoet, M.; **Sturbaut, M.**; Farce, A.; Renault, N.; Allemand, F.; Guichou, J.-F.; Drucbert, A.-S.; Foulon, C.; Magnez, R.; Thuru, X.; Corvaisier, M.; Huet, G.; Chavatte, P.; Melnyk, P.; Bailly, F.; Cotelle, P. Toward the Discovery of a Novel Class of YAP–TEAD Interaction Inhibitors by Virtual Screening Approach Targeting YAP–TEAD Protein–Protein Interface. *Cancers* **2018**, *10*, 140

Sturbaut, M.; Bailly, F.; Coevoet, M.; Allemand, F.; Pugniere, M.; Melnyk, P.; Guichou, J.-F. ; Cotelle, P. Discovery of a cryptic site on the interface 2 of TEAD. *Journal of Medicinal Chemistry* (in preparation)

ORAL COMMUNICATIONS

Sturbaut, M.; Bailly, F.; Melnyk, P.; Cotelle, P. *Design and synthesis of TEAD's ligands as new anticancer drug*, 9th Ph.D. Student Day (Lille, France, 03/12/2018)

Sturbaut, M.; Gibault, F.; Bailly, F.; Coevoet, M.; Magnez, R.; Thuru, X.; Melnyk, P.; Cotelle, P. *Conception et synthèse de ligands de TEAD pour le traitement de cancers*. 17^{ème} Rencontre en Chimie Organique Biologique (Aussois, France, 03/18-22/2018)

Sturbaut, M.; Gibault, F.; Guichou, J.-F.; Allemand, F.; Magnez, R.; Thuru, X.; Melnyk, P.; Bailly, F.; Cotelle, P. *Conception et synthèse de ligands de TEAD*. 2nd research day (Lille, France, 07/11/2018)

Cotelle, P. ; Gibault, F.; **Sturbaut, M.**; Guichou, J.-F.; Allemand, F.; Magnez, R.; Thuru, X.; Bailly, F.; Melnyk, P. *Design of TEAD modulators*. YAP/TAZ and TEAD: At the Crossroads of Cancer II (Telluride, Colorado, USA, 06/28/2018)

Sturbaut, M.; Bailly, F.; Coevoet, M.; Pugniere, M.; Melnyk, P.; Allemand, F.; Guichou, J.-F.; Cotelle, P. ; *Design and synthesis of TEAD ligands for the cancer treatment*. EFMC-YMCS Symposium 2019 (Athens, Greece, 09/5-6/2019)

POSTER COMMUNICATIONS

Sturbaut, M.; Gibault, F.; Guichou, J.-F.; Allemand, F.; Magnez, R.; Thuru, X.; Melnyk, P.; Bailly, F.; Cotelle, P. *Conception et synthèse de ligands de TEAD*. 2nd research day (Lille, France, 07/11/2018)

Sturbaut, M.; Gibault, F.; Farce, A.; Melnyk, P.; Bailly, F.; Cotelle, P. *Design and synthesis of protein-protein interaction inhibitors of the YAP-TEAD complex*. 18th André Verbert Day (Lille, France, 09/13/2018)

Sturbaut, M.; Bailly, F.; Coevoet, M.; Pugniere, M.; Melnyk, P.; Allemand, F.; Guichou, J.-F.; Cotelle, P. ; *Design and synthesis of TEAD ligands for the cancer treatment*. EFMC-YMCS Symposium 2019 (Athens, Greece, 09/5-6/2019)

Table des matières

REMERCIEMENTS	
ABREVIATIONS.....	
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : LA VOIE HIPPO ET SES ACTEURS FINAUX (YAP, TAZ ET TEAD)	2
1. La voie Hippo	3
1.1. Mécanisme de la voie Hippo chez le mammifère	3
1.2. Les différents effecteurs de la voie Hippo.....	4
1.3. TEAD tronqué	7
1.4. Les complexes impliquant TEAD.....	7
1.5. Modification post-traductionnel de TEAD : la palmitoylation	20
1.6. Dérégulation de la voie Hippo.....	21
2. Cibler la voie Hippo	24
2.1. Cibler YAP	24
2.2. Cibler TEAD.....	26
CHAPITRE 2 : CONCEPTION ET SYNTHÈSE DES TROIS DIAZOLES CIBLANT L'INTERFACE 3	34
1. Conception	35
2. Synthèse	37
2.1. Synthèse du 1-(2-aminophényl)-5-(3,4-dichlorophényl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidène)-1H-pyrazole-4-carbohydrazide 6	37
2.2. Synthèse du 5-(2-aminophényl)-4-(3,4-dichlorophényl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidène)-1H-pyrazole-3-carbohydrazide 13	38
2.3. Synthèse du 1-(2-aminophényl)-5-(3,4-dichlorophényl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidène)-1H-imidazole-4-carbohydrazide 23	40
3. Activité cellulaire	44
CHAPITRE 3 : CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE PYRAZOLES TRISUBSTITUÉS CIBLANT L'INTERFACE 2	46
1. Conception des pyrazole-4-carboxamides	48
1.1. Remplacement de l'isatine par un motif benzylamide ou phénéthylamide	48

1.2.	Conception des pyrazole-4-carboxamides	49
2.	Synthèse des pyrazole-4-carboxamides	50
2.1.	Stratégie de synthèse	50
2.2.	Synthèse des précurseurs.....	51
2.3.	Problème de la régiosélectivité de l'alkylation des pyrazoles.....	52
2.4.	Synthèse des pyrazoles 1,3,4-trisubstitués	55
3.	Evaluation biologique	56
3.1.	Effet de nos composés sur la température de dénaturation de hTEAD2 ₂₁₇₋₄₄₇	56
3.2.	Résonance Plasmonique de Surface (SPR)	57
3.3.	Co-cristallisation des ligands avec hTEAD2	59
3.4.	Thermophorèse à Microéchelle (MST).....	61
3.5.	Evaluation biologique	64
4.	Conclusion et perspectives.....	66
CHAPITRE 4 : CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE DERIVES DE L'ACIDE NIFLUMIQUE CIBLANT LA POCHE INTERNE.....		68
1.	Conception de dérivés de l'acide niflumique	69
2.	Synthèse	70
2.1.	Synthèse des diarylamines	70
2.2.	Synthèse des phénylaminopyridines.....	71
3.	Evaluation.....	75
3.1.	Effet de nos composés sur la température de dénaturation de hTEAD2 ₂₁₇₋₄₄₇	75
3.2.	Co-cristallisation des ligands avec hTEAD2	75
3.3.	Thermophorèse à micro-échelle (MST).....	77
3.4.	Evaluation biologique	78
4.	Conclusion	79
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		80
PARTIE EXPÉRIMENTALE		82
BIBLIOGRAPHIE		143

Figure 1: La voie Hippo chez le mammifère.....	4
Figure 2: Structure simplifiée de la protéine YAP ¹⁶	5
Figure 3: Structure simplifiée de la protéine TAZ ¹⁶	5
Figure 4: Structures simplifiées de VgLL1-4 ¹⁸	6
Figure 5: Structure simplifiée de TEAD avec le pourcentage d'homologie selon les paralogues ¹⁶	6
Figure 6: Structure du complexe hYAP ₅₀₋₁₇₁ - hTEAD1 ₂₀₉₋₄₂₆ (PDB:3KYS) ³⁰	8
Figure 7: Interfaces de liaisons entre YAP et TEAD (PDB:3KYS) ³⁰	9
Figure 8: Superposition du complexe mTAZ ₂₅₋₅₇ - mTEAD4 ₂₁₀₋₄₂₇ (PDB:5GN0) ³⁴ et du complexe hYAP ₅₀₋₁₇₁ - hTEAD1 ₂₀₉₋₄₂₆ (PDB:3KYS) ³⁰	10
Figure 9: Deuxième mode de liaison de mTAZ-mTEAD4 ³⁴	10
Figure 10: Alignement des séquences du domaine de liaison à TEAD de YAP et VgLL1 ¹⁷	11
Figure 11: Superposition des structures du complexe VgLL1 ₂₀₋₅₆ - TEAD4 ₂₁₀₋₄₂₇ , en bleu (PDB:4EAZ) ¹⁷ et du complexe YAP-TEAD1, en rose (PDB:3KYS) ³⁰	12
Figure 12: Deuxième mode de liaison de mVgLL4 ₂₀₃₋₂₅₆ -mTEAD4 ₂₁₀₋₄₂₇ (PDB: 4LN0) ²¹ avec le domaine TDU1 en rose et TDU2 en bleu.....	13
Figure 13: A) Superposition de hTEAD4(36–139)-DNA (13-mer) (PDB code 5GZB en rose) ³⁶ et hTEAD1(31–104)-DNA (18-mer) (PDB code : 5NNX en bleu) ³⁷ ; B) Comparaison structurale du DBD de TEAD seul (en marron PDB code : 2HZD) ²³ ou en complexe avec l'ADN (en rose PDB code : 5GZB).....	14
Figure 14: Zoom sur les cavités de l'interaction hTEAD4(36–139)-DNA (13-mer) (PDB:5GZB).....	15
Figure 15: Titration calorimétrique isotherme de la liaison entre YAP ₆₁₋₁₀₀ et TEAD2 et YAP ₂₋₂₆₈ et TEAD2 ²⁴	16
Figure 16: Mutagénèse dirigée sur la protéine YAP. Etude par gène rapporteur ³⁰	18
Figure 17: Mutagénèse dirigée sur la protéine TEAD1. Etude par gène rapporteur ³⁰	18
Figure 18: Analyses BLI de l'interaction TEAD4 et VGLL4 mutants. A) mutations sur TDU1 B) mutations sur TDU2 ²¹	19
Figure 19: A) Conséquences des mutations H212A/F213A et H240A/F241A sur l'activité transcriptionnelle de TEAD induite par YAP B) Evaluation des fragments TDU1 et TDU2 seuls sur l'activité transcriptionnelle de TEAD induite par YAP ²¹	19
Figure 20: Hyperplasie chez la drosophile due à l'activation de YAP/TAZ ²	22
Figure 21: Apparition de tumeurs hépatiques après plusieurs mois, lors de l'inactivation des kinases MST 1/2 ^{45,49} de gauche à droite ; foie de souris wt, foie de souris dont les gènes MST1 et MST2 ont été inactivés de manière conditionnelle pendant le développement embryonnaire (2 et 6 mois).....	22
Figure 22: Structure des inhibiteurs de YAP/TAZ.....	25
Figure 23: Structure de la molécule CA3.....	26
Figure 24: Différents sites de la protéine TEAD, pouvant être ciblés par de petites molécules.....	27
Figure 25: Structure du peptide cyclique 1 ⁶⁵	27

Figure 26: Formation du pont disulfure intramoléculaire du peptide YAP mutant en complexe avec TEAD1 (en marron). Superposition avec la YAP natif (PDB : 3KYS en rose) et le peptide YAP mutant (PDB : 4RE1 en bleu) ..	28
Figure 27: Acides aminés non naturels présents dans le pentadecapeptide.....	29
Figure 28: Structure générale des inhibiteurs isothiazole ⁶⁸	29
Figure 29: Structure des AINS, ligands de TEAD ⁶⁹	30
Figure 30: Structure du TED-347, analogue de l'acide flufénamique ⁷⁰	30
Figure 31: Structure du MGH-CP1 ⁷¹	31
Figure 32: Structure du fragment 1, ligand de l'interface 2 ⁷²	32
Figure 33: Structure du CPD-3, ligand potentiel de l'interface 3.....	33
Figure 34: Structure du hit I.....	35
Figure 35: Représentation schématique de la molécule I dans la poche de TEAD impliquée dans l'interface 3... ..	35
Figure 36: Structures de l'imidazole et des pyrazoles dérivés du composé hit I.....	36
Figure 37: Structure des composés triazoles I et II.....	47
Figure 38: Co-cristallisation du fragment III avec hTEAD2 ₂₁₇₋₄₄₇	47
Figure 39: Thermofluor de 3 composés en comparaison à TEAD2 seul (en bleu).....	48
Figure 40: A gauche Zoom sur le 5-benzyloxyindole (en rose) s'insérant dans la poche hydrophobe et superposition avec l'acide palmitique (en vert); A droite Superposition des complexes du 5-benzyloxyindole (en rose) et du composé III (en bleu) avec hTEAD2	49
Figure 41: Conception des pyrazoles benzylamide et phénéthylamide.....	50
Figure 42: Expérience HMBC sur le composé 39'	53
Figure 43: Expérience HMBC sur le composé 39	53
Figure 44: Expérience nOe 1D menée sur le composé 46.....	54
Figure 45: Courbe de thermofluor des composés 45, 51 et 52 en comparaison avec hTEAD2 ₂₁₇₋₄₄₇ . En bas, les dérivés premières des courbes.	57
Figure 46: Screening des composés par SPR à 250 μM	58
Figure 47: Superposition des cinq ligands pyrazole et de YAP (en vert) en liaison avec hTEAD2 (unité B)	59
Figure 48: Superposition de hTEAD2 en absence (en bleu) et en présence (en marron clair) de molécules. A gauche: Zoom sur la formation de la poche cryptique. A droite: Mouvement de Y382 et insertion du dichlorophényle.....	60
Figure 49: Zoom sur le positionnement de la molécule 46 au niveau de l'interface 2	61
Figure 50: Courbe dose-réponse de YAP ₅₀₋₁₀₂ vs TEAD2 ₂₁₇₋₄₄₇	62
Figure 51: Figure comparative de la courbe dose-réponse des molécules 49 (en rouge) et 51 (en vert)	62
Figure 52: Activité transcriptionnelle de TEAD en présence des composés à 10 μM sur cellules HEK293.....	64
Figure 53: Expression des gènes cibles en présence des composés sur cellules cancéreuses MDA-MB231 (sein) ..	65
Figure 54: Structure des composés 24, 25 et C19.....	66
Figure 55: Structure des acides fénamiques et niflumique décrits par Pobbati et al	69
Figure 56: Superposition des structures cristallographiques de hTEAD2 avec le 5-benzyloxyindole et l'acide bromofénamique.....	69

<i>Figure 57: Nouvelles séries basées sur les acides fénamiques et niflumique synthétisées</i>	<i>70</i>
<i>Figure 58: Voie de synthèse du composé 73 via réaction de Burchwald-Hartwig.....</i>	<i>70</i>
<i>Figure 59: Thermofluor des dérivés de l'acide niflumique.....</i>	<i>75</i>
<i>Figure 60: Positionnement de la molécule 74 dans la poche interne.....</i>	<i>76</i>
<i>Figure 61: Superposition du ligand 74 avec l'acide bromofénamique (à gauche) et le 5-benzyloxyindole (à droite)</i>	<i>76</i>
<i>Figure 62: Courbe dose-réponse du composé 74 en MST.....</i>	<i>77</i>
<i>Figure 63: Courbe dose-réponse des composés 73 et 78 en MST.....</i>	<i>78</i>
<i>Figure 64: Activité transcriptionnelle de TEAD en présence des composés à 10 μM sur cellules HEK293.....</i>	<i>78</i>

Schéma 1: Synthèse du pyrazole 6	37
Schéma 2: Synthèse du pyrazole 10	38
Schéma 3: Synthèse du pyrazole 13	39
Schéma 4: Voie de synthèse 1, voie BICA ⁷⁸	40
Schéma 5: Voie de synthèse 2	41
Schéma 6: Voie de synthèse 3 ^{80,81}	41
Schéma 7: Voie de synthèse 4	42
Schéma 8: Synthèse de l'imidazole cible 23	44
Schéma 9: Schéma réactionnel de la formation du pyrazole substitué en position 1	51
Schéma 10: Rétrosynthèse des pyrazole-4-carboxamides	51
Schéma 11: Synthèse des précurseurs 24 et 25	52
Schéma 12: Régiosélectivité de l'alkylation de 25	52
Schéma 13: Voie de synthèse des composés cibles avec R = Et pour 30-33 et R = tBu pour 34	55
Schéma 14: Synthèse des diarylamines 73 et 74 via réaction cuprocatalysée	71
Schéma 15: Synthèse de l'acide 2-((3-(benzyloxy)phenyl)amino)nicotinique 75 à partir du 3-bromophénol	72
Schéma 16: Synthèse de l'acide 2-((3-(benzyloxy)phenyl)amino)nicotinique 75 à partir de du 3-aminophénol... ..	72
Schéma 17: Synthèse de l'acide 2-((3-(benzyloxy)phenyl-5-trifluorométhyl)amino)nicotinique 76	73
Schéma 18: Synthèse de l'acide 2-((4-(benzyloxy)phenyl)amino)nicotinique 77	73
Schéma 19: Synthèse de l'acide 2-((2-bromo-4-(benzyloxy)phenyl)amino)nicotinique 78	74
Tableau 1: Constantes de dissociation (K_D) vis-à-vis de hTEAD ₂₁₇₋₄₃₄ mesurées par SPR sur différents fragments de YAP et TAZ ³¹	15
Tableau 2: Constantes de dissociation (K_D) mesurées par SPR sur différents TEAD ³³	16
Tableau 3: Effet des mutations du DBD-TEAD sur l'interaction avec l'ADN mesuré par ITC ³⁶	20
Tableau 4: Hyperactivation des protéines TEAD dans les cancers ²⁸	23
Tableau 5: Conditions de réactions de Suzuki pour l'obtention du composé 20	42
Tableau 6: Evaluation de l'activité transcriptionnelle de TEAD en présence des composés 6 , 13 et 23 à 10 μ M .	44
Tableau 7: Constantes d'affinité obtenues pour les composés 44 à 58	63

ABREVIATIONS

ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
Cyr61	Cysteine-rich angiogenic protein 61
DBD	DNA Binding Domain
DCM	Dichlorométhane
DMF	Diméthylformamide
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Glutathione S-transferase
HGC	Human gastric cancer
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC ₅₀	Inhibitor Concentration
ITC	Isothermal Titration Calorimetry / titration calorimétrique isotherme
K _d	Constante de dissociation
LATS	Large Tumor Suppressor kinase
MST	Mammalian Ste20-like Protein kinase
MST	Microscale Thermophoresis / Thermophorèse à micro-échelle
NBS	N-bromosuccinimide
NF2	Neurofibromatose type II

PDB	Protein Data Bank
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SPR	Surface Plasmon Resonance / Résonance plasmonique de surface
TAZ	Transcriptional co-Activator with PDZ binding motif
TBD	TEAD Binding Domain
TDU	Tondu
TEAD	Transcriptional Enhanced Associate Domain
THF	Tétrahydrofurane
TSA	Thermal Shift Assay
VgLL	Vestigial Like Protein
YAP	Yes Associated Protein
YBD	YAP Binding Domain

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le cancer est aujourd'hui la première cause de mortalité en France devant les maladies cardiovasculaires. Bien qu'il existe à ce jour, de nombreux traitements anticancéreux, il apparaît généralement des phénomènes de résistances ou rechutes après chirurgie, radiothérapie ou chimiothérapie. De plus, les chimiothérapies actuelles sont en général lourdes et provoquent de nombreux effets secondaires. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des cancers chimiorésistants représente donc un enjeu majeur pour la recherche et le développement.

La voie Hippo a été identifiée comme acteur majeur dans le développement et le contrôle de la taille des organes. Elle comprend une cascade de kinases qui agissent sur l'activité de la protéine YAP (Yes-Associated-Protein) et de son paralogue TAZ (Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif), coactivateurs transcriptionnels. Au cours du développement, la voie Hippo vient contrôler l'activité nucléaire de YAP (ou de TAZ) *via* leur phosphorylation qui induit leur séquestration dans le cytoplasme. YAP et TAZ ont été identifiés comme oncogènes surexprimés dans de nombreux cancers et leur activité est liée à leur localisation nucléaire et à leur interaction avec les facteurs de transcription de la famille TEAD (Transcriptional Enhancer Associated Domain). La surexpression nucléaire de YAP induit la transcription de gènes responsables de la prolifération et de la différenciation cellulaire, de la résistance à l'apoptose et qui sont impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Ainsi, les complexes YAP(ou TAZ)/TEAD apparaissent comme des cibles particulièrement originales dans le traitement de cancers.

A partir des données cristallographiques du complexe YAP-TEAD, nous avons ciblé la protéine TEAD et identifié plusieurs interfaces de liaisons. Tout d'abord, nous avons ciblé l'interface 3 en concevant et synthétisant des molécules à partir d'un hit issu d'un criblage virtuel. La seconde stratégie a consisté à intégrer des données cristallographiques issues d'un criblage d'une chimiothèque de petites molécules (fragment based-design). Une première famille chimique se positionne au niveau de l'interface 2 tandis que la dernière famille s'insère dans la cavité interne de TEAD.

CHAPITRE 1 : LA VOIE HIPPO ET SES ACTEURS

FINAUX (YAP, TAZ ET TEAD)

1. La voie Hippo

De nombreux processus biologiques tels que la prolifération, la mort et la différenciation cellulaire, sont fondamentaux pour le développement, la croissance des organes ainsi que le renouvellement des cellules âgées ou dysfonctionnelles qui est nécessaire afin de maintenir l'homéostasie des tissus.

En conditions pathologiques comme la cicatrisation ou la régénération d'un organe, la différenciation et la prolifération cellulaires sont régulées par divers mécanismes cellulaires pour rétablir la physiologie normale des tissus.

La voie de signalisation Hippo, initialement décrite chez la Drosophile est hautement conservée chez les mammifères et a été identifiée comme le régulateur clé de la croissance tissulaire normale en contrôlant la balance prolifération cellulaire/apoptose^{1,2}

1.1. Mécanisme de la voie Hippo chez le mammifère

La voie Hippo consiste en une cascade de kinases qui a pour fonction principale de contrôler l'activité des deux co-activateurs transcriptionnels Yes-associated protein (YAP) et transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) en régulant leur localisation cellulaire par phosphorylation (Figure 1).

Le contrôle de la localisation de YAP et de TAZ est principalement due à la densité cellulaire³. En réponse à des signaux membranaires reçus lorsque les cellules sont en confluence, les kinases MST1/2 (Mammalian Ste20-like Protein kinase) vont être activées par autophosphorylation ou par phosphorylation des kinases TAO (TAOK1/2/3)⁴ au niveau de la Thr₁₈₃ pour MST1 et Thr₁₈₀ pour MST2. Cette activation va entraîner la phosphorylation de la protéine SAV1 avec laquelle elles forment un hétérodimère entraînant l'activation des kinases LATS 1 et 2 (Large Tumor Suppressor kinase) sur les Thr₁₀₇₉ et Thr₁₀₄₁ et de leurs co-activateurs Mob1. Cette cascade de kinases a pour but final la phosphorylation et donc l'inactivation des co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ (Figure 1). La phosphorylation au niveau de la sérine 127 (S89 pour TAZ), du motif consensus HXRXXS de YAP, entraîne la création d'un domaine de liaison à la protéine 14-3-3 conduisant à la rétention cytoplasmique. La phosphorylation sur la sérine 381 de YAP (S311 pour TAZ) conduit à la polyubiquitinylation et sa dégradation⁵. En l'absence de YAP(TAZ) nucléaire, les facteurs de transcription TEAD1-4 (Transcriptional Enhanced Associate Domain) interagissent avec les co-répresseurs VgLL1-4, ce qui entraîne la répression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et dans la résistance à l'apoptose.

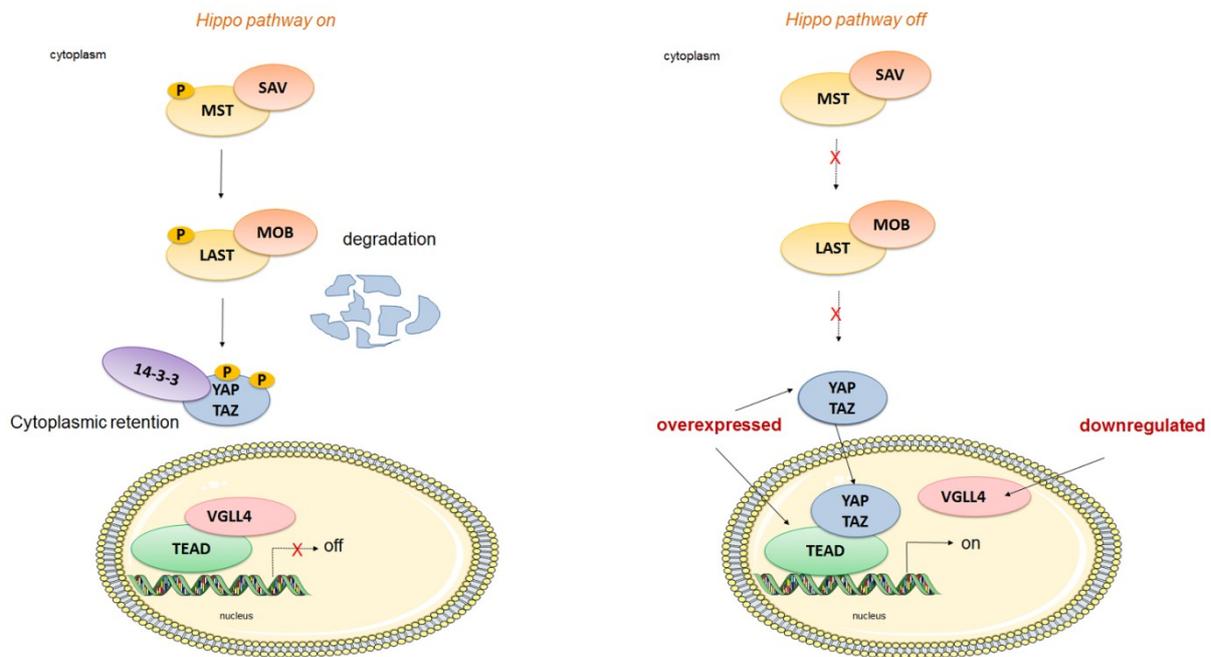


Figure 1: La voie Hippo chez le mammifère

A l'inverse, lorsque la voie est inactive, les co-activateurs YAP et TAZ non phosphorylés vont entrer dans le noyau et interagir avec TEAD. Cette interaction entraîne l'expression des gènes cibles tels que Axl⁶, CTGF (Connective Tissue Growth factor)⁷ ou Cyr61 (Cysteine-rich angiogenic protein 61) à l'origine de la prolifération cellulaire et donc de la croissance des organes⁷.

Cependant, les interactions nucléaires YAP/TAZ-TEAD1-4 ne sont pas seulement régulées par la voie Hippo, mais également par de nombreux autres systèmes de signalisation tels que les récepteurs couplés aux protéines G et la voie de signalisation Wnt qui communiquent avec la voie Hippo⁸.

1.2. Les différents effecteurs de la voie Hippo

1.2.1. Les protéines YAP

YAP est un co-activateur transcriptionnel impliqué dans la prolifération cellulaire et dans la régulation de la taille des organes. Son niveau d'expression varie selon les tissus. En tant que co-activateur transcriptionnel, YAP a besoin de se lier à des facteurs de transcription, tels que TEAD, p73⁹ ou le domaine cytoplasmique ErbB4¹⁰, pour induire l'expression de gènes. Ces associations ont pour but d'assurer l'homéostasie des tissus¹¹.

La protéine YAP possède au niveau N-terminal un domaine de liaison à TEAD (TBD)¹², puis un domaine de liaison aux protéines 14-3-3, suivi d'un ou de deux domaines WW, selon les isoformes, et d'un domaine de trans-activation au niveau C-terminal qui facilite l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle. Enfin la partie C-terminale se termine par un motif de liaison PDZ qui facilite la

translocation de YAP du cytoplasme vers le noyau¹³(Figure 2). Dépourvus de domaine de liaison à l'ADN, les co-activateurs ont besoin des facteurs de transcription pour exercer leur rôle physiologique. A ce jour, huit isoformes de la protéine YAP ont été identifiées chez l'Homme¹⁴, répartis en 2 sous-groupes: YAP1 et YAP2 selon leur domaine WW, quatre isoformes avec un domaine WW (YAP1-1(α - δ)) et quatre isoformes possédant deux domaines WW (YAP1-2(α - δ)).

Le gène humain YAP1 est localisé sur le chromosome 11 en position q22.1 et a été décrit comme un potentiel oncogène¹⁵. Une surexpression de YAP et sa localisation nucléaire élevée sont corrélées avec le développement de cancers³.

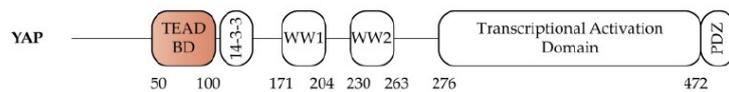


Figure 2: Structure simplifiée de la protéine YAP¹⁶

1.2.2. La protéine TAZ

La protéine TAZ est le paralogue de YAP chez les vertébrés. Elle est constituée d'environ 400 acides aminés avec une structure similaire à celle de l'isoforme YAP1-1 α avec 42% d'homologie. Comme YAP, TAZ possède une région N-terminale avec un domaine de liaison à TEAD suivi d'un domaine de liaison à 14-3-3. Elle ne possède qu'un domaine WW permettant l'interaction avec LATS1/2 notamment (Figure 3).

Le gène humain TAZ est localisé sur le chromosome 3 en position q25.1.

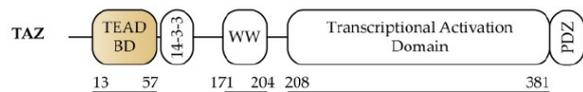


Figure 3: Structure simplifiée de la protéine TAZ¹⁶

1.2.3. Les protéines VgLL

Comme YAP ou TAZ, les protéines VgLL ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN et doivent se lier à des facteurs de transcription. Elles se lient à TEAD via le domaine Tondu (TDU) également appelé Vg. Le domaine TDU est hautement conservé pour VgLL1-3 et se situe au niveau N-terminal alors que VgLL4 possède deux domaines TDU partiellement conservés au niveau C-terminal¹⁷(Figure 4).

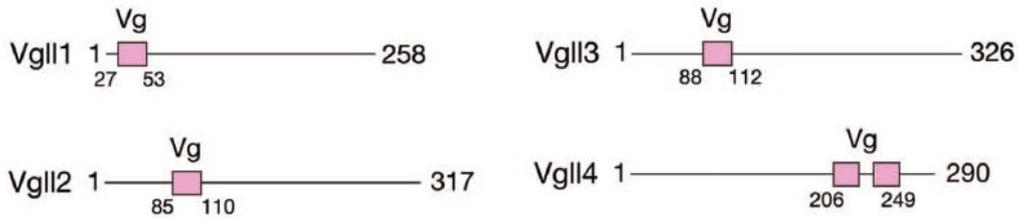


Figure 4: Structures simplifiées de VgLL1-4¹⁸

La fonction de ces protéines est encore mal connue, il semblerait que VgLL1-3 soient des co-activateurs de TEAD. VgLL1 entraîne la prolifération cellulaire dans des lignées de cancer de la prostate¹⁷ et VgLL2 joue un rôle dans la différenciation musculaire¹⁹ alors que VgLL4 serait un corépresseur²⁰ et suppresseur de tumeur dans les cancers gastriques²¹. Dans les muscles squelettiques, VgLL3 se lie à TEAD1, 3 et 4 pour influencer la myogénèse. Son niveau d'expression est faible. Dans le muscle sain, il augmente lors de l'hypertrophie ou de la régénération et est surexprimé dans le cas de muscles dystrophiques ou de rhabdomyosarcome alvéolaire²².

1.2.4. Les protéines TEAD

La famille TEAD (Transcriptional Enhanced Associate Domain) comprend 4 membres, codés par 4 gènes différents, chez le mammifère, possédant un même domaine de liaison à l'ADN (homéodomaine)²³, au niveau N-terminal, qui se lie au promoteur sur les motifs 5'-GGAATG-3'. La partie C-terminale, YAP binding domain (YBD), adopte une conformation en β -sandwich « immunoglobulin-like »²⁴. Ce domaine YBD permet le recrutement des différents co-activateurs.

L'alignement des séquences des quatre TEAD¹⁶ (Figure 5) montre de fortes homologies au niveau du domaine de liaison à l'ADN et au niveau du domaine de liaison aux co-activateurs.

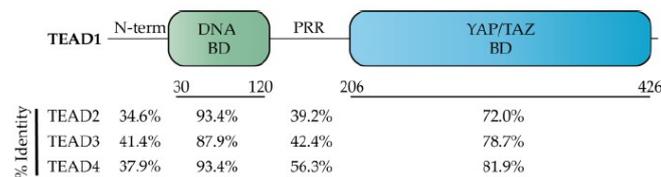


Figure 5: Structure simplifiée de TEAD avec le pourcentage d'homologie selon les paralogues¹⁶

Les protéines TEAD sont fortement exprimées lors du développement mais également au stade embryonnaire. Elles sont notamment impliquées dans la cardiogenèse²⁵, la myogénèse²⁶ et le développement neuronal²⁷.

Les quatre membres sont exprimés différemment dans les tissus. Chaque tissu exprime au moins un paralogue de TEAD. La fonction de chaque TEAD est déduite par des études d'inactivation de gènes sur souris. L'inactivation de TEAD1 entraîne des malformations cardiaques ou la mort embryonnaire²⁵. Il semblerait donc que TEAD1 soit important dans la formation et la différenciation du muscle cardiaque. L'inactivation de TEAD2 entraîne un défaut dans le tube neural, précurseur embryonnaire du système nerveux central²⁷. TEAD4 serait impliquée dans l'implantation de l'embryon tandis que les fonctions de TEAD3 sont encore inconnues.

Les protéines TEAD jouent un rôle important dans l'homéostasie des tissus mais peuvent également être impliquées dans le développement de cancers humains. De nombreux cancers sont liés à une hyper activation de TEAD favorisant l'expression de gènes tels que CTGF, Cyr61, Axl²⁸.

1.3. TEAD tronqué

En 2016, Qi *et al*²⁹ ont montré que la voie Hippo était également régulée par une forme tronquée de TEAD4, appelé TEAD4-S, produit par l'épissage du gène TEAD4, où l'exon 3 est éliminé. Cette troncature fournit une protéine TEAD où le domaine de liaison à l'ADN est manquant mais le domaine d'interaction à YAP est conservé. La forme tronquée peut donc se retrouver aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme pour interagir avec YAP/TAZ et ainsi réguler l'activité de YAP par antagonisme au TEAD complet (TEAD4-FL). En effet, l'interaction YAP-TEAD4-S n'entraîne pas de transcription de gènes.

Alors que la forme complète de TEAD semble être la plus abondante, la forme tronquée est également retrouvée dans tous les tissus mais en quantité plus faible. On observe une diminution de la présence de cet isoforme dans les cancers humains, ce qui suggère que TEAD4-S serait un répresseur de la prolifération cellulaire. En effet, en comparaison avec TEAD4-FL, TEAD4-S inhibe la prolifération cellulaire sur des lignées de cancers du poumon. Il joue également un rôle dans la répression de la transition épithélio-mésenchymateuse. YAP-TEAD-FL induit une augmentation des marqueurs de l'EMT (la vimentine et N-cadherine) alors que TEAD4-S diminue l'expression de ces marqueurs²⁹.

1.4. Les complexes impliquant TEAD

1.4.1. YAP-TEAD

La première structure cristallographique de hTEAD1₂₀₉₋₄₂₆-hYAP2₅₀₋₁₇₁ (PDB : 3KYS) a été décrite en 2010³⁰. Même si tout le fragment de YAP n'est pas résolu c'est la seule structure où apparaît le plus grand nombre d'interfaces. Le complexe formé entre YAP et TEAD a une dimension de 50 x 60 x 40

Å³. Il est constitué de douze feuillets β et quatre hélices α pour TEAD tandis que le domaine de liaison à TEAD (TBD) de YAP est divisé en quatre parties distinctes : un feuillet β (résidus 52-58), une hélice α (résidus 61-73), un linker (résidu 74-84) et une boucle Ω (résidus 85-99)³¹. Dans la structure de TEAD, deux feuillets β sont positionnés l'un contre l'autre formant un β -sandwich entouré de quatre hélices α ^{24,30}. Le premier feuillet β est formé des feuillets β 1, β 2, β 5, β 8 et β 9, le deuxième feuillet est formé des feuillets β 3, β 4, β 6, β 7, β 10, β 11 et β 12. Les hélices α 3 et α 4 se situant entre les feuillets β 9 et β 10 stabilisent le β -sandwich³⁰.

D'après la structure cristallographique, YAP s'enroule autour de TEAD via trois interfaces (Figure 6).

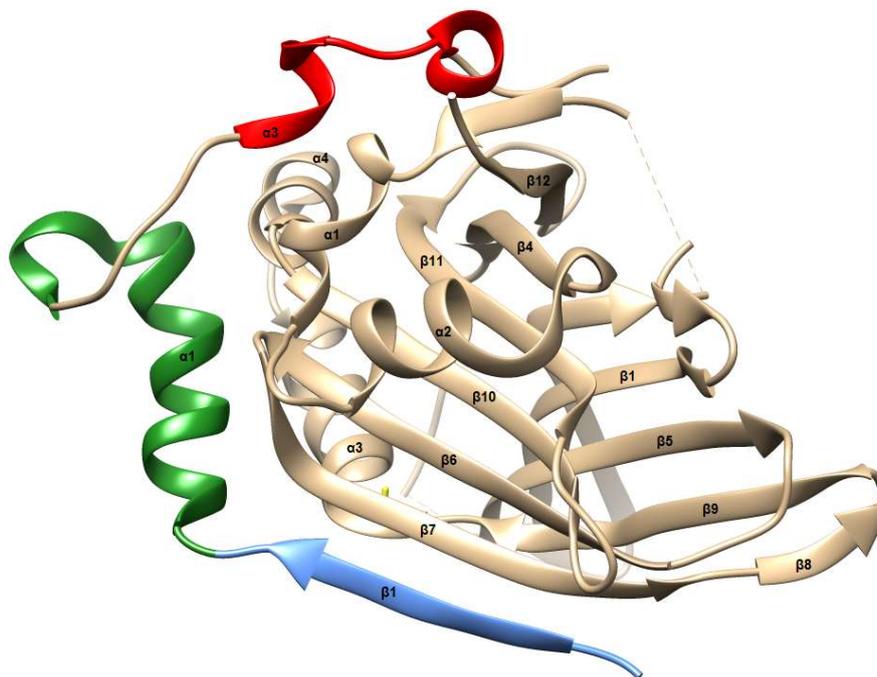


Figure 6: Structure du complexe hYAP₅₀₋₁₇₁ - hTEAD₁₂₀₉₋₄₂₆ (PDB:3KYS)³⁰

Dans l'interface 1 (en bleu) le feuillet β 1 de YAP (résidus 52-58) et le feuillet β 7 de TEAD (résidus 333-339) sont antiparallèles et sont liés par sept liaisons hydrogène n'impliquant que les enchaînements peptidiques (Figure 7). La 2^{ème} interface (en vert) correspond à une interaction entre l'hélice α 1 de YAP (résidus 61-73) avec les hélices α 3 et α 4 de TEAD (résidus 360-384). La liaison est due principalement à des interactions hydrophobes entre les acides aminés L65, L68 et F69 formant le motif LXXLF de YAP avec F329, Y361, F365, K368, L368, L372, V381 et F385 de TEAD (Figure 7). Le résidu L65 (YAP) interagit, en particulier, avec Y361, F365, et K368 (TEAD) ; L68 (YAP) est en liaison avec F329, F365 et F385 (TEAD) tandis que F69 (YAP) interagit avec F365, K368, L369, L372 et V381 (TEAD). L'interface 3 (en rouge) est une interaction entre la boucle Ω de YAP (résidus 86-100) et les feuillets β 4, β 11, β 12 et les hélices α 1 et α 4 de TEAD. On observe des interactions de Van der Waals

entre les acides aminés M86, L91 et F95 de YAP et I262, V257, L287, V406 et Y421 de TEAD (Figure 7) mais également des liaisons hydrogène entre le groupement guanidine de YAP R89 et le carbonyle de TEAD D255 et deux liaisons hydrogène entre S94 de YAP avec Y421 et E255 de TEAD.

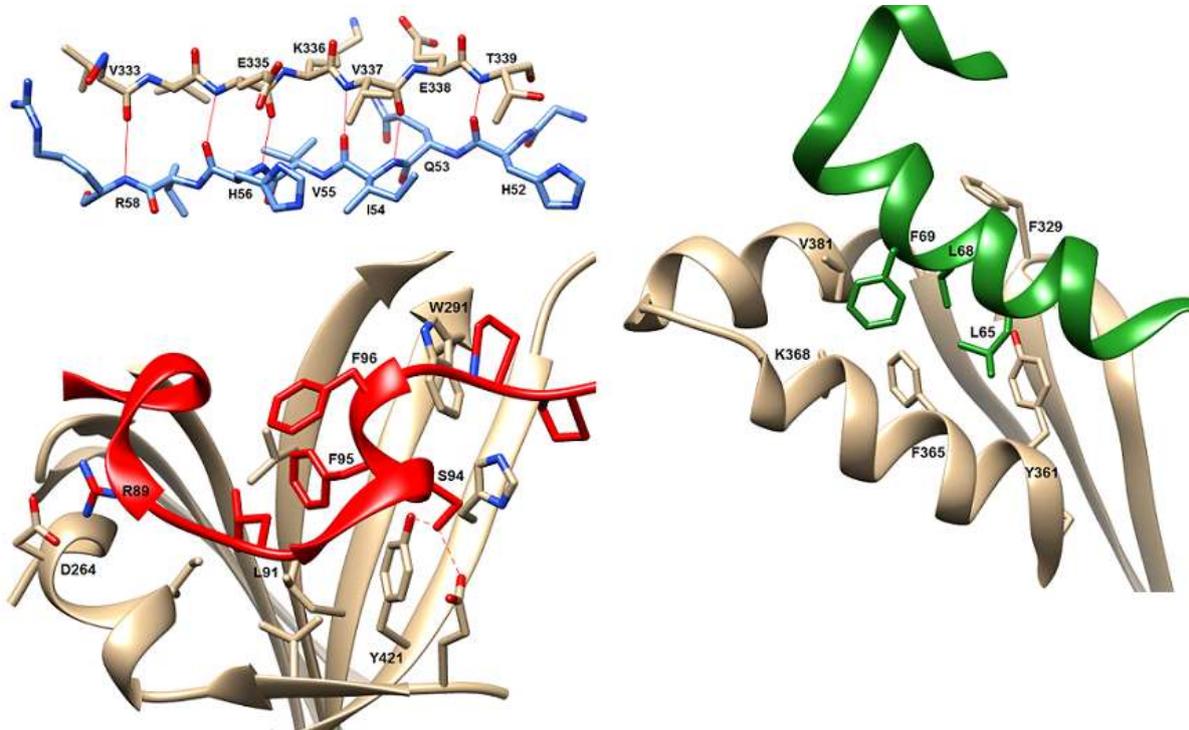


Figure 7: Interfaces de liaisons entre YAP et TEAD (PDB:3KYS)³⁰

De nombreuses autres structures sont disponibles maintenant avec TEAD2 ou TEAD4 mais les séquences de YAP utilisées ne permettent que de confirmer les interfaces 2 et 3 présentées ci-dessus^{16,32,33}

1.4.2. TAZ-TEAD

La structure cristallographique mTAZ₂₅₋₅₇- mTEAD₂₁₀₋₄₂₇ a été déterminée très récemment par Kaan *et al*³⁴ et montre deux modes de liaison. Le premier mode de liaison est similaire à la liaison YAP-TEAD (en rose sur la Figure 8) où une molécule de TAZ (en vert sur la Figure 8) s'enroule autour de TEAD pour former un hétérodimère (PDB : 5GN0). Les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de TAZ se positionnent de façon identique à l'hélice α et la boucle Ω de YAP. La seule différence observée se trouve dans la boucle de liaison, entre les interfaces 2 et 3, qui est plus courte que celle de YAP et qui adopte donc une position différente. La surface d'interaction est d'environ 1300 Å² pour TAZ-TEAD similaire à celle de YAP-TEAD³⁵.

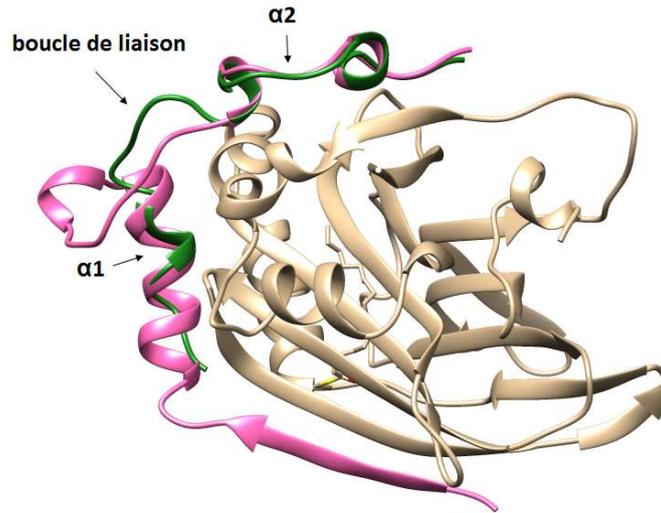


Figure 8: Superposition du complexe $mTAZ_{25-57}$ - $mTEAD4_{210-427}$ (PDB:5GNO)³⁴ et du complexe $hYAP_{50-171}$ - $hTEAD1_{209-426}$ (PDB:3KYS)³⁰

Dans le second mode de liaison, deux molécules de TAZ enveloppent deux molécules de TEAD pour former un hétérotétramère. Les deux molécules de TAZ s'entrecroisent et lient les TEAD ensemble (Figure 9). L'hélice $\alpha 1$ de TAZ est liée à un TEAD alors que l'hélice $\alpha 2$ est liée à l'autre TEAD.

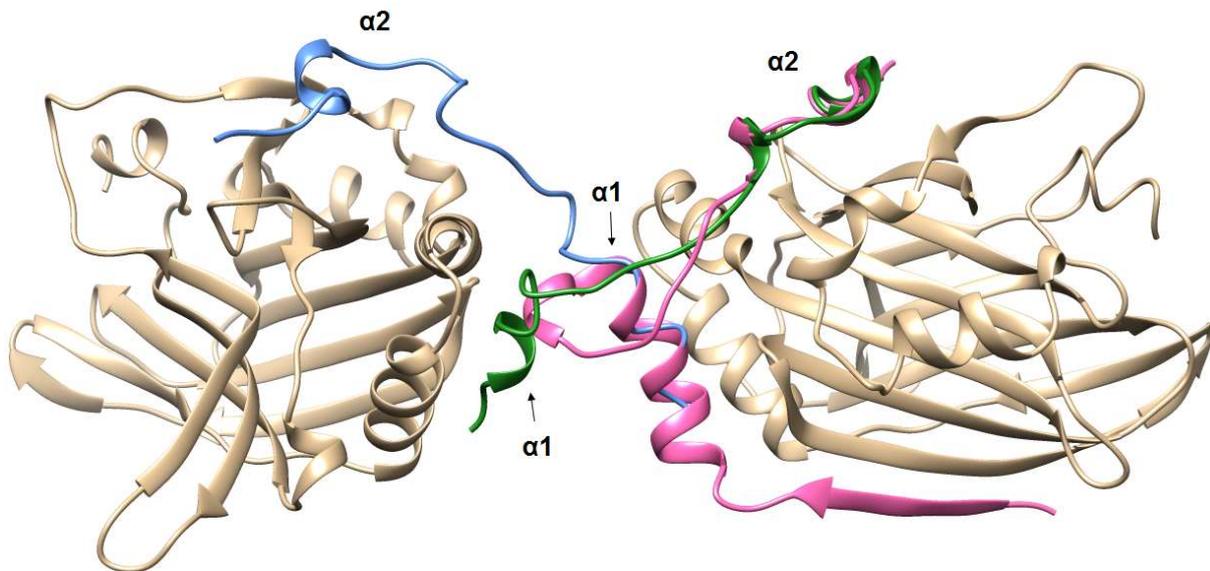


Figure 9: Deuxième mode de liaison de $mTAZ$ - $mTEAD4$ ³⁴

Dans les deux cas, les modes de liaisons sont similaires : l'hélice $\alpha 1$ de TAZ interagit avec les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ et les feuillets $\beta 6$ - $\beta 7$ de TEAD. Cette interface hydrophobe repose sur des interactions entre L28, L31, F32, V35, M36 de TAZ avec Y362, F366, K369, L370, L373, M378, V382, F386 de TEAD.

La seconde interface est assurée par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes entre les résidus F52 et F53 de TAZ avec L288, K290, W292 et V407 de TEAD, d'interactions de type Van der Waals entre F52, K290 de YAP et P56, Q418 de TEAD, et de liaisons hydrogènes entre S51 de TAZ et Y422, E256 de TEAD.

1.4.3. VGLL-TEAD

La première structure VgLL-TEAD a été décrite en 2012 par Pobbati *et al*¹⁷. La structure mVgLL₂₀₋₅₆-mTEAD₄₂₁₀₋₄₂₇ est semblable à celle du complexe YAP-TEAD malgré des structures primaires différentes (Figure 10).

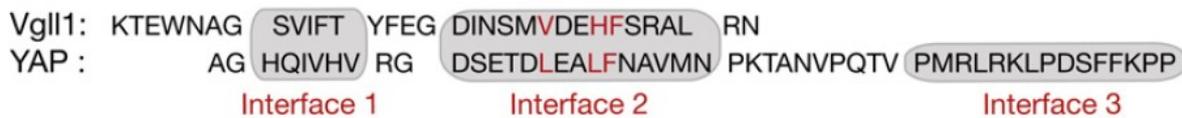


Figure 10: Alignement des séquences du domaine de liaison à TEAD de YAP et VgLL¹⁷

VgLL1 s'enroule autour de TEAD via deux interfaces. L'interface 1 est un feuillet β anti-parallèle formé entre le feuillet β 2 de VgLL1 (résidus 27-31) et β 7 de TEAD4. L'interaction est principalement due à des liaisons hydrogène entre les résidus 28-30 de VgLL1 et 336-338 de TEAD4. L'interface 2 est une interaction entre l'hélice α de VgLL1 (résidu 36-49) avec les hélices α 3 et α 4 de TEAD4 et est plutôt médiée par des interactions hydrophobes (PDB : 4EAZ). On retrouve le motif VxxHF dans l'hélice de VgLL1, semblable au motif LxxLF de YAP (lettres en rouge sur la Figure 10). F45 de VgLL1 interagit avec F366, K369, L370, L373 et V382 de TEAD4 de façon similaire à F69 de YAP. En comparaison à L65 on retrouve V41 de VgLL1 qui effectue des interactions hydrophobes avec Y362, F366, et K369 de TEAD4. H44 de VgLL1 effectue deux liaisons hydrogène, un des azotes de l'imidazole est un donneur de liaison hydrogène pour la fonction carbonyle de V382. Le second azote joue le rôle d'accepteur pour le groupement hydroxyle de S329.

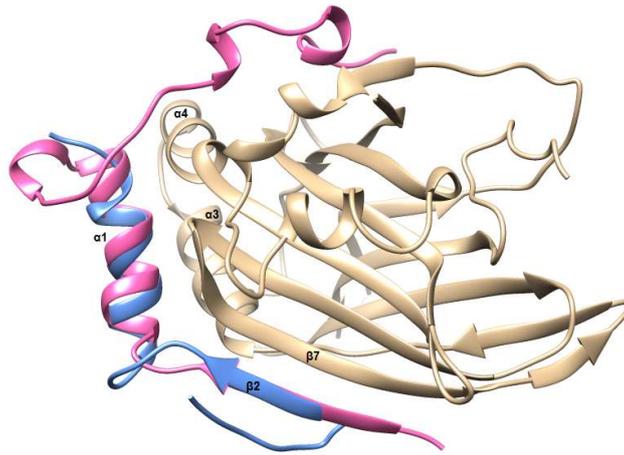


Figure 11: Superposition des structures du complexe VgLL1₂₀₋₅₆ - TEAD4₂₁₀₋₄₂₇, en bleu (PDB:4EAZ)¹⁷ et du complexe YAP-TEAD1, en rose (PDB:3KYS)³⁰

Une seconde structure a été élucidée par Jiao *et al* en 2014²¹ utilisant un fragment de VgLL4 murin plus long. mVgLL4₂₀₃₋₂₅₆-mTEAD4₂₁₀₋₄₂₇ forment un complexe 1 : 2. En effet, VgLL4 possède deux domaines de liaison à TEAD (TDU) qui lie chacun une molécule de TEAD4 (Figure 12).(PDB : 4LN0). Le domaine TDU1 (en rose) est composé d'une hélice $\alpha 1$ alors que le domaine TDU2 (en bleu) est formé d'un feuillet $\beta 1$ suivi de deux hélices α ($\alpha 2$ et $\alpha 3$). L'interaction VgLL4-TEAD4 est principalement médiée par des interactions hydrophobes. Les acides aminés V206, H209, F210, R212 et L214 de TDU1 (formant le motif VxxHF) interagissent avec F330, Y362, F366, K369, L370, L373, M378 et V382 de TEAD4. La seconde molécule de TEAD4 interagit avec les résidus V235, H237, F238, K240 et L242 de TDU2 (on retrouve également le motif VxxHF). W246 et I249 de l'hélice $\alpha 3$ de TDU2 forment des interactions hydrophobes avec TEAD4 également, et le feuillet $\beta 1$ de TDU2 est antiparallèle au feuillet β de TEAD4. La surface d'interaction entre TDU2 et TEAD4 est deux fois plus importante que celle de TDU1 suggérant une interaction plus forte pour TDU2.

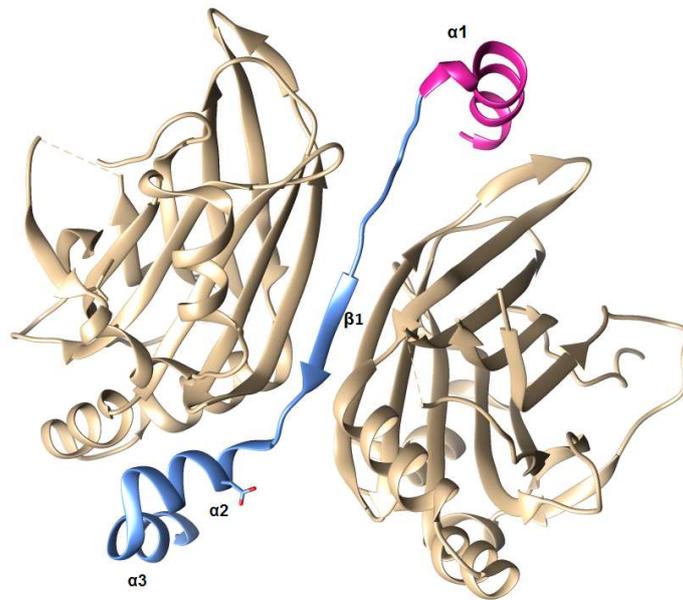


Figure 12: Deuxième mode de liaison de mVgLL4₂₀₃₋₂₅₆-mTEAD4₂₁₀₋₄₂₇(PDB: 4LNO)²¹ avec le domaine TDU1 en rose et TDU2 en bleu

1.4.4. TEAD-ADN

Etant donné que YAP ne peut se lier directement à l'ADN, le domaine de liaison à l'ADN (DBD) de TEAD est essentiel. Il interagit avec les régions promotrices des gènes cibles pour permettre la régulation de la transcription. La séquence de reconnaissance 5'-TGGAATGT-3', où se lie TEAD, est présente dans les régions promotrices de gènes impliqués dans le développement des muscles lisses, cardiaques et squelettiques et est appelée muscle-CAT element (m-CAT element). Bien que le mécanisme de reconnaissance à l'ADN soit encore inconnu, la structure cristallographique du DBD de TEAD4 (acides aminés 36-139) en complexe avec m-CAT element (13 paires de bases) a été élucidée³⁶(Figure 13A).

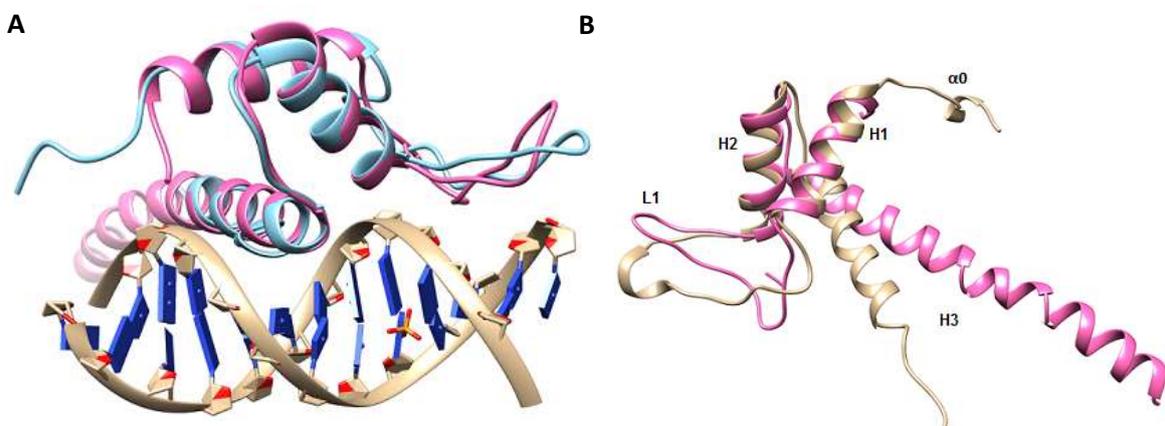


Figure 13: A) Superposition de hTEAD4(36–139)-DNA (13-mer) (PDB code 5GZB en rose)³⁶ et hTEAD1(31–104)-DNA (18-mer) (PDB code : 5NNX en bleu)³⁷ ; B) Comparaison structurale du DBD de TEAD seul (en marron PDB code : 2HZD)²³ ou en complexe avec l'ADN (en rose PDB code : 5GZB)

La structure du DNA binding domain (DBD ou TEA domain) a d'abord été élucidée par RMN par Anbanandam *et al*²³. TEAD-DBD est une protéine globulaire composée de trois hélices α (H1, H2 et H3) séparées par deux boucles (L1 et L2) (Figure 13B). Le repliement général du DBD est caractéristique des protéines régulatrices de la transcription avec les motifs hélice-boucle-hélice³⁸. La comparaison entre le DBD de TEAD seul, élucidé par RMN (PDB : 2HZD)²³, et le DBD en complexe avec m-CAT (PDB : 5GZB³⁶ et 5NNX³⁷) montre une hélice H3 plus longue et un changement de conformation, pour une meilleure interaction avec l'ADN. De plus, la structure seule possède une petite hélice $\alpha 0$ et une boucle L1 qui changent de conformation lors de la formation du complexe pour faciliter la capture de l'ADN. Le domaine se lie avec les 13 paires de base du m-CAT formant deux sites de reconnaissance et avec une surface d'interaction de 1030 Å²³⁶. Le changement au niveau de la boucle L1 permet l'insertion du feuillet $\beta 1$ dans une cavité. La rotation de 30° de l'hélice H3 permet l'insertion dans une seconde cavité plus importante. Les résidus N78 et E79 de l'hélice H2 et les chaînes latérales de R108 et R111 de l'hélice H3 forment des ponts salins et des liaisons hydrogènes avec les phosphates de l'ADN. S100 forme une liaison hydrogène avec l'azote 7 de l'adénine 5. Q103 interagit avec l'adénine 5, l'adénine 7' et l'adénine 8'. L'amide de Q103 fait une liaison hydrogène avec l'azote 6 de l'adénine 5, l'azote 7 de l'adénine 7' et l'azote 7 de l'adénine 8'. Les résidus V42, W43 et V103 de DBD de TEAD forment des interactions de type Van der Waals et hydrophobes avec les bases et les désoxyriboses de l'ADN. Dans la petite cavité, les interactions sont principalement de types hydrophobes. Les chaînes latérales de I66, L68 et M74 du feuillet β et la partie adjacente de la boucle L1 forment une poche hydrophobe avec les désoxyriboses et les bases de l'ADN (Figure 14). L65 forme des ponts salins et des liaisons hydrogène avec la chaîne principale de l'ADN³⁶.

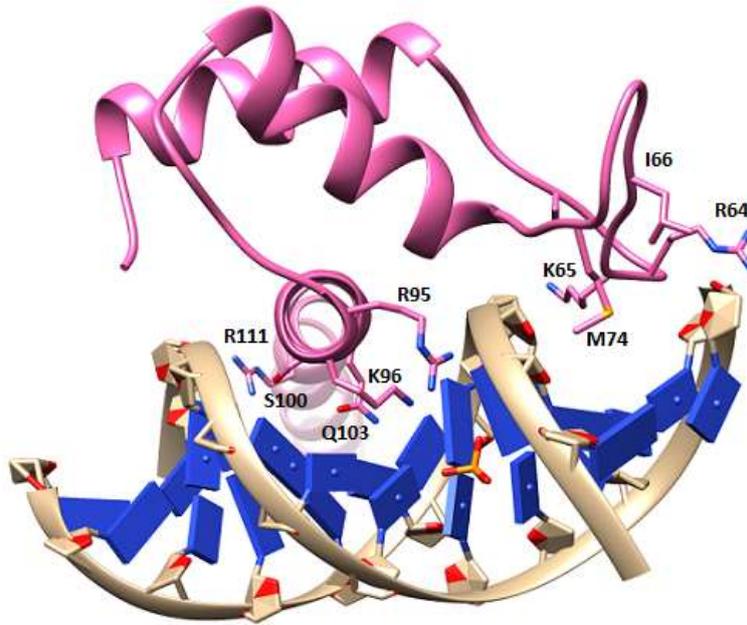


Figure 14: Zoom sur les cavités de l'interaction hTEAD4(36-139)-DNA (13-mer) (PDB:5GZB)

1.4.5. Mesures physico-chimiques de l'interaction YAP/TAZ-TEAD et VgLL-TEAD

Plusieurs études d'interaction ont été menées afin de déterminer les fragments protéiques les plus importants pour l'interaction de YAP ou de TAZ avec TEAD.

Une première étude a mesuré l'affinité des fragments YAP et de TAZ (feuillet β -hélice α -linker-boucle Ω) pour TEAD4. Les fragments étudiés montrent une affinité nanomolaire pour TEAD (Tableau 1). La délétion du feuillet β qui permet d'obtenir le peptide (50-99) diminue légèrement l'affinité. Réduire le peptide à la région hélice α – linker – boucle Ω confère une affinité pour TEAD qui reste dans la gamme nanomolaire³¹. Pris séparément, l'hélice α et la boucle Ω se lient plus faiblement à TEAD mais l'affinité de la boucle Ω pour TEAD reste néanmoins dans la gamme micromolaire ($IC_{50}(YAP_{85-99}) = 70 \mu M$, $IC_{50}(TAZ_{43-56}) = 13 \mu M$ mesurées par TR-FRET)³¹ alors que l'affinité de l'hélice α est supérieure à $150 \mu M$. Des résultats similaires sont reportés pour TAZ.

Tableau 1: Constantes de dissociation (K_D) vis-à-vis de hTEAD4₂₁₇₋₄₃₄ mesurées par SPR sur différents fragments de YAP et TAZ³¹

Fragments	SPR (K_D (nM))	Fragments	SPR (K_D (nM))
wt-YAP ₅₀₋₁₇₁	3	wt-TAZ ₁₃₋₁₂₄	5
wt-YAP ₅₀₋₉₉	11	wt-TAZ ₁₃₋₅₆	12
wt-YAP ₆₁₋₉₉	29	wt-TAZ ₂₄₋₅₆	45

Tableau 2: Constantes de dissociation (K_D) mesurées par SPR sur différents TEAD³³

TEAD	Ligand de TEAD		
	hYAP ₆₀₋₉₉	hTAZ ₁₄₋₅₆	mVgll1 ₂₇₋₅₁
hTEAD1 ₂₀₉₋₄₂₆	77 nM	49 nM	132 nM
hTEAD2 ₂₂₁₋₄₄₇	63 nM	17 nM	74 nM
hTEAD3 ₂₁₈₋₄₃₅	44 nM	12 nM	57 nM
hTEAD4 ₂₁₇₋₄₃₄	44 nM	17 nM	67 nM

Plus récemment, Bokhovchuk *et al*³³ ont mesuré par SPR les constantes d'affinité de hYAP₆₀₋₉₉, hTAZ₁₄₋₅₆ et mVgll1₂₇₋₅₁ pour hTEAD1₂₀₉₋₄₂₆, hTEAD2₂₂₁₋₄₄₇, hTEAD3₂₁₈₋₄₃₅ et hTEAD4₂₁₇₋₄₃₄. On observe peu de différences entre les protéines TEAD avec une affinité croissante de mVgll1 à hTAZ (Tableau 2).

Une autre étude a été effectuée par titration calorimétrique isotherme (ITC)²⁴ sur différents fragments de YAP. Le fragment 2-268 de YAP se lie à TEAD2 avec une constante de dissociation (K_D) de 33 nM alors que le peptide 61-100 se lie avec un K_D trois fois supérieur (96 nM). Les résultats (Figure 15) sont similaires pour les deux peptides, ce qui signifie que, selon cette étude, le fragment 61-100 (interfaces 2 et 3) constitue l'essentiel du domaine de liaison à TEAD.

Les K_D mesurés par des méthodes d'interaction moléculaire différentes sur des peptides différents, tant par leur longueur que par leur enchaînement, restent dans une gamme nanomolaire cohérente et confirment les données cristallographiques.

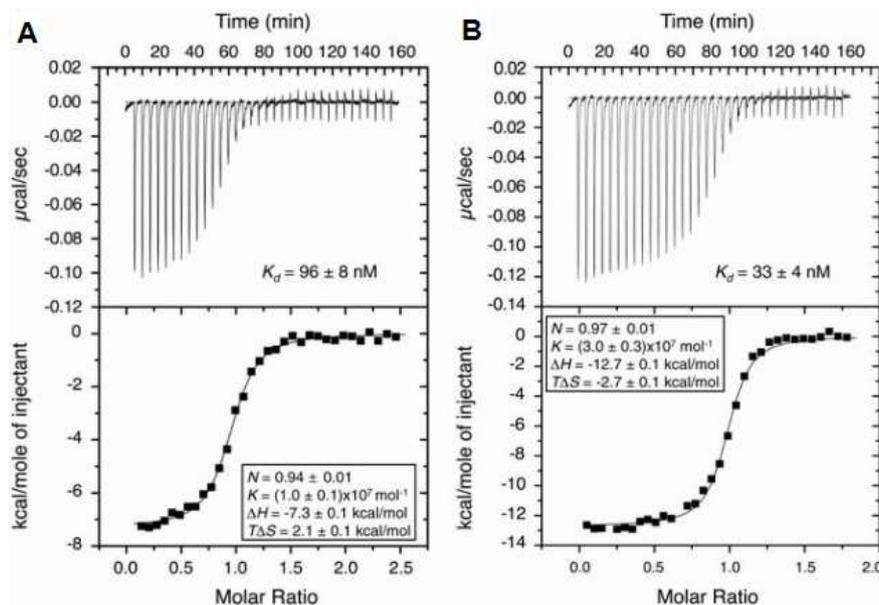


Figure 15: Titration calorimétrique isotherme de la liaison entre YAP₆₁₋₁₀₀ et TEAD2 et YAP₂₋₂₆₈ et TEAD2²⁴

En ce qui concerne VgLL, mVgLL₂₀₋₅₁ présente une affinité pour hTEAD4₂₁₇₋₄₃₄ de 46 nM mesurée par TR-FRET, similaire aux résultats obtenus pour hYAP₆₁₋₉₉ et hTAZ₂₄₋₅₆ avec des valeurs de 29 nM et 45 nM respectivement³¹ et ceci malgré l'absence de boucle Ω dans l'interaction VgLL-TEAD.

La délétion du feuillet $\beta 1$ de VgLL (délétion des acides aminés 20-26) n'entraîne pas de perte d'affinité pour TEAD4, résultat en accord avec la structure cristallographique de Pobbati *et al*, le feuillet $\beta 1$ n'intervient pas dans l'interaction. Au contraire, la délétion du feuillet $\beta 2$ (27-31), impliqué dans l'interface 1, entraîne une forte diminution de l'interaction avec une affinité, de l'ordre du micromolaire, 45 fois plus faible que celle de VgLL₂₀₋₅₁. La partie feuillet $\beta 2$ -hélice α semble donc être la région minimale pour conserver une affinité nanomolaire³⁹.

1.4.6. Etudes de l'interaction YAP/TEAD par mutagenèse dirigée

Une étude de mutagenèse dirigée a été effectuée pour évaluer la contribution de certains acides aminés dans l'interaction YAP-TEAD³⁰.

L'étude s'est d'abord portée sur l'effet des mutations de YAP sur l'affinité entre les deux protéines (Figure 16). Des délétions sur le feuillet $\beta 1$ (50-59) de YAP ont montré un faible effet sur l'interaction. Pour L68A et F69A du motif LXXLF, impliqués dans des interactions hydrophobes, leur mutation réduit légèrement l'interaction entre les deux protéines. Les acides aminés les plus impliqués sont ceux de l'interface 3 avec les acides aminés S94 et F96 : en effet leur remplacement par une alanine entraîne une diminution de l'affinité ; de même les modifications M86A, R89A, L91A, et F95A diminuent fortement l'activité transcriptionnelle de TEAD. L'étude de mutagenèse dirigée effectuée sur TEAD1 (Figure 17) est en accord avec les précédents résultats puisque seules les mutations sur la tyrosine 406 (Y406A et Y406H) correspondant à la tyrosine 421, présente dans l'interface 3, induisent une forte diminution de l'interaction. Chan *et al* a, par ailleurs, montré que la double mutation L68A et F69A du motif LXXLF, réduisait la capacité de TAZ à se lier à TEAD⁴⁰.

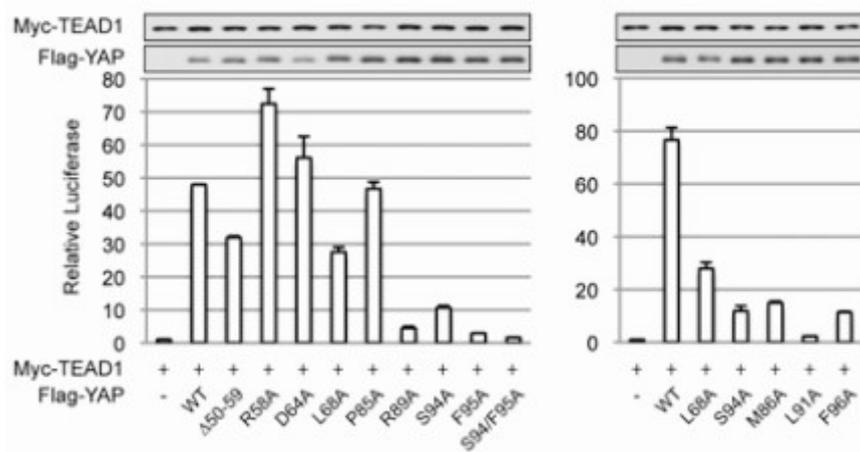


Figure 16: Mutagenèse dirigée sur la protéine YAP. Etude par gène rapporteur³⁰

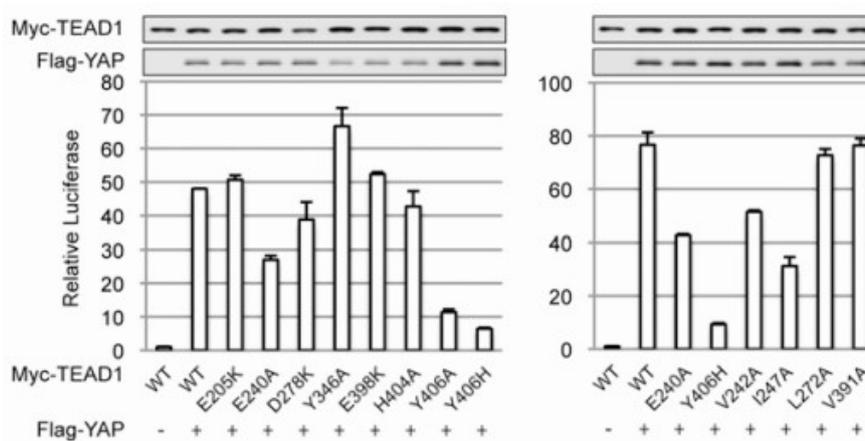


Figure 17: Mutagenèse dirigée sur la protéine TEAD1. Etude par gène rapporteur³⁰

L'ensemble de ces résultats (SPR, ITC et mutagenèse dirigée) montre que les interfaces 2 et 3 sont les plus importantes pour assurer l'interaction entre YAP (et TAZ) et TEAD.

1.4.7. Etudes de l'interaction VgLL/TEAD par mutagenèse dirigée

Des mutations ont été effectuées sur VgLL²¹ afin d'évaluer, de même, les acides aminés clés de l'interaction par BioLayer Interferometry (BLI). Cette méthode permet d'analyser la cinétique d'interaction entre deux partenaires en détectant les modifications de réflexion de la lumière blanche sur la couche externe d'un capteur à fibre optique. Les mutations, au niveau de TDU1, sur V209A, H212A, F213A, R215A, L217A et la double mutation H212A/F213A affectent peu l'interaction VgLL4-TEAD4 alors que des mutations effectuées au niveau du TDU2, H240A et H240A/F241A la diminuent fortement (Figure 18). Ces résultats confirment l'importance du domaine TDU2 pour la formation du complexe.

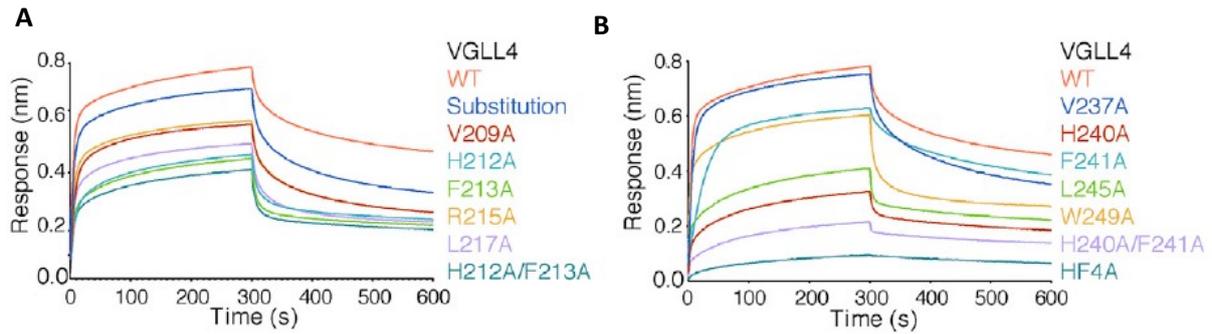


Figure 18: Analyses BLI de l'interaction TEAD4 et VGLL4 mutants. A) mutations sur TDU1 B) mutations sur TDU2²¹

Les modes de liaisons entre VgLL et TEAD suggèrent que VgLL entre en compétition avec YAP pour se lier à TEAD. En effet, les mutations sur TDU1 (H212A/F213A) empêchent l'effet inhibiteur de VgLL sur YAP-TEAD. Comme prévu, les acides aminés impliqués dans TDU2 inhibent complètement l'effet répresseur. On observe jusqu'à six fois plus d'activité de TEAD induite par YAP²¹ lors des mutations H240A et F241A par rapport au « wild-type »(Figure 19A).

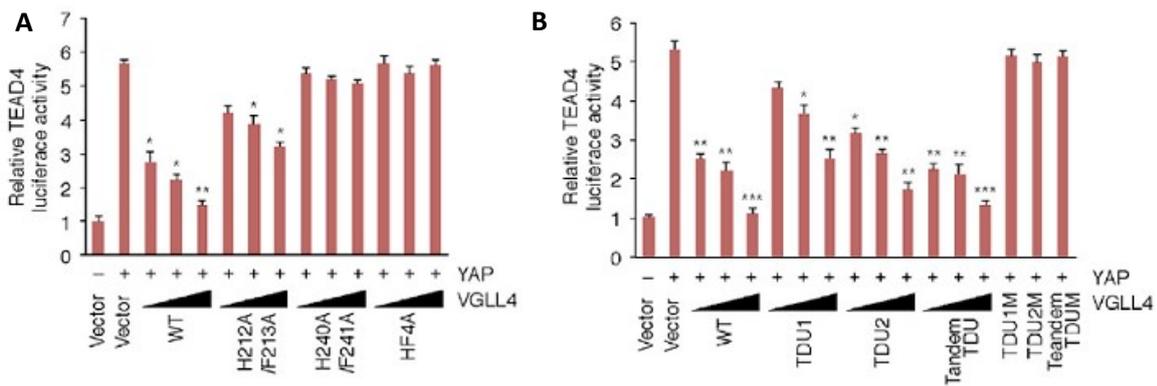


Figure 19: A) Conséquences des mutations H212A/F213A et H240A/F241A sur l'activité transcriptionnelle de TEAD induite par YAP B) Evaluation des fragments TDU1 et TDU2 seuls sur l'activité transcriptionnelle de TEAD induite par YAP²¹.

Comme cela est montré sur la Figure 19B, le fragment TDU1 diminue l'activité de TEAD4 induite par YAP de manière moins significative que le wt-VgLL alors que TDU2 inhibe fortement la formation du complexe YAP-TEAD. Ces résultats montrent que les domaines TDU seuls, et particulièrement TDU2, sont suffisants pour entrer en compétition avec YAP et inhiber l'activité résultante de l'interaction²¹.

1.4.8. Etudes de l'interaction ADN/TEAD par mutagenèse dirigée

Une identification des résidus impliqués dans l'interaction TEAD-ADN a été effectuée par EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) et ITC³⁶. Les mutations R64A, K65A, I66A, L68A, M74A, R95A, K96A, Q103A and R111A diminuent la formation du complexe. La mutation S100A inhibe

complètement l'interaction TEAD-ADN avec un K_D 37 fois plus élevé que pour la protéine « wild-type » (Tableau 3).

Tableau 3: Effet des mutations du DBD-TEAD sur l'interaction avec l'ADN mesuré par ITC³⁶

Analyte	K_D (μ M)	Analyte	K_D (μ M)
DBD-wt	0.23	R64A	0.43
K65A	0.50	I66A	0.32
L68A	1.08	M74A	1.05
R95A	0.93	K96A	0.75
S100A	8.55	Q103A	0.81
R111A	1.45	R95Q	3.31

De plus, des cellules HEK293 transfectées par des protéines TEAD4 mutantes, R64/K65/I66/L68A (de la petite cavité) et R95/K96/S100/Q103A (de la grande cavité), montrent une diminution de l'expression des gènes cibles CTGF et Cyr61 et une inhibition de la croissance de cellules cancéreuses gastriques (HCG-27). L'interaction TEAD-ADN semble donc essentielle pour l'effet oncogénique de TEAD.

1.5. Modification post-traductionnelle de TEAD : la palmitoylation

La palmitoylation (S-acylation) correspond à la formation d'une liaison covalente réversible thioester, entre l'acide palmitique (C16:0) et la chaîne latérale d'une cystéine. La palmitoylation permet de réguler la localisation et la fonction de nombreuses protéines ou encore d'agir sur la conformation, la stabilisation des protéines et les interactions protéine-protéine.

Chan *et al*^[41] et Noland *et al*⁴² ont montré, selon des approches différentes, que les quatre protéines TEAD sont S-palmitoylées chez les mammifères.

Afin d'identifier les sites de palmitoylation, Chan *et al* ont muté les cystéines 53, 327 et 359 de TEAD1 en sérine et testé l'effet de leur mutation sur la palmitoylation. Toutes les mutations, dont principalement C359S, empêchent la modification post-traductionnelle, ce qui suggère que le résidu C359 est le principal site de palmitoylation⁴¹. De plus, la cristallographie de TEAD2 YBD (PDB : 5HGU) montre une densité électronique dans une poche hydrophobe proche du résidu C380 de TEAD2 (correspondant à C359 de TEAD1) correspondant à l'acide palmitique. Sa fonction carboxylique s'oriente vers la cystéine mais ne se lie pas de manière covalente. Les auteurs ont, ensuite, testé l'impact de la palmitoylation sur l'interaction YAP/TAZ-TEAD en utilisant Gal4-TEAD1 et Gal4-TEAD2, gènes rapporteurs de la luciférase qui permettent de caractériser la formation du complexe actif

YAP/TAZ-TEAD. Les mutations (C359S, double mutations C327/359S ou triple mutations) montrent une nette diminution de l'interaction. La palmitoylation de TEAD joue donc un rôle important dans l'interaction avec YAP et donc sur l'activité transcriptionnelle de TEAD, sans agir sur sa localisation cellulaire ni sur sa conformation⁴¹.

Noland *et al*⁴² ont, également, observé une densité électronique sur la cristallographie de TEAD2 et TEAD3 au niveau des cystéines 380 et 371, respectivement. Ils ont confirmé l'hypothèse de la présence d'un acide gras par spectrométrie de masse. La mutation de cette cystéine 380 conduit à la perte de fonction de TEAD2 dans la cellule. De plus, la température de dénaturation de TEAD2 vs TEAD2 non palmitoylé (traitée à l'hydroxylamine) passe de $61,1 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ à $48,8 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$ suggérant l'importance de la palmitoylation pour la stabilité de la protéine⁴².

Par SPR, Mesrouze *et al*⁴³ ont montré sur hTEAD4₂₁₇₋₄₃₄ que l'affinité de YAP₁₋₅₁₋₉₉ ou de TAZ₁₄₋₅₆ pour TEAD S-acylé est trois fois meilleure que pour TEAD non S-acylé.

La palmitoylation ne semble pas affecter la localisation de TEAD mais altère l'association YAP/TEAD et l'activité transcriptionnelle de TEAD. L'acide palmitique régule de manière allostérique la liaison à YAP (et sans doute à TAZ).

Les dernières données cristallographiques (inclus les nôtres) montrent que l'acide myristique (C14 :0) est aussi un possible ligand post-traductionnel de TEAD. L'acide gras (palmitique ou myristique) peut être libre (5HGU), lié sous forme de thioester (C380 (TEAD2)) ou sous forme d'amide (K344 (TEAD4)) (PDB : 6GEI).

1.6. Dérégulation de la voie Hippo

De nombreuses études ont montré l'importance de la voie Hippo dans le développement de cancers. Ces études ont montré le rôle de YAP/TAZ dans certains cancers, notamment dû à leur hyperactivation et leur surexpression⁴⁴, mais également le rôle de TEAD¹⁸.

Une activation prolongée de YAP/TAZ entraîne la prolifération excessive des cellules^{3,45}. Des études d'immunohistochimie montrent que la surexpression et la localisation nucléaire de YAP/TAZ sont corrélées à la malignité des cancers et à un faible taux de survie chez les patients atteints de cancer du poumon, du sein⁴⁶, cancers ovariens⁴⁷, et cancers colorectaux⁴⁸.

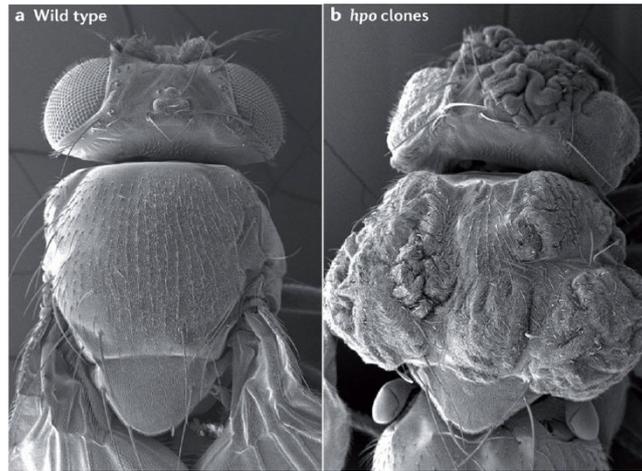


Figure 20: Hyperplasie chez la drosophile due à l'activation de YAP/TAZ²

La mutation S127A de YAP empêche la séquestration cytoplasmique par la protéine 14-3-3 et ainsi favorise sa localisation nucléaire et son interaction avec TEAD ce qui entraîne une croissance anormale de l'organe comme le montre la Figure 20 où l'on observe une hyperplasie chez la drosophile. De même chez la souris, la délétion des kinases MTS induit une hypertrophie du foie (2 mois) puis l'apparition d'hépatocarcinomes (6 mois) (Figure 21)^{45,49}.



Figure 21: Apparition de tumeurs hépatiques après plusieurs mois, lors de l'inactivation des kinases MST1/2^{45,49} de gauche à droite ; foie de souris wt, foie de souris dont les gènes MST1 et MST2 ont été inactivés de manière conditionnelle pendant le développement embryonnaire (2 et 6 mois)

De plus, un niveau d'expression de TEAD élevé est aussi corrélé avec le développement de cancers solides¹⁸ tels que les cancers du sein, du poumon, de la prostate⁵⁰ et les cancers colorectaux. (Tableau 4).

Tableau 4: Hyperactivation des protéines TEAD dans les cancers²⁸

Cancer type	TEAD Family	Expression in cancers
Gastric cancer	TEAD1/4	Up-regulated
Liver cancer	TEADs	Up-regulated
Colorectal cancer	TEAD2/4	Up-regulated
Lung cancer	TEADs	Up-regulated
Breast cancer	TEAD4	Up-regulated
Ovarian cancer	TEADs	Up-regulated
Prostate cancer	TEAD1	Up-regulated

Une surexpression de TEAD peut induire la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) comme pour certains cancers du sein où TEAD2 est surexprimé. L'EMT est la perte d'adhésion cellule-cellule rendant les cellules invasives et peut mener à la formation de métastases. Cette surexpression est notamment induite par la présence excessive de YAP et TAZ dans le noyau⁵¹. De nombreux cancers colorectaux montrent une expression anormale de TEAD2 et TEAD4. Une étude a d'ailleurs montré que la répression de TEAD4 diminue la migration cellulaire et les métastases⁵². Une altération de l'expression de TEAD1 semble jouer un rôle dans la résistance à l'apoptose⁵³.

Un niveau d'expression de TEAD1 élevé est aussi observé dans de nombreux cancers du sein et dans des carcinomes des trompes de fallope⁵⁴ et est corrélé à un faible taux de survie chez les patients atteints de cancers de la prostate⁵⁰.

Une étude portant sur une caractérisation moléculaire complète de 19 gènes principaux de la voie Hippo a été publiée par Wang *et al*⁵⁵. Cette étude a été effectuée sur 9125 échantillons de tumeurs provenant de 33 types de cancer provenant du Cancer Genome Atlas. En utilisant des données multidimensionnelles «omiques», Wang *et al* ont calculé la modification du nombre de copies somatiques et la fréquence de mutation. Le niveau d'aberration de l'ADN est relativement bas. Les gènes présentant la plus forte altération sont TAZ suivi de TEAD4 puis de YAP. Wang *et al* ont aussi démontré une fréquence d'amplification de YAP et de TAZ, une hétérogénéité élevée de l'expression et des corrélations significatives dans le pronostic pour 5 types de cancers de cellules squameuses : carcinome urothélial de la vessie, adénocarcinome endocervical et carcinome de cellules squameuses du col de l'utérus, carcinome œsophagien, carcinome de cellules squameuses du cou et de la tête et carcinome de cellules squameuses du poumon. Les surexpressions des gènes de la voie Hippo sont répertoriées selon le type de cancer et on peut remarquer que TEAD1 et TEAD3 apparaissent plus

souvent dans les cancers du sein, du col de l'utérus, des ovaires, de l'endomètre mais aussi des poumons.

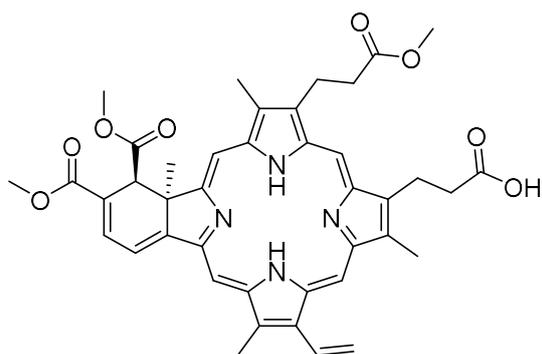
2. Cibler la voie Hippo

La voie Hippo est une nouvelle cible thérapeutique intéressante qui fait l'objet de nombreuses recherches principalement dans le domaine du cancer. Un certain nombre de molécules, ciblant les différents effecteurs de cette voie, ont été découverts.

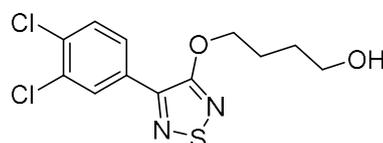
2.1. *Cibler YAP : inhibition indirecte de l'interaction*

En 2012, Liu-Chittenden *et al*⁵⁶ ont criblé plus de 3300 composés, issus de la librairie *Johns Hopkins Drug Library*, approuvés par la FDA ou en phase II d'essai clinique. Ce criblage a permis d'identifier 71 hits qui inhibent l'activité transcriptionnelle de TEAD (test luciférase) à 10 μ M dont la verteporfin (VP) (Figure 22). Un test sur cellules HEK293 exprimant GAL4-TEAD4 a été effectué en présence des composés sélectionnés. VP diminue significativement l'activité galactosidase de GAL4-TEAD4 montrant une inhibition de l'interaction YAP-TEAD. De nombreuses études ont montré que VP agit plutôt au niveau cytoplasmique. Il a notamment été montré que VP inhibe l'interaction YAP-TEAD en régulant sa séquestration cytoplasmique de YAP par les protéines 14-3-3⁵⁷.

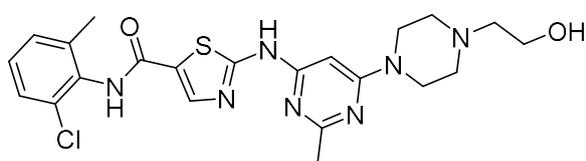
Basu *et al*⁵⁸ ont criblé une série de composés synthétisés au sein de leur laboratoire grâce au gène rapporteur à la luciférase (8xGTIIIC-luc-TEAD) à une concentration de 10 μ M. Le composé C19 (Figure 22) présente une activité inhibitrice avec une IC_{50} inférieure à 2 μ M. Il présente des propriétés activatrices non seulement sur la voie Hippo mais également sur les voies Wnt et TGF- β . Il diminue la migration cellulaire et la prolifération et présente une activité anti-tumorale sur modèle murin. Il semble induire la phosphorylation de YAP et TAZ et donc leur localisation cytoplasmique, par activation des kinases MST et LATS. C19 diminue l'expression des gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), la migration cellulaire et la prolifération.



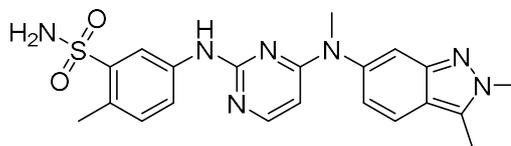
Verteporfine



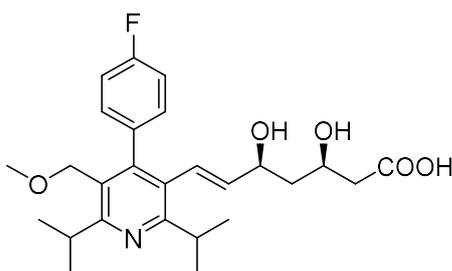
C19



Dasatinib



Pazotinib



Cerivastatin

Figure 22: Structure des inhibiteurs de YAP/TAZ

En 2014, un criblage de petites molécules (issues d'une chimiothèque d'agents anti-tumoraux) a été effectué sur cellules MDA-MB-231 (cancer du sein) afin d'identifier des composés ciblant YAP et TAZ. La localisation des protéines est évaluée par immunofluorescence. Les multi-inhibiteurs de tyrosine kinase, Dasatinib et Pazopanib (Figure 22) ont été identifiés comme inhibiteurs avec des IC_{50} dans la gamme nanomolaire, affectant la localisation nucléaire, la phosphorylation et la dégradation de YAP et TAZ⁵⁹.

Sorrentino *et al*⁶⁰ ont montré que les statines et en particulier la cérvastatine (Figure 22) inhibent la localisation nucléaire de YAP et de TAZ et de ce fait l'interaction YAP/TAZ-TEAD ainsi que l'expression des gènes cibles Birc5, Ankrd1, Cyr61 et CTGF sur de nombreuses lignées de cancer (sein, poumon, colon, ovaire, rein, pancréas).

La firme américaine Vivace Therapeutics a décrit trois séries de composés tricycliques, des tétrazoles substitués⁶¹ (WO2018204532A1), des composés tricycliques comportant un fragment benzosulfonyl⁶² (WO2019_040380A2) et des composés tricycliques comportant un fragment benzocarbonyl⁶³ (WO2019_113236A1). Les doses inhibitrices des composés en test gène rapporteur à la luciférase ne sont pas reportées précisément (< 0.1 μ M jusqu'à 5 μ M). Il est question aussi d'effet suppresseur de tumeurs sur souris et d'inhibition de prolifération cellulaire cancéreuse, sans aucun résultat avancé.

Les activités biologiques d'une de ces molécules (CA3, Figure 23) ont été publiées en 2017 par Song et al⁶⁴. CA3 possède une activité inhibitrice sur l'activité transcriptionnelle YAP/TEAD via la diminution de l'expression protéique de YAP et montre une inhibition de la croissance cellulaire d'adénocarcinome œsophagien *in vitro* et *in vivo*.

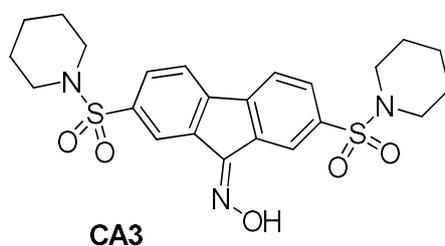


Figure 23: Structure de la molécule CA3

2.2. Cibler TEAD : inhibition directe de l'interaction

Les structures cristallographiques de TEAD révèlent trois sites « druggables » : les interfaces 2 et 3 (en rouge et vert sur la Figure 24), impliquées dans la liaison avec YAP ou TAZ et décrites comme essentielles pour la formation du complexe protéique, et la poche interne hydrophobe (en violet), accueillant un acide gras (myristique ou palmitique), capable de réguler l'association YAP/TAZ-TEAD.

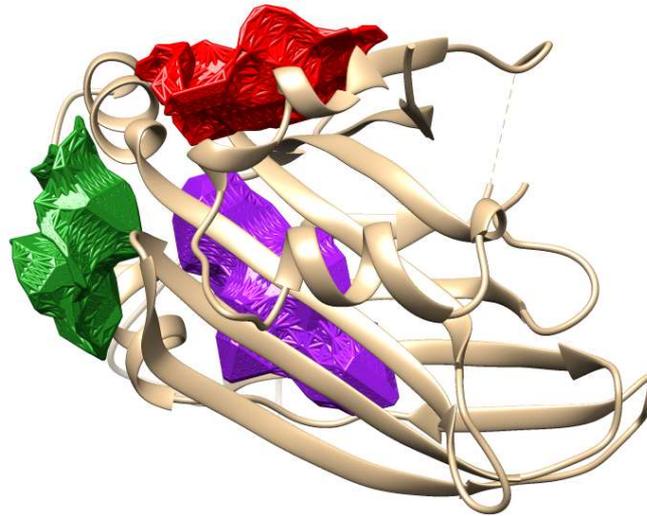


Figure 24: Différents sites de la protéine TEAD, pouvant être ciblés par de petites molécules

La première stratégie envisagée, pour cibler TEAD, a été la synthèse de peptides cycliques dérivés de YAP. Le fragment 84-100 a été identifié comme fragment essentiel pour l'interaction YAP-TEAD avec un K_D de 37 μM . Les auteurs se sont basés sur ce fragment et y ont ajouté des modifications bénéfiques telles que les mutations D93A, M86 en 3-chlorophénylalanine, R87 en homocystéine, L91 en norleucine et F96C. Finalement, le peptide a été rigidifié par un pont disulfure pour former le peptide **1** (Figure 25) capable de se lier à TEAD₁₂₀₉₋₄₂₆ avec un K_D de 15 nM et présentant une IC_{50} de 25 nM⁶⁵ (compétition mesurée par SPR avec TEAD1 à une concentration constante de 50 nM).

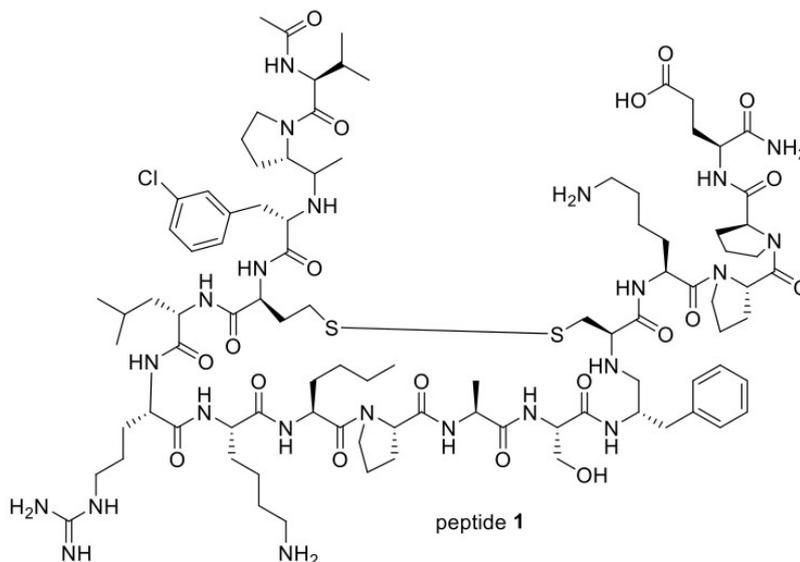


Figure 25: Structure du peptide cyclique⁶⁵

Un autre peptide basé sur l'interface 3 a été développé. La structure tertiaire de YAP montre une interaction cation- π entre R87 et F96. Ces résidus, n'étant pas impliqués dans l'interaction avec TEAD1, ont été remplacés par des cystéines pour permettre la formation d'une liaison covalente et stabiliser la conformation du peptide⁶⁶. Des mutations bénéfiques ont également été effectuées sur D93A et E100R pour former le peptide **6** (numérotation de la publication) de séquence $_{84}V P M C L R K L P A S F C K P P R_{100}$. Il présente un K_D (1,2 μM) sept fois meilleur que le peptide non modifié. Le peptide cyclique mutant (R87C, D93A, F96C et E100R) a été co-cristallisé avec TEAD1 (PDB : 4RE1) (Figure 26). Comme prévu, il s'insère au niveau de l'interface 3 et présente les mêmes interactions que YAP natif pour TEAD1. Cependant les auteurs ont émis des réserves sur l'activité cellulaire du peptide **6**, suggérant que le pont disulfure provoquerait une faible perméabilité cellulaire.

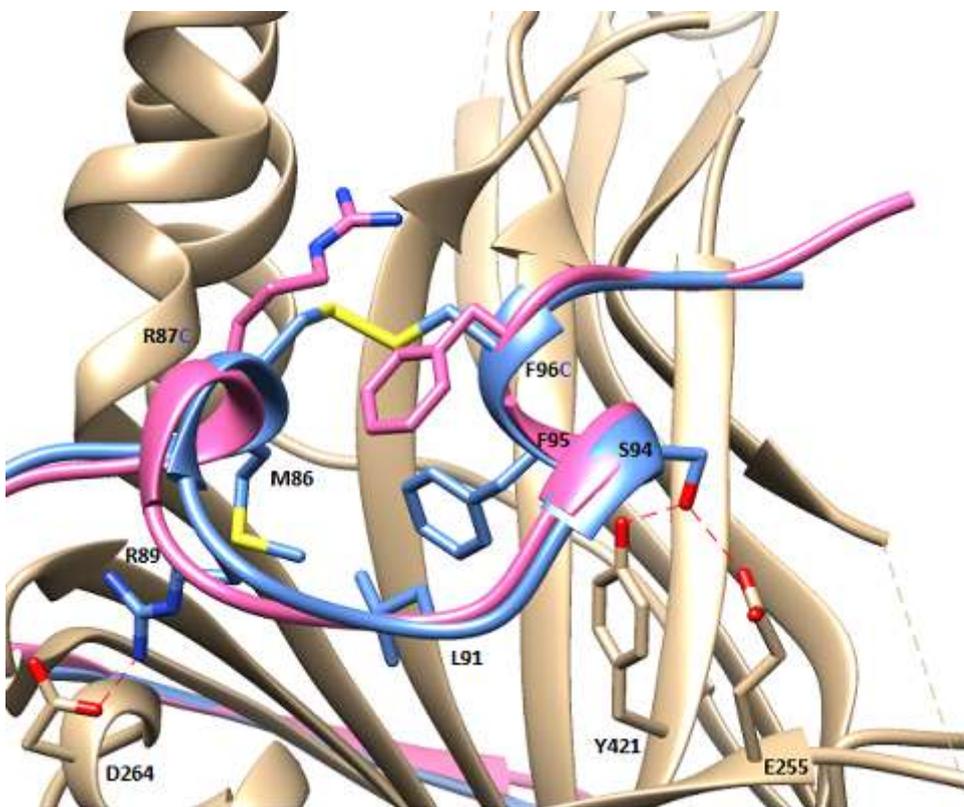


Figure 26: Formation du pont disulfure intramolécule du peptide YAP mutant en complexe avec TEAD1 (en marron).
 Superposition avec la YAP natif (PDB : 3KYS en rose) et le peptide YAP mutant (PDB : 4RE1 en bleu)

Très récemment, l'équipe du Dr Chène (Novartis)⁶⁷ a publié la synthèse d'un nouveau pentadécapeptide incorporant des acides aminés non naturels (P-W(6-Cl)-RLRK-Cba-Hyp-DSF-Nal-KEP)(Figure 27) qui inhibent l'interaction YAP-TEAD avec un IC_{50} de 16 ± 5 nM (mesuré par TR-FRET) et possède un K_D de 25 nM mesuré par SPR. Ce pentadécapeptide a été cristallisé avec hTEAD4₂₁₆₋₄₃₄ (PDB : 6Q36).

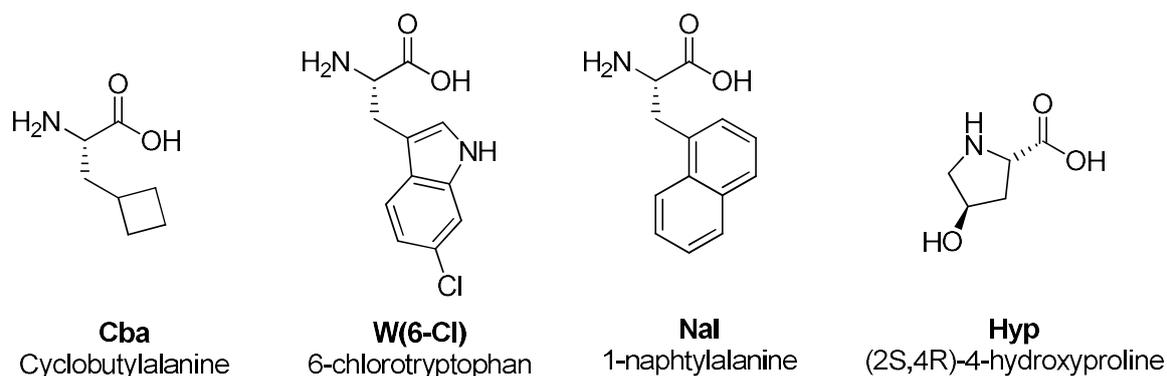


Figure 27: Acides aminés non naturels présents dans le pentadecapeptide

Un peptide intégrant un fragment deVgLL4, appelé super-TDU, a également été synthétisé. Ce peptide est un hybride correspondant au domaine de liaison à TEAD (interface 2) de VgLL4 (236-252), le domaine TDU2, suivi de la boucle Ω de YAP (79-99) impliqué dans l'interface 3. Il inhibe l'interaction YAP-TEAD et diminue la prolifération cellulaire sur des lignées de cancers gastriques tels que MGC-803 ou BGC-823 ainsi que l'expression de gènes cibles (CTGF, Cyr61, ...)²¹. Ce peptide est, cependant, rapidement dégradé par les enzymes cellulaires.

A partir d'un screening Alpha Lisa de l'interaction YAP/TEAD suivi d'un test gène rapporteur à haut débit, la firme Inventiva⁶⁸ a identifié et breveté une famille de 3-(2-benzylidène-hydrazinyl)benzo[d]isothiazole 1,1-dioxydes diversement substitués (Figure 28), capables d'empêcher le développement de mésothéliomes.

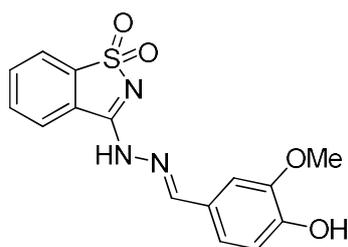


Figure 28: Structure générale des inhibiteurs isothiazole⁶⁸

Dans une étude publiée en 2015⁶⁹, un criblage de 1600 composés (issus d'une librairie US FDA approved drugs) a été effectué sur TEAD4 par Thermal Shift Assay (TSA) et a permis d'identifier l'acide flufénamique (et ses dérivés), un anti-inflammatoire non stéroïdien, comme ligand de TEAD et premier inhibiteur non peptidique de l'interaction YAP-TEAD. Les acides flufénamique (FA) et bromofénamique (BFA) (Figure 29) ont été co-cristallisés avec hTEAD2. Tous les deux se positionnent dans la poche hydrophobe (PDB : 5DQ8 et 5DQE respectivement) et présentent pour hTEAD4 des

K_D mesurés par titration calorimétrique isotherme (ITC) de 73 et 234 μM , respectivement. L'acide FA effectue principalement des interactions hydrophobes avec les acides aminés de la poche. On observe également une liaison hydrogène entre la fonction acide carboxylique de FA et l'atome d'azote du squelette peptidique de la cystéine 380 et une liaison ionique entre la fonction acide carboxylique de FA et K357. L'acide niflumique (NA) (Figure 29) n'a pas pu être co-cristallisé mais présente néanmoins une meilleure affinité pour hTEAD4 que ces analogues avec un K_D de 28 μM mesuré de même par ITC. L'activité transcriptionnelle de TEAD a été évaluée pour FA et NA, grâce au gène rapporteur de la luciférase et une nette diminution de l'expression de la luciférase est observée pour une concentration de 150 μM . L'expression des gènes cibles tels que Axl est diminuée également sur cellules MCF10A (cancer du sein) à une concentration de 150 μM . Cependant, l'acide NA n'affecte pas la liaison de YAP pour TEAD.

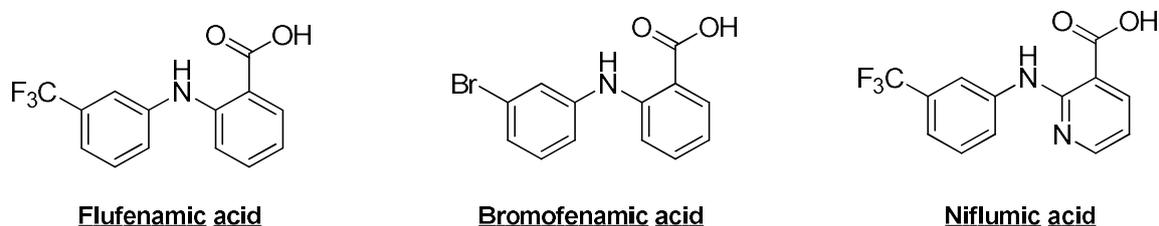


Figure 29: Structure des AINS, ligands de TEAD⁶⁹

Plus récemment, Bum-Erdene *et al*⁷⁰ ont décrit une molécule TED-347 (Figure 30), analogue de l'acide flufénamique, capable de se lier de manière covalente à la cystéine 380 (TEAD2) à l'entrée de la poche palmitate et ainsi capable d'inhiber l'interaction YAP-TEAD à 10 μM . TED-347 possède une fonction α -chlorométhylcétone capable de se lier de façon covalente avec la cystéine 367 de TEAD4 (C380 de TEAD2). Afin d'évaluer la liaison de TED-347 à TEAD, les auteurs ont mesuré l'affinité de YAP₆₀₋₉₉ ($K_D = 78.2 \pm 9.9$ nM) pour TEAD4 par polarisation de fluorescence (FP) en présence et en absence de ligand. TED-347 inhibe l'interaction YAP-TEAD de 53% avec une EC_{50} de 5.9 ± 0.4 μM , au bout de 24 heures d'incubation, tandis que son analogue non chloré, ne pouvant former de liaison covalente, ne présente pas d'inhibition.

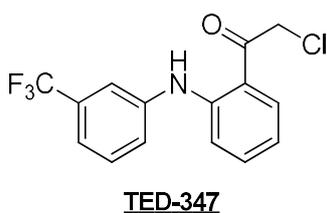


Figure 30: Structure du TED-347, analogue de l'acide flufénamique⁷⁰

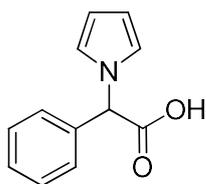
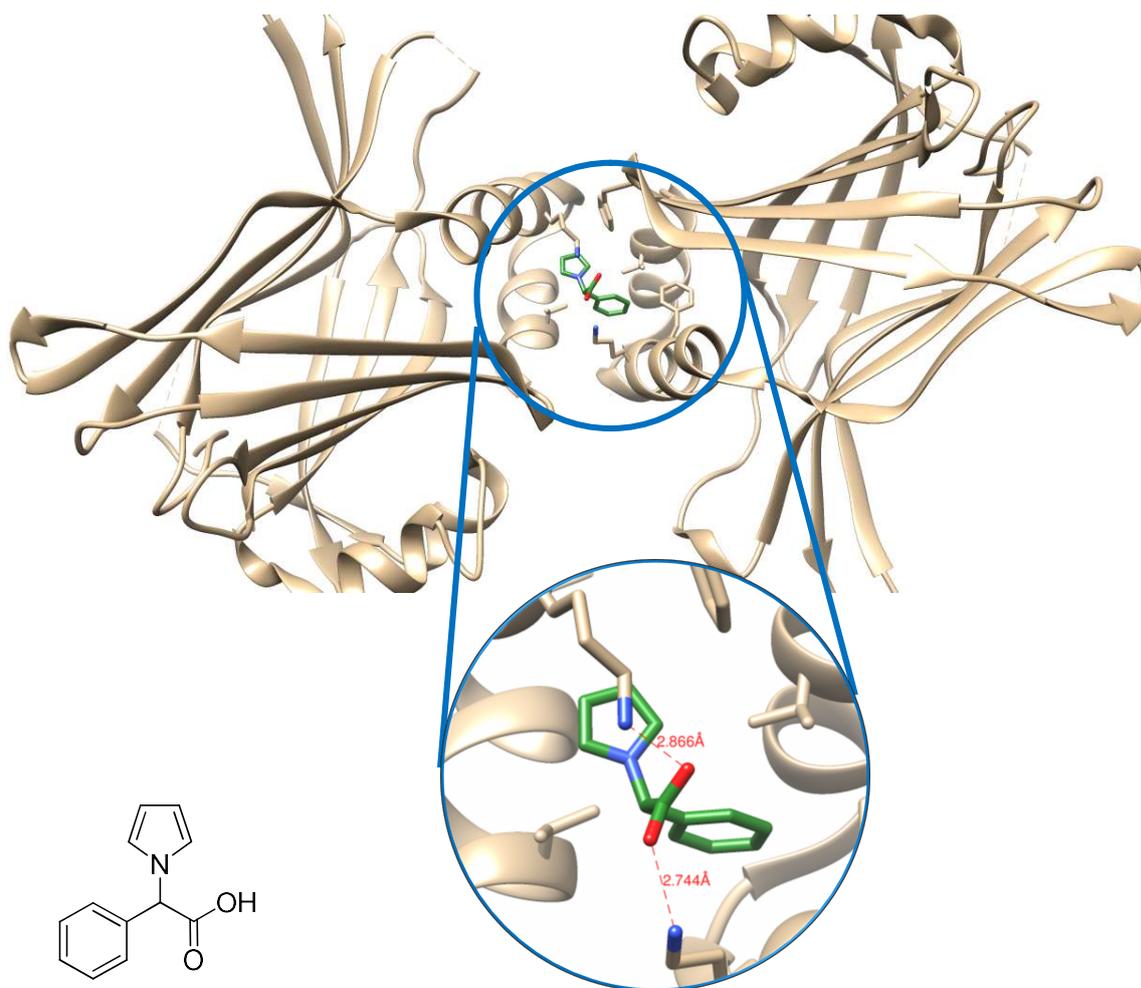
Afin de confirmer le site de liaison, TED-347 a été co-cristallisé avec TEAD2. La structure montre une densité électronique au niveau de la cystéine 380 de la poche hydrophobe (PDB : 6E5G) que les auteurs attribuent à la présence de TED-347 lié de manière covalente à TEAD2. De plus, le composé diminue l'activité transcriptionnelle de TEAD de 70% à 5 μ M.

Xu *et al*⁷¹ ont criblé une librairie de 50 000 composés sur une lignée HEK293A grâce au gène rapporteur de la luciférase. Le composé MGH-CP1 a été identifié comme inhibiteur du complexe YAP-TEAD avec une IC₅₀ de 83 nM (activité transcriptionnelle de TEAD sur cellules HEK293A transfectées par Gal4-TEAD) et diminue l'expression des gènes cibles CTGF et Cyr61 sur diverses lignées cancéreuses. La co-cristallisation de ce composé avec TEAD2-YBD semble montrer que cette molécule s'insère dans la poche hydrophobe. Cependant, ces résultats n'apparaissent que dans un brevet et les données cristallographiques n'ont pas été déposées à la PDB et sont donc non vérifiables.



Figure 31: Structure du MGH-CP1⁷¹

En 2017, un autre fragment, issu d'un criblage par TSA sur mTEAD4, a été identifié comme ligand de l'interface 2. (PDB : 5XJD) L'acide 2-phényl-2-(1H-pyrrol-1-yl)acétique s'insère de manière quasi-symétrique entre deux molécules de mTEAD4 au niveau des résidus F366, K369, L370, L373 et V382 qui sont impliqués dans l'interaction avec le motif conservé LXXLF de YAP/TAZ et forme une liaison hydrogène par sa fonction acide carboxylique avec la fonction amine de K369 (Figure 32). Pour rappel, des mutations au niveau de ce motif consensus de YAP entraîne une diminution de l'interaction YAP-TEAD³⁰. Ce hit présente une faible affinité (300 μ M) mesurée par ITC mais ne présente pas d'activité inhibitrice de l'interaction protéine-protéine au niveau cellulaire⁷².



Fragment 1

Figure 32: Structure du fragment 1, ligand de l'interface 2⁷²

En 2019, Smith *et al*⁷³ ont sélectionné 16 composés issus d'un docking par dynamique moléculaire (issus de l'une librairie de 8 millions de molécules à partir de ZINC) sur TEAD1 et mesuré leur capacité à inhiber l'activité transcriptionnelle de TEAD (test luciférase sur cellules HeLa). Quatre molécules inhibent, à plus de 60%, l'activité transcriptionnelle de TEAD. Et parmi elles, une molécule, CPD-3 (Figure 33) empêche complètement la liaison de YAP sur TEAD1 avec une IC₅₀ de 48 μM. Selon la pose de docking, la partie indole-aromatique interagit dans une poche hydrophobe de TEAD1 avec L272, E368, E393 et Y406, au niveau de l'interface 3, essentielle pour la liaison à YAP. De plus, ce composé empêche l'expression des gènes cibles CTGF et Cyr61 sur cellules HeLa (col de l'utérus) et RaVSMC (cellules de muscles lisses aortiques de rat). L'activité biologique de CPD-3 est essentiellement due au fragment CPD-3.1 qui inhibe les activités des 4 membres de la famille TEAD avec des IC₅₀ comprises entre 33 et 44 μM, l'expression de Cyr61 (IC₅₀ environ 60 μM) et plus modestement de CTGF (40% d'inhibition à 80 μM), la prolifération et la migration cellulaire (cellules HeLa).

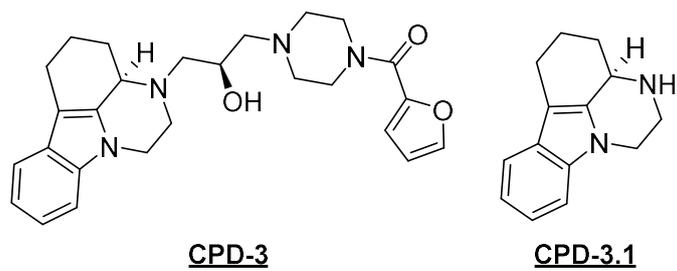


Figure 33: Structure du CPD-3, ligand potentiel de l'interface 3

CHAPITRE 2 : CONCEPTION ET SYNTHÈSE DES TROIS DIAZOLES CIBLANT L'INTERFACE 3

1. Conception

La première stratégie envisagée a été de cibler la protéine TEAD au niveau de l'interface 3, décrite comme essentielles pour la formation du complexe YAP-TEAD. Ce premier chapitre s'appuie sur une partie des travaux de thèse de Floriane Gibault et constitue en quelques sortes une continuité.

La thèse de Floriane Gibault a conduit à l'identification d'un hit (molécule I), ciblant l'interface 3, qui a été pharmacomodulé afin d'améliorer l'activité biologique. Il provoque à une concentration de 10 μM une nette diminution ($\approx 50\%$) de l'activité transcriptionnelle de TEAD dans un test gène rapporteur à la luciférase sur cellules HEK293 (cellules non cancéreuses) (Figure 34).

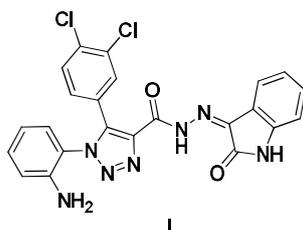


Figure 34: Structure du hit I

Une étude de docking de cette molécule I dans la cavité de hTEAD1 définie par l'interface 3 a été menée afin d'estimer les interactions potentielles ligand-cible. Des interactions essentielles ont été proposées. La molécule I s'insérerait dans la poche hydrophobe de hTEAD1 via trois interactions principales (Figure 35). Le premier cycle aromatique en 1, porteur d'une fonction amine, interagirait avec la fonction acide de Glu₂₅₅, le second cycle aromatique 3,4-dichlorophényle s'insérerait dans une poche hydrophobe, l'un des atomes d'azote du triazole effectuerait une liaison hydrogène avec la fonction phénol de Tyr₄₂₁ et le linker interagirait avec la fonction amine de Lys₂₈₉ (Figure 35).

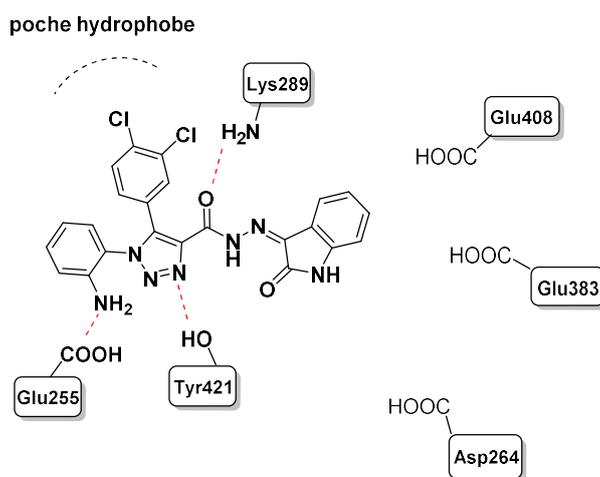


Figure 35: Représentation schématique de la molécule I dans la poche de TEAD impliquée dans l'interface 3

L'étude de mutagenèse dirigée effectuée sur TEAD1³⁰ a par ailleurs montré que les mutations sur la tyrosine 406 (numérotation de l'article) (Y406A et Y406H), correspondant à la tyrosine 421 (numérotation uniprot), induisent une forte diminution de l'interaction YAP/TAZ-TEAD.

L'objectif de ma première année de thèse a été de remplacer l'hétérocycle triazole central du hit I par des motifs imidazole ou pyrazole (Figure 36) afin d'évaluer l'importance de chaque atome d'azote dans l'interaction potentielle et l'activité biologique résultante. J'ai ainsi synthétisé les trois diazoles isomères dérivés du composé I.

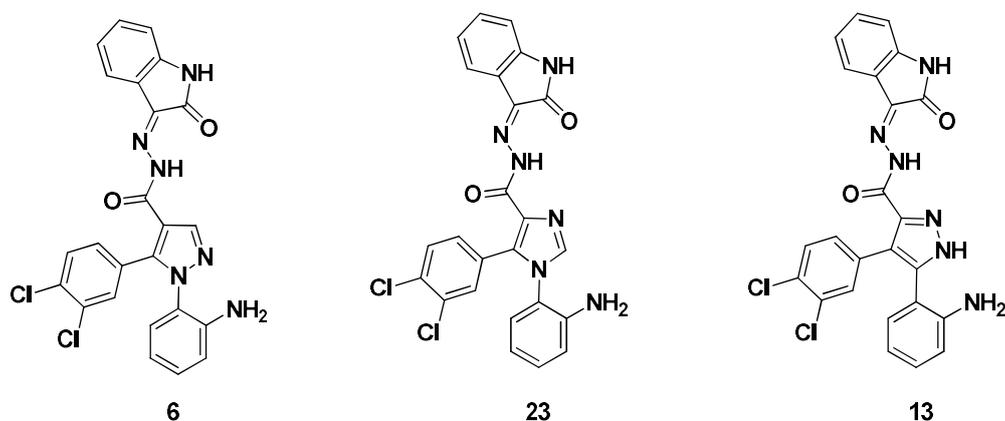


Figure 36: Structures de l'imidazole et des pyrazoles dérivés du composé hit I

2. Synthèse

2.1. Synthèse du 1-(2-aminophényl)-5-(3,4-dichlorophényl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidène)-1H-pyrazole-4-carbohydrazide **6**

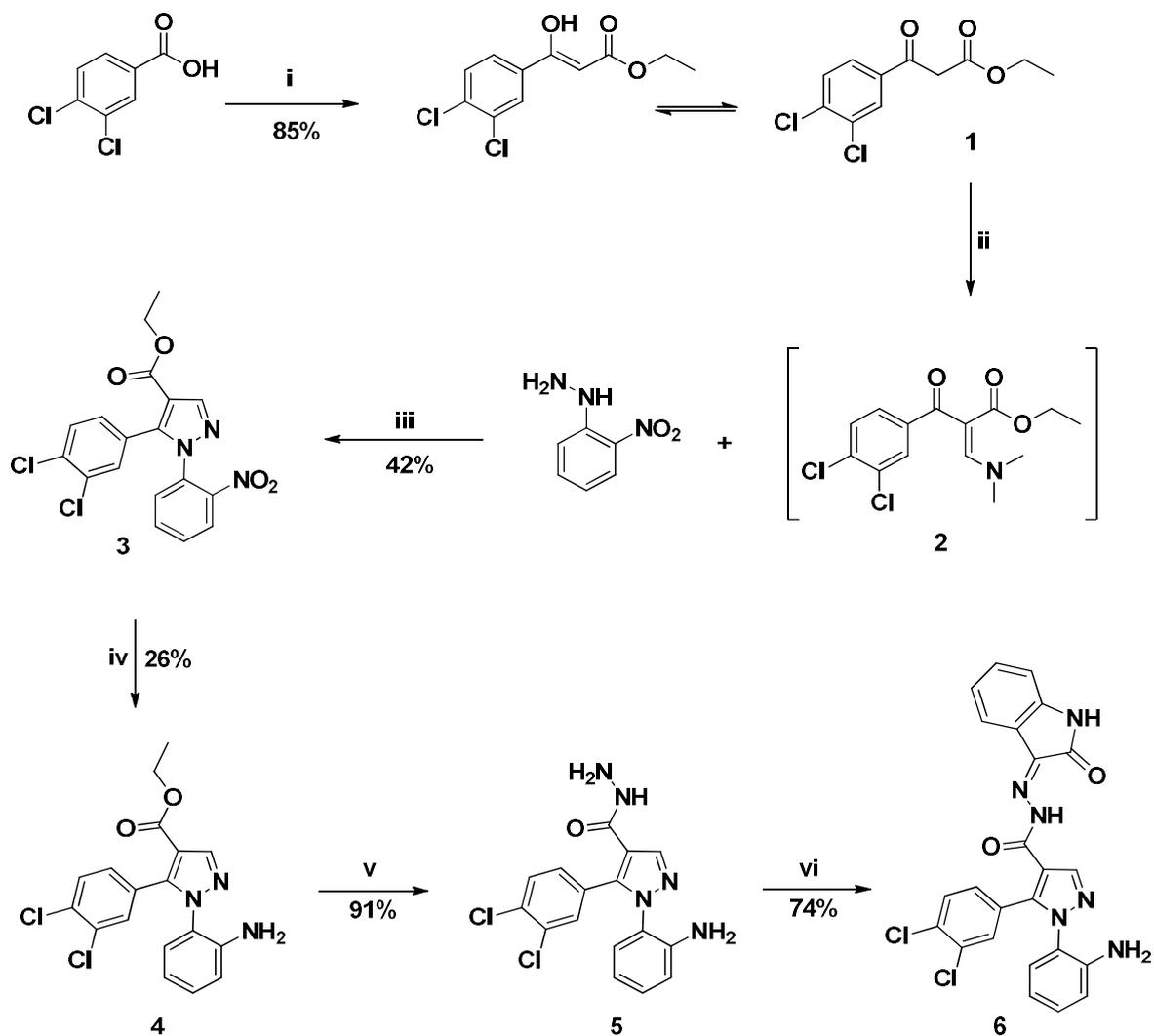


Schéma 1: Synthèse du pyrazole **6**

Réactifs et conditions : i) 3-éthoxy-3-oxopropanoate de potassium (1,2 éq.) CDI (1,2 éq.), MgCl₂ (1,2 éq.), NEt₃ (1,2 éq.), THF, ACN, 6h, 20 °C; ii) DMF-DMA (1,1 éq.), toluène, 110 °C, 4 h; iii) 2-nitrophénylhydrazine (1,1 éq.), HCl (10%), tert-butanol, reflux, 16 h; iv) Na₂S₂O₄ (10 éq.), aq. 35% NH₃ (10 éq.), H₂O/THF, 20 °C, 16h; v) **4** (1 éq.), NH₂-NH₂.H₂O (3 éq.), EtOH, reflux, 16h; vi) isatine (1 éq.), EtOH, reflux, 16 h

L'acide 3,4-dichlorobenzoïque réagit avec le 3-éthoxy-3-oxopropanoate de potassium en présence de carbonyldiimidazole (CDI), de chlorure de magnésium et de triéthylamine⁷⁴ pour obtenir le β-cétoester intermédiaire (**1**) isolé et caractérisé sous la forme d'un mélange tautomère (« dicéto » et « β-cétoénole »). Ce dernier est mis en réaction avec le diméthylformamide diméthylacétal (DMF-DMA)

pour former l'énaminone intermédiaire (**2**) non isolé qui réagit avec le 2-nitrophénylhydrazine produisant ainsi le pyrazole trisubstitué⁷⁵ (**3**) avec un rendement de 42% (Schéma 1).

La synthèse du carbohydrazide (**5**) peut se faire en une étape en présence d'hydrazine monohydratée et de charbon palladié. Cette méthode a pour avantage la formation de l'hydrazide et la réduction de la fonction nitro en amine. Cependant, cette réduction n'est pas optimale pour les composés chlorés puisque l'on observe une déshalogénéation partielle ou totale (selon le temps d'hydrogénation) de ces derniers. C'est pourquoi, la formation du carbohydrazide (**5**) est effectuée en deux étapes.

Tout d'abord la fonction nitro du composé (**3**) est réduite par du dithionite de sodium en présence d'ammoniaque puis la fonction ester est mise en réaction avec l'hydrazine monohydratée pour former le carbohydrazide. Finalement l'isatine est condensée sur le carbohydrazide (**5**) en présence d'acide acétique. Le composé final (**6**), insoluble dans l'éthanol, est isolé par filtration. Le rendement global de cette synthèse est de 7,3% en 6 étapes avec pour étape limitante la réduction de la fonction nitro (26%).

2.2. Synthèse du 5-(2-aminophényl)-4-(3,4-dichlorophényl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidène)-1H-pyrazole-3-carbohydrazide **13**

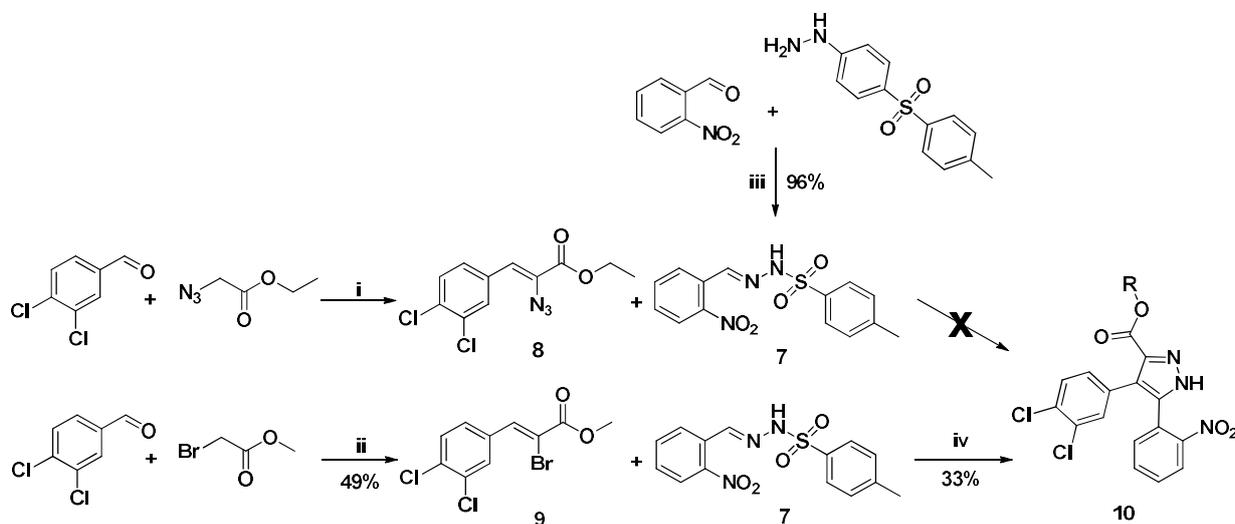


Schéma 2: Synthèse du pyrazole **10**

Réactifs et conditions: i) EtONa (4 éq.), THF, -15°C, 2 h; ii) TiCl₄ (1,2 éq.), NEt₃ (2 éq.), DCM, 20 °C, 4 h; iii) EtOH, reflux, 1 h iv) CsCO₃ (5 éq.), DMF, 20°C, 5 h.

En vue de synthétiser le pyrazole **10** trisubstitué en positions 3, 4 et 5 nous nous sommes inspirés de l'article publié par Zhang *et al*⁷⁶. Les auteurs proposent une réaction multicomposante entre un benzaldéhyde, la tosylhydrazine et un azoture de vinyle. Nos tentatives pour synthétiser le composé **8** à partir du 3,4-dichlorobenzaldéhyde et de l'azidoacétate d'éthyle se sont révélées infructueuses. Nous nous sommes donc tournés vers la synthèse de l'analogue bromé **9** (selon le protocole décrit par Augustine *et al*⁷⁷) (Schéma 2).

Le 3,4-dichlorobenzaldéhyde réagit avec le bromoacétate de méthyle en présence de TiCl_4 pour former le composé **9**.

Enfin, le sulfonohydrazone **7** a été synthétisé par réaction du 2-nitrobenzaldéhyde avec la tosylhydrazine avec un rendement de 96%.

Seul le composé **9** nous a permis d'accéder au pyrazole **10** avec un rendement de 33% (Schéma 2).

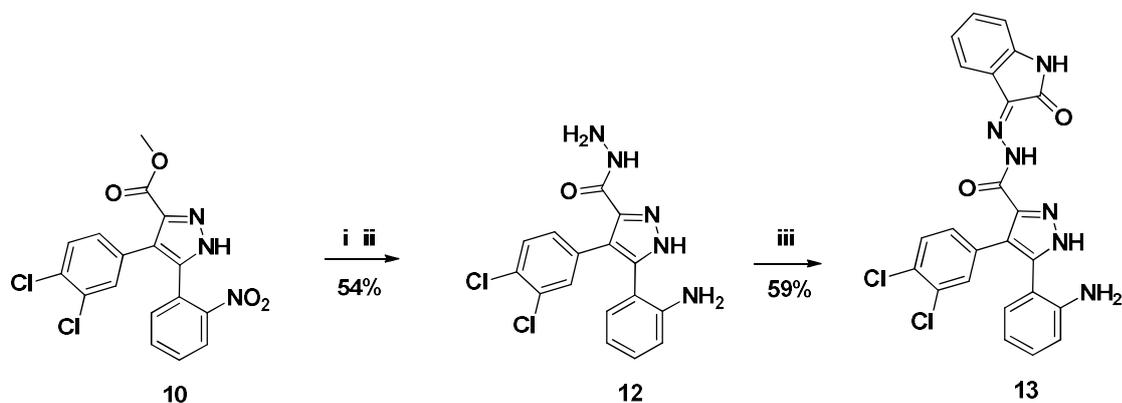


Schéma 3: Synthèse du pyrazole **13**

Réactifs et conditions: i) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (10 éq.), aq. 35% NH_3 (10 éq.), $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$, 20 °C, 16 h; ii) $\text{NH}_2\text{-NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (3 éq.), EtOH, reflux, 16 h; iii) isatine (1 éq.), EtOH, reflux, 16 h

Comme précédemment, la fonction nitro est réduite par le dithionite de sodium en présence d'ammoniaque avant formation du carbohydrazone, pour donner **12**. L'isatine est ensuite condensée sur le carbohydrazone en présence d'acide acétique. Le composé final **13**, insoluble dans l'éthanol, est isolé par filtration (Schéma 3).

2.3. Synthèse du 1-(2-aminophényl)-5-(3,4-dichlorophényl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidène)-1H-imidazole-4-carbohydrazide **23**

La synthèse du cycle imidazole s'est avérée être beaucoup plus difficile que celle des pyrazoles. Plusieurs voies de synthèse ont été explorées. Les trois premières voies de synthèse visent à construire le cycle imidazole, la quatrième utilise comme matière première le 1H-imidazole-4-carboxylate de méthyle commercial. Seule cette quatrième voie s'est avérée être efficace pour l'obtention de l'imidazole trisubstitué cible.

2.3.1. Voie de synthèse 1, voie « BICA »

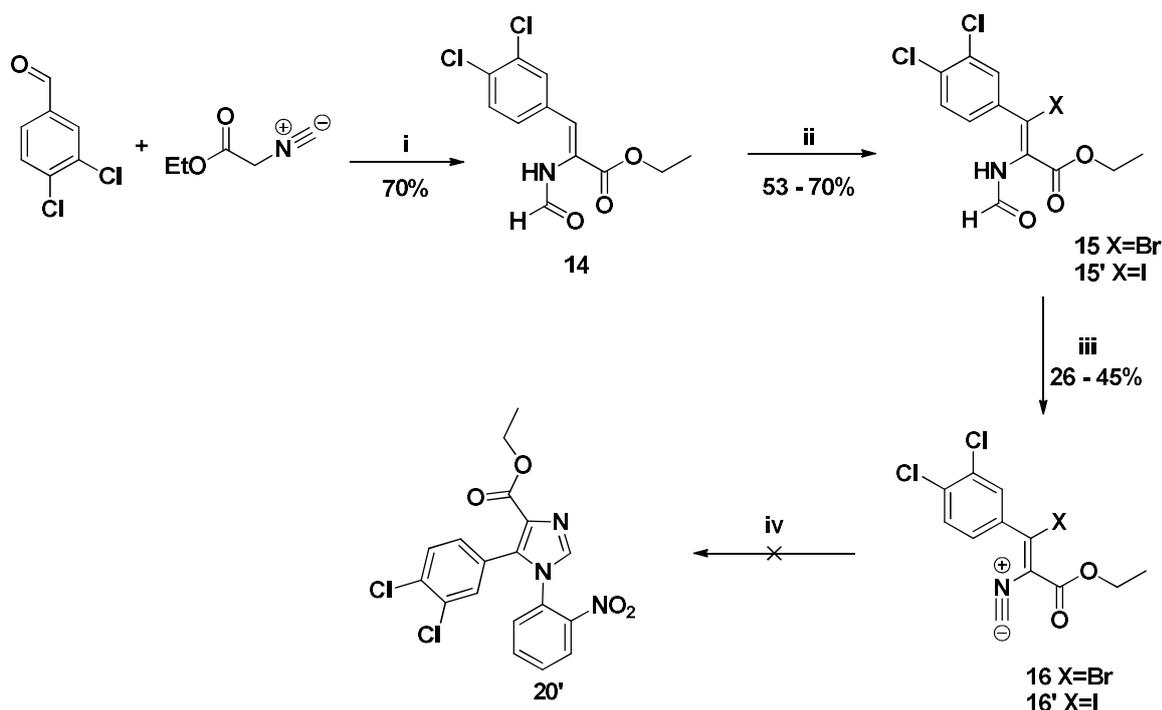


Schéma 4: Voie de synthèse 1, voie BICA⁷⁸

Réactifs et conditions: i) NaH (3 éq.), AcOH (5 éq.), THF, 20 °C, 3 h ; ii) NXS (1 éq.), NEt₃ (1 éq.), Na₂S₂O₄, DMF, 20 °C, 3 h; iii) POCl₃ (1,1 éq.), NEt₃ (2,5 éq.), K₂CO₃ (2,5 éq.), DCM, 0°C, 2 h; iv) 2-nitroaniline (1 éq.), NEt₃ (1 éq.), DMF

La première voie de synthèse s'inspire de la synthèse de Nunami *et al*⁷⁸. Elle consiste en une condensation entre le 3,4-dichlorobenzaldéhyde et l'isocynoacétate d'éthyle en présence d'hydrure de sodium pour former le composé **14** qui est ensuite bromé par du N-bromosuccinimide. Le composé **15** obtenu est converti en bromoisocynoacrylate (BICA) par déshydratation du groupement formylamide par de l'oxychlorure de phosphore et de la triéthylamine (Schéma 4).

Le composé **16** est traité avec une quantité équimolaire de 2-nitroaniline et de triéthylamine à température ambiante. Cette étape de cyclisation ne nous a pas permis d'obtenir l'imidazole trisubstitué désiré.

Le composé **14** a également été iodé pour donner le composé **15'** mais la dernière étape a également posé problème.

Il semble que le caractère électro-attracteur du groupe nitro en ortho de la fonction amino de la 2-nitroaniline réduise considérablement la réactivité de cette molécule ne permettant pas la substitution de l'atome d'halogène de l'intermédiaire **16**.

2.3.2. Voie de synthèse 2

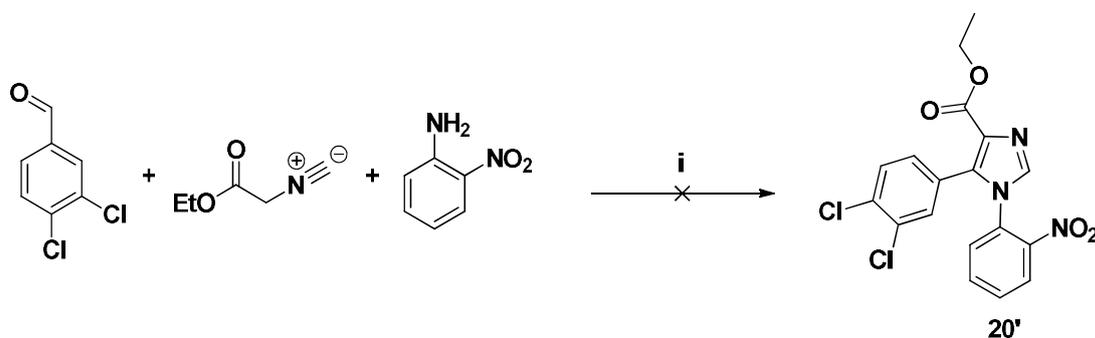


Schéma 5: Voie de synthèse 2

Réactifs et conditions: i) CuI (10%), pyridine (1 éq.), EtOH, 50 °C, 16 h

Une deuxième voie de synthèse one-pot a été mise en œuvre. Elle utilise le 3,4-dichlorobenzaldéhyde, l'isocynoacétate d'éthyle et la 2-nitroaniline en quantités stoechiométriques en présence d'iodure de cuivre I en quantité catalytique⁷⁹ (Schéma 5). Cet essai a aussi été infructueux.

2.3.3. Voie de synthèse 3

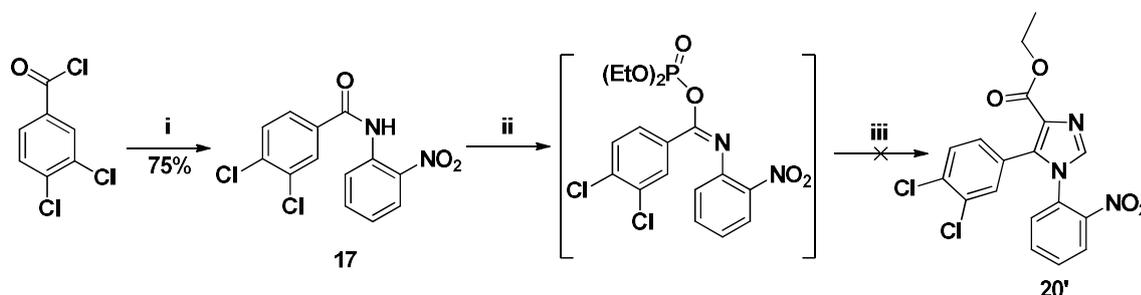


Schéma 6: Voie de synthèse 3^{80,81}

Réactifs et conditions : i) chlorure de 3,4-dichlorobenzyle (2 éq.), 2-nitroaniline (1 éq.), pyridine (2

éq.),DCM,t. a., 8 h; ii) KOtBu (1,2 éq.), ClPO(OEt)₂ (1,3 éq.),THF, -35°C, 30 mn, puis 0°C, 50 mn; iii) isocynoacétate d'éthyle (1,3 éq.), KOtBu (1,1 éq.), -78°C-20°C, 5h

La troisième voie de synthèse consiste à condenser un isocynoacétate sur un iminophosphate. Le composé **17** est préparé par réaction entre la 2-nitroaniline et l'acide 3,4-dichlorobenzoïque activé en chlorure d'acyle. D'après Aguilar *et al*⁸⁰, l'amide formé est traité avec du chlorophosphate de diéthyle pour générer l'imino-phosphate correspondant instable qui est condensé en conditions basiques avec l'isocynoacétate d'éthyle pour produire l'imidazole (Schéma 6). Cette synthèse n'a pas permis d'obtenir le composé **20'**. Ici encore le caractère attracteur du groupe nitro semble défavoriser la formation de l'imino-phosphate intermédiaire. D'après la CCM et la LC-MS, nous obtenons très majoritairement le produit de départ **17**.

2.3.4. Voie de synthèse 4

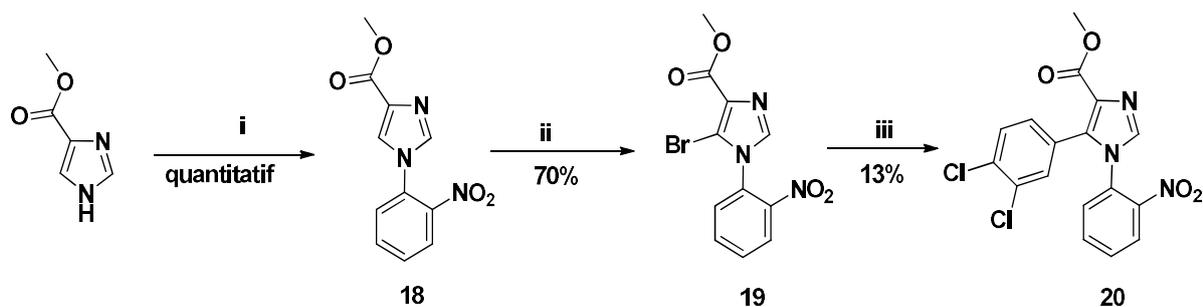


Schéma 7: Voie de synthèse 4

Réactifs et conditions: i) 1-fluoro-2-nitrobenzène (1,1 éq.), K₂CO₃ (1 éq.), ACN, reflux, 12 h; ii) NBS (1 éq.), THF, 20°C, 5 h; iii) acide 3,4-dichlorophénylboronique (1,5 éq.), K₃PO₄ (4 éq.), Pd(PPh₃)₄ (10%), 100°C, 16 h.

Le 1H-imidazole-4-carboxylate de méthyle est substitué quantitativement en position 1 par le 1-fluoro-2-nitrobenzène en présence de carbonate de potassium. Le produit résultant **18**⁸² est bromé en position 5 par du N-bromosuccinimide (70%), et finalement une réaction de Suzuki en présence de l'acide 3,4-dichlorophénylboronique est effectuée (Schéma 7).

Plusieurs conditions de réactions de Suzuki ont été testées:

Tableau 5: Conditions de réactions de Suzuki pour l'obtention du composé **20**

	Acide boronique	Base	Catalyseur	Solvant	T°	Temps réaction	Rendement
1	Acide 3,4-	4 éq	7% Pd(OAc) ₂ ,	dioxane	100	16 h	Traces non

	dichlorophénylboronique	K ₃ PO ₄	10% PPh ₃		°C		isolées
2	Acide 3,4-dichlorophénylboronique	4 éq K ₃ PO ₄	7% Pd(OAc) ₂ , 15% P(o-tol) ₃	dioxane	100 °C	16 h	Traces non isolées
3	Acide 3,4-dichlorophénylboronique	4 éq K ₃ PO ₄	10% Pd(PPh ₃) ₄ commercial	Toluène eau	100 °C	16 h	8%
4	Acide phénylboronique	4 éq K ₂ CO ₃	10% Pd(PPh ₃) ₄ commercial	Toluène eau	100 °C	16 h	0%
5	Acide 3,4-dichlorophénylboronique	4 éq K ₃ PO ₄	10% Pd(PPh ₃) ₄ synthétisé	Toluène eau	100 °C	16 h	13%

Les premières conditions de Suzuki utilisaient le diacétate de palladium en présence de triphénylphosphine ou de tri-orthotolylphosphine dans le dioxane. Le produit **20a** a été détecté en LC-MS mais s'est révélé difficilement purifiable. Les manipulations suivantes ont consisté à utiliser un autre catalyseur, le tétrakistriphénylphosphine palladium (0) commercial dans un mélange eau-toluène, ce qui nous a permis d'obtenir l'imidazole trisubstitué avec un rendement de 8%. Ce même catalyseur a également été fraîchement synthétisé au laboratoire sans amélioration significative du rendement de la réaction (13% vs 8%) (Tableau 5).

Cette réaction mériterait d'être optimisée notamment en modifiant la base (anion et cation) et le solvant. Néanmoins la quantité de composé **20** s'est révélée suffisante pour que nous puissions porter nos efforts sur la suite de la synthèse.

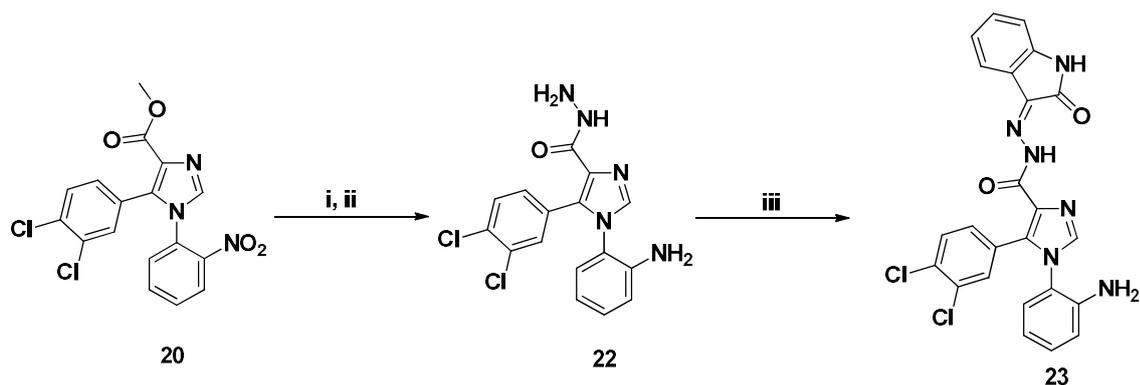


Schéma 8: Synthèse de l'imidazole cible 23

Réactifs et conditions: i) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (10 éq.), aq. 35% NH_3 (10 éq.), $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$, 20 °C, 16 h; ii) $\text{NH}_2\text{-NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (3 éq.), EtOH, reflux, 16 h; iii) isatine (1 éq.), EtOH, reflux, 16 h

3. Activité cellulaire

Les trois diazoles précédemment synthétisés ont été testés pour leur potentiel d'inhibition de l'activité transcriptionnelle de TEAD sur un modèle cellulaire transitoirement transfecté (cellules HEK293T transfectées par le plasmide TEAD-luc reporter 8XGTIIC-luciférase) (Tableau 6). L'activité luciférase est normalisée sur l'activité β -galactosidase qui est aussi un contrôle qualitatif de la cytotoxicité des molécules.

Tableau 6: Evaluation de l'activité transcriptionnelle de TEAD en présence des composés 6, 13 et 23 à 10 μM

Molécule	Concentration testée	Activité luciférase normalisée	Toxicité qualitative
Hit I	5 μM	75% \pm 10 %	
	10 μM	53% \pm 5 %	
6	1 μM	111% \pm 15 %	
	10 μM	44% \pm 5 %	Tox +
23	10 μM	116% \pm 3 %	
13	10 μM	40% \pm 15 %	Tox +++

Les résultats cellulaires des trois diazoles synthétisés comparés au composé hit I de départ montrent que l'activité biologique semble être fortement influencée par la présence de l'atome d'azote central du triazole du hit I. En effet, bien que ne présentant pas de cytotoxicité l'imidazole 23 n'a pas d'effet sur l'activité luciférase à 10 μM . Par contre, les deux pyrazoles (6 et 13) inhibent l'interaction

YAP/TAZ-TEAD avec une cytotoxicité accrue, notamment pour le pyrazole **13**. Le composé **6** conserve une activité similaire à celle du hit **I** à une concentration de 10 μ M.

L'hétérocycle central pyrazole dont l'un des atomes d'azote est substitué nous a semblé suffisamment prometteur pour remplacer le triazole.

Dans le chapitre suivant, j'aborderai donc la synthèse de pyrazole trisubstitué avec sur l'un des atomes d'azote un motif ω -aminoalkyle car le motif 2-aminoéthyle s'était révélé supérieur au groupe 2-aminophényle dans les travaux antérieurs au laboratoire.

Ce présent chapitre complète un travail plus large où de nombreuses modifications ont été apportées sur le triazole afin d'améliorer activité, affinité et solubilité.

**CHAPITRE 3 : CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE
PYRAZOLES TRISUBSTITUÉS CIBLANT
L'INTERFACE 2**

Les composés précédemment synthétisés présentent une faible solubilité et sont donc difficiles à évaluer aussi bien sur tests cellulaires que par des méthodes biophysiques. Dans ce cadre, le composé hit de départ a été simplifié. Tout d'abord, l'aminophényle en position 1 a été remplacé par une chaîne éthylamine pour former le composé II. Ceci améliore l'activité inhibitrice de l'interaction YAP/TAZ-TEAD sur cellules HEK293. On passe d'une activité transcriptionnelle de 50% pour le composé hit à une concentration de 10 μM à 65% pour le composé II à 1 μM . Cependant, ce nouveau composé est cytotoxique à concentration plus élevée ($\text{CC}_{50} = 16.2 \mu\text{M}$).

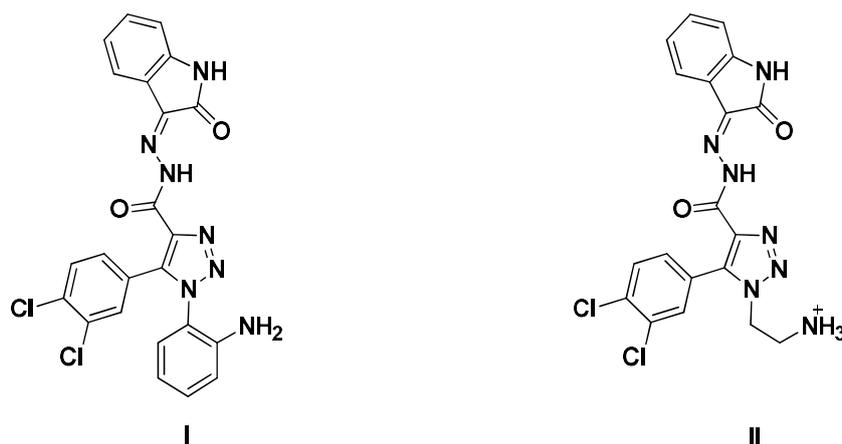


Figure 37: Structure des composés triazoles I et II

De plus, une simplification du triazole II, correspondant à la molécule sans isatine, a été co-cristallisé avec la protéine hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ (Figure 38). Cette molécule III s'insère dans la poche hydrophobe (poche palmitate) de la protéine. L'amine en position 1 du triazole interagirait avec la chaîne latérale de la sérine 345, un des atomes de chlore du motif dichlorophényle est proche de la cystéine 380 et la partie hydrazide s'oriente vers une large poche hydrophobe (Figure 38). Il montre par ailleurs à 10 μM une inhibition de 53% de l'activité transcriptionnelle de TEAD similaire à celle du triazole de départ (50%) sans cytotoxicité notable dans cette gamme de concentrations.

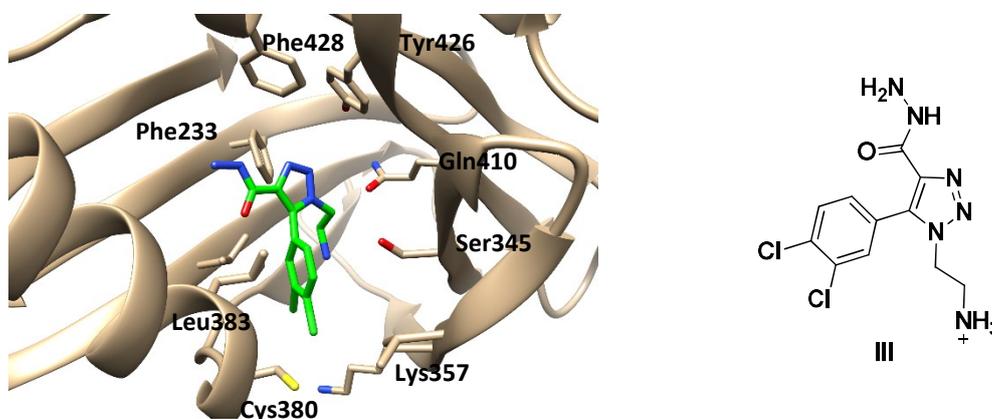


Figure 38: Co-cristallisation du fragment III avec hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇

La fonctionnalisation du pyrazole disubstitué par des chaînes alkylamine semble être moins fastidieuse que pour le 1,2,3-triazole. En effet, lors de la thèse de Floriane Gibault, la synthèse des composés triazoles, substitués par des chaînes alkylamine en 1, a donné de mauvais rendements et la purification s'est révélée difficile (mélange possible de 3 régioisomères). Etant donné que le pyrazole **6**(du chapitre 2) a légèrement une meilleure activité que son équivalent triazole, le motif pyrazoletrisubstitué est conservé pour la suite.

1. Conception des pyrazole-4-carboxamides

1.1. Remplacement de l'isatine par un motif benzylamide ou phénéthylamide

L'analyse du complexe hTEAD2-fragment **III** (Figure 38) montre qu'il existe un large espace hydrophobe non occupé proche de la fonction hydrazide. Nous voulions aussi nous affranchir du motif isatine, responsable des problèmes de solubilité et de cytotoxicité importante.

Nous nous sommes donc appuyés sur des travaux effectués par le Professeur J. F. Guichou au Centre de Biochimie Structurale de Montpellier (CBS).

Une chimiothèque de fragments du CBS constituée d'environ 500 molécules, a été criblée à 500 μM par TSA sur la protéine hTEAD2 (5 μM). Les 44 fragments présentant un ΔT_m supérieur à 0,7°C ont été identifiés comme ligands potentiels de hTEAD2 (Figure 39 ci-dessous).

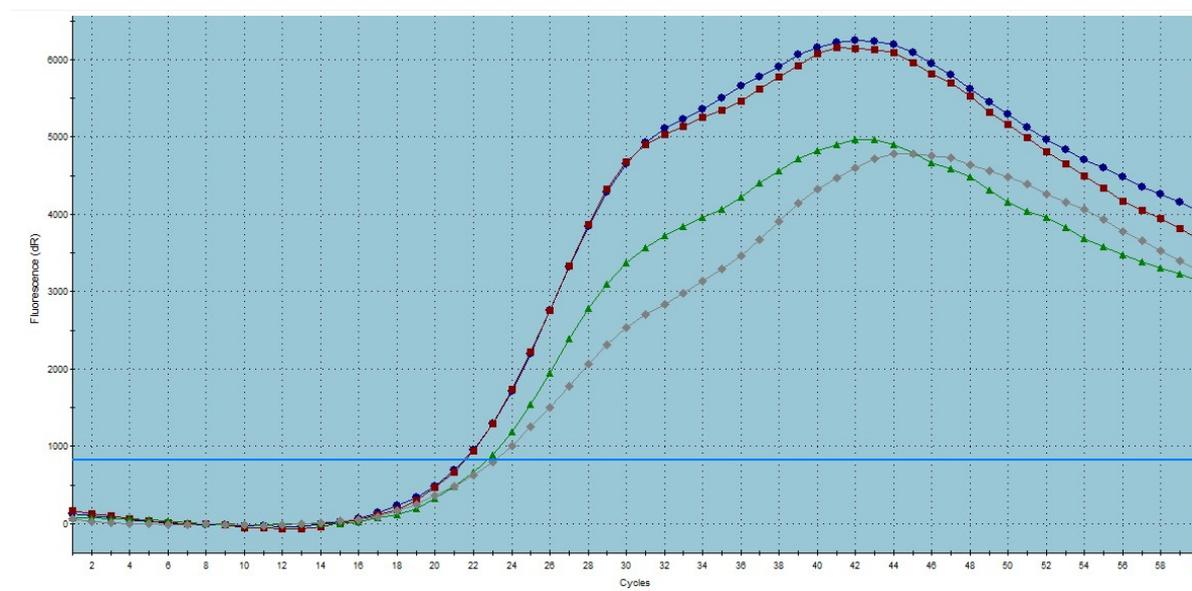


Figure 39: Thermofluor de 3 composés en comparaison à TEAD2 seul (en bleu)

Par exemple, le thermofluor montre que le fragment F251 (en rouge) ne se lie pas à hTEAD2 (en bleu) tandis que le fragment F292 (en vert) stabilise la protéine avec un $\Delta T_m = 0,95$ °C. De même pour le fragment F361 (en gris) un ΔT_m plus élevé de 3,99 °C est déterminé.

Parmi ces molécules, 6 ont co-cristallisé avec hTEAD2 et donné des structures exploitables. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au 5-benzyloxyindole (fragment F248) qui cristallise dans la poche palmitate et s'insère profondément dans la partie hydrophobe pour effectuer notamment une interaction de type π -stacking entre le groupe benzyle et le résidu F428 (Figure 40). On remarque également que le 5-benzyloxyindole s'oriente de la même manière que l'acide palmitique (Figure 40)

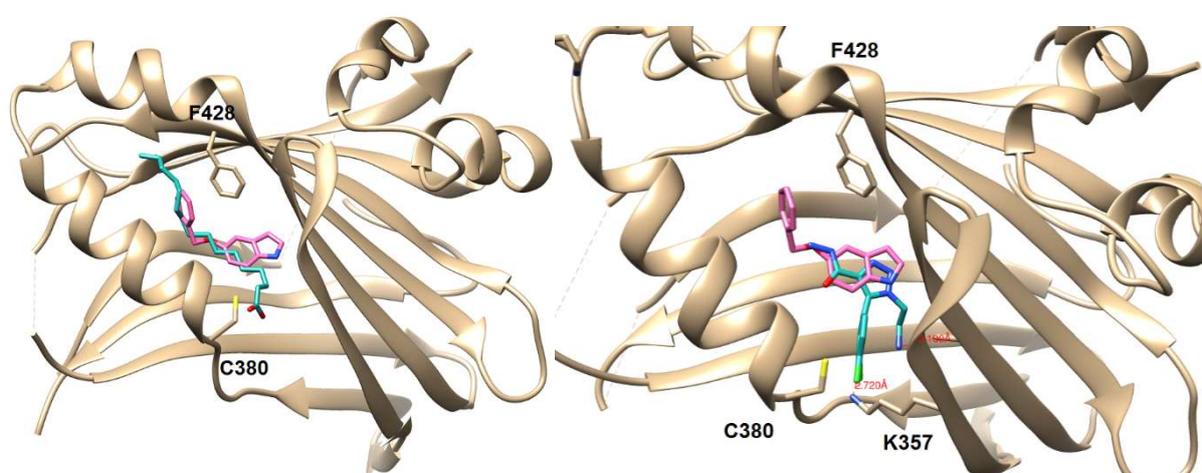


Figure 40: A gauche Zoom sur le 5-benzyloxyindole (en rose) s'insérant dans la poche hydrophobe et superposition avec l'acide palmitique (en vert); A droite Superposition des complexes du 5-benzyloxyindole (en rose) et du composé III (en bleu) avec hTEAD2

1.2. Conception des pyrazole-4-carboxamides

Par la superposition entre ce fragment 5-benzyloxyindole et le composé III (Figure 41), nous avons remarqué que :

-la fonction hydrazide peut être remplacée par une fonction amide sur laquelle sera fixé un groupe benzyle ou phénéthyle afin d'essayer d'établir un stacking avec F428;

-le triazole central, qui se superpose au niveau de l'indole, peut être remplacé par un pyrazole et la chaîne alkyle fonctionnalisée substituant l'un des deux atomes d'azote de l'hétérocycle est conservée pour effectuer une interaction entre le résidu S345 et une fonction amine ou acide carboxylique terminale. On pourra également envisager une liaison ionique entre la fonction acide carboxylique terminale et le résidu K357. De même que précédemment, la longueur de chaîne est modulable pour évaluer le nombre de carbones optimal pour ces interactions potentielles.

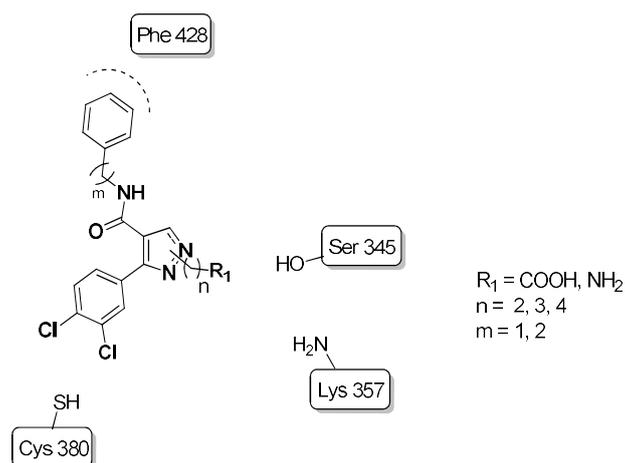


Figure 41: Conception des pyrazoles benzylamide et phénéthylamide

Notre objectif, dans ce chapitre, a donc été de synthétiser une famille de pyrazole-4-carboxamides trisubstitués représentés sur la Figure 41. Nous nous sommes limités à la série correspondant au régioisomères majoritaires obtenus expérimentalement (pyrazoles 1,3,4-trisubstitués, vide infra partie 2.4). Nous avons aussi étudié les esters éthyliques précurseurs (en lieu et place de la fonction benzylamide ou phénéthylamide).

2. Synthèse des pyrazole-4-carboxamides

2.1. Stratégie de synthèse

La formation du pyrazole 1,4,5-trisubstitué cible peut être envisagée par réaction d'un β -cétoester sur une hydrazine convenablement substituée. Cependant, la synthèse de cette hydrazine substituée est fastidieuse. Elle nécessite l'utilisation de l'hydrazine monoprotégée par un groupement Boc à savoir le *tert*-butylcarbazate (BocNH-NH_2). D'après Bordessa *et al*⁸³, la substitution du *tert*-butylcarbazate par le 3-bromo-propanoate d'éthyle donne un rendement faible de 43% pour 4 jours de réaction (Schéma 9). Cet intermédiaire (éventuellement purifiable) devra être ensuite déprotégé, étape qui pourrait encore poser des problèmes de rendement, si une purification s'avère nécessaire, d'autant plus que l'hydrazine monosubstituée obtenue risque d'être partiellement hydrosoluble. Par ailleurs, il est préférable d'effectuer le couplage de type peptidique en premier (conversion de la fonction ester éthylique par la benzylamine ou la phénéthylamine), de façon à ne pas entrer en compétition avec la chaîne alkyl acide (ou alkyl ester) (Schéma 9).

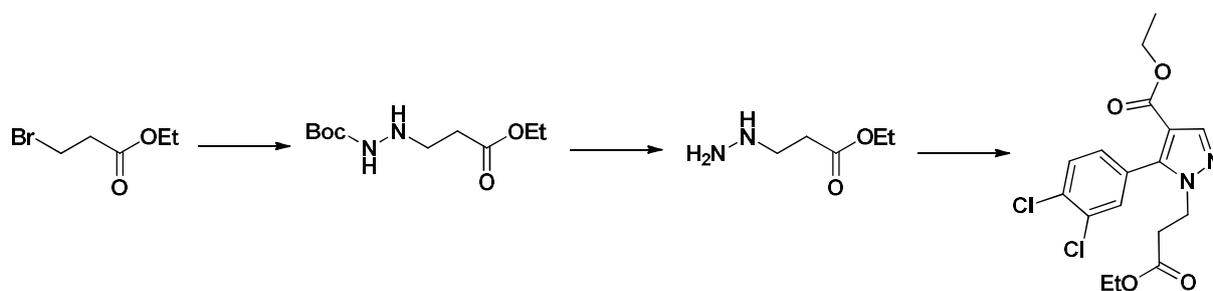


Schéma 9: Schéma réactionnel de la formation du pyrazole substitué en position 1

La synthèse qui nous est donc apparue la plus simple consiste à construire le précurseur hétérocyclique **24** à partir du β -cétoester **1**, puis former le motif benzylamide ou phénéthylamide. La chaîne alkyle ω -fonctionnalisée protégée sera alors introduite (Schéma 10). Enfin une étape de déprotection sera nécessaire pour libérer les fonctions amine ou acide terminales présentes sur la chaîne alkyle. Cette synthèse permet d'avoir un précurseur commun à toutes les molécules et de ne diversifier qu'en fin de synthèse. Cependant cette stratégie conduit à l'obtention de deux régioisomères.

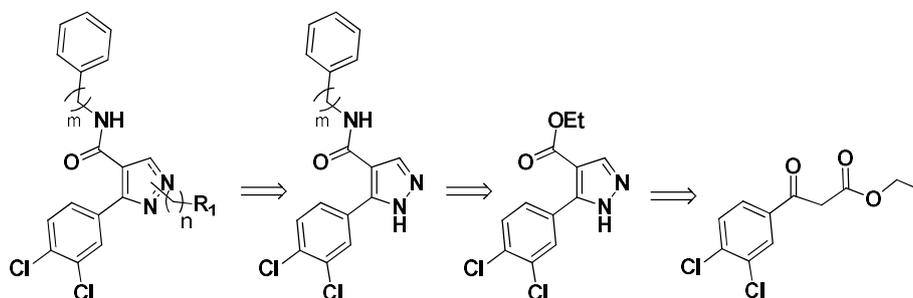


Schéma 10: Rétrosynthèse des pyrazole-4-carboxamides

2.2. Synthèse des précurseurs

Le précurseur **24** est obtenu par réaction du β -cétoester **1** avec le DMF-DMA pour former l'énamine **2** correspondante, non isolée, qui réagit ensuite avec l'hydrazine monohydratée⁸⁴ (Schéma 11).

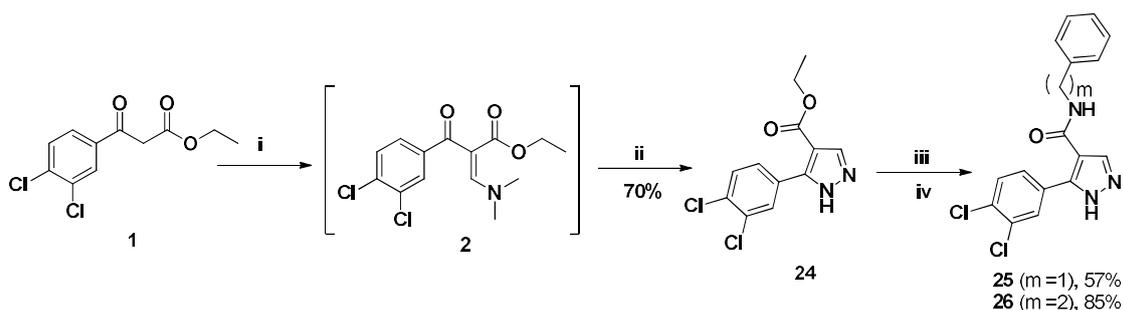


Schéma 11: Synthèse des précurseurs **24** et **25**

Réactifs et conditions : i) DMF-DMA (1,1 éq.), 90 °C, 3 h ; ii) $\text{NH}_2\text{-NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1 éq.), EtOH, 70 °C, 2 h ; iii) NaOH (5 éq.), EtOH, Δ ; iv) benzylamine ou phénéthylamine (1 éq.), EDCI (1,2 éq.), HOBT (1,2 éq.), DMF, 20 °C, 16 h

La synthèse des composés benzamide et phénéthylamides s'effectue par saponification du composé **24** pour permettre un couplage de type pseudo-peptidique avec la benzylamine ou la phénéthylamine en présence de EDCI et de HOBT pour former les composés précurseurs communs, **25** et **26** avec des rendements de 57% et 85%, respectivement.

2.3. Problème de la régiosélectivité de l'alkylation des pyrazoles

Lors de l'étape suivante, les divers substituants sont introduits sur l'un des atomes d'azote du pyrazole par réaction de substitution nucléophile avec des ω -halogénoalkylphthalimides ou ω -halogénoalkylesters. Le problème de la régiosélectivité de l'alkylation des pyrazoles disubstitués s'est donc posé. Pour l'appréhender, j'ai pris un exemple type en mettant en réaction l'intermédiaire **25** en présence du 4-bromobutylphthalimide et de carbonate de potassium (Schéma 12).

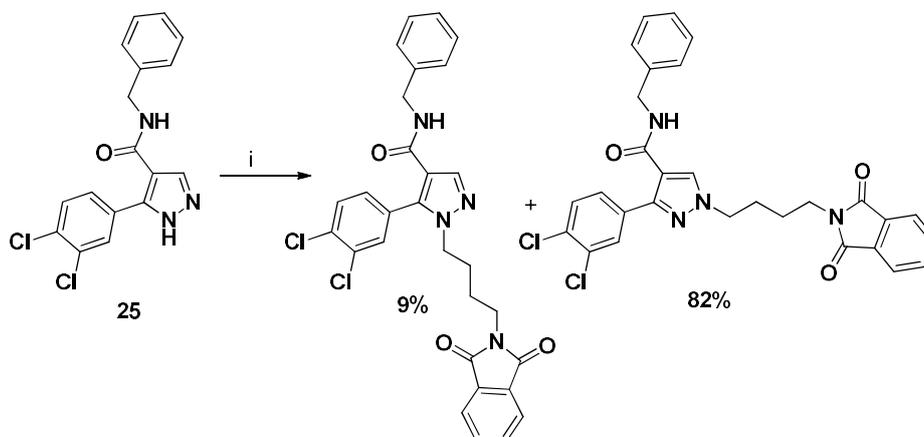


Schéma 12: Régiosélectivité de l'alkylation de **25**

Réactifs et conditions : iii) 4-bromobutylphthalimide (1 éq.), K_2CO_3 (2 éq.), ACN, reflux, 16 h

La réaction conduit à la formation des deux régioisomères attendus séparés après chromatographie flash sur silice: le pyrazole 1,3,4-trisubstitué majoritaire (82%) et l'isomère 1,4,5-trisubstitué minoritaire (9%). Ces deux isomères ont été caractérisés par expérience RMN-2D.

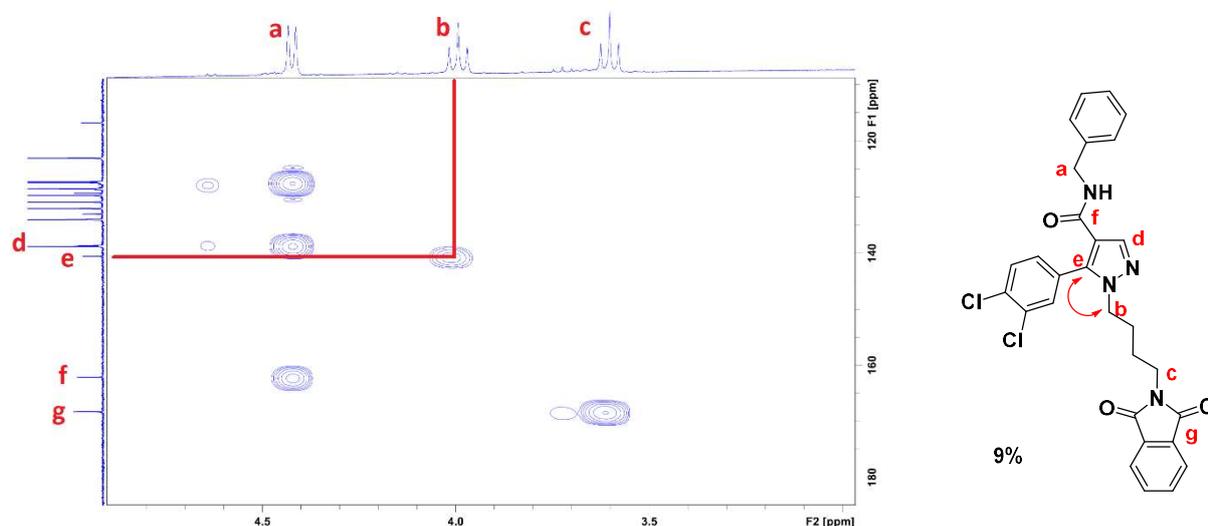


Figure 42: Expérience HMBC sur le composé **39'**

La carte de corrélation HMBC de l'isomère 1,4,5, composé **39'** (Figure 42), montre notamment une tache de corrélation entre le méthylène attaché à l'atome d'azote du pyrazole (**b**) de la chaîne butyle et le carbone quaternaire (**e**) du pyrazole, suggérant la substitution sur l'azote 1, tandis que la même analyse de l'isomère 1,3,4, soit le composé **39** (Figure 43) montre une corrélation entre ce même méthylène (**i**) et le carbone tertiaire du pyrazole (**k**).

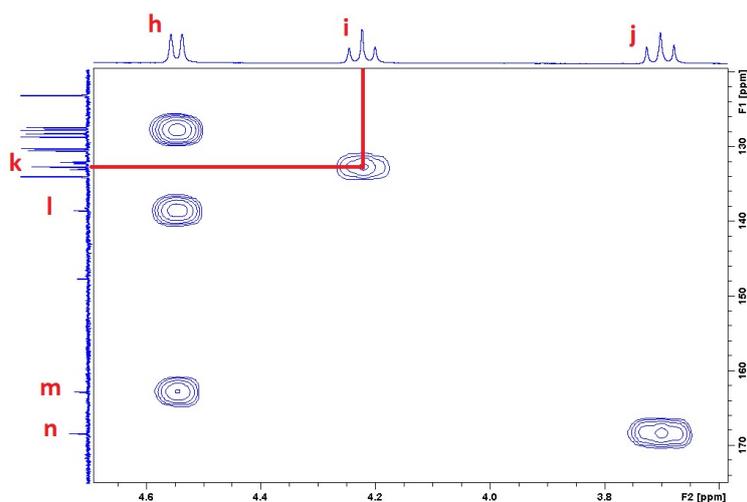


Figure 43: Expérience HMBC sur le composé **39**

Nous avons confirmé la position de la chaîne alkyle sur une molécule différente, par une expérience nOe 1D. Cette expérience (Figure 44) a été effectuée sur la molécule finale **45** issue de l'isomère majoritaire après déprotection à l'hydroxyde de sodium (Schéma 13). L'irradiation du proton (**b**) du pyrazole entraîne un effet Overhauser sur les signaux du proton (**a**) porté par l'atome d'azote de la fonction amide et des protons (**d**) du méthylène de la chaîne alkyle directement connecté au pyrazole.

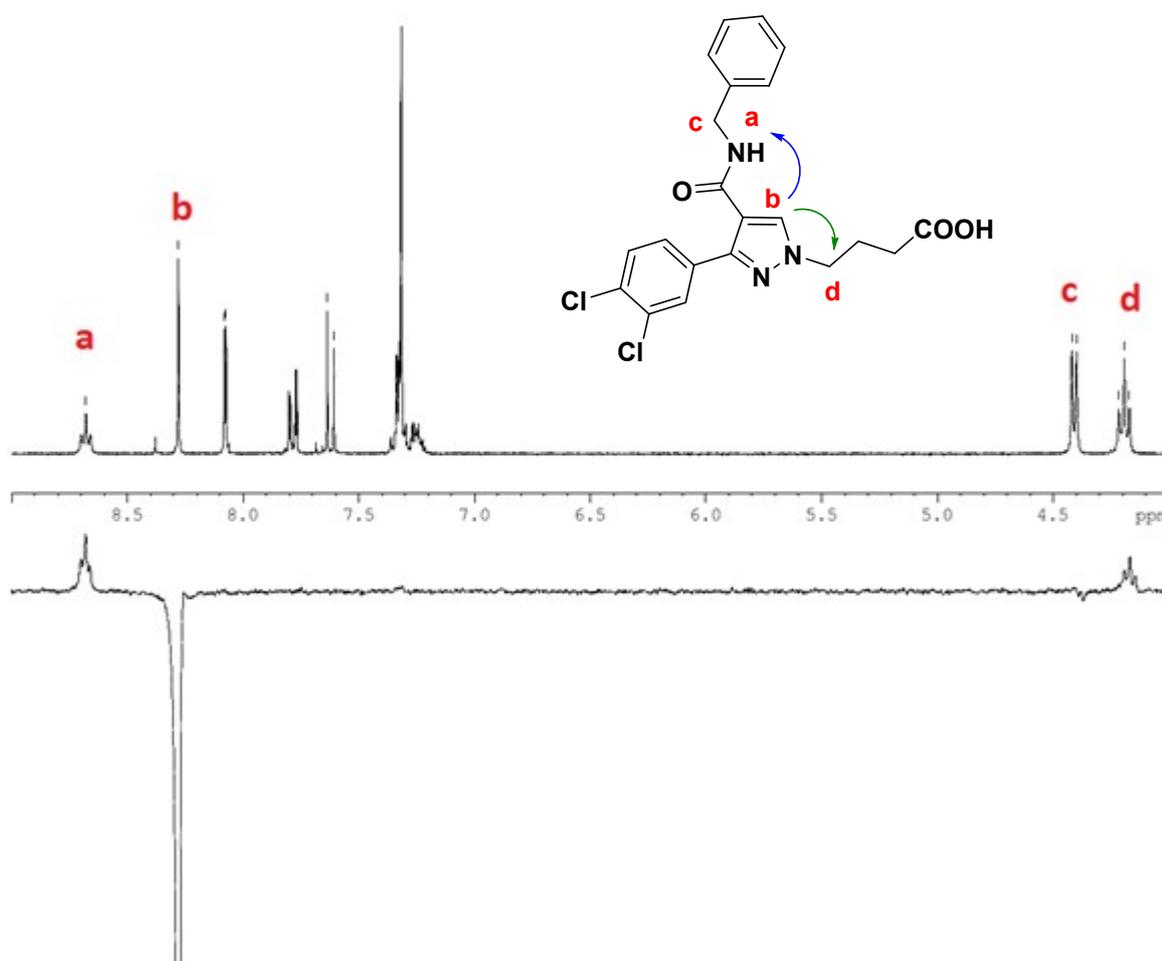


Figure 44: Expérience nOe 1D menée sur le composé **45**

L'isomère 1,3,4-trisubstitué protégé s'est révélé être majoritaire dans tous les cas de figure. Les synthèses ont donc été menées à leur terme à partir de ces isomères uniquement.

2.4. Synthèse des pyrazoles 1,3,4-trisubstitués

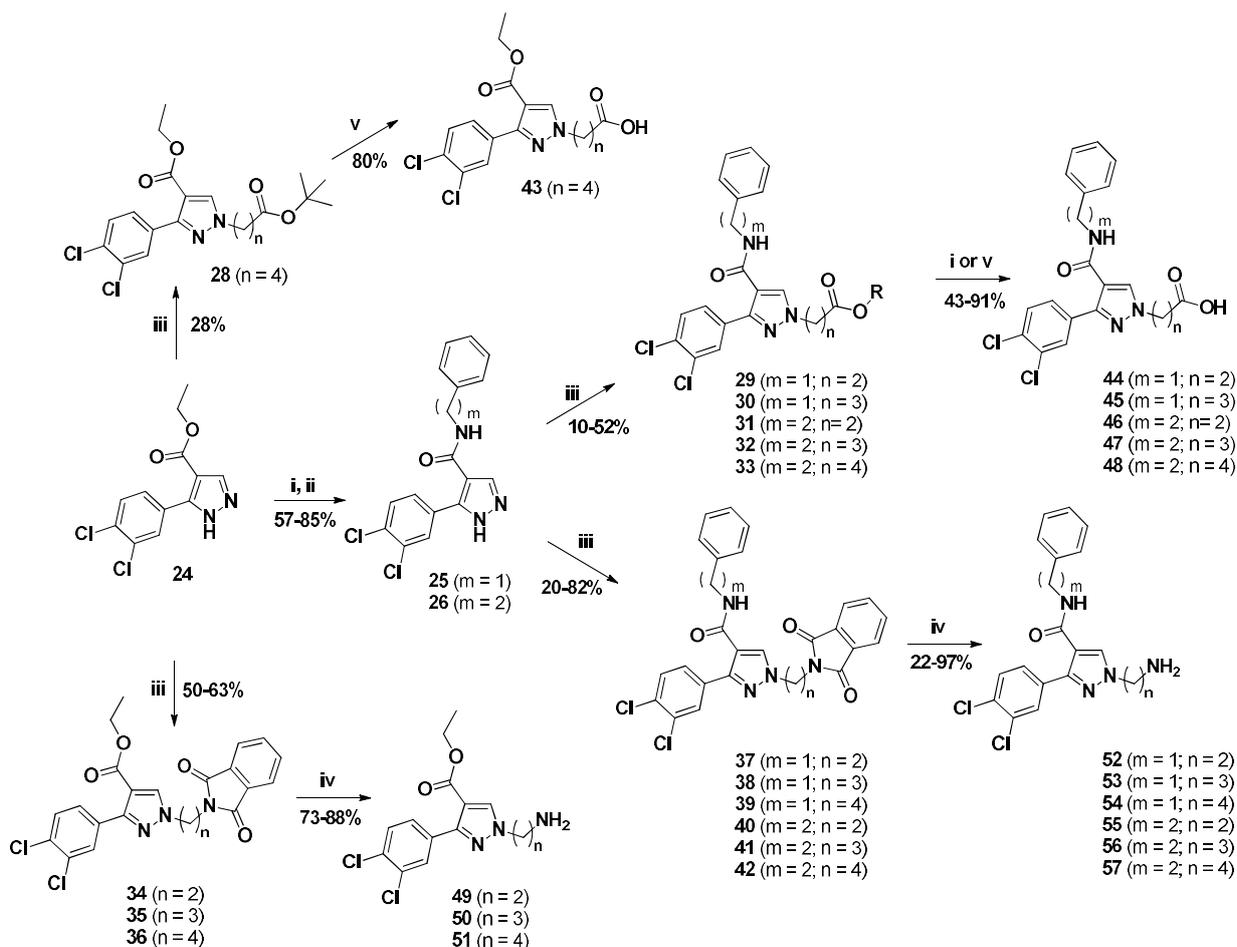


Schéma 13: Voie de synthèse des composés cibles avec R = Et pour 30-33 et R = tBu pour 34

Réactifs et conditions : i) NaOH (10 éq.), EtOH, reflux, 16 h; ii) benzylamine ou phénéthylamine (1 éq.), EDCI (1,2 éq.), HOBt (1,2 éq.), DMF, température ambiante, 16 h; iii) ω -Halogénoalkylphthalimide ou ω -halogénoalkylester (1 éq.), K_2CO_3 (2éq.), anh. ACN, reflux, 16 h; iv) $NH_2 NH_2 \cdot H_2O$ (10 éq.), EtOH, reflux, 3 h; v) TFA (25 éq.), DCM, température ambiante, 16 h.

Pour synthétiser les composés ω -aminés, les composés **24-26** sont substitués par des ω -bromoalkylphthalimides (n = 2, 3 ou 4) en présence de K_2CO_3 . Les intermédiaires phthalimides obtenus **34-42** avec des rendements compris entre 20 et 82%, sont ensuite déprotégés en présence d'hydrazine monohydratée pour former les composés cibles **49-57** avec des rendements compris entre 22 et 97%.

Les acides **43-48**, sont aussi obtenus en deux étapes : condensation des esters aliphatiques ω -halogénés à 2, 3 ou 4 carbones en présence de K_2CO_3 sur les intermédiaires **25** et **26** pour former les

esters **28-33** avec des rendements compris entre 10 et 52%, puis saponification des esters **29-32** pour former les acides **44-47** avec des rendements compris entre 43 et 91%.

En vue de synthétiser l'acide ester **43**, il était nécessaire de protéger la fonction acide introduite lors de l'alkylation du pyrazole **24** par un groupe protecteur orthogonal au groupe éthyle de la fonction ester de ce composé **24**. Nous avons tout d'abord envisagé l'utilisation du groupe benzyle mais la déprotection sélective en présence de formiate d'ammonium et de charbon palladié aurait conduit à une deshalogénéation partielle ou totale du cycle benzénique. Par conséquent, nous nous sommes orientés vers la synthèse du 5-bromopentanoate de *tert*-butyle **27**. L'acide bromopentanoïque est mis en réaction avec le *tert*-butanol en milieu acide sulfurique et en présence de sulfate de magnésium. L'ester tertibutylique **27** est enfin mis en réaction avec le pyrazole **24** dans les mêmes conditions que précédemment pour donner le composé **28** qui est sélectivement déprotégé avec de l'acide trifluoroacétique pour former le composé **43**.

3. Evaluation biologique

3.1. *Effet de nos composés sur la température de dénaturation de hTEAD₂₁₇₋₄₄₇*

Nous avons mesuré la température de dénaturation (T_m) de la protéine hTEAD₂₁₇₋₄₄₇ en absence et en présence de ligand par Fluorimétrie à balayage nano différentiel. Un shift de la température peut être induit par la liaison d'un ligand qui stabilise la protéine entraînant ainsi une augmentation de la température de dénaturation. Contrairement au TSA classique, la NanoDSF n'utilise pas de marquage au SYPRO® orange mais mesure la fluorescence intrinsèque des résidus tryptophane ou tyrosine de la protéine étudiée pour détecter les changements structuraux. Les mesures se font à deux longueurs d'onde différentes, 330 et 360nm. La représentation choisie ici (Figure 45) est le ratio des fluorescences aux deux longueurs d'onde en fonction de la température ainsi que leur dérivée première. Comme décrit par l'équipe du Dr Chène⁴³, la protéine hTEAD₂₁₇₋₄₃₄ seule montre deux points d'inflexion fortement visible sur la courbe de dérivés. Nous avons observé le même profil pour notre protéine (courbes en rouge) (Figure 45). Ces deux températures sont dues à la présence de l'acide gras (myristique ou palmitique). En effet, le premier T_m , à 43.8°C, correspond à la température de dénaturation de TEAD non acylé. Le second point à 57.1°C correspond au T_m de TEAD acylé. Ces premiers résultats indiquent alors une stabilisation de la protéine par l'acide gras (myristique ou palmitique). Ces valeurs sont proches de celles obtenues par l'équipe du Dr Chène⁴³ (45°C et 54.5°C).

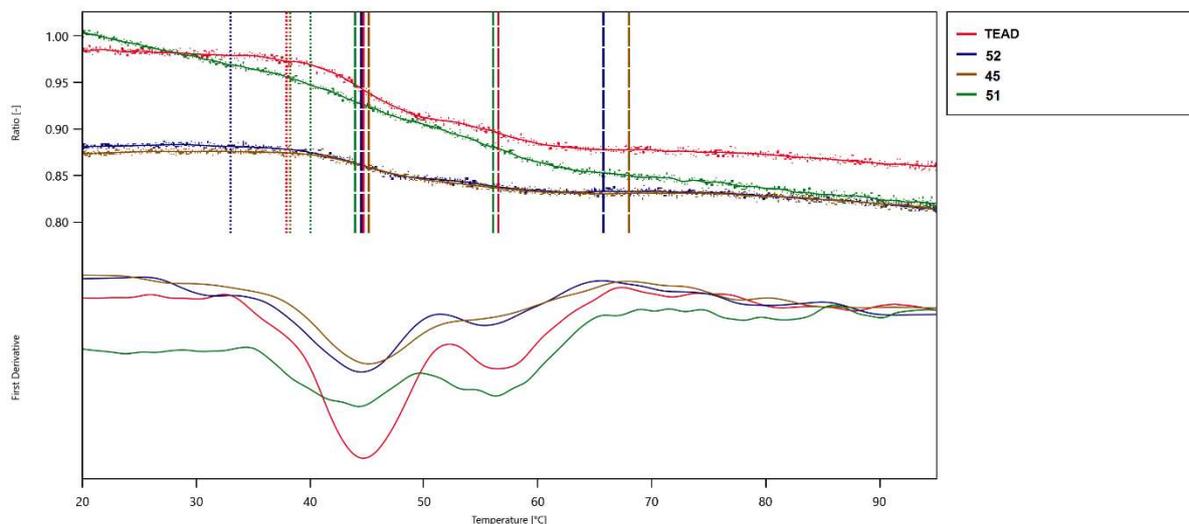


Figure 45: Courbe de thermofluor des composés **45**, **51** et **52** en comparaison avec hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇. En bas, les dérivées premières des courbes.

Par soucis de clarté, seuls les résultats de trois molécules sont montrés sur la figure 45. Néanmoins, toutes les molécules étudiées présentent deux points d'inflexion que ce soit les esters (exemple de la molécule **51**, (ester éthylique, amine, $n = 4$)) ou les dérivés amide et quel que soit la nature de la chaîne alkyle ou la fonction terminale (exemple des molécules **52** (benzylamide, amine, $n = 2$) et **45** (benzylamide, acide, $n = 3$) et semble affecter les deux formes (non-acylée ou acylée) de la protéine hTEAD2. Cependant, à cause des deux points d'inflexion, il est difficile d'en tirer des valeurs quantitatives de différences de températures (ΔT_m).

3.2. Résonance Plasmonique de Surface (SPR)

Une étude de SPR a été menée, à la Plateforme Protéomique Imagerie et Interaction moléculaire (PP2I) de Montpellier, afin d'évaluer la capacité des molécules synthétisées à se lier à hTEAD2. Cette technique permet de mesurer l'interaction entre un analyte et une protéine, immobilisée sur une lame recouverte par une couche d'or. Elle se base sur la mesure de l'angle de résonance à l'interface de la lame en présence et en absence de ligand. Pour cela, le peptide hYAP_{60-100a} a été utilisé, comme contrôle positif, pour permettre de vérifier que la protéine hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ immobilisée sur la lame CM5 n'est pas altérée. La constante de dissociation obtenue est de 100 nM. Elle est en accord avec les résultats de la littérature (96 nM mesuré par ITC pour YAP₆₁₋₁₀₀ et hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇²⁴ ou 63 nM mesuré par SPR pour YAP₆₀₋₉₉ et hTEAD2₂₂₁₋₄₄₇³¹).

Un screening des composés a été ensuite effectué à une concentration de 250 μ M (Figure 46).

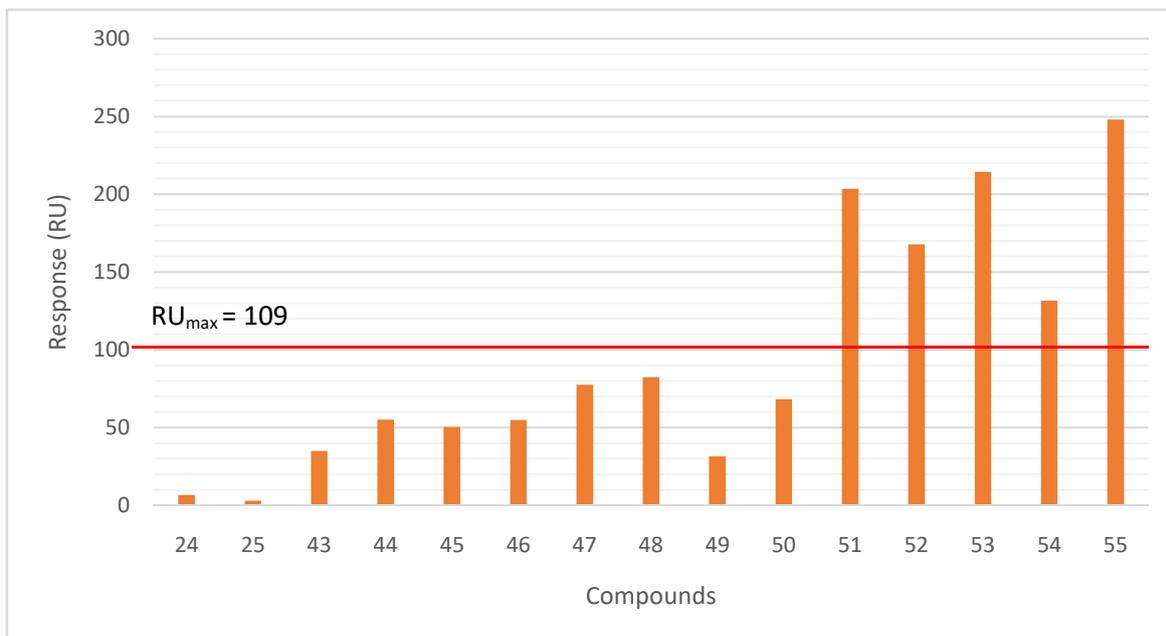


Figure 46: Screening des composés par SPR à 250 μ M

En série ester éthylique, le pyrazole non substitué en position 1 (molécule **24**) ne semble pas se lier à TEAD. Alors que l'ajout d'une chaîne alkylamine ou alkylacide permet la liaison à la protéine. En effet, le niveau de liaison obtenu par SPR indique que l'ester portant une fonction acide terminale, **43**, se lie à hTEAD2. Il en est de même pour les esters portant une fonction amine terminale **49, 50, 51**. On observe une réponse supérieure au RU_{max} pour le **51** ($RU > RU_{max} = 109$), pouvant indiquer une surstoéchiométrie.

La transformation de la fonction ester du pyrazole **24** non substitué en benzamide **25** ne permet pas la liaison à TEAD2. Les résultats sont similaires aux composés esters. On observe le même effet que précédemment pour les acides (**44** et **45**) et pour les amines (**52, 53** et **54**) également avec une réponse supérieure pour **53** notamment.

En série phénéthylamide, les acides carboxyliques se lient à hTEAD2, quelle que soit la longueur de chaîne (**46, 47** et **48**).

Ces résultats montrent que la substitution en position 4 a peu d'importance. Les esters répondent aussi bien que les dérivés benzamide ou phénéthylamide.

Par contre, la chaîne en position 1 semble essentielle à la liaison des composés à hTEAD2. De plus, on n'observe une réponse supérieure au RU_{max} uniquement dans le cas de composés possédant une fonction amine terminale.

3.3. Co-cristallisation des ligands avec hTEAD2

Les cristaux hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ ont été préalablement formés puis trempés avec les composés synthétisés à des temps de trempage court (2 heures) et long (24 heures). Cinq molécules (**44**, **45**, **46**, **51** et **52**) ont été co-cristallisées avec hTEAD2 avec des résolutions comprises entre 2,0 et 2,22Å. Les structures ont été résolues dans un groupe d'espace C2 avec 2 molécules de TEAD. Les ligands n'interagissent qu'avec une molécule de TEAD. La structure de TEAD présente, systématiquement, l'acide palmitique ou l'acide myristique dans la poche hydrophobe. Ces acides gras se présentent sous forme libre ou sont liés à la cystéine 380 ou à la lysine 357 sous forme de thio-ester ou amide. Comme pour les structures de TEAD décrites dans la littérature, TEAD2 adopte une structure globulaire repliée en β -sandwich d'un côté et constituée de quatre hélices α de l'autre.

Etonnamment, les cinq molécules se positionnent de manière similaire au niveau des hélices α 3 et α 4 de TEAD2 (résidus 381-405) impliquées dans l'interface 2 avec l'hélice α 1 de YAP (résidus 61-73) (Figure 47). Pour rappel, les acides aminés clés impliqués dans cette interface 2 sont F365, K368, L368, L372, V381 qui interagissent avec le motif LxxLF de YAP. Les mutations L68A et F69A du motif LXXLF réduisent légèrement l'interaction entre les deux protéines³⁰ alors que la double mutation réduit significativement la capacité de TAZ à se lier à TEAD⁴⁰.

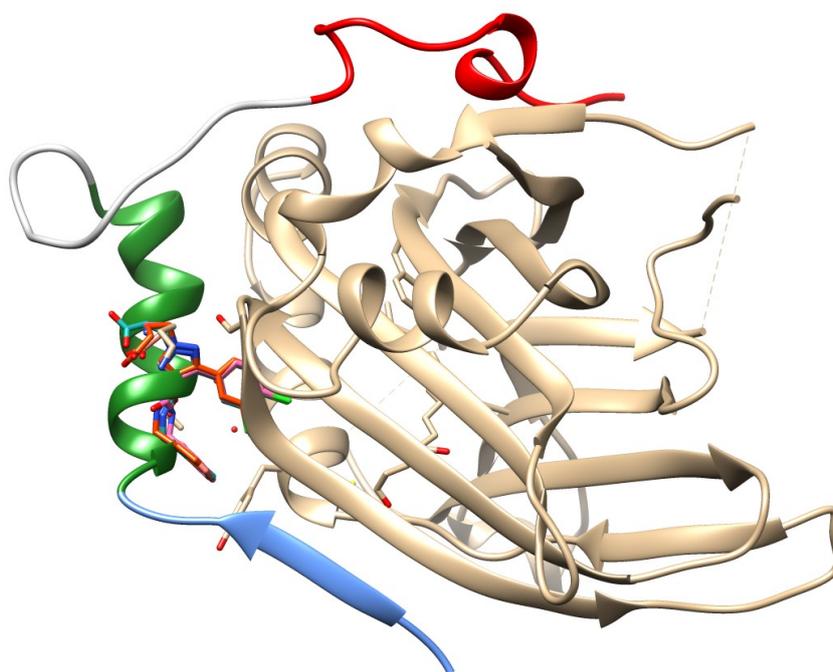


Figure 47: Superposition des cinq ligands pyrazole et de YAP (en vert) en liaison avec hTEAD2 (unité B)

La liaison de nos cinq molécules fait apparaître à la surface de TEAD2 une poche cryptique, suite à un mouvement de la tyrosine 382 vers l'autre dimère de TEAD. Cette nouvelle orientation permet la formation d'une liaison hydrogène « interTEAD » entre Y382 (unité B) et le NH de Q353 de l'autre

molécule de TEAD (unité A non représentée sur les figures) (Figure 48). Cette poche cryptique est ainsi occupée par le motif 3,4-dichlorophényle.

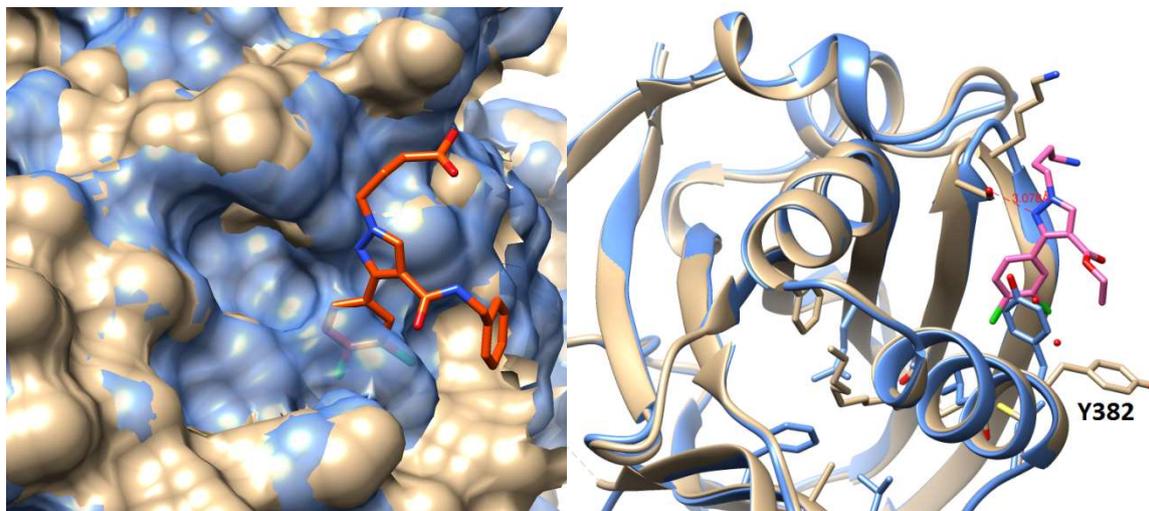


Figure 48: Superposition de hTEAD2 en absence (en bleu) et en présence (en marron clair) de molécules. A gauche: Zoom sur la formation de la poche cryptique. A droite: Mouvement de Y382 et insertion du dichlorophényle

La notion de poche cryptique est assez récente. Un site cryptique est défini comme étant un site formé lors de la liaison d'un ligand sur la protéine mais non détecté sur la structure de la protéine native^{85,86}. En effet, de nombreuses protéines présentent une surface externe assez plate (peu vallonnée) et considérée comme non « druggable ». C'est généralement le cas pour les interactions protéine-protéine. Les sites cryptiques nécessitent un changement de conformation pour devenir apparents.

Le motif 3,4-dichlorophényle effectue donc des interactions hydrophobes dans cette poche et s'oriente de la même manière que le groupe isobutyle de L65 de YAP vers F386 de TEAD2. Le cycle phényle (pour les composés **44**, **45**, **46** et **52**) effectue une interaction hydrophobe de type π -stacking avec Y382 dans sa nouvelle position, formant un angle d'environ 80° avec le cycle phénolique de Y382 (Figure 49). Ce cycle phényle se place au niveau de la Ser61 de YAP qui interagit avec Y382 de TEAD2. L'atome d'azote non substitué du pyrazole forme une liaison hydrogène avec S349 et se situe au niveau de D64 de YAP. Pour les dérivés possédant une chaîne alkylacide (**44**, **45** et **46**), on observe une liaison ionique avec l'ammonium terminal de K352 (Figure 49).

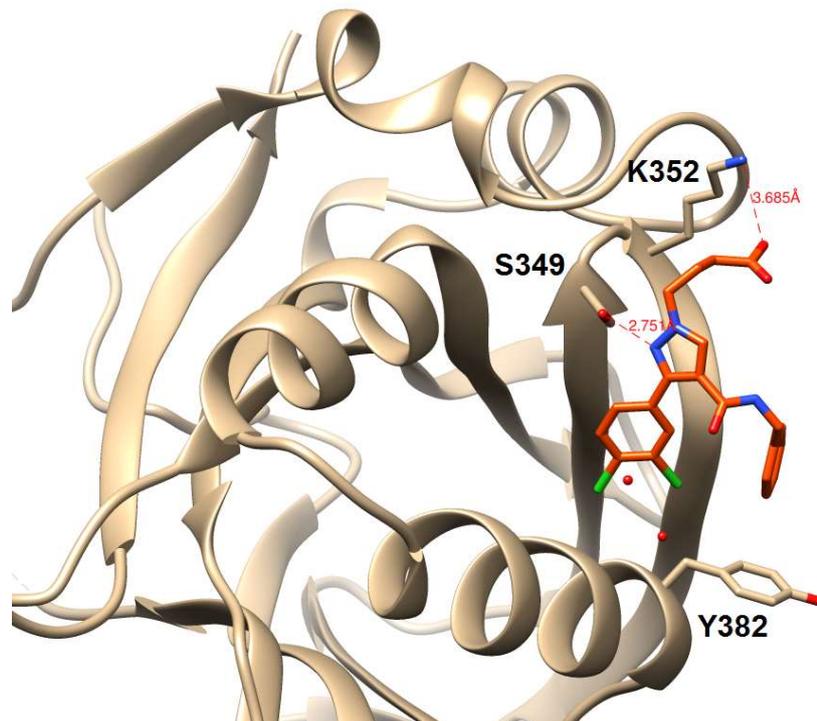


Figure 49: Zoom sur le positionnement de la molécule 46 au niveau de l'interface 2

3.4. Thermophorèse à Microéchelle (MST)

La MST est une méthode récente permettant l'analyse des interactions protéine-protéine et ligand-protéine. Elle nécessite une faible consommation d'échantillon dont au moins un partenaire est fluorescent et n'entraîne pas d'immobilisation de la protéine. La technique est basée sur le mouvement des molécules selon un gradient de température. Toute modification, telle qu'une modification de charge, de solvatation, ou de taille entraîne un mouvement différent de la protéine dans ce gradient de température, détecté par l'appareil. Dans notre cas, le protocole expérimental mis en place permet la détermination de l'affinité YAP-TEAD et ligand-TEAD sans purification de la protéine cible, directement sur lysat cellulaire. Les interactions protéiques dans le corps humain sont très différentes de celles observées *in vitro*. Une étude de 2010⁸⁷ a montré que l'affinité d'une petite molécule (la quercétine) pour son récepteur (cAMP-dépendent kinase) est 400 fois plus élevée dans un milieu contenant 30% de sérum mimant les conditions physiologiques que dans un tampon HEPES. En ajoutant dans un tampon HEPES de l'albumine de sérum humaine (HSA) à 190 μM , ces mêmes auteurs ont été capables de mimer le milieu biologique. Ces résultats montrent l'importance de la matrice biologique dans laquelle on travaille et l'intérêt de travailler sur lysat cellulaire plutôt qu'en tampon salin.

Pour les mesures de fluorescence, nous avons choisi de travailler sur la protéine hTEAD2₂₁₄₋₄₄₇ couplée à la GFP (Green Fluorescent Protein $\lambda_{\text{ex}} = 475 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 504 \text{ nm}$). Le plasmide contenant GFP-

hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ est transfecté dans des cellules CHO-K1. Après amplification avec sélection par antibiotiques, la sélection clonale par cytométrie en flux permet de sélectionner les cellules surexprimant l'eGFP-hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇. Après lyse cellulaire, les protéines sont extraites pour les mesures de MST.

Pour valider notre méthode, l'interaction hYAP₅₀₋₁₀₂ avec hTEAD2₂₁₄₋₄₄₇ couplée à la GFP a été mesurée (Figure 50). La constante de dissociation obtenue est de 90 nM en accord avec les résultats de la littérature (96 nM mesuré par ITC pour YAP₆₀₋₁₀₀ vs TEAD2₂₁₄₋₄₄₇²⁴).

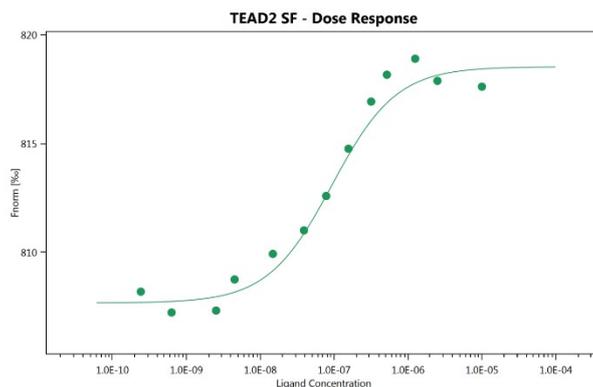


Figure 50: Courbe dose-réponse de YAP₅₀₋₁₀₂ vs TEAD2₂₁₄₋₄₄₇

Pour le screening de la famille des pyrazoles, la concentration de eGFP-hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ est maintenue constante (≈ 30 nM) tandis que la concentration du partenaire ligand non marqué varie entre 15 nM et 500 μ M.

Toutes les manipulations sont effectuées en triplicat à trois puissances de thermophorèse (20-40-60% MST power) différentes et sur trois expériences indépendantes (trois cultures cellulaires). De façon à rester homogène, nous avons comparé les résultats à 40% MST power (Figure 51).

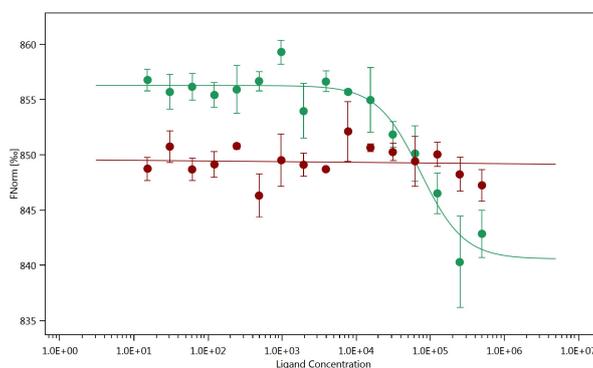
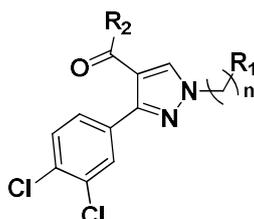


Figure 51: Figure comparative de la courbe dose-réponse des molécules 49(en rouge) et 51 (en vert)

Tableau 7: Constantes d'affinité obtenues pour les composés 44 à 58

compound	n	R	R'	K _D (μM)
24	---	---	OC ₂ H ₅	n.d
49	2	NH ₂	OC ₂ H ₅	Pas d'interaction
50	3	NH ₂	OC ₂ H ₅	n.d molécule fluorescente
51	4	NH ₃ ⁺ , Cl ⁻	OC ₂ H ₅	K _D = 104 ± 46 μM
43	4	COOH	OC ₂ H ₅	190 ± 100 μM
44	2	COOH	NHCH ₂ C ₆ H ₅	n.d molécule fluorescente
45	3	COOH	NHCH ₂ C ₆ H ₅	K _D = 77 ± 46 μM
46	2	COOH	NH(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	K _D = 170 ± 70 μM
47	3	COOH	NH(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	K _D > 2 mM
48	4	COOH	NH(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	K _D = 130 ± 80 μM
52	2	NH ₂	NHCH ₂ C ₆ H ₅	K _D > 700 μM
53	3	NH ₂	NHCH ₂ C ₆ H ₅	K _D > 500 μM
54	4	NH ₂	NHCH ₂ C ₆ H ₅	n.d molécule fluorescente
55	2	NH ₂	NH(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	n.d
56	3	NH ₂	NH(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	K _D > 2 mM
57	4	NH ₃ ⁺ , CF ₃ COO ⁻	NH(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	K _D > 1 mM



Les résultats de MST sur les pyrazoles substitués par des fonctions amide montrent que les composés porteurs d'une chaîne alkylamide présentent des K_D allant de 70 à 170 μM à une exception près (**47**) alors que les molécules possédant une chaîne alkylamine ont des K_D de l'ordre du millimolaire. Pour les esters, un K_D de 104 μM a été déterminé pour **51** et 190 μM pour son équivalent acide **43**.

3.5. Evaluation biologique

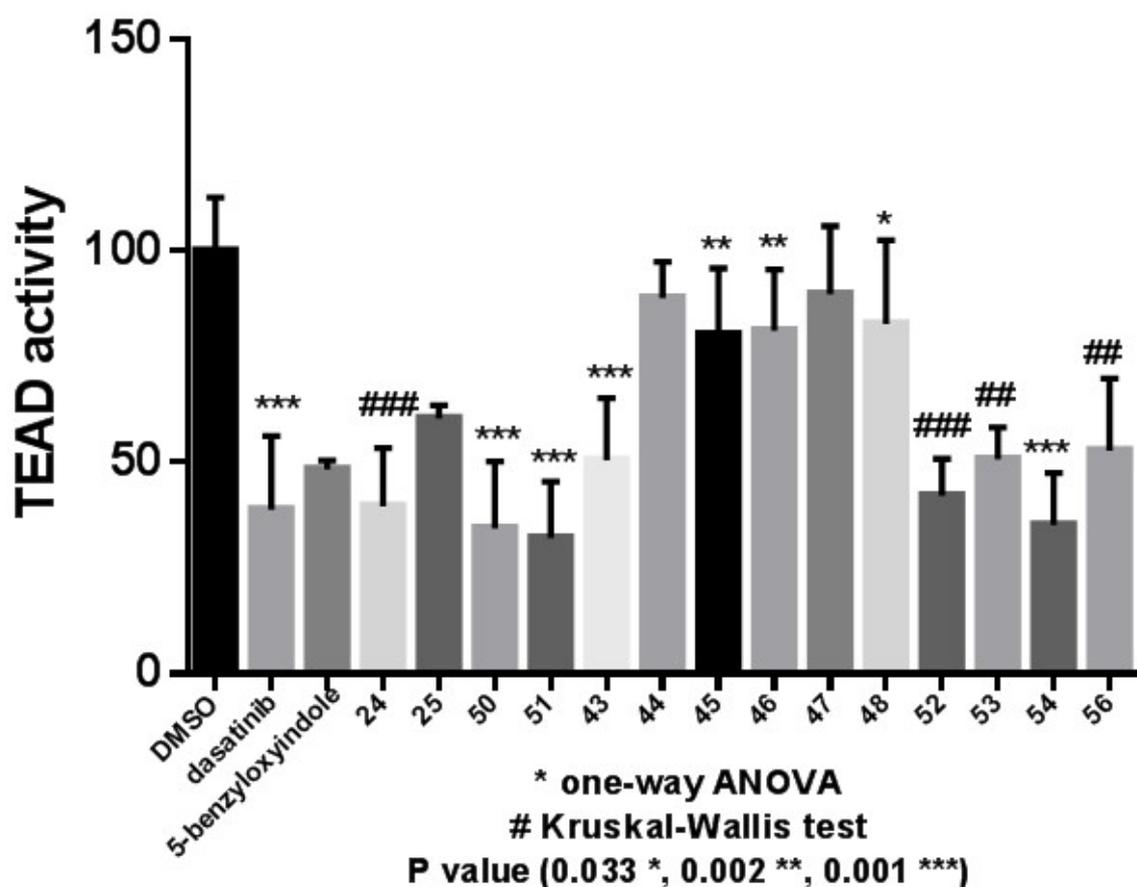


Figure 52: Activité transcriptionnelle de TEAD en présence des composés à 10 μM sur cellules HEK293

L'activité biologique de nos molécules à une concentration unique de 10 μM a tout d'abord été évaluée sur cellules HEK293T transfectées par le gène rapporteur à la luciférase (Figure 52). Ce test permet d'évaluer la capacité des composés à inhiber l'interaction YAP/TAZ-TEAD et donc à réduire l'activité transcriptionnelle de TEAD (mesurée grâce à la luciférase). La mesure de l'activité β -galactosidase sert à normaliser les valeurs expérimentales obtenues et d'indicateur qualitatif de l'état des cellules transfectées (cela permet donc d'avoir une idée de la cytotoxicité des molécules testées). On utilise comme référence le dasatinib à une concentration de 1 μM .

D'après les résultats présentés ci-dessus (Figure 52), les acides (**44**, **45**, **46**, **47** et **48**) sont inactifs tandis que les amines (**52**, **53**, **54**, et **56**) inhibent l'activité transcriptionnelle de TEAD de plus de 50%. Ces derniers présentent néanmoins une certaine cytotoxicité. Les esters porteurs d'une fonction amine **50** et **51** sont les plus actifs avec une inhibition de 60% sans cytotoxicité apparente notable.

Au vu des résultats précédents, l'inactivité des dérivés acides peut s'expliquer par un mauvais passage des membranes (cellulaire ou nucléaire) ou une reconnaissance et dégradation rapide par les enzymes cellulaires. Cependant, on remarque que leur équivalent ester **43** diminue l'activité transcriptionnelle de TEAD de 50%. Il semble donc judicieux de conserver ce motif ester aussi bien pour l'activité que pour le passage de membrane.

Etonnamment les pyrazoles non substitués en **1**, **24** et **25**, présentent une activité inhibitrice. Ils ont donc été sélectionnés avec les composés les plus actifs pour leur capacité à diminuer le niveau protéique des gènes cibles de l'interaction YAP/TAZ-TEAD dans un modèle de culture de cellules cancéreuses.

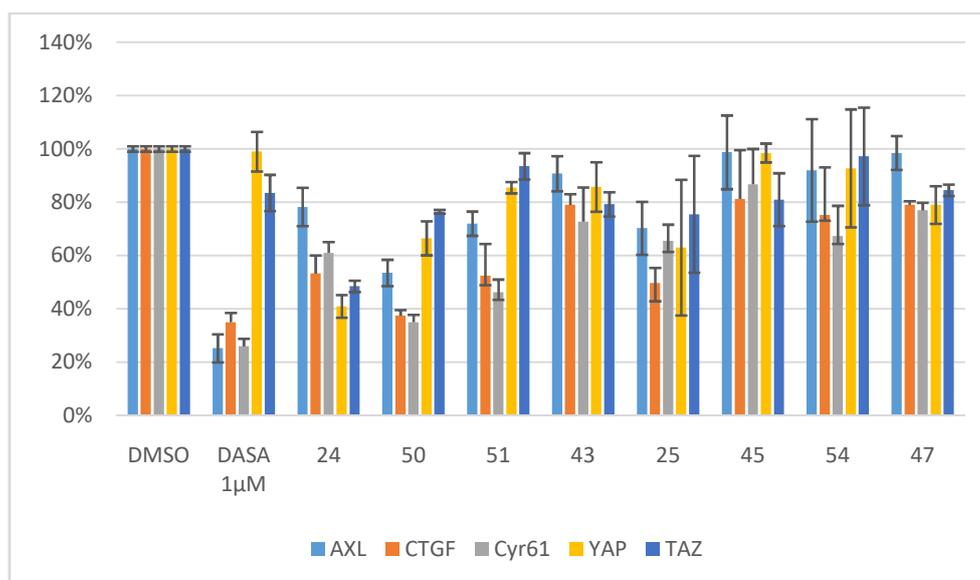


Figure 53: Expression des gènes cibles en présence des composés sur cellules cancéreuses MDA-MB231 (sein)

Les composés les plus actifs ont été testés sur cellules cancéreuses MDA-MB231 (cellules de cancer du sein hormono-indépendant) dans des conditions de croissance (48 h, 10% SVF). On mesure les expressions protéiques de YAP, TAZ, Cyr61, CTGF et Axl par Western Blot (Figure 53). Les résultats ont été obtenus en duplicat (deux puits) sur deux expériences (deux cultures cellulaires différentes).

La molécule **51** (10 µM) inhibe l'expression de CTGF, Cyr61 et Axl à 48%, 54% et 28% respectivement sans affecter significativement l'expression de YAP et TAZ. On trouve des résultats similaires pour son analogue à 3 carbones **50**. Comme pour la transfection, les acides **45** et **47** sont inactifs. L'amine **54** à

4 carbones, diminue légèrement l'expression des gènes CTGF et Cyr61 et n'affecte pas YAP et TAZ. Les pyrazoles **24** et **25** influent sur l'expression de YAP/TAZ, ce qui serait cohérent avec l'hypothèse émise précédemment.

Les pyrazoles non substitués en 1, **24** et **25**, présentent à la fois un effet sur le niveau protéique de Cyr61, CTGF et Axl mais aussi sur le niveau protéique de YAP et de TAZ ce qui permet de penser que ces molécules (surtout **24**) agissent sur le niveau de phosphorylation de YAP/TAZ en activant les kinases MST et LATS. Ainsi l'activation de MST1/2 ou LATS1/2, induirait une rétention cytoplasmique plus importante de YAP et de TAZ et donc une diminution de leur expression protéique. Ceci ne semble pas étonnant car leur structure est semblable au composé C19⁵⁹, connu pour agir notamment sur les étapes amont de la voie Hippo.

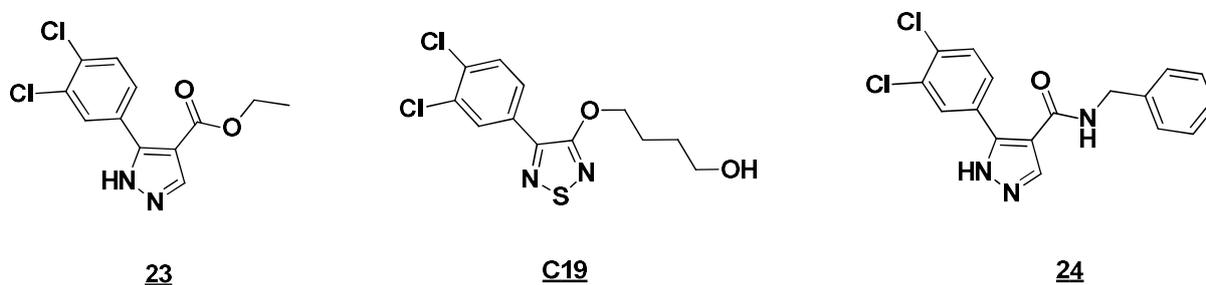


Figure 54: Structure des composés **24**, **25** et C19

4. Conclusion et perspectives

Le développement de cette famille de pyrazoles trisubstitués nous a conduits à la synthèse d'une quinzaine de composés capables de se lier de manière tout à fait inattendue au niveau de l'interface 2 de TEAD. Pour valider notre conception initiale basée sur les données cristallographiques de la molécule **III** et du 5-benzyoxyindole (obtenue à Montpellier), il sera nécessaire de finaliser la synthèse de plusieurs pyrazoles 1,4,5-trisubstitués, d'évaluer/comparer (vis-à-vis de leur isomère 1,3,4) leur activité biologique et tenter de cristalliser ces derniers afin de déterminer leur site de liaison.

Grâce aux premiers résultats biophysiques et biologiques, nous avons souligné l'importance de la présence d'une fonction ester en position 4 et d'une chaîne alkylamine en position 1. Une plus grande diversification de cette famille permettra de conclure sur des relations structure-activité. Nous pourrions notamment revenir sur le motif 3,4-dichlorophényle afin de déterminer les éléments structuraux indispensables et les limites permettant à une molécule de se lier à la poche cryptique induite.

**CHAPITRE 4 : CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE
DÉRIVÉS DE L'ACIDE NIFLUMIQUE CIBLANT LA
POCHE INTERNE**

1. Conception de dérivés de l'acide niflumique

Plusieurs molécules, de l'article de Pobbati *et al*⁶⁹ présentent une affinité micromolaire pour la protéine TEAD, dont l'acide bromofénamique (cristallisé avec hTEAD2), l'acide flufénamique (cristallisé avec hTEAD2) et l'acide niflumique avec des affinités de 234 μM , 73 μM et 28 μM respectivement (Figure 55).

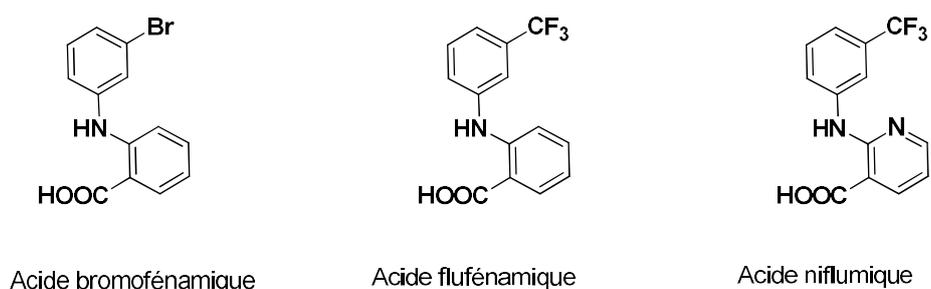


Figure 55: Structure des acides fénamiques et niflumique décrits par Pobbati et al

Nous avons superposée la structure cristallographique du fragment 5-benzyloxyindole avec hTEAD2 (en vert sur la Figure 56) avec celle de l'acide bromofénamique (en rose sur la Figure 56) décrite dans la littérature⁶⁹. On observe une parfaite superposition de deux cycles aromatiques : le cycle portant l'atome de brome pour l'acide bromofénamique et le cycle benzénique de l'indole.

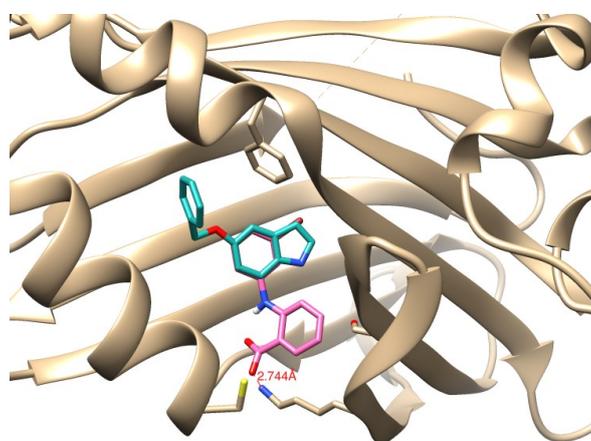


Figure 56: Superposition des structures cristallographiques de hTEAD2 avec le 5-benzyloxyindole et l'acide bromofénamique

Il apparaît clairement sur la Figure 56 que l'adjonction d'un groupe benzyloxy en position méta par rapport à l'atome d'azote des acides flufénamiques devrait favoriser l'affinité pour TEAD. Ainsi, nous avons envisagé la synthèse des composés 1,3,5-trisubstitués (séries I et II) inspirées des acides fénamiques et niflumique (Figure 57). Le groupe R1 sera un hydrogène, un atome de brome (acide bromofénamique) ou un groupe trifluorométhyle (acides flufénamique et niflumique). Nous avons adjoint à ces deux séries, trois nouveaux composés inspirés de l'acide niflumique (série III, Figure 57)

où les atomes d'oxygène et d'azote du cycle benzénique central occupent les mêmes positions que dans le 5-benzyloxyindole.

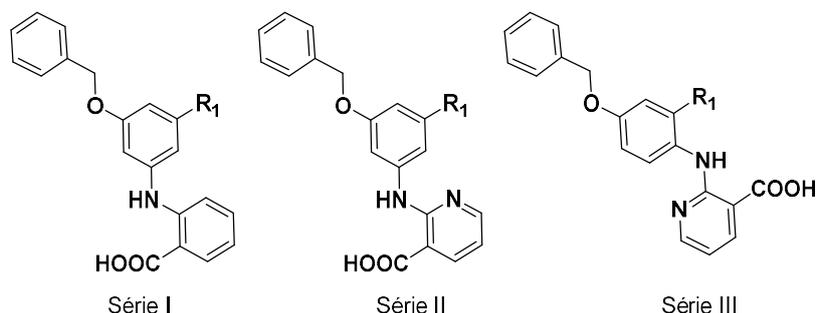


Figure 57: Nouvelles séries basées sur les acides fénamiques et niflumique synthétisées

2. Synthèse

2.1. Synthèse des diarylamines

Les diarylamines peuvent être obtenues par couplage métallo-catalysé. Deux couplages ont été expérimentés : le couplage de Buchwald-Hartwig qui utilise un dérivé palladié en présence d'une phosphine et le couplage d'Ullmann qui utilise des sels de cuivre.

2.1.1. Couplage de Buchwald-Hartwig

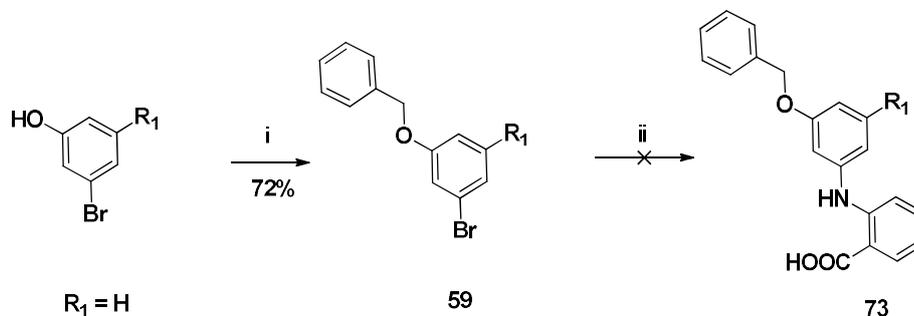


Figure 58: Voie de synthèse du composé 73 via réaction de Buchwald-Hartwig

Réactifs et conditions : i) Benzyl bromide (1 éq.), NaH (1.2 éq.), anh DMF, 20 °C, 16 h; ii) anthranilic acid (1 éq.), Cs₂CO₃ (1,5 éq.), Pd(OAc)₂(0.1 éq.), BINAP (0.15 éq.), dioxane, reflux, 16 h.

Le 3-bromophénol convenablement substitué réagit avec du bromure de benzyle en présence de NaH pour former le 1-(benzyloxy)-3-bromobenzène avec un rendement de 72%. Le composé 59 est engagé dans une réaction de type Buchwald-Hartwig en présence de carbonate de césium, de palladium diacétate et de BINAP. Après une nuit à reflux, nous n'observons pas d'évolution de la réaction. La LC-MS ne montre que la présence du produit de départ.

Devant ces échecs, nous avons donc opté pour le couplage d'Ullman cuprocatalysé entre un halogénure d'aryle et l'acide anthranilique.

2.1.2. Couplage d'Ullmann

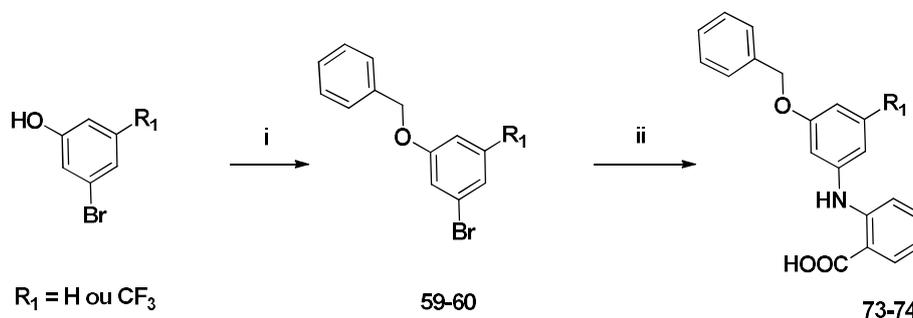


Schéma 14: Synthèse des diarylamines **73** et **74** via réaction cuprocatalysée

Réactifs et conditions : i) NaH (1.2 éq.), DMF, 20 °C, 2h ; ii) K₂CO₃ (1 éq.), CuI (0.2 éq.), L-Proline (0.2 éq.), alcool iso-amylque, 140°C, 1h, MW.

Comme pour l'obtention du composé **59**, le 3-bromo-5-trifluorométhylphénol réagit avec du bromure de benzyle en présence de NaH pour former le 1-(benzyloxy)-3-bromo-5-trifluorométhylbenzène **60** avec un rendement de 87%. On réalise une réaction de type Ullmann suivant les conditions réactionnelles de Marques *et al*⁸⁸ en tube scellé. Les rendements de ces deux réactions sont faibles de l'ordre de 10%.

Dans le cas où R₁ = Br, nous ne pouvons être sélectif d'un brome. Une autre stratégie de synthèse devra être envisagée.

2.2. Synthèse des phénylaminopyridines

Dans le cas des phénylaminopyridines, la réaction de choix consiste à effectuer une substitution nucléophile aromatique sur les acides 2-fluoro ou chloronicotiniques par une aniline convenablement substituée. Néanmoins nous avons voulu à titre de comparaison la réaction d'Ullmann avec l'acide 2-aminonicotinique.

2.2.1. A partir du 3-bromophénol

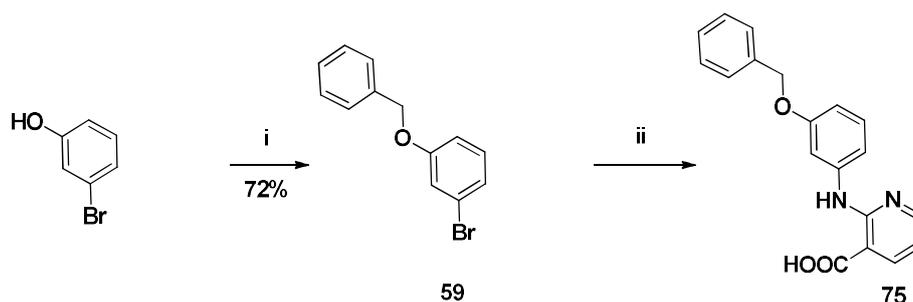


Schéma 15: Synthèse de l'acide 2-((3-(benzyloxy)phényl)amino)nicotinique 75 à partir du 3-bromophénol

Réactifs et conditions : i) bromure de benzyle (1 éq.), NaH (1,2 éq.), anh. DMF, 20 °C, 2h ; ii) acide aminonicotinique (1 éq.) K₂CO₃ (1 éq.), CuI (0,2 éq.), L-Proline (0,2 éq.), alcool iso-amylque, 140°C, 16h

A partir du même intermédiaire 1-(benzyloxy)-3-bromobenzène **59**, l'acide 2-aminonicotinique est engagé dans la réaction de type Ullmann. D'après la LC-MS, nous observons la formation d'un produit secondaire et très peu la formation du produit cible après 16h en tube scellé. L'iodure de cuivre est donc ajouté en quantité équimolaire et la réaction est remise sous tube scellé. Le produit cible se forme après 2 jours de réaction. Nous obtenons un milieu réactionnel avec le produit de départ, le produit cible et un produit secondaire difficilement séparable. Le composé n'a donc pas été isolé dans ces conditions.

On peut supposer que la fonction acide carboxylique et l'atome d'azote de la pyridine désactive la fonction amine de l'acide 2-aminonicotinique.

2.2.2. A partir du 3-aminophénol

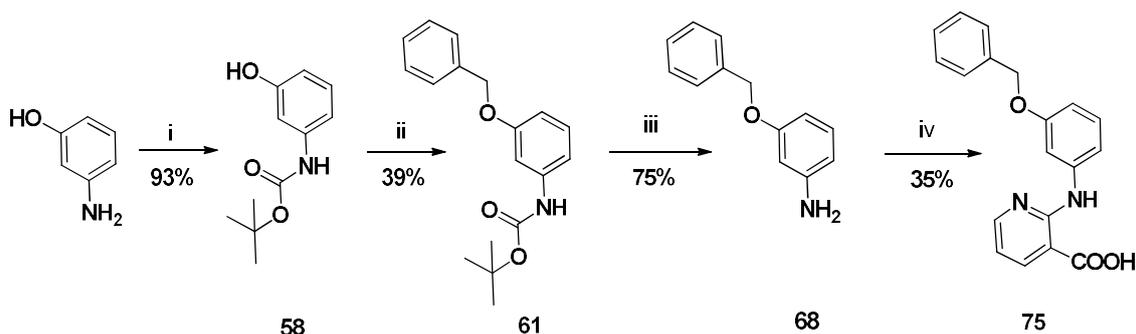


Schéma 16: Synthèse de l'acide 2-((3-(benzyloxy)phényl)amino)nicotinique 75 à partir de du 3-aminophénol

Réactifs et conditions : i) Boc₂O (1,2 éq.), THF, 80°C, 24h ; ii) K₂CO₃(1 éq.), ACN, 20 °C, 3h ; iii) HCl, dioxane, 20 °C, 2h ; iv) acide 2-chloronicotinique (1 éq.), acide acétique, 100°C, 6h.

La fonction amine du 3-aminophénol est protégée à l'aide de Boc₂O pour former le carbamate correspondant **58**. Le rendement de cette réaction est quantitatif. La O-benzylation du N-(3-

hydroxyphényl)-carbamate de tertio-butyle est effectuée grâce au bromure de benzyle en présence de K_2CO_3 . On obtient ainsi le N-[3-(benzyloxy)phényl]carbamate de tertio-butyle **61** avec un rendement de 39%. L'amine est déprotégée en milieu acide avec un rendement de 75%. L'acide 2-chloronicotinique est condensé à $100^\circ C$ dans l'acide acétique⁸⁹ pour obtenir l'acide 2-[[3-(benzyloxy)phényl]amino]pyridine-3-carboxylique **75** avec un faible rendement de 35%.

2.2.3. A partir du 3-nitro-5-trifluorométhylphénol

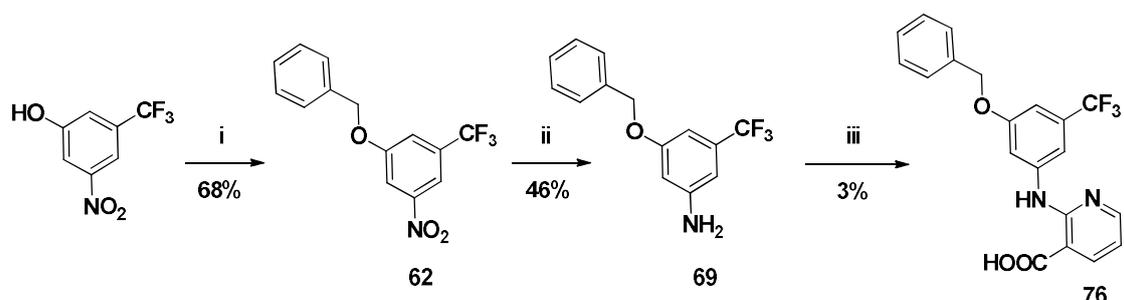


Schéma 17: Synthèse de l'acide 2-((3-(benzyloxy)phényl-5-trifluorométhyl)amino)nicotinique **76**

Réactifs et conditions : i) Benzyl bromide (1 éq.), NaH (1,2 éq.), anh. DMF, $20^\circ C$, 2h ; ii) $Na_2S_2O_4$, NH_3 , H_2O , THF, $20^\circ C$, 16h ; iii) acide 2-chloronicotinique (1 éq.), acide acétique, $100^\circ C$, 6h.

La fonction phénol du 3-nitro-5-trifluorométhylphénol réagit avec le bromure de benzyle en présence de NaH pour former le composé O-benzylé **62** avec un rendement de 68%. La fonction nitro est réduite par du dithionite de sodium et l'ammoniaque pour former l'aniline **69** avec un rendement de 46%. Ce composé est engagé dans une réaction de substitution nucléophile aromatique avec l'acide 2-chloronicotinique dans l'acide acétique.

2.2.4. A partir du 4-nitrophénol

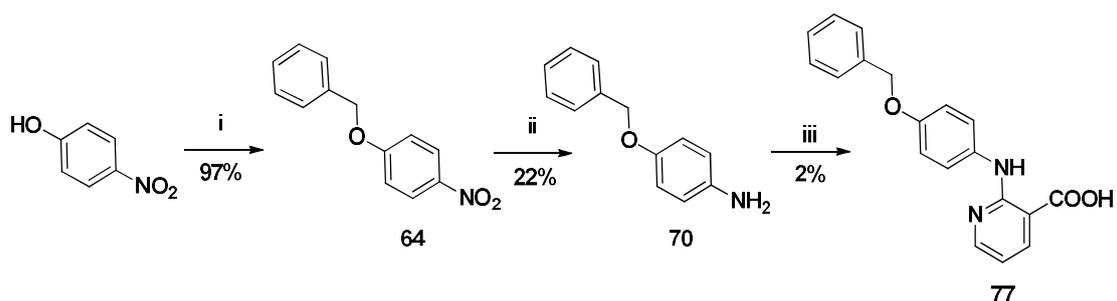


Schéma 18: Synthèse de l'acide 2-((4-(benzyloxy)phényl)amino)nicotinique **77**

Réactifs et conditions : i) bromure de benzyle (1 éq.), NaH (1,2 éq.), DMF anhydre, température ambiante, 2h ; ii) $Na_2S_2O_4$, NH_3 , H_2O , THF, température ambiante, 16h ; iii) acide 2-chloronicotinique (1 éq.), acide acétique, $100^\circ C$, 6h.

Le 4-nitrophénol est tout d'abord alkylé avec le bromure de benzyle en présence de NaH pour former le composé O-benzylé **66** avec un rendement de 97%. La fonction nitro est ensuite réduite par du dithionite de sodium et ammoniacque pour former le composé **70** avec un faible rendement de 22%. Enfin nous avons réussi à isoler le composé final **77** avec un rendement de 2% seulement dû à des problèmes de purification.

2.2.5. A partir du 3-bromo-4-nitrophénol

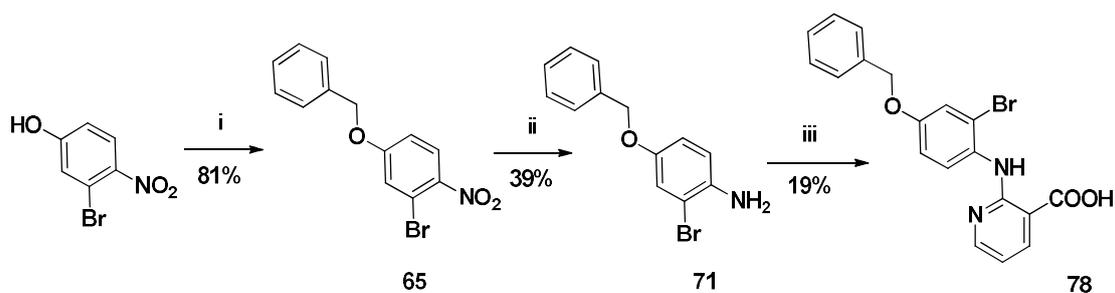


Schéma 19: Synthèse de l'acide 2-((2-bromo-4-(benzyloxy)phényl)amino)nicotinique **78**

Réactifs et conditions : i) benzyle bromide (1 éq.), NaH (1,2 éq.), anh. DMF, 20 °C, 2h ; ii) Na₂S₂O₄, NH₃, H₂O, THF, 20 °C, 16h ; iii) acide 2-chloronicotinique (1 éq.), acide acétique, 100°C, 6h.

Le 3-bromo-4-nitrophénol réagit avec le bromure de benzyle en présence de NaH pour former le composé O-alkylé. La fonction nitro est réduite par du dithionite de sodium et de l'ammoniacque avant d'être engagé dans une réaction de substitution nucléophile aromatique pour former le composé **78** avec un rendement de 19%.

3. Evaluation

3.1. Effet de nos composés sur la température de dénaturation de hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇

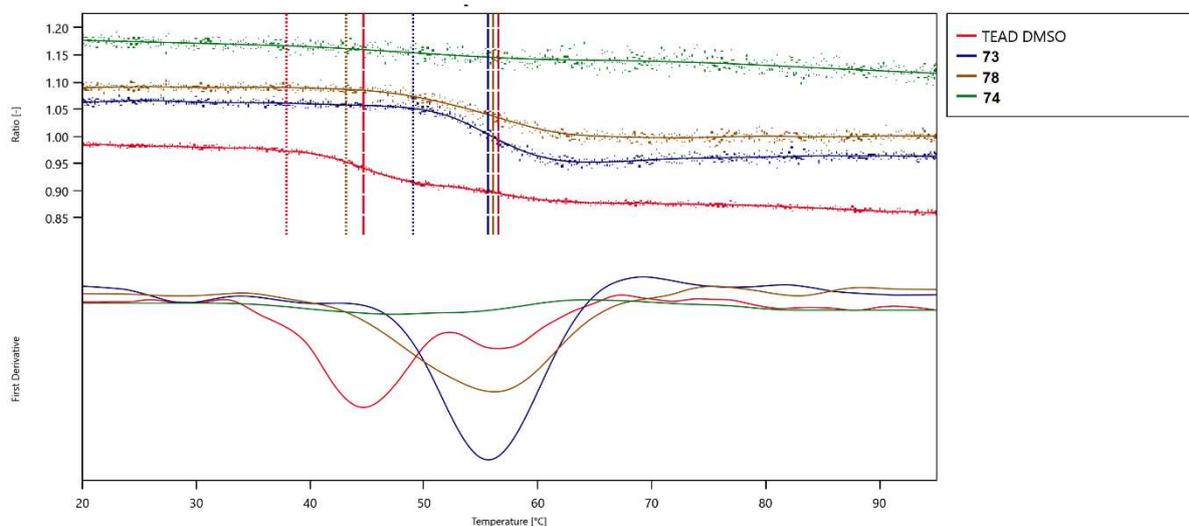


Figure 59: Thermofluor des dérivés de l'acide niflumique

Comme précédemment, nous avons mesuré la température de dénaturation (T_m) de la protéine hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ en absence et en présence de ligand par Fluorimétrie à balayage nano différentiel. Sur la figure 59, on retrouve les deux points d'inflexion pour hTEAD2 seul (en rouge). Contrairement à la première famille de molécules (chapitre III), les courbes des composés ne montrent plus qu'un seul point d'inflexion vers 55°C. Conçus pour aller dans la poche, les composés occuperaient la poche interne de TEAD faisant ainsi disparaître le T_m de TEAD non acylé. Cependant, TEAD occupé par des petites molécules serait légèrement moins stable que TEAD acylé ($T_m = 55^\circ\text{C} < T_m \text{ TEAD acylé} = 57^\circ\text{C}$). Si notre hypothèse est confirmée, cette technique nous permettrait de cribler des molécules et de prédire leur site de liaison, à savoir leur capacité à se fixer dans la cavité interne de TEAD ou sur les interfaces.

3.2. Co-cristallisation des ligands avec hTEAD2

Les cristaux hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ ont été préalablement formés puis trempés avec les composés synthétisés à des temps courts (2 heures de trempage) et temps longs (24 heures de trempage). Une structure présentant le ligand **74** a été résolue à 1,88 Å. Le composé est présent dans les deux monomères.

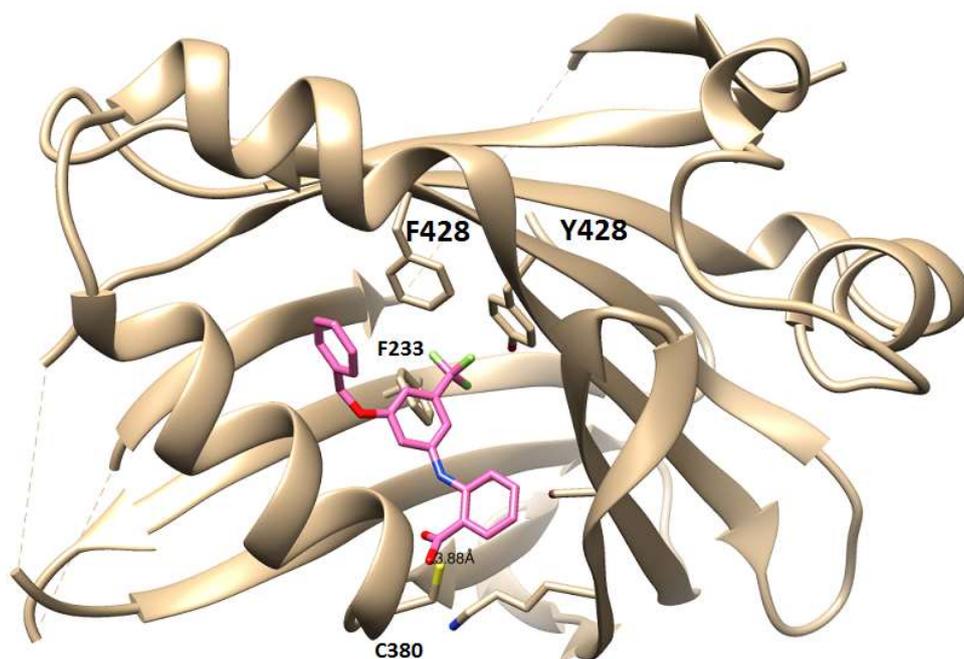


Figure 60: Positionnement de la molécule **74** dans la poche interne

La molécule **74** s'insère dans la poche hydrophobe pour former différentes interactions. L'acide carboxylique s'oriente vers la cystéine 380 comme la fonction acide de l'acide palmitique. Le groupe benzyle effectue un π -stacking avec F428. Le CF_3 semble interagir avec le cycle aromatique de Y426 formant une interaction de type anion- π . En effet, le cycle aromatique de la tyrosine Y428 et celui formé par les trois atomes de fluor sont quasiment parallèles. De plus, F233 stabiliserait le cycle aromatique central du composé (Figure 60).

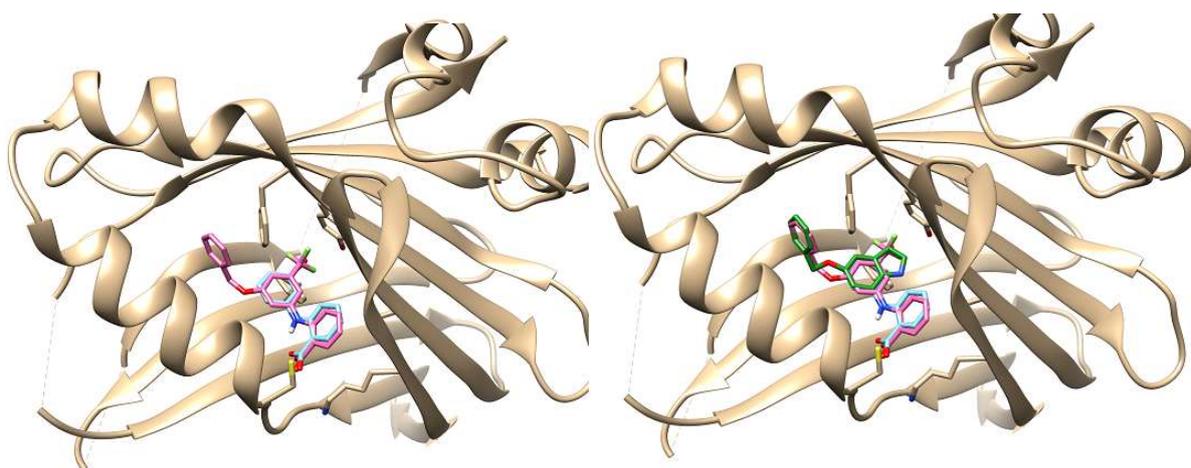


Figure 61: Superposition du ligand **74** avec l'acide bromofénamique (à gauche) et le 5-benzyloxyindole (à droite)

Si l'on superpose ce composé à l'acide bromofénamique, on observe une parfaite superposition entre des cycles aromatiques (Figure 61). L'atome de brome et le groupe trifluorométhyle s'orientent

dans le même sens. On retrouve les mêmes interactions au niveau de l'acide carboxylique. L'indole se superpose également très bien à la molécule. La fusion des deux molécules permet donc l'obtention de composés gardant les mêmes orientations et interactions que les fragments indolique et fénamique.

3.3. Thermophorèse à micro-échelle (MST)

Comme précédemment, la constante d'affinité des composés pour TEAD2 est évaluée par MST sur lysat cellulaire. Le composé **75** se lie à la GFP. En effet, la liaison observée est retrouvée lorsque l'on effectue la même mesure avec Muc4-GFP, une autre protéine disponible au laboratoire en lysat.

Le composé **74** se lie faiblement à la protéine. Le plateau haut n'est pas observé. Pour des raisons de solubilité, il nous est impossible de monter en concentration pour atteindre ce plateau. Seule une estimation est donc possible. La constante de dissociation serait supérieure à 800 μM .

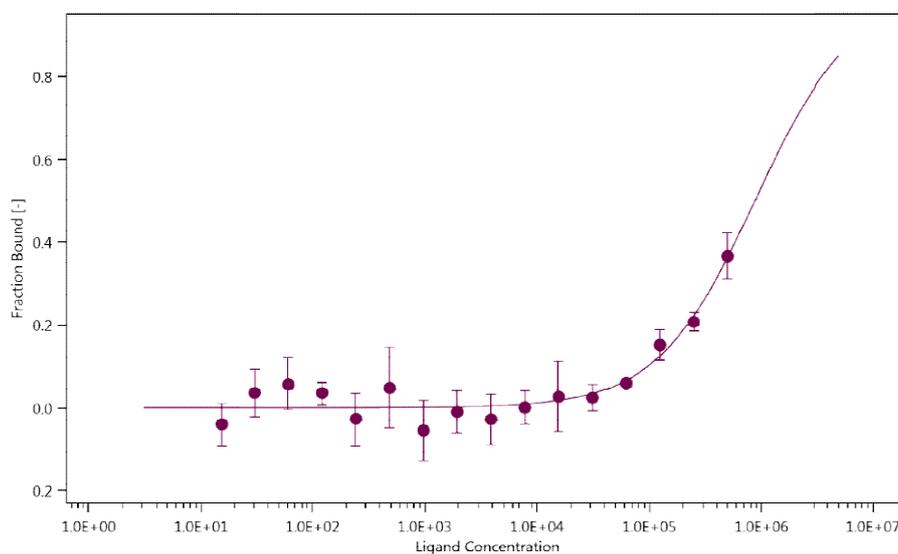


Figure 62: Courbe dose-réponse du composé **74** en MST

Les deux autres composés **73** et **78** ont une meilleure affinité pour TEAD2 puisqu'ils se lient respectivement avec une constante de $49 \pm 27 \mu\text{M}$ et $53 \pm 33 \mu\text{M}$. On remarque cependant des écarts-type importants dus à différentes raisons notamment le lysat cellulaire qui augmente le bruit et la faible amplitude de réponse à cause de la taille des molécules.

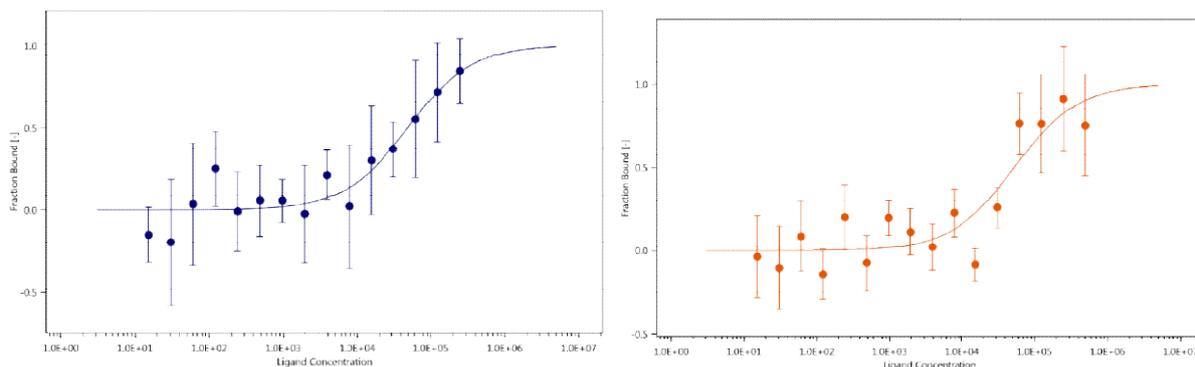


Figure 63: Courbe dose-réponse des composés **73** et **78** en MST

3.4. Evaluation biologique

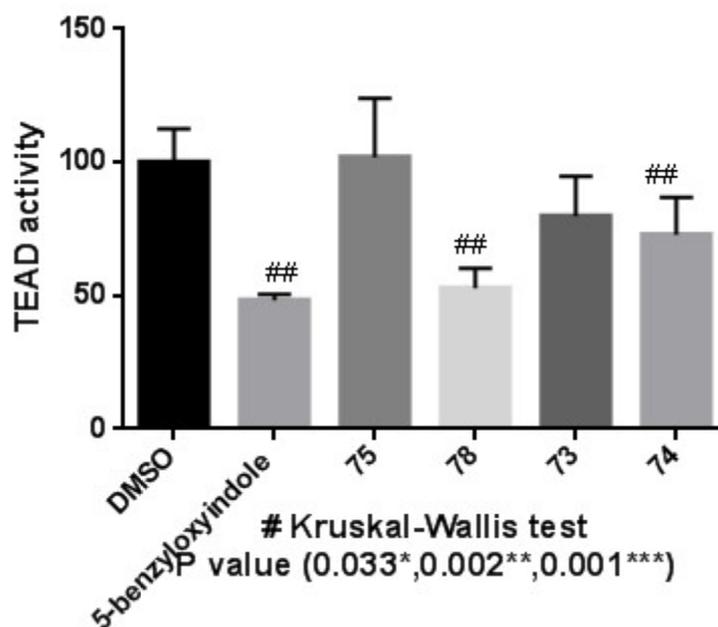


Figure 64: Activité transcriptionnelle de TEAD en présence des composés à 10 μ M sur cellules HEK293

Comme précédemment, les molécules sont testées sur cellules HEK293 grâce au gène rapporteur à la luciférase (Figure 64). L'évaluation biologique montre une activité faible de l'ordre de 25% pour **73** et **74**. **75** ne présente pas d'activité contrairement au **78** qui inhibe à 50% l'activité transcriptionnelle de TEAD à 10 μ M. Aucun des composés ne présente de cytotoxicité.

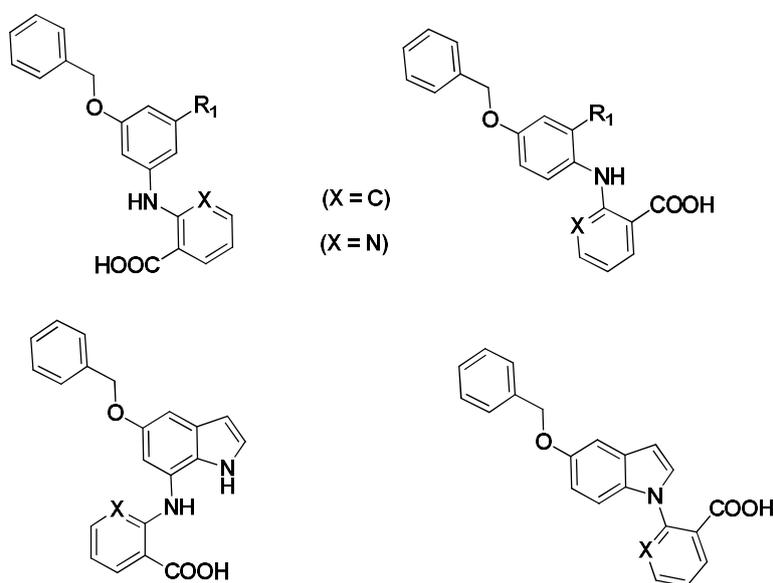
4. Conclusion

A ce jour, 6 composés ont été synthétisés et 4 ont été évalués. Les 3 derniers composés sont en cours de synthèse soit par réaction cuprocatalysée pour les composés phényle ou via substitution nucléophile aromatique pour les dérivés pyridine.

Les données de nanoDSF nous donnent une première indication quant au site de liaison. En effet, l'observation d'un seul point d'inflexion suggère que ces composés se fixent dans la poche hydrophobe. Ces résultats ont été confirmés par la co-cristallisation du composé **74** avec hTEAD2. Les expériences en thermophorèse à micro-échelle nous ont permis de déterminer des constantes d'affinité de l'ordre du micromolaire.

L'évaluation biologique sur cellules HEK293 indique que le composé **75** semble inactif tandis que les autres inhibent l'activité transcriptionnelle de TEAD entre 20 et 50%. A ce jour, il est difficile d'en déduire des relations structure-activité ou structure-affinité au vu du faible nombre de molécules évaluées.

Les premiers résultats obtenus sont encourageants et ce chapitre doit être achevé sous peu. Il s'insère dans un projet plus vaste. Il sera notamment complété par la synthèse et l'évaluation de composés incluant l'hétérocycle indole. Ce travail a déjà été entrepris par Florine Toulotte (en 1^{ère} année de thèse sur le même sujet).



L'ensemble des résultats obtenus devrait nous permettre de proposer des relations structure-activité en vue d'améliorer l'activité biologique.

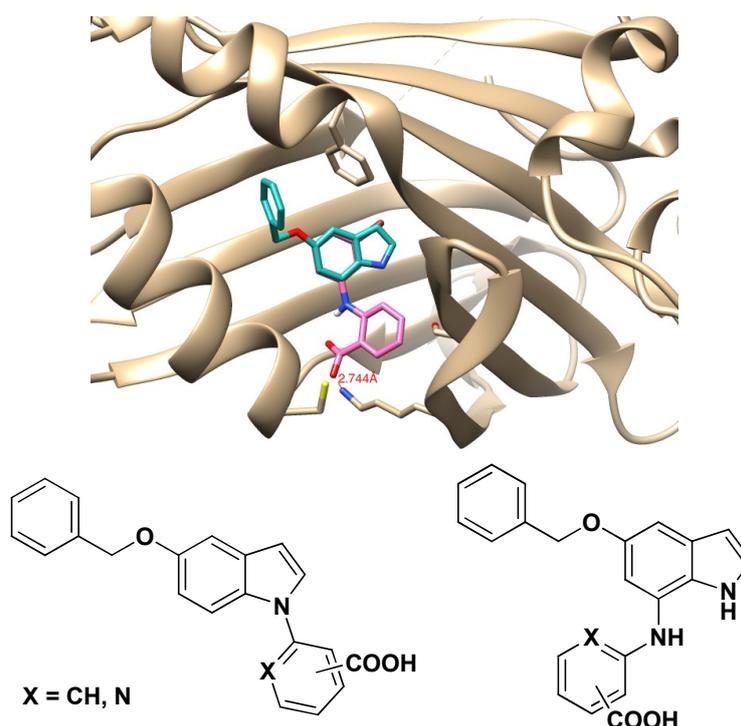
CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La voie Hippo a récemment été identifiée comme jouant un rôle important dans la croissance des organes en régulant la prolifération cellulaire *via* la phosphorylation de YAP(TAZ). Hypophosphorylé, YAP(TAZ) entre dans le noyau pour interagir avec TEAD. Cette interaction entraîne l'augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire, ainsi que l'acquisition de phénotypes cancéreux tels que la transition épithélio-mésenchymateuse, la dissémination métastatique et la résistance à l'apoptose. Le complexe YAP(TAZ)/TEAD apparaît comme une cible intéressante dans le traitement du cancer, puisqu'un défaut d'activité de la voie Hippo ou une surexpression de YAP, TAZ ou de TEAD contribuent à la prolifération cellulaire aberrante et à la formation de métastases. L'analyse bibliographique des données concernant le complexe YAP(TAZ)/TEAD a permis d'identifier trois interfaces intéressantes pour inhiber l'interaction protéine-protéine.

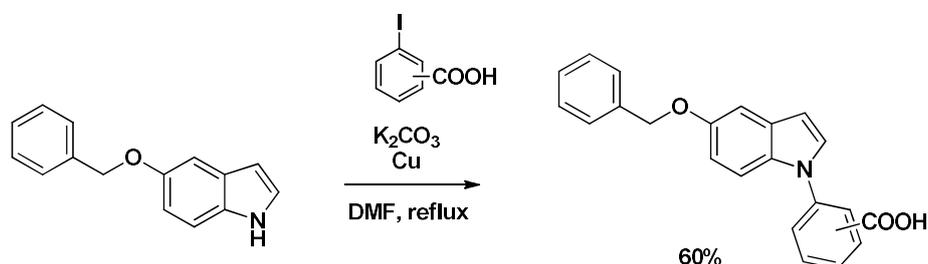
La première stratégie a consisté à cibler l'interface 3, initialement considérée comme la plus importante pour la formation du complexe. A partir d'un composé original, issu du criblage virtuel, les premiers résultats du laboratoire ont permis d'orienter notre stratégie vers la synthèse de composés modulant l'hétérocycle central triazole par des motifs pyrazole ou imidazole afin d'évaluer l'importance de chaque azote dans l'interaction avec la tyrosine 421, acide aminé clé de l'interaction. Les résultats biologiques confirment l'importance de l'azote central pour conserver voire améliorer l'activité biologique. Ces travaux ont permis de compléter un travail plus large entrepris précédemment.

Une seconde famille chimique de pyrazole a été développée, basé sur la cristallographie d'un fragment. Etonnamment, les structures cristallographiques obtenues ont infirmé le site de liaison attendu (poche interne) et ont permis de caractériser la présence d'une poche cryptique au niveau de l'interface 2 de TEAD2. Ces molécules se lient avec des affinités de l'ordre du micromolaire. Les premiers résultats biologiques sont encourageants et nous ont permis de tirer des premières relations structure-activité avec notamment l'importance de la fonction ester en position 4. Le composé **52** semble prometteur. Nous avons mesuré pour ce composé une constante d'affinité pour hTEAD2 de l'ordre de 100 μM et une diminution de l'activité transcriptionnelle de TEAD de 70% à 10 μM sans cytotoxicité notable. De plus, il est actif sur cellules MDA-MB-231 (cancer du sein) puisqu'il diminue l'expression des gènes cibles tels que CTGF, Axl ou Cyr61 (mesuré par Western Blot). Il est envisagé de le tester sur d'autres lignées cellulaires cancéreuses.

Basée sur la superposition des structures cristallographiques de deux complexes du domaine C-terminal de hTEAD2 avec au le 5-benzyloxyindole et l'acide bromofénamique, nous avons conçu une dernière série chimique susceptible d'avoir une meilleure affinité pour la poche interne de hTEAD2. Comme espéré, ces composés s'insèrent dans la poche hydrophobe avec une parfaite superposition avec leurs précurseurs. Les premiers résultats biophysiques ont permis d'identifier deux molécules avec une affinité micromolaire et montre une inhibition de l'activité transcriptionnelle de TEAD de 30% à 10 μ M. Ce travail préliminaire ouvre des perspectives très intéressantes notamment la synthèse d'indoles diversement substitués.



L'hétérocycle indole sera par exemple substitué en position 1 ou en position 7 par des motifs acide benzoïque ou acide nicotinique.



Les premiers essais ont conduit à la synthèse des dérivés en position 1 par l'acide benzoïque par réaction d'Ullmann, catalysé au cuivre, avec des rendements de l'ordre de 60%.

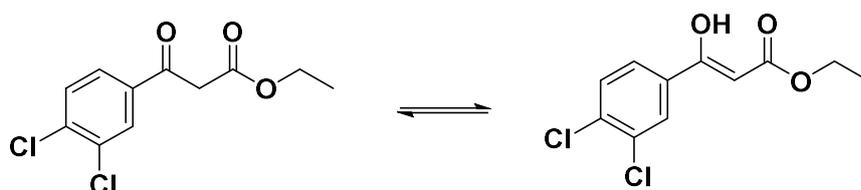
PARTIE EXPÉRIMENTALE

Chemicals and solvents were purchased from various suppliers (Sigma–Aldrich, Alfa Aesar, Fisher, VWR) and used without purification. Reaction monitoring was performed by thin layer chromatography (TLC) on Macherey-Nagel Alugram Sil 60/UV254 (thickness=0.2 mm). TLC was revealed by UV ($\lambda=254$ nm) and/or the appropriate stain. Purification of compounds was carried out using column chromatography (flash). Flash chromatography was performed on a Reveleris Flash Chromatography System using Büchi flash RS columns. NMR spectra were recorded on a Bruker DRX 300 spectrometer operating at 300 MHz for ^1H and 75 MHz for ^{13}C or on a Bruker Avance 500 spectrometer at 500 MHz (^1H), 126 MHz (^{13}C). Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) relative to tetramethylsilane (TMS) or to residual proton signal in deuterated solvents. Chemical shifts are reported as position (δ in ppm), multiplicity (s=singlet, d=doublet, t=triplet, q=quartet, m=massif, br s=broadened singlet), coupling constant (J , in Hz), relative integral, and assignment. Attributions of protons and carbons were achieved by analysis of 1D and 2D experiments (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, and HMBC). Mass spectra were performed on a Water XBridge C18 column (5 μm particule size, dimensions 50 mm x 46 mm), using electrospray ionization and a UV detector (diode array). A gradient starting from 98% H_2O /formate buffer 5 mM (pH 3.8) and reaching 100% CH_3CN /formate buffer 5 mM (pH 3.8) within 4 min at a flow rate of 2 mL/min was used followed by a return to the starting conditions within 1 min. The purity of final compounds was verified by high pressure liquid chromatography (HPLC) column: C18 Interchrom UPTISPHERE. Analytical HPLC was performed on a Shimadzu LC-2010AHT system equipped with a UV detector set at 254 nm and 215 nm. The following eluent systems were used: buffer A (H_2O /TFA, 100:0.1) and buffer B (CH_3CN / H_2O /TFA, 80:20:0.1). HPLC retention times (HPLC t_r) were obtained at a flow rate of 0.2 mL/min for 35 min using the following conditions: a gradient run from 100% of buffer A over 1 min, then to 100% of buffer B over the next 30 min. Melting point analyses were performed on Barnstead Electrothermel Melting Point Series IA9200.

Synthesis of ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-3-oxopropanoate (β keto ester 1)

Carbonyldiimidazole (1.2 eq., 10.20 g, 62.80 mmol) was added to a solution of 3,4-dichlorobenzoic acid (1 eq., 10 g, 52.40 mmol) in THF (400 mL). The resulting solution was stirred for 4 h at room temperature. Separately, to a solution of ethyl potassium malonate (1.2 eq., 10.70 g, 62.80 mmol) in ACN (300 mL) were added MgCl_2 (1.2 eq., 5.98 g, 62.80 mmol) and triethylamine (1.2 eq., 6.36 g,

62.80 mmol). The two solutions were combined and stirred for 2 hrs at room temperature. After concentration under vacuum, the residue was taken up in water. The pH of the solution was adjusted to pH 5.0 with aq. 1.0 M HCl solution. The resulting solution was extracted several times with ethyl acetate and the organic layers were combined and dried over magnesium sulfate. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by column chromatography with Cyclohexane/EtOAc (80:20, v/v) to afford ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-3-oxopropanoate.



$C_{11}H_{10}Cl_2O_3$

MW = 261.10 g/mol

Yield: 85%

Aspect: Colorless liquid

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): keto form (75%), δ = 1.25(t, 3H, 3J = 7.0 Hz), 3.94(s, 2H), 4.21(q, 2H, 3J = 7.0 Hz), 7.56(dd, 1H, 3J = 8.6 Hz, 4J = 2.2 Hz), 7.73(d, 1H, 3J = 8.6 Hz), 8.01(d, 1H, 4J = 2.2 Hz)

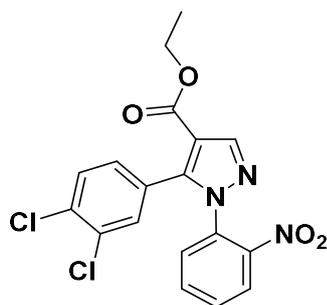
enol form (25%), δ = 1.32 (t, 3H, 3J = 7.0 Hz), 4.21 (q, 2H, 3J = 7.0 Hz), 5.62 (s, 1H), 7.47 (d, 1H, 3J = 8.6 Hz), 7.56 (dd, 1H, 3J = 8.6 Hz, 4J = 2.2 Hz), 7.83 (d, 1H, 4J = 2.2 Hz), 12.54 (s, 1H, OH)

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): keto form, δ = 14.0(CH₃), 45.9 (CH₂), 61.7 (CH₂), 127.5(CH), 130.6(CH), 130.9 (CH), 133.6(C_{IV}), 135.5(C_{IV}); 138.4(C_{IV}), 166.8 (C=O), 190.3(C=O)

Enol form, δ = 14.2(CH₃), 60.6(CH₂), 88.4(CH), 125.1(CH), 128.0(CH), 130.5(CH), 133.1(C_{IV}), 133.4 (C_{IV}), 135.3(C_{IV}), 168.7(C-O), 172.8(C=O)

Synthesis of ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate(3)

A mixture of ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-3-oxopropanoate (1 eq., 240 mg, 0.92 mmol), *N,N*-dimethylformamide dimethyl acetal (1.1 eq., 120 mg, 0.14 mL, 1.01 mmol) in anhydrous toluene (3 mL) was stirred under reflux for 4 h. Solvents were removed *in vacuo* to give the crude intermediate enaminone. The residue was dissolved in *tert*-butanol (3 mL) with (2-nitrophenyl)hydrazine (1.1 eq., 154 mg, 1.01 mmol) and 37% HCl (10 drops). The mixture was stirred under reflux for 16 hrs. After concentration *in vacuo*, the residue was taken up in diethyl ether and the precipitate was filtered.



$C_{18}H_{13}Cl_2N_3O_4$

MW = 406.22 g/mol

Yield: 42%

Aspect: white powder Mp = 115-117 °C

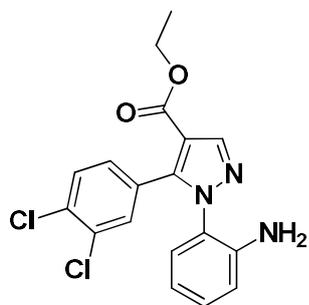
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.27 (t, 3H, 3J = 7.1 Hz), 4.25 (q, 2H, 3J = 7.1 Hz), 7.16 (dd, 1H, 3J = 8.3 Hz, 4J = 1.9 Hz), 7.24 (m, 1H), 7.40 (d, 1H, 3J = 8.3 Hz), 7.47 (d, 1H, 4J = 1.9 Hz), 7.60 (m, 2H), 7.90 (m, 1H), 8.19 (s, 1H)

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.2 (CH_3), 60.6 (CH_2), 114.6 (C_{IV}), 125.5 (CH), 127.6 (C_{IV}), 129.5 (CH), 129.6 (CH), 130.2 (CH), 130.2 (CH), 132.2 (C_{IV}), 132.3 (CH), 132.5 (C_{IV}), 133.5 (CH), 134.2 (C_{IV}), 143.6 (CH), 144.2 (C_{IV}), 145.9 (C_{IV}), 162.3 (C=O)

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 405.03, Found: 406.20, $[M+H]^+$, t_R = 3.32 min.

Synthesis of ethyl 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate (4)

To a solution of ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate (1 eq., 150 mg, 0.37 mmol) in H_2O / THF (50:50, v/v, 8 mL) were added successively aqueous 35% ammonia (0.3 mL/mmol of reagent) and $Na_2S_2O_4$ (10 eq., 642 mg, 3.70 mmol). The solution was stirred at room temperature for 16hrs. The solution was extracted several times with EtOAc. Organic layers were combined, dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography with DCM/MeOH (98/2, v/v).



$C_{18}H_{15}Cl_2N_3O_2$

MW = 376.24 g/mol

Yield: 26%

Aspect: white solid Mp = 108-110°C

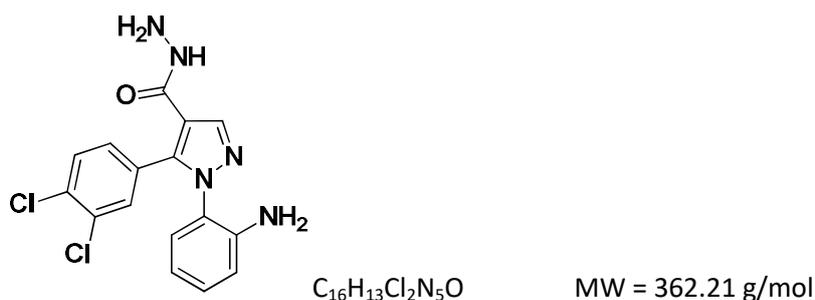
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.28 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz), 4.01 (br s, 1H), 4.26 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz), 6.60 (td, 1H, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 6.70 (dd, 1H, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 6.82 (dd, 1H, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.0 Hz), 7.10 (dd, 1H, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 7.16 (td, 1H, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 7.35 (d, 1H, ³J = 8.4 Hz), 7.49 (d, 1H, ⁴J = 2.0 Hz), 8.25 (s, 1H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 14.2 (CH₃), 60.4 (CH₂), 113.5 (C_{IV}), 116.9 (CH), 118.4 (CH), 124.5 (C_{IV}), 127.9 (CH), 128.2 (C_{IV}), 129.5 (CH), 129.8 (CH), 130.3 (CH), 132.0 (C_{IV}), 132.3 (CH), 133.5 (C_{IV}), 143.2 (CH), 144.2 (C_{IV}), 144.6 (C_{IV}), 162.6 (C=O)

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 375.05, Found: 376.20, [M+H]⁺, t_R = 3.25 min.

Synthesis of 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carbohydrazide (5)

Hydrazine monohydrate (3 eq., 16 mg, 15.5 μL, 0.32 mmol) was added to a solution of ethyl 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate (1 eq., 40 mg, 0.11 mmol) in absolute ethanol (1.5 mL). The mixture was stirred overnight at reflux. The mixture was concentrated under vacuum and the residue was taken up in EtOAc. Organic layer was washed with water, dried on MgSO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography with DCM/MeOH (98/2, v/v).



Yield: 91%

Aspect: white powder Mp = 85-88°C

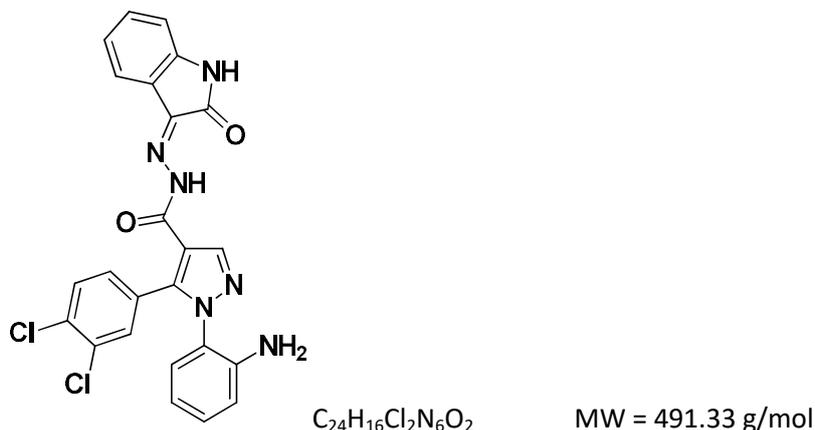
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.99 (br s, 2H), 6.60 (td, 1H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 6.70 (dd, 1H, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 6.80 (dd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.2 Hz), 7.03 (br s, 1H), 7.15 (m, 2H), 7.38 (d, 1H, ³J = 8.2 Hz), 7.5 (d, 1H, ⁴J = 2.0 Hz), 8.10 (br s, 1H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 115.0 (C_{IV}), 116.9 (CH), 118.4 (CH), 124.3 (C_{IV}), 127.8 (CH), 128.0 (C_{IV}), 129.2 (CH), 130.4 (CH), 130.5 (CH), 131.9 (CH), 132.8 (C_{IV}), 134.1 (C_{IV}), 140.6 (CH), 141.8 (C_{IV}), 143.2 (C_{IV}), 163.7 (C=O)

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 361.05, Found: 362.20, [M+H]⁺, t_R = 2.40 min.

Synthesis of (Z)-1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-1H-pyrazole-4-carbohydrazide (6)

To a solution of 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carbohydrazide (1 eq., 70 mg, 0.19 mmol) and isatin (1 eq., 28.4 mg, 0.19 mmol) in absolute EtOH (9 mL) were added three drops of glacial acetic acid. The solution was refluxed for 24 hrs. The precipitate was filtered and dried.



Yield: 74%

Aspect: yellow powder Mp > 300 °C

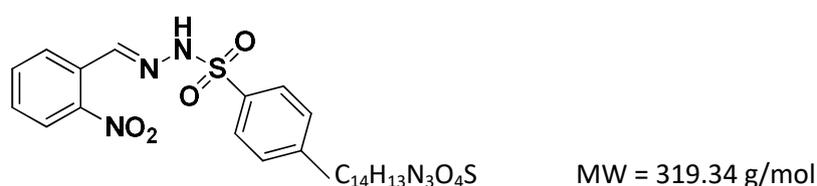
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 5.15 (br s, 2 H), 6.48 (t, 1 H, ³J = 6.9 Hz), 6.7 (d, 1 H, ³J = 7.8 Hz), 6.92 (d, 1 H, ³J = 7.8 Hz), 6.96 (d, 1 H, ³J = 7.2 Hz), 7.09 (t, 2 H, ³J = 7.5 Hz), 7.31 (dd, 1 H, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.5 Hz), 7.34 (t, 1 H, ³J = 8.0 Hz), 7.53 (d, 1 H, ³J = 7.2 Hz), 7.58 (d, 1 H, ³J = 8.4 Hz), 7.70 (d, 1 H, J = 1.5 Hz), 8.29 (s, 1 H), 11.28 (br s, 1 H), 13.14 (br s, 1 H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 111.6 (CH), 114.8 (C_{IV}), 115.9 (CH), 116.1 (CH), 120.3 (C_{IV}), 121.3 (CH), 123.1 (CH), 123.3 (C_{IV}), 129.2 (CH), 129.4 (C_{IV}), 130.6 (2 CH), 130.7 (CH), 130.8 (C_{IV}), 131.1 (CH), 132.0 (CH), 132.5 (CH), 132.6 (C_{IV}), 141.1 (C_{IV}), 142.7 (C_{IV}), 144.2 (C_{IV}), 145.4 (C_{IV}), 157.1 (CO), 163.1 (CO)

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 490.07, Found: 489.00, [M-H]⁻, 491.05, [M+H]⁺, t_R = 3.03 min.

Synthesis of 4-methyl-*N'*-(2-nitrobenzylidene)benzenesulfonohydrazide (7)

Tosylhydrazine (1 eq., 246 mg, 1.32 mmol) was added to a solution of 2-nitrobenzaldehyde (1 eq., 200 mg, 1.32 mmol) in EtOH (5 mL). The solution was stirred at reflux for 1 hr. The precipitate was filtered and washed with ether.



Yield:100%

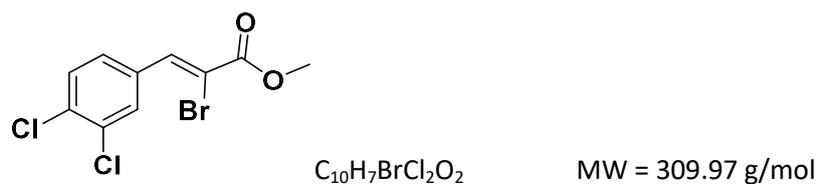
Aspect: White powder Mp = 160-162°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.36 (s, 3H), 7.42 (d, 2H, ³*J* = 8.0 Hz), 7.62 (m, 1H), 7.77 (m, 4H), 8.01 (dd, 1H, ³*J* = 8.1 Hz ⁴*J* = 1.2 Hz), 8.27 (s, 1H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 21.5 (CH₃), 125.1 (CH), 127.6 (2 CH), 128.3 (CH), 128.5 (C_{IV}), 130.3 (2 CH), 131.2 (CH), 134.2 (CH), 136.5 (C_{IV}), 142.8 (CH), 144.1 (C_{IV}), 148.3 (C_{IV})

Synthesis of methyl -2-bromo-3-(3,4-dichlorophenyl)prop-2-enoate (9)

To a solution of 3,4-dichlorobenzaldehyde (1 eq., 1 g, 5.71 mmol) and methyl bromoacetate (1.1 eq., 0.96 g, 0.60 mL, 6.29 mmol) in DCM (16 mL) under N₂ atmosphere, was added titanium tetrachloride (1.2 eq., 1.30 g, 3.70 mL, 6.86 mmol) in drops over 10 min. After stirring at room temperature for 30 min, NEt₃ (2 eq., 1.16 g, 1.60 mL, 11.40 mmol) was added dropwise over 10 min while keeping the temperature below 30 °C. After stirring at room temperature for 4 h, the solution was quenched carefully with water. The organic layer was washed with water, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).



Yield:49%

Aspect:White solid

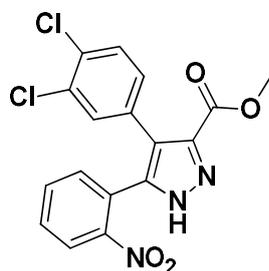
Mp = 90-92 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.84 (s, 3H), 7.76 (d, 1H, ³J = 8.6 Hz), 7.89 (dd, 1H, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 1.8 Hz), 8.14 (d, 1H, ⁴J = 1.8 Hz), 8.26 (s, 1H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 54.3 (CH₃), 114.9 (CH), 129.3 (C_{IV}), 130.4 (CH), 131.2 (CH), 131.8 (C_{IV}), 132.1 (CH), 133.2 (C_{IV}), 134.4 (C_{IV}), 139.0 (CH), 163.2 (CO)

Synthesis of methyl 4-(3,4-dichlorophenyl)-5-(2-nitrophenyl)-1H-pyrazole-3-carboxylate (10)

A mixture of 4-methyl-*N'*-[(1*E*)-(2-nitrophenyl)methylidene]benzene-1-sulfonohydrazide (1 eq., 77 mg, 0.24 mmol), methyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-2-hydroxyprop-2-enoate (1 eq., 60 mg, 0.24 mmol) and Cs₂CO₃ (5 eq., 395 mg, 1.21 mmol) in DMF (2 mL) was stirred at room temperature for 5h and then at 50C for 2 hrs. After the completeness of the reaction, the mixture was quenched with cold water (10 mL), and extracted three times with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).



C₁₇H₁₁Cl₂N₃O₄

MW = 392.19 g/mol

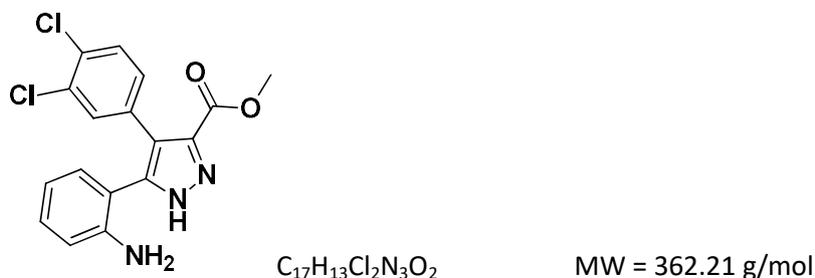
Yield: 47%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.54 (s, 3 H), 3.87 (s, 1 H), 7.52 (m, 3 H), 7.64 (dd, 1 H, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.9 Hz), 7.68 (dd, 1 H, ³J = 7.2 Hz, ⁴J = 1.5 Hz), 7.76 (d, 1 H, ⁴J = 1.5 Hz), 8.14 (dd, 1 H, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.3 Hz)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 51.4 (CH₃), 124.4 (CH), 124.6 (C_{IV}), 128.6 (CH), 129.3 (C_{IV}), 129.7 (C_{IV}), 129.8 (C_{IV}), 130.1 (CH), 130.3 (CH), 131.1 (CH), 132.1 (C_{IV}), 132.3 (CH), 132.6 (C_{IV}), 132.9 (CH), 133.9 (C_{IV}), 149.8 (C_{IV}), 162.7 (CO)

Synthesis of methyl 5-(2-aminophenyl)-4-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-3-carboxylate (11)

To a solution of methyl 4-(3,4-dichlorophenyl)-5-(2-nitrophenyl)-1H-pyrazole-3-carboxylate (1 eq., 960 mg, 2.45 mmol) in MeOH (30 mL) was added 10% Pd/C (0.05 eq., 13 mg, 0.12 mmol). The solution was stirred under H₂ atmosphere for 2 days. The palladium on carbon was filtered on celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure and purified by column chromatography with DCM/MeOH (98/2, v/v).



Yield: 54%

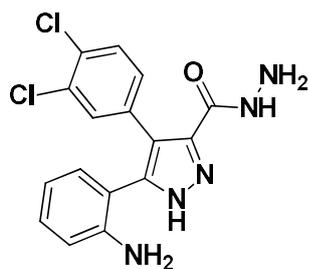
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.30 (s, 3H), 4.96 (br s, 2H), 6.49 (td, 1H, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 0.9 Hz), 6.65 (dd, 1H, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 0.9 Hz), 6.86 (dd, 1H, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 7.05 (td, 1H, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.6 Hz), 7.14 (dd, 1H, ³J = 8.3 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 7.48 (dd, 1H, ³J = 8.3 Hz), 7.50 (d, 1H, ⁴J = 2.0 Hz), 13.80 (br s, 1H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 51.9 (CH₃), 115.4 (CH), 116.1 (CH), 116.4 (C_{IV}), 128.8 (C_{IV}), 129.9 (C_{IV}), 130.1 (CH), 130.5 (CH), 130.7 (CH), 130.8 (C_{IV}), 130.9 (CH), 131.4 (C_{IV}), 132.3 (C_{IV}), 133.7 (C_{IV}), 138.2 (C_{IV}), 147.3 (CH), 159.2 (CO)

LC-MS (ESI)*m/z* Calculated: 361.04, Found: 360.2, [M-H]⁻, 362.2, [M+H]⁺, t_R = 2.95 min.

Synthesis of 5-(2-aminophenyl)-4-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-3-carbohydrazide (12)

To a solution of methyl 5-(2-aminophenyl)-4-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-3-carboxylate (1 eq., 130 mg, 0.36 mmol) in EtOH (2.5 mL) was added hydrazine monohydrate (10 eq., 115 mg, 3.60 mmol). The mixture was stirred under reflux for 16hrs, concentrated under vacuum and taken up in EtOAc. The organic layer was washed with water, dried on MgSO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography on silica gel with DCM/MeOH (98:2, v/v).



$C_{16}H_{13}Cl_2N_5O$

MW = 362.21 g/mol

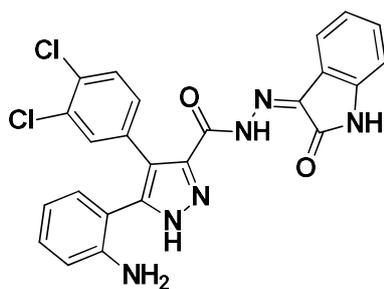
Yield: 54%

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 4.40 (br s, 2 H), 4.80 (br s, 2 H), 6.55 (td, 1 H, 3J = 7.4 Hz, 4J = 0.8 Hz), 6.67 (dd, 1 H, 3J = 8.0 Hz, 4J = 0.8 Hz), 6.93 (dd, 1 H, 3J = 7.7 Hz, 4J = 1.3 Hz), 7.09 (td, 1 H, 3J = 8.0 Hz, 4J = 1.3 Hz), 7.14 (dd, 1 H, 3J = 8.3 Hz, 4J = 2.0 Hz), 7.44 (d, 1 H, 3J = 8.3 Hz), 7.53 (d, 1 H, 4J = 2.0 Hz), 9.35 (br s, 1 H), 13.60 (br s, 1 H)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 115.4 (CH), 116.3 (CH), 116.4 (C_{IV}), 122.6 (CH), 128.8 (C_{IV}), 129.9 (C_{IV}), 130.1 (CH), 130.4 (C_{IV}), 130.7 (CH), 130.8 (CH), 131.4 (C_{IV}), 131.9 (CH), 133.9 (C_{IV}), 138.2 (C_{IV}), 147.1 (C_{IV}), 159.2 (CO)

Synthesis of (Z)-5-(2-aminophenyl)-4-(3,4-dichlorophenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-1H-pyrazole-3-carbohydrazide (13)

To a solution of 5-(2-aminophenyl)-4-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-3-carbohydrazide (1 eq., 50 mg, 0.14 mmol) in EtOH (1 mL) was added isatin (0.95 eq., 19.3 mg, 0.13 mmol) and a few drops of acetic acid. The mixture was refluxed overnight. The precipitate formed was filtered.



$C_{24}H_{16}Cl_2N_6O_2$

MW = 491.33 g/mol

Yield: 59%

Aspect: yellow powder

Mp > 300 °C

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): 59% Z form, 41% E form, δ = 4.80 (br s, 2 H, NH_2 E), 4.90 (br s, 2 H, NH_2 Z), 6.56 (t, J = 7.8 Hz, 1 H Z), 6.67 (d, J = 7.8 Hz, 1 H Z), 6.94 (d, J = 7.8 Hz, 1 H Z), 6.96 (m, 1 H E), 7.10 (m, 1 H Z), 7.25 (dd, 3J = 8.4, 4J = 0.9 Hz, 1 H Z), 7.30 (t, 3J = 7.7 Hz, 1 H E), 7.35 (t, 3J = 7.6 Hz, 1 H E), 7.48-7.40 (m, 10 H), 7.63 (d, 3J = 8.4 Hz, 1 H Z), 7.74 (d, 3J = 8.4 Hz, 1 H E), 8.12 (d, 3J = 7.8 Hz, 1 H E),

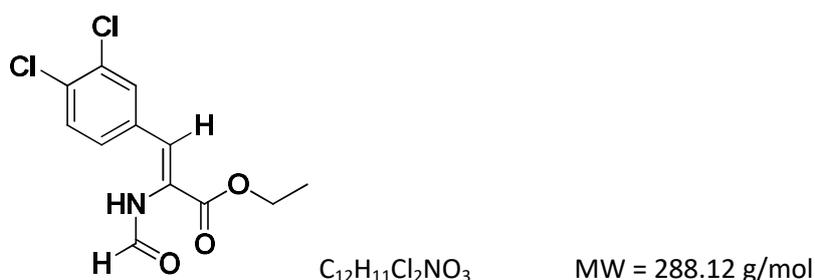
8.38 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 1 H *E*), 11.26 (br s, 1 H, NH *E*), 11.44 (br s, 1 H, NH *Z*), 14.12 (br s, 1 H, NH *E*), 14.46 (br s, 1 H, NH *Z*),

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 108.8$ (C_{IV}), 111.5 (CH), 112.2 (C_{IV}), 115.3 (C_{IV}), 116.2 (C_{IV}), 116.4 (CH), 121.2 (C_{IV}), 122.6 (2 CH), 123.1 (C_{IV}), 128.8 (CH), 129.7 (C_{IV}), 129.9 (CH), 130.4 (CH), 130.7 (CH), 130.8 (CH), 131.4 (C_{IV}), 131.6 (C_{IV}), 132.4 (CH), 133.2 (C_{IV}), 138.2 (CH), 147.5 (C_{IV}), 159.0 (CO), 163.0 (CO);

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 490.07, Found: 489.2, $[\text{M}-\text{H}]^-$, 491.1, $[\text{M}+\text{H}]^+$, $t_{\text{R}} = 3.09$ min.

Synthesis of ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-2-formamidoacrylate (14)

NaH (3 eq., 205 mg, 8.56 mmol) was suspended in THF (5 mL), and a solution of 3,4-dichlorobenzaldehyde (1 eq., 500 mg, 2.86 mmol), ethyl isocyanoacetate (1.5 eq., 0.50 mL, 4.28 mmol) in THF (1 mL) was added dropwise at room temperature over 20 min. After stirring at room temperature for 2.5 hrs, the reaction mixture was ice-cooled, and AcOH (4.9 eq., 834 mg, 0.80 mL, 13.90 mmol) was added dropwise. After stirring for 10 min, the mixture was poured into ice-water and extracted with ethyl acetate. The extract was washed successively with water, saturated aqueous sodium bicarbonate solution, water and brine, and dried over MgSO_4 . The solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel with Cyclohexane /EtOAc (10:0 to 10:10, v/v).



Yield: 60%

Aspect: White solid Mp = 136-138 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): 60% *Z* form, 40% *E* form $\delta = 1.08$ (t, $^3J = 7.0$ Hz, 3 HE), 1.24 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 3 HZ), 4.11 (q, $^3J = 7.0$ Hz, 2 HE), 4.19 (q, $^3J = 7.0$ Hz, 2 HZ), 6.89 (s, 1 HE), 7.20 (dd, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, 1 HE), 7.20 (s, 1HZ), 7.48 (d, $^4J = 2.0$ Hz, 1 H *E*), 7.58 (d, $^3J = 7.3$ Hz, 1 H *E*), 7.59 (dd, $^3J = 8.5$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 1 H *Z*), 7.67 (d, $^3J = 8.5$ Hz, 1HZ), 7.86 (d, $^4J = 1.5$ Hz, 1HZ), 8.15 (s, 1 H *E*), 8.19 (s, 1 HZ), 9.93 (br s, 1 HZ), 10.25 (br s, 1 H *E*)

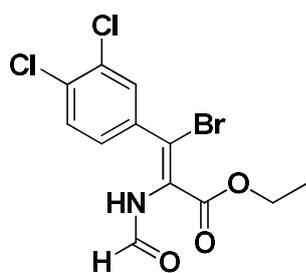
¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 14.5 (CH₃), 61.7 (CH₂), 127.1 (C_{IV}), 128.7 (CH), 130.2 (CH), 131.1 (CH), 131.7 (CH), 132.0 (C_{IV}), 132.1 (C_{IV}), 134.6 (C_{IV}), 161.2 (CO), 164.7 (CO)

LC-MS (ESI)*m/z* Calculated: 287.01, Found: 288.0, [M-H]⁻, *t*_R = 2.83 min.

Synthesis of ethyl 3-halo-3-(3,4-dichlorophenyl)-2-formamidoacrylate

To a solution of ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-2-formamidoprop-2-enoate (1 eq., 400 mg, 1.39 mmol) in DMF (8 mL) was added NBS (1 eq., 247 mg, 1.39 mmol). The resulting solution was stirred at room temperature for 2hrs. After the slow addition of NEt₃ (1 eq., 140 mg, 0.19 mL, 1.39 mmol), the reaction mixture was stirred at room temperature for 1hr. Aqueous 10% sodium thiosulfate (8 mL) was added and the mixture was stirred for 1hr. The precipitate was filtered.

Ethyl 3-bromo-3-(3,4-dichlorophenyl)-2-formamidoacrylate (15)



C₁₂H₁₀BrCl₂NO₃

MW = 367.02 g/mol

Yield: 71%

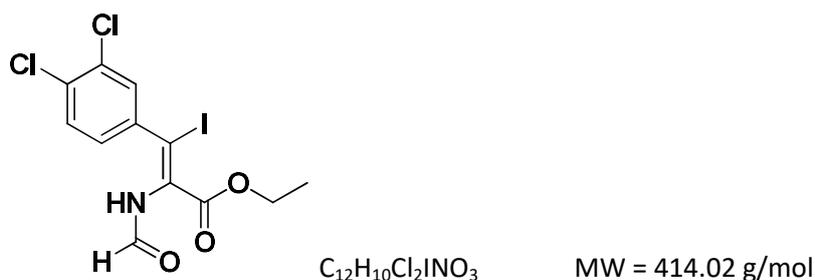
Aspect: White solid Mp = 119-121 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): *isomer Z*, δ = 0.89 (t, 3 H, ³*J* = 7.1 Hz), 3.92 (q, 2 H, ³*J* = 7.1 Hz), 7.30 (dd, 1 H, ³*J* = 8.4 Hz, ⁴*J* = 2.2 Hz), 7.57 (d, 1 H, ⁴*J* = 2.2 Hz), 7.69 (d, 1 H, ³*J* = 8.4 Hz), 8.18 (s, 1 H), 10.21 (br s, 1 H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): *isomer Z*, δ = 13.7 (CH₃), 61.8 (CH₂), 115.3 (C_{IV}), 129.5 (CH), 130.6 (C_{IV}), 130.9 (CH), 131.2 (CH), 131.5 (C_{IV}), 132.5 (C_{IV}), 138.5 (C_{IV}), 160.6 (CO), 162.3 (CO)

LC-MS (ESI)*m/z* Calculated: 364.92, Found: 364.0, [M-H]⁻, *t*_R = 3.00 min.

Ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-2-formamido-3-iodoacrylate (15')



Yield: 53%

Aspect: White solid Mp = 165-167 °C

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 0.84 (t, 3H, 3J = 7.0 Hz), 3.87 (q, 2H, 3J = 7.0 Hz), 7.20 (dd, 1H, 3J = 8.3 Hz, 4J = 2.2 Hz), 7.44 (d, 1H, 4J = 2.2 Hz), 7.63 (d, 1H, 3J = 8.3 Hz), 8.16 (s, 1H); 9.93 (br s, 1 H)

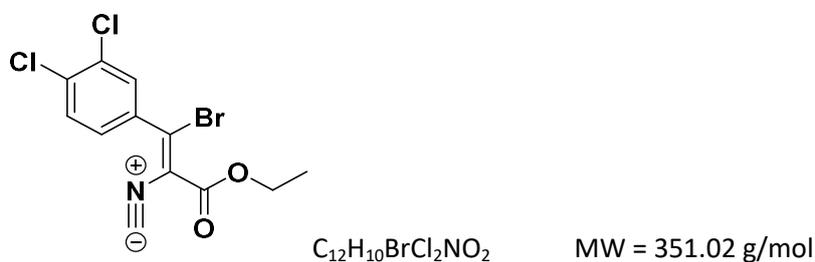
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 13.5 (CH₃), 62.4 (CH₂), 115.4 (C_{IV}), 128.2 (CH), 130.2 (CH), 130.6 (CH), 132.4 (C_{IV}), 133.3 (C_{IV}), 133.8 (C_{IV}), 140.1 (C_{IV}), 158.3 (CO), 160.6 (CO)

LC-MS (ESI) m/z Calculated: 412.91, Found: 411.8, [M-H]⁻, 414.0, [M+H]⁺, t_R = 3.00 min.

Synthesis of ethyl (E)-3-halo-3-(3,4-dichlorophenyl)-2-isocyanoacrylate

POCl₃ (1.1 eq., 0.010 mL, 0.12 mmol) was added dropwise to a solution of ethyl 3-halo-3-(3,4-dichlorophenyl)-2-formamidoprop-2-enoate (1 eq., 0.11 mmol) and NEt₃ (2.5 eq., 0.038 mL, 0.27 mmol) in DCM (0.5 mL) at -20°C under vigorous stirring. The mixture was stirred at 0 °C for 2 hrs and then poured into aq. 1.0 M K₂CO₃ solution (2.5 eq.). Phases were separated and the organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography on silica gel with Cyclohexane/EtOAc (50:50, v/v).

Ethyl (E)-3-bromo-3-(3,4-dichlorophenyl)-2-isocyanoacrylate (16)

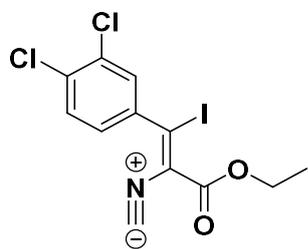


Yield: 42%

Aspect: White solid

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.17 (t, 3 H, 3J = 7.4 Hz), 4.16 (q, 2 H, 3J = 7.4 Hz), 7.16 (dd, 1 H, 3J = 8.4 Hz, 4J = 2.1 Hz), 7.43 (d, 1 H, 4J = 2.1 Hz), 7.49 (d, 1 H, 3J = 8.4 Hz)

Ethyl (E)-3-(3,4-dichlorophenyl)-3-iodo-2-isocyanoacrylate (16')



$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{INO}_2$

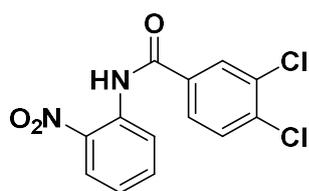
MW = 396.02 g/mol

Yield: 90%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.13 (t, 3J = 7.3 Hz, 3 H E), 1.19 (t, 3J = 7.4 Hz, 3 H Z), 4.11 (q, 3J = 7.3 Hz, 2HE), 4.18 (q, 3J = 7.1 Hz, 2 H Z), 7.10 (dd, 3J = 8.3 Hz, 4J = 2.0 Hz, 1HE), 7.21 (dd, 3J = 8.4 Hz, 4J = 2.2 Hz, 1HZ), 7.35 (d, 4J = 2.0 Hz, 1HE), 7.46 (d, 3J = 8.3 Hz, 1HE), 7.47 (d, 4J = 2.2 Hz, 1 H Z), 7.50 (d, 3J = 8.4 Hz, 1 H Z)

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 13.6 (CH_3), 13.7 (CH_3), 63.1 (CH_2), 63.2 (CH_2), 116.8 ($\text{C}_{\text{IV}}\text{E}$), 126.6 (CH Z); 127.6 (CH E); 129.1 (CH Z); 129.4 ($\text{C}_{\text{IV}}\text{Z}$), 130.3 (CH Z et CH E), 130.4 (CH Z), 131.2 ($\text{C}_{\text{IV}}\text{Z}$), 132.4 ($\text{C}_{\text{IV}}\text{Z}$), 132.5 ($\text{C}_{\text{IV}}\text{E}$), 132.8 ($\text{C}_{\text{IV}}\text{E}$), 134.2 (C_{IV}), 135.2 ($\text{C}_{\text{IV}}\text{Z}$), 135.4 ($\text{C}_{\text{IV}}\text{E}$), 140.3 ($\text{C}_{\text{IV}}\text{Z}$), 146.2 ($\text{C}_{\text{IV}}\text{E}$), 157.4 ($\text{C}_{\text{IV}}\text{Z}$), 158.5 ($\text{C}_{\text{IV}}\text{E}$), 172.5 ($\text{C}_{\text{IV}}\text{Z}$), 174.1 ($\text{C}_{\text{IV}}\text{E}$)

Synthesis of 3,4-dichloro-N-(2-nitrophenyl)benzamide (17)



$\text{C}_{13}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_3$

MW = 311.12 g/mol

To a stirred solution of *o*-nitroaniline (1 eq., 164 mg, 1.19 mmol) and pyridine (2 eq., 188 mg, 0.193 mL, 2.39 mmol) in dry dichloromethane (4.5 mL) was added dropwise 3,4-dichlorobenzoyl chloride (2 eq., 500 mg, 2.39 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 8 hrs. The precipitate formed was filtered and washed with water.

Yield: 75%

Aspect: Yellow solid

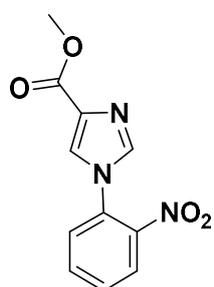
Mp: 148-150 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.52 (m, 1H), 7.76 (dd, 1H, ³*J* = 8.1 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz), 7.83 (m, 1H), 7.93 (d, 1H, ³*J* = 8.4 Hz), 7.99 (dd, 1H, ³*J* = 8.4 Hz, ⁴*J* = 2.0 Hz), 8.07 (dd, 1H, ³*J* = 8.2 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz), 8.25 (d, 1H, ⁴*J* = 2.0 Hz)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 125.5 (CH), 126.7 (CH), 126.9 (CH), 128.6 (CH), 130.2 (CH), 131.3 (C_{IV}), 131.4 (C_{IV}), 131.6 (CH), 132.1 (C_{IV}), 134.3 (CH), 135.7 (C_{IV}), 143.9 (C_{IV}), 163.8 (CO)

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 310.00, Found: 309.0, [M-H]⁻, *t*_R = 3.33 min.

Synthesis of methyl 1-(2-nitrophenyl)-1H-imidazole-4-carboxylate (18)



C₁₁H₉N₃O₄

MW = 247,21 g/mol

A mixture of 1-fluoro-2-nitrobenzene (1.1 eq., 1.55 g, 1.16 mL, 11 mmol), methyl 1*H*-imidazole-4-carboxylate (1 eq., 1.26 g, 9.99 mmol) and K₂CO₃ (1 eq., 1.38 g, 9.99 mmol) in acetonitrile (30 mL) was heated at reflux for 12hrs. After cooling the reaction mixture to room temperature, the precipitate was filtered and washed twice with ethyl acetate.

Yield: 99%

Aspect: White powder

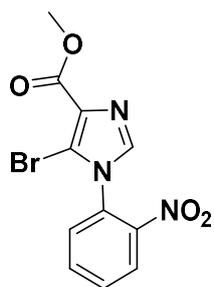
Mp = 190-192 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.78 (s, 3 H), 7.79 (m, 2 H), 7.93 (td, 1 H, ³*J* = 7.6 Hz, ⁴*J* = 1.4 Hz), 8.07 (d, 1 H, ⁴*J* = 1.3 Hz), 8.26 (m, 2 H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 51.7 (CH₃), 126.2 (CH), 127.8 (CH), 129.9 (CH), 129.9 (C_{IV}), 131.1 (CH), 133.5 (C_{IV}), 135.3 (CH), 139.6 (CH), 144.7 (C_{IV}), 162.9 (CO)

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 247.06, Found: 248.2, [M+H]⁺, *t*_R = 1.98 min.

Synthesis of methyl 5-bromo-1-(2-nitrophenyl)-1H-imidazole-4-carboxylate (19)



$C_{11}H_8BrN_3O_4$

MW = 326.11 g/mol

To a solution of methyl 1-(2-nitrophenyl)-1*H*-imidazole-4-carboxylate (1 eq., 0.30 g, 1.21 mmol) in DCM (10 mL) was added NBS (1 eq., 0.21 g, 1.21 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hrs. The mixture was concentrated under vacuum. The residue was taken up in EtOAc and washed with water. The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure.

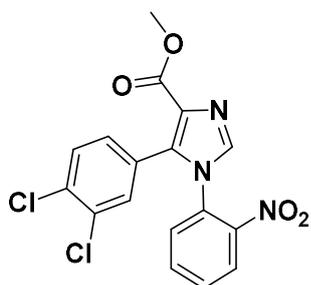
Yield: 51%

1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 3.78 (s, 3 H), 7.84 (dd, 1H, 3J = 7.6 Hz, 4J = 1.5 Hz), 7.90 (td, 1H, 3J = 8.1 Hz, 4J = 1.5 Hz), 7.99 (td, 1H, 3J = 7.6 Hz, 4J = 1.5 Hz), 8.34 (dd, 1H, 3J = 8.1 Hz, 4J = 1.4 Hz), 8.40 (s, 1H)

^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 52.0 (CH_3), 122.6 (C_{IV}), 126.4 (CH), 129.4 (C_{IV}), 130.9 (CH), 131.6 (CH), 132.5 (CH), 133.8 (C_{IV}), 135.8 (CH), 145.2 (C_{IV}), 161.9 (CO)

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 324.97, Found: 326.0, $[M+H]^+$, t_R = 2.28 min.

Synthesis of methyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1*H*-imidazole-4-carboxylate (20)



$C_{17}H_{11}Cl_2N_3O_4$

MW = 392.19 g/mol

Methyl 5-bromo-1-(2-nitrophenyl)-1*H*-imidazole-4-carboxylate (1 eq., 1 g, 3.07 mmol) was dissolved in toluene (20 mL)/ H_2O (10 mL) with 3,4-dichlorophenylboronic acid (1.5 eq., 0.88 g, 4.60 mmol) and K_3PO_4 (4 eq., 2.60 g, 12.30 mmol). Tetrakis(triphenylphosphine)palladium (10%, 0.35 g, 0.31 mmol) was added and the reaction mixture was heated at 100°C for 16 hrs. The reaction was quenched with water and extracted three times with ethyl acetate. Organic layers were combined,

dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo* to give a red oil which was purified by column chromatography using Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

Yield: 13%

Aspect: Yellow crystal

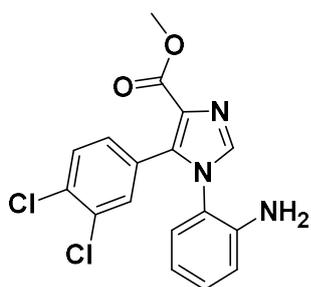
Mp = 152-154 °C

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 3.97 (s, 3H), 7.12 (dd, 1H, 3J = 8.4 Hz, 4J = 2.1 Hz), 7.31 (d, 1H, 3J = 8.4 Hz), 7.48 (dd, 1H, 3J = 7.5 Hz, 4J = 1.5 Hz), 7.57 (d, 1H, 4J = 2.1 Hz), 7.77 (m, 2H), 7.78 (s, 1H), 8.11 (dd, 1H, 3J = 7.9 Hz, 4J = 1.6 Hz)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 52.1 (CH_3); 126.6 (CH); 127.2 (CH); 128.2 (C_{IV}); 128.3 (CH); 129.9 (CH); 130.1 (C_{IV}); 130.5 (2 CH); 131.2 (CH); 132.9 (C_{IV}); 134.1 (C_{IV}); 134.3 (C_{IV}); 134.7 (CH); 145.3 (C_{IV}); 146.2 (C_{IV}); 162.7 (CO)

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 391.01, Found: 390.1, $[\text{M}-\text{H}]^-$, 392.1, $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_{R} = 2.93 min.

Synthesis of methyl 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-imidazole-4-carboxylate (**21**)



$C_{17}H_{13}Cl_2N_3O_2$ MW : 362.21 g/mol

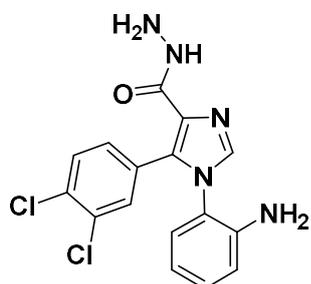
To a solution of methyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-nitrophenyl)-1H-imidazole-4-carboxylate (1 eq., 0.67 g, 1.64 mmol) in H_2O (18 mL) / THF (18 mL) were successively added aqueous 35% ammonia (0.3 mL/mmol of reagent) and $Na_2S_2O_4$ (5 eq., 1.43 g, 8.19 mmol). The solution was stirred at room temperature for 16 hrs. The solution was diluted with EtOAc (50 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc. The organic layers were combined, dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography using Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

Yield: 32%

1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 3.31 (s, 3H), 5.00 (br s, 2H), 6.45 (td, 1H, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz), 6.75 (dd, 1H, $^3J = 8.2$ Hz, $^4J = 1.1$ Hz), 6.83 (dd, 1H, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz), 7.07 (td, 1H, $^3J = 8.2$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz), 7.17 (dd, 1H, $^3J = 8.4$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz), 7.52 (d, 1H, $^3J = 8.4$ Hz), 7.60 (d, 1H, $^4J = 2.0$ Hz), 8.19 (s, 1H)

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 361.04, Found: 362.1, $[M+H]^+$, $t_R = 2.95$ min.

Synthesis of 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-imidazole-4-carboxyhydrazide (**22**)



$C_{16}H_{13}Cl_2N_5O$ MW = 362.21 g/mol

Hydrazine monohydrate (15 eq., 0.33 g, 0.32 mL, 6.63 mmol) was added to a solution of methyl 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-imidazole-4-carboxylate (1 eq., 0.16 g, 0.44 mmol) in absolute EtOH (5 mL). The mixture was stirred at reflux overnight. The mixture was concentrated under vacuum. The residue was taken up in EtOAc and washed with water. Organic layer was dried

over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography using DCM/MeOH (98:2, v/v).

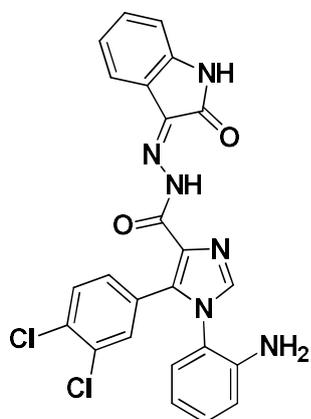
Yield: 97%

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 4.40 (br s, 2 H), 5.21 (br s, 2 H), 6.59 (td, 1 H, ³*J* = 7.8 Hz, ⁴*J* = 1.3 Hz), 6.85 (dd, 1 H, ³*J* = 8.1 Hz, ⁴*J* = 1.3 Hz), 6.95 (dd, 1 H, ³*J* = 7.8 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz), 7.19 (td, 1 H, ³*J* = 7.8 Hz, ⁴*J* = 1.7 Hz), 7.35 (dd, 1 H, ³*J* = 8.4 Hz, ⁴*J* = 2.0 Hz), 7.44 (m, 1 H), 7.58 (d, 1 H, ³*J* = 8.5 Hz), 7.69 (m, 1 H), 9.30 (br s, 1 H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 116.5 (CH), 116.7 (CH), 122.1 (C_{IV}), 126.5 (CH), 127.7 (CH), 128.6 (CH), 129.7 (CH), 130.1 (CH), 130.8 (C_{IV}), 130.9 (CH), 131.4 (C_{IV}), 131.5 (C_{IV}), 131.7 (C_{IV}), 136.2 (C_{IV}), 143.9 (C_{IV}), 161.7 (CO)

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 361.05, Found: 362.0, [M+H]⁺, *t_R* = 2.56 min.

Synthesis of (Z)-1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)-1H-imidazole-4-carbohydrazide (23)



C₂₄H₁₆Cl₂N₆O₂

MW = 491.33 g/mol

A solution of 1-(2-aminophenyl)-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-imidazole-4-carbohydrazide (1 eq., 60.0 mg, 0.17 mmol), isatin (1 eq., 24.4 mg, 0.17 mmol) and three drops of glacial acetic in absolute EtOH (7.50 mL) was refluxed overnight. The precipitate formed was filtered.

Yield: 61%

Aspect: Yellow solid

Mp > 300 °C

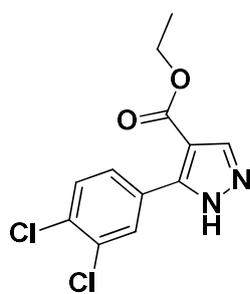
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 100% *Z* form, δ = 5.35 (br s, 2H), 6.62 (m, 1H), 6.85 (m, 1H), 6.97 (t, 1H, ³*J* = 7.6 Hz), 7.08 (m, 1 H), 7.12-7.30 (m, 2 H), 7.34-7.56 (m, 3 H), 7.57-7.82 (m, 2 H), 8.20 (s, 1 H), 11.21 (br s, 1 H), 14.30 (br s, 1 H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 111.7 (CH), 116.3 (CH), 120.6 (C_{IV}), 121.4 (CH), 123.0 (CH), 126.5 (C_{IV}), 127.7 (CH), 128.6 (CH), 129.7 (CH), 130.4 (CH), 130.8 (C_{IV}), 131.1 (CH), 131.3 (CH), 131.9 (C_{IV}), 132.2 (CH), 132.4 (CH), 133.4 (C_{IV}), 134.6 (C_{IV}), 137.7 (C_{IV}), 142.8 (C_{IV}), 144.3 (C_{IV}), 144.9 (C_{IV}), 157.1 (CO), 163.2 (CO)

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 490.07, Found: 491.1, [M+H]⁺, *t*_R = 3.12 min.

Synthesis of ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate (24)

A stirred solution of ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-3-oxopropanoate (1 eq., 2 g, 7.66 mmol) and *N,N*-dimethylformamide dimethyl acetal (1.1 eq., 1g, 8.43 mmol) was heated at 90°C for 3 h. After evaporation of excess DMF-DMA under reduced pressure, the intermediate crude enaminone was dissolved in EtOH (14 mL) with hydrazine monohydrate (1 eq., 0.38 g, 7.66 mmol) and heated at 70°C for 2hrs. After concentration under vacuum, the residue was taken up in EtOAc, washed with water. The organic phase was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography (DCM/MeOH 98/2).



C₁₂H₁₀Cl₂N₂O₂

MW = 285.13 g/mol

Yield: 69%

Aspect: White solid

Mp = 136-138 °C

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.32 (t, 3H, ³*J* = 7.1 Hz), 4.30 (q, 2H, ³*J* = 7.1 Hz), 7.50 (d, 1H, ³*J* = 8.0 Hz); 7.62 (dd, 1H, ³*J* = 8.4 Hz, ⁴*J* = 2.0 Hz), 7.88 (d, 1H, ⁴*J* = 2.0 Hz), 8.14 (s, 1H).

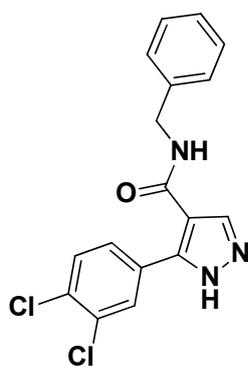
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 14.2 (CH₃), 60.6 (CH₂), 111.9 (C_{IV}), 128.5 (CH), 130.0 (CH), 130.6 (C_{IV}), 131.0 (CH), 132.3 (C_{IV}), 133.3 (C_{IV}), 137.7 (CH), 148.3 (C_{IV}), 168.9 (CO).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 284.01, Found: 285.10, [M+H]⁺, 283.10, [M-H]⁻, *t*_R = 2.93 min.

Synthesis of *N*-benzyl-5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-pyrazole-4-carboxamide (25)

A mixture of ethyl 5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-pyrazole-4-carboxylate (1 eq., 2.30 g, 8.07 mmol) and NaOH (10 eq., 3.20 g, 80.70 mmol) in ethanol (90 mL) was stirred at reflux for 16 h. After concentration under vacuum, the residue was taken up in water and extracted with DCM. The aqueous layer was acidified with aq. 1.0 M HCl solution and extracted with EtOAc. The organic layer was dried over MgSO₄, concentrated under vacuum and used without purification in the next step.

5-(3,4-Dichlorophenyl)-1*H*-pyrazole-4-carboxylic acid (1 eq., 1g, 3.89 mmol), EDCI (1.2 eq., 0.72 g, 4.67 mmol) and HOBT (1.2 eq., 0.63 g, 4.67 mmol) were dissolved in DMF (100 mL). After cooling to 5 °C, benzylamine (1 eq., 0.42 g, 0.42 mL, 3.89 mmol) was added to the mixture and the solution was stirred overnight at room temperature. After concentration under vacuum, the residue was taken up in EtOAc and washed with water. The organic layer was dried over MgSO₄, concentrated under vacuum and purified by column chromatography with Cyclohexane/EtOAc (10:0 → 50:50, v/v).



C₁₇H₁₃Cl₂N₃O

MW = 346.21 g/mol

Yield: 57%

Aspect: Orange powder Mp = 174-176°C

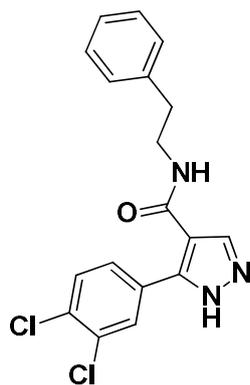
¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 4.40 (d, 2H, ³J = 5.8 Hz), 7.30 (m, 5H), 7.61 (d, 1H, ³J = 8.4 Hz), 7.70 (s, 1H), 7.80 (dd, 1H, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.8 Hz), 8.09 (d, 1H, ⁴J = 1.8 Hz), 8.29 (d, 1H, ³J = 1.1 Hz), 8.65 (t, 1H, ³J = 5.8 Hz).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 42.7 (CH₂), 115.3 (C_{IV}), 127.2 (CH), 127.7 (2 CH), 128.7 (2 CH), 128.9 (CH), 130.4 (CH), 130.5 (CH), 130.9 (2 C_{IV}), 132.0 (CH), 134.5 (C_{IV}), 140.1 (C_{IV}), 147.8 (C_{IV}), 163.5 (CO).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 345.05, Found: 346.10, [M+H]⁺, 344.20, [M-H]⁻, t_R = 2.74 min.

Synthesis of 5-(3,4-dichlorophenyl)-*N*-phenethyl-1*H*-pyrazole-4-carboxamide (26)

5-(3,4-dichlorophenyl)-1*H*-pyrazole-4-carboxylic acid (1 eq., 1.30 g, 5.05 mmol), EDCI (1.2 eq., 0.94 g, 6.07 mmol) and HOBt (1.2 eq., 0.92 g, 6.07 mmol) were dissolved in DMF (125 mL). After cooling to 5°C, phenethylamine (1 eq., 0.61 g, 0.64 mL, 5.05 mmol) was added and the mixture was stirred overnight. After concentration under vacuum, the residue was taken up in EtOAc and washed with water. The organic layer was dried over MgSO₄, concentrated under vacuum and purified by column chromatography with Cyclohexane/EtOAc (10:0 → 50:50, v/v).



C₁₈H₁₅Cl₂N₃O

MW = 360.24 g/mol

Yield: 85%

Aspect: Yellow solid

Mp = 201-202°C

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.89 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz), 3.56 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz); 7.15-7.33 (m, 5 H), 7.61 (d, 1H, ³J = 8.4 Hz), 7.75 (dd, 1H, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.9 Hz), 8.07 (d, 1H, ⁴J = 1.9 Hz), 8.15 (s, 1 H)

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 2.79 (t, 2 H, ³J = 7.2 Hz), 3.55 (t, 2 H, ³J = 7.2 Hz), 7.20-7.32 (m, 5 H), 7.53 (m, 2 H), 7.87 (t, 1 H, ⁴J = 1.2 Hz), 7.98 (s, 1 H).

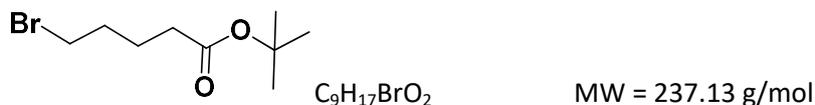
¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 36.5 (CH₂), 42.1 (CH₂), 116.3 (C_{IV}), 127.4 (CH), 127.8 (C_{IV}), 127.9 (C_{IV}), 129.5 (CH), 129.5 (2 CH), 129.8 (C_{IV}), 129.9 (2 CH), 131.4 (CH), 131.5 (CH), 133.2 (C_{IV}), 133.3 (C_{IV}), 140.5 (CH), 165.9 (CO).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 359.06, Found: 360.16, [M+H]⁺, 358.27, [M-H]⁻, t_R = 2.82 min.

Synthesis of tert-butyl 5-bromopentanoate (27)

To a solution of magnesium sulfate (1.9 eq., 0.53 g, 21.50 mmol) in DCM (65 mL), sulfuric acid (1.1 eq., 1.21 g, 0.66 mL, 12.40 mmol) was added. The mixture was stirred for 15 min and then 5-bromovaleric acid (1 eq., 2 g, 11 mmol) was added, followed by *tert*-butanol (5 eq., 0.41 g, 5.3 mL, 55.80 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature. After filtration of magnesium

sulfate, the organic phase was washed with aq. 1.0 M NaHCO₃ solution and water, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum.



Yield: 96%

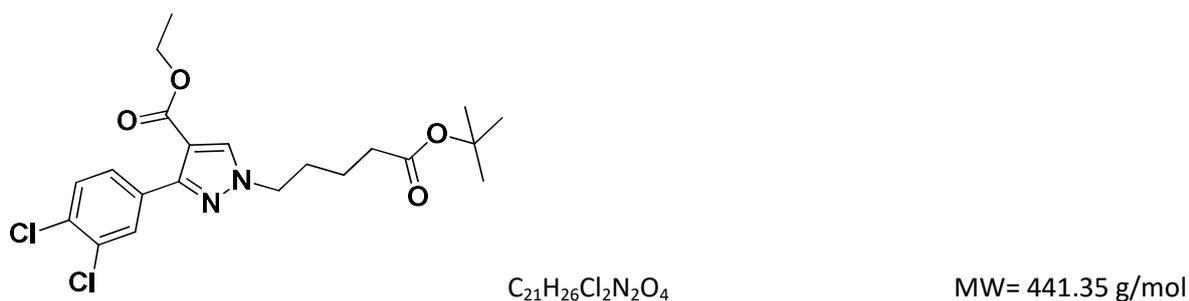
Aspect: Colorless oil

NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.44 (s, 9 H), 1.65-1.79 (m, 2 H), 1.81-1.96 (m, 2 H), 2.25 (t, 2 H, ³J = 7.2 Hz), 3.41 (t, 2 H, ³J = 6.6 Hz).

General procedure for the synthesis of ethyl (4-(benzyl or phenethylcarbamoyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazol-1-yl)alkanoate and N-benzyl or phenethyl-3-(3,4-dichlorophenyl)-1-(ω -(1,3-dioxoisindolin-2-yl)alkyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide

A solution of N-benzyl-5-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide (1 eq., 0.30 g, 0.87 mmol), K₂CO₃ (2 eq., 0.24 g, 1.73 mmol) and the convenient ethyl ω -bromoalkylcarboxylate or N-(ω -bromoalkyl)phthalimide (1 eq., 0.87 mmol) in anhydrous acetonitrile (15 mL) and under a nitrogen atmosphere was stirred at reflux overnight and concentrated under reduced pressure. The residue was taken up in EtOAc and washed with water. The organic layer was dried over MgSO₄, concentrated under vacuum and purified by column chromatography (DCM/MeOH 98/2)

Ethyl 1-(5-(tert-butoxy)-5-oxopentyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate (28)

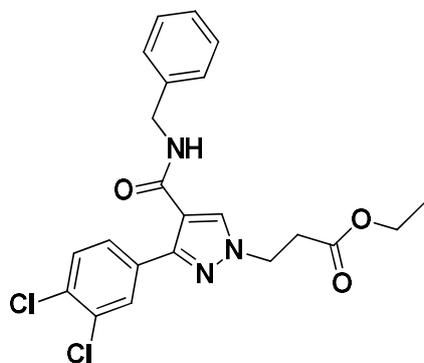


Yield: 28%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.14 (s, 9 H), 1.28 (t, 3 H, ³J = 7.1 Hz), 1.60 (m, 2 H), 1.92 (m, 2 H), 2.25 (t, 2 H, ³J = 7.3 Hz), 4.13 (t, 2 H, ³J = 6.8 Hz), 4.23 (q, 2 H, ³J = 7.1 Hz), 7.45 (d, 1 H, ³J = 8.3 Hz), 7.68 (dd, 1 H, ³J = 8.3 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 7.94 (d, 1 H, ⁴J = 2.0 Hz), 7.96 (s, 1 H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.3 (CH_3), 21.9 (CH_2), 28.1 (3 CH_3), 29.3 (CH_2), 34.7 (CH_2), 52.4 (CH_2), 60.3 (CH_2), 80.4 (C_{IV}), 111.7 (C_{IV}), 128.7 (CH), 129.7 (CH), 131.1 (CH), 131.8 (C_{IV}), 132.3 (C_{IV}), 132.5 (C_{IV}), 135.2 (CH), 150.4 (C_{IV}), 162.8 (CO), 172.4 (CO).

Ethyl 3-(4-(benzylcarbamoyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazol-1-yl)propanoate (29)



$\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_3$

MW = 446.33 g/mol

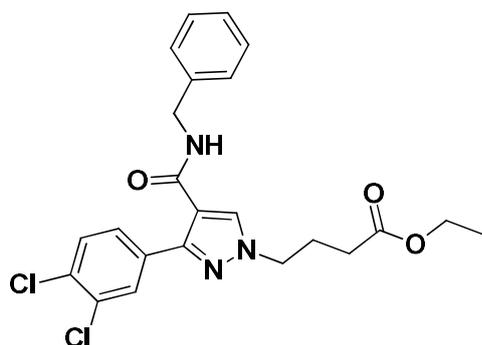
Yield: 52%

^1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ = 1.25 (t, 3H, 3J = 7.2 Hz), 2.94 (t, 2H, 3J = 6.4 Hz), 4.15 (q, 2H, 3J = 7.2 Hz), 4.44 (t, 2H, 3J = 6.4 Hz), 4.51 (d, 2H, 3J = 5.9 Hz), 5.94 (s, 1H), 7.32 (m, 5H), 7.45 (d, 1H, 3J = 8.2 Hz), 7.59 (dd, 1H, 3J = 8.2 Hz, 4J = 1.9 Hz), 7.89 (d, 1H, 4J = 1.9 Hz), 7.92 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_2Cl_2): δ = 13.9 (CH_3), 34.3 (CH_2), 43.5 (CH_2), 47.9 (CH_2), 60.9 (CH_2), 115.9 (C_{IV}), 127.4 (CH), 127.6 (2 CH), 128.2 (CH), 128.5 (C_{IV}), 128.6 (2 CH), 130.3 (CH), 130.5 (CH), 132.3 (C_{IV}), 132.8 (C_{IV}), 133.1 (CH), 138.4 (C_{IV}), 147.8 (C_{IV}), 162.6 (CO), 170.6 (CO).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 445.10, Found: 460.20, $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_{R} = 3.32 min.

Ethyl 4-(4-(benzylcarbamoyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazol-1-yl)butanoate (30)



$\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_3$

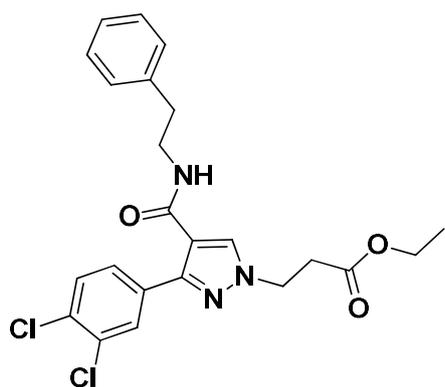
MW = 460.35 g/mol

Yield : 23%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.26 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz), 2.23 (m, 2 H), 2.35 (m, 2 H), 4.15 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz), 4.22 (t, 2H, ³J = 6.7 Hz), 4.51 (d, 2H, ³J = 5.7 Hz), 5.80 (s, 1 H), 7.23 (m, 2 H), 7.33 (m, 3 H), 7.39 (d, 1H, ³J = 8.3 Hz), 7.48 (dd, 1H, ³J = 8.3 Hz, ⁴J = 1.9 Hz), 7.80 (d, 1H, ⁴J = 1.8 Hz), 7.90 (s, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 14.2 (CH₃), 25.3 (CH₂), 30.8 (CH₂), 43.8 (CH₂), 51.6 (CH₂), 60.7 (CH₂), 116.2 (C_{IV}), 127.6 (CH), 127.8 (2 CH), 128.2 (CH), 128.8 (2 CH), 130.5 (CH), 130.7 (CH), 132.3 (C_{IV}), 132.8 (C_{IV}), 132.9 (C_{IV}), 133.2 (CH), 137.8 (C_{IV}), 147.7 (C_{IV}), 162.6 (CO), 172.4 (CO).

Ethyl 3-(3-(3,4-dichlorophenyl)-4-(phenethylcarbamoyl)-1H-pyrazol-1-yl)propanoate (31)



C₂₃H₂₃Cl₂N₃O₃

MW = 460.35 g/mol

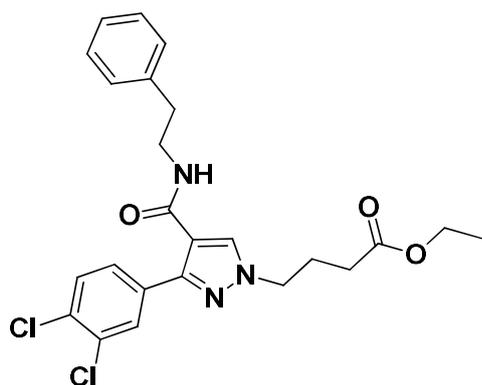
Yield: 52%

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ = 1.25 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz), 2.83 (t, 2H, ³J = 6.9 Hz), 2.93 (t, 2H, ³J = 6.4 Hz), 3.60 (q, 2H, ³J = 6.8 Hz), 4.15 (q, 2 H, ³J = 7.1 Hz), 4.41 (t, 2 H, ³J = 6.4 Hz), 5.62 (m, 1 H), 7.15 (m, 2 H), 7.20-7.33 (m, 3 H), 7.42 (d, 1 H, ³J = 8.3 Hz), 7.49 (dd, 1 H, ³J = 8.3 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 7.83 (d, 1 H, ⁴J = 2.0 Hz), 7.83 (s, 1 H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₂Cl₂): δ = 13.9 (CH₃), 34.3 (CH₂), 35.3 (CH₂), 40.5 (CH₂), 47.9 (CH₂), 60.9 (CH₂), 116.1 (C_{IV}), 126.4 (CH), 128.0 (CH), 128.5 (2 CH), 128.6 (2 CH), 130.3 (CH), 130.4 (CH), 132.2 (C_{IV}), 132.3 (C_{IV}), 132.8 (C_{IV}), 133.1 (CH), 138.8 (C_{IV}), 147.6 (C_{IV}), 162.5 (CO), 170.4 (CO).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 459.11, Found: 460.20, [M+H]⁺, *t_R* = 3.30 min.

Ethyl 4-(3-(3,4-dichlorophenyl)-4-(phenethylcarbamoyl)-1H-pyrazol-1-yl)butanoate (32)



$C_{24}H_{25}Cl_2N_3O_3$

MW = 474.38 g/mol

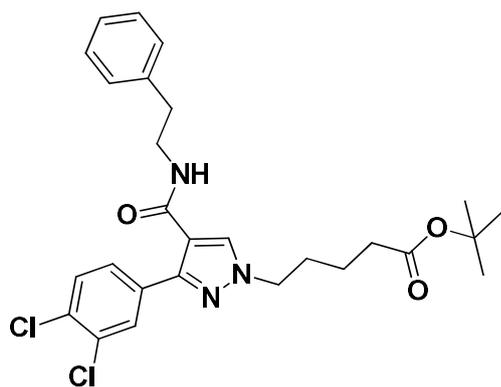
Yield: 10%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.20 (t, 3H, 3J = 7.1 Hz), 2.03 (m, 2 H), 2.22 (t, 2 H, 3J = 6.5 Hz), 2.76 (t, 2 H, 3J = 6.5 Hz), 3.57 (q, 2 H, 3J = 6.1 Hz), 3.97 (t, 2 H, 3J = 6.8 Hz), 4.04 (q, 2 H, 3J = 7.1 Hz), 5.40 (t, 1 H, 3J = 5.1 Hz), 7.06 (m, 2 H), 7.13 (dd, 1 H, 3J = 8.2 Hz, 4J = 2.0 Hz), 7.18-7.32 (m, 3 H), 7.43 (d, 1 H, 4J = 2.0 Hz), 7.47 (d, 1 H, 3J = 8.2 Hz), 7.84 (s, 1 H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.1 (CH_3), 25.1 (CH_2), 30.7 (CH_2), 35.3 (CH_2), 40.1 (CH_2), 48.6 (CH_2), 60.6 (CH_2), 116.8 (C_{IV}), 126.6 (CH), 128.5 (2 CH), 128.6 (2 CH), 129.3 (CH), 131.0 (CH), 131.7 (CH), 133.4 (C_{IV}), 134.5 (C_{IV}), 138.5 (C_{IV}), 138.5 (C_{IV}), 139.4 (CH), 140.3 (C_{IV}), 162.2 (CO), 172.3 (CO).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 473.13, Found: 474.20, $[M+H]^+$, t_R = 3.18 min.

Tert-butyl 5-(3-(3,4-dichlorophenyl)-4-(phenethylcarbamoyl)-1H-pyrazol-1-yl)pentanoate (33)



$C_{27}H_{31}Cl_2N_3O_3$

MW = 516.46 g/mol

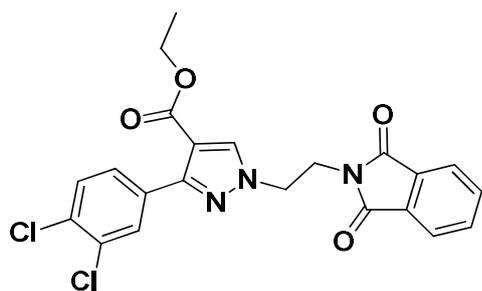
Yield: 36%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.44 (s, 9 H), 1.60 (quin, 2 H, 3J = 7.4 Hz), 1.89 (quin, 2 H, 3J = 7.4 Hz), 2.23 (t, 2 H, 3J = 7.1 Hz), 2.78 (t, 2 H, 3J = 6.6 Hz), 3.60 (q, 2 H, 3J = 6.0 Hz), 4.10 (t, 2 H, 3J = 6.8 Hz), 5.67 (t, 1 H, 3J = 5.4 Hz), 7.07-7.29 (m, 5 H), 7.33 (m, 2 H), 7.76 (m, 2 H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 22.0 (CH₂), 28.1 (3 CH₃), 29.4 (CH₂), 34.7 (CH₂), 35.2 (CH₂), 40.5 (CH₂), 52.4 (CH₂), 80.5 (C_{IV}), 116.1 (C_{IV}), 126.6 (CH), 128.1 (CH), 128.5 (2 CH), 128.7 (2 CH), 130.5 (CH), 130.7 (CH), 132.5 (C_{IV}), 132.8 (C_{IV}), 132.8 (C_{IV}), 133.0 (C_{IV}), 138.5 (CH), 147.4 (C_{IV}), 162.8 (CO), 172.4 (CO).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 515.17, Found: 516.29, [M+H]⁺, t_R = 3.65 min.

Ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)ethyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate (34)



$C_{22}H_{17}Cl_2N_3O_4$

MW = 458.29 g/mol

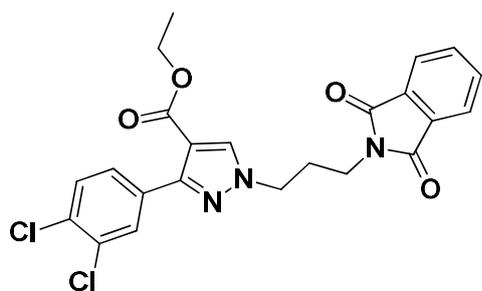
Yield: 54%

1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ = 1.28 (t, 3H, 3J = 7.2 Hz); 4.15-4.27 (m, 4H), 4.47 (t, 2H, 3J = 5.4 Hz), 7.40 (d, 1 H, 3J = 8.3 Hz), 7.55 (dd, 1 H, 3J = 8.3 Hz, 4J = 2.0 Hz), 7.73-7.80 (m, 3 H), 7.80-7.87 (m, 2 H), 8.02 (s, 1 H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_2Cl_2): δ = 13.9 (CH_3), 37.8 (CH_2), 49.9 (CH_2), 60.3 (CH_2), 112.3 (C_{IV}), 123.3 (2 CH), 128.5 (CH), 129.5 (CH), 130.8 (CH), 131.5 (C_{IV}), 131.9 (2 C_{IV}), 132.0 (C_{IV}), 132.5 (C_{IV}), 134.0 (C_{IV}), 134.2 (2 CH), 135.9 (CH), 150.5 (C_{IV}), 162.5 (CO), 167.7 (2 CO).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 457.06, Found: 458.20, $[M+H]^+$, t_R = 3.47 min.

Ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate (35)



$C_{23}H_{19}Cl_2N_3O_4$

MW = 472.32 g/mol

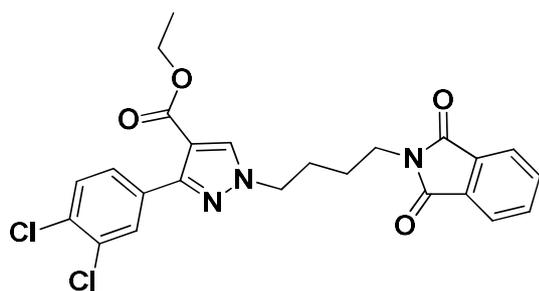
Yield: 63%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.31 (t, 3 H, 3J = 7.1 Hz), 2.38 (quin, 2 H, 3J = 6.6 Hz), 3.81 (t, 2 H, 3J = 6.3 Hz), 4.21 (t, 2 H, 3J = 7.1 Hz), 4.25 (q, 2 H, 3J = 7.1 Hz), 7.44 (d, 1 H, 3J = 8.4 Hz), 7.64 (dd, 1H, 3J = 8.4 Hz, 4J = 2.0 Hz), 7.68-7.74 (m, 2 H), 7.77-7.84 (m, 2 H), 7.88 (d, 1 H, 4J = 2.0 Hz), 8.08 (s, 1 H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3 (CH_3), 28.6 (CH_2), 35.3 (CH_2), 50.4 (CH_2), 60.2 (CH_2), 111.6 (C_{IV}), 123.1 (2 CH), 128.6 (CH), 129.6 (CH), 131.0 (CH), 131.7 (2 C_{IV}), 132.2 (C_{IV}), 132.4 (C_{IV}), 133.9 (C_{IV}), 134.0 (2 CH), 135.9 (CH), 150.4 (C_{IV}), 162.6 (CO), 168.2 (2 CO).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 471.08, Found: 472.10, $[M+H]^+$, t_R = 3.42 min.

Ethyl 3-(3,4-dichlorophenyl)-1-(4-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)butyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate (36)



$C_{24}H_{21}Cl_2N_3O_4$

MW = 486.35 g/mol

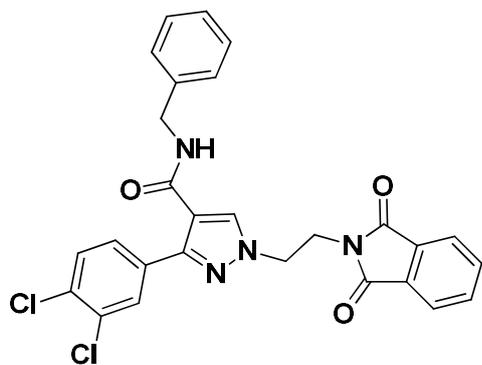
Yield: 50%

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.32 (t, 3 H, 3J = 7.1 Hz), 1.71-1.81 (m, 2H), 1.91-2.04 (m, 2 H), 3.76 (t, 2 H, 3J = 6.9 Hz), 4.21 (t, 2 H, 3J = 6.4 Hz), 4.27 (q, 2 H, 3J = 7.1 Hz), 7.46 (d, 1 H, 3J = 8.4 Hz), 7.68 (dd, 1 H, 3J = 8.4 Hz, 4J = 2.0 Hz), 7.73 (m, 2 H), 7.85 (m, 2 H), 7.94 (d, 1 H, 4J = 2.0 Hz), 8.08 (s, 1 H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3 (CH_3), 25.5 (CH_2), 27.2 (CH_2), 37.0 (CH_2), 52.0 (CH_2), 60.3 (CH_2), 111.8 (C_{IV}), 123.3 (2 CH), 128.6 (CH), 129.7 (CH), 131.1 (CH), 131.8 (C_{IV}), 132.0 (2 C_{IV}), 132.3 (C_{IV}), 132.4 (C_{IV}), 134.0 (2 CH), 135.3 (CH), 150.6 (C_{IV}), 162.7 (CO), 168.4 (2 CO).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 485.09, Found: 486.10, $[M+H]^+$, t_R = 3.56 min.

N-Benzyl-3-(3,4-dichlorophenyl)-1-(2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)ethyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide (37)



$C_{27}H_{20}Cl_2N_4O_3$

MW = 519.38 g/mol

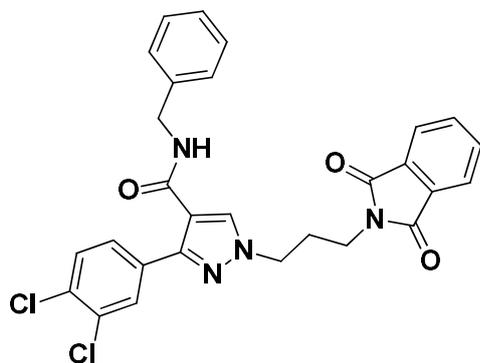
Yield: 47%

1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ = 4.14 (t, 2H, 3J = 7.1 Hz), 4.46 (m, 4H), 7.33 (m, 6 H), 7.41 (dd, 1 H, 3J = 8.3 Hz, 4J = 1.9 Hz), 7.63 (d, 1 H, 4J = 1.9 Hz), 7.75 (m, 2 H), 7.82 (m, 2 H), 7.88 (s, 1 H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_2Cl_2): δ = 37.9 (CH_2), 43.5 (CH_2), 49.8 (CH_2), 116.6 (C_{IV}), 123.2 (2 CH), 127.4 (CH), 127.6 (2 CH), 128.1 (CH), 128.6 (2 CH), 130.1 (CH), 130.3 (CH), 131.8 (2 C_{IV}), 132.2 (2 C_{IV}), 132.5 (C_{IV}), 132.9 (CH), 134.2 (2 CH), 138.3 (C_{IV}), 147.9 (C_{IV}), 162.4 (CO), 167.7 (2 CO).

N-Benzyl-3-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide

(38)



$C_{28}H_{22}Cl_2N_4O_3$

MW = 533.41 g/mol

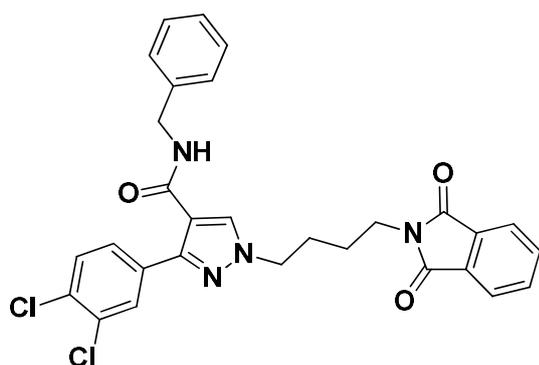
Yield: 48%

1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ = 2.38 (m, 2H), 3.77 (t, 2H, 3J = 6.3 Hz), 4.21 (t, 2H, 3J = 6.6 Hz), 4.51 (d, 2H, 3J = 5.8 Hz), 6.00 (m, 1H, NH), 7.36 (m, 5 H), 7.41 (d, 1H, 3J = 8.4 Hz), 7.53 (dd, 1H, 3J = 8.4 Hz, 4J = 2.0 Hz), 7.67 (m, 2H); 7.73 (m, 2H), 7.78 (d, 1H, 4J = 2.0 Hz), 7.90 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_2Cl_2): δ = 28.3 (CH_2), 35.4 (CH_2), 43.5 (CH_2), 50.4 (CH_2), 115.7 (C_{IV}), 122.9 (2 CH), 127.4 (CH), 127.7 (2 CH), 128.0 (CH), 128.6 (2 CH), 130.1 (CH), 130.3 (CH), 131.9 (2 C_{IV}), 132.1 (2 C_{IV}), 132.7 (C_{IV}), 133.1 (CH), 133.9 (2 CH), 138.5 (C_{IV}), 147.6 (C_{IV}), 162.6 (CO), 168.2 (2 CO).

N-Benzyl-3-(3,4-dichlorophenyl)-1-(4-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)butyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide

(39)



$C_{29}H_{24}Cl_2N_4O_3$

MW = 547.43 g/mol

Yield: 82%

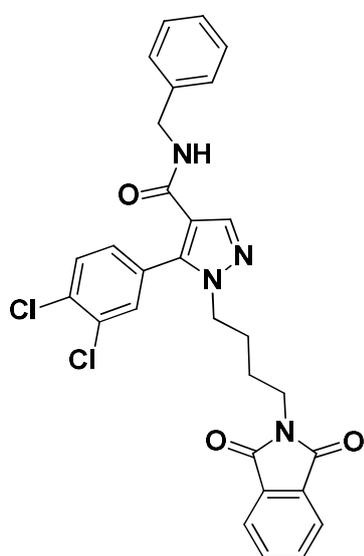
1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 1.59 (m, 2 H), 1.83 (m, 2 H), 3.60 (t, 2 H, 3J = 6.7 Hz), 4.17 (t, 2 H, 3J = 6.7 Hz), 4.39 (d, 2 H, 3J = 6.0 Hz), 7.30 (m, 5 H), 7.58 (d, 1 H, 3J = 8.4 Hz), 7.74 (dd, 1 H, 3J = 8.6 Hz, 4J = 1.9 Hz), 7.81 (m, 4 H), 8.03 (d, 1 H, 4J = 1.9 Hz), 8.25 (s, 1 H), 8.63 (t, 1 H, 3J = 6.0 Hz).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 25.5 (CH₂), 27.4 (CH₂), 37.3 (CH₂), 42.7 (CH₂), 51.6 (CH₂), 115.6 (C_{IV}), 123.4 (2 CH), 127.2 (CH), 127.7 (2 CH), 128.7 (2 CH), 128.8 (CH), 130.4 (CH), 130.5 (CH), 130.6 (C_{IV}), 130.9 (C_{IV}), 132.1 (2 C_{IV}), 133.5 (CH), 134.1 (C_{IV}), 134.8 (2 CH), 140.0 (C_{IV}), 147.5 (C_{IV}), 163.1 (CO), 168.5 (2 CO).

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ = 1.60 (m, 2 H), 1.79 (m, 2 H), 3.59 (t, 2 H, ³*J* = 6.9 Hz), 3.99 (t, 2 H, ³*J* = 7.1 Hz), 4.40 (d, 2 H, ³*J* = 5.9 Hz), 6.05 (t, 1 H, ³*J* = 5.9 Hz), 7.17 (dd, 1 H, ³*J* = 7.8 Hz, ⁴*J* = 1.4 Hz), 7.23-7.35 (m, 4 H), 7.50-7.58 (m, 2 H), 7.71-7.78 (m, 3 H), 7.78-7.84 (m, 2 H), 7.85 (s, 1 H)

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 546.12, Found: 547.10, [M+H]⁺, *t_R* = 3.37 min.

N-benzyl-5-(3,4-dichlorophenyl)-1-(4-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)butyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide (39')



C₂₉H₂₄Cl₂N₄O₃

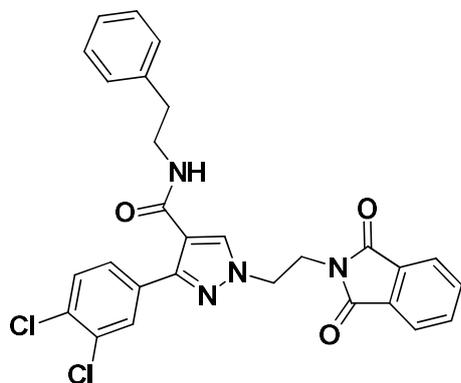
MW = 547.43 g/mol

Yield: 9%

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ = 1.58 (m, 2 H), 1.79 (m, 2 H), 3.60 (t, 2 H, ³*J* = 7.0 Hz), 3.99 (t, 2 H, ³*J* = 7.0 Hz), 4.42 (d, 2 H, ³*J* = 5.8 Hz), 7.17 (dd, 1 H, ³*J* = 8.0 Hz, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.22-7.37 (m, 5 H), 7.52 (d, 1 H, ⁴*J* = 1.8 Hz), 7.54 (d, 1 H, ³*J* = 8.0 Hz), 7.72-7.78 (m, 2 H), 7.79-7.83 (m, 2 H), 7.84 (s, 1 H)

¹³C NMR (75 MHz, CD₂Cl₂): δ = 25.5 (CH₂), 27.2 (CH₂), 37.1 (CH₂), 43.2 (CH₂), 49.1 (CH₂), 116.7 (C_{IV}), 123.1 (2 CH), 127.2 (CH), 127.4 (2 CH), 128.5 (2 CH), 129.3 (C_{IV}), 129.7 (CH), 130.9 (CH), 132.0 (CH), 132.1 (2 C_{IV}), 132.9 (C_{IV}), 133.8 (C_{IV}), 133.9 (2 CH), 138.6 (C_{IV}), 138.7 (CH), 140.5 (C_{IV}), 162.1 (CO), 168.2 (2 CO).

3-(3,4-Dichlorophenyl)-1-(2-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)ethyl)-N-phenethyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (40)



$C_{28}H_{22}Cl_2N_4O_3$

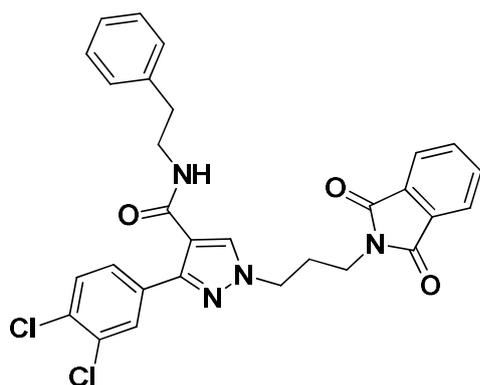
MW = 533.41 g/mol

Yield: 20%

1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ = 2.80 (t, 2H, 3J = 7.0 Hz), 3.56 (q, 2H, 3J = 6.4 Hz), 4.14 (t, 2H, 3J = 5.6 Hz), 4.43 (t, 2H, 3J = 6.4 Hz), 5.56 (t, 1H, 3J = 5.4 Hz), 7.13 (dd, 1H, 3J = 8.0 Hz, 4J = 1.7 Hz), 7.2-7.3 (m, 6H), 7.55 (d, 1H, 4J = 1.7 Hz), 7.74-7.80 (m, 3H), 7.80-7.86 (m, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_2Cl_2): δ = 28.5 (CH_2), 37.9 (CH_2), 41.6 (CH_2), 49.9 (CH_2), 116.2 (C_{IV}), 123.1 (2 CH), 127.4 (CH), 127.9 (2 CH), 128.8 (2 CH), 130.2 (CH), 130.3 (CH), 131.8 (2 C_{IV}), 132.2 (2 C_{IV}), 132.6 (C_{IV}), 132.9 (CH), 134.0 (2 CH), 138.4 (C_{IV}), 147.6 (C_{IV}), 162.5 (CO), 167.3 (2 CO).

3-(3,4-Dichlorophenyl)-1-(3-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propyl)-N-phenethyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (41)



$C_{29}H_{24}Cl_2N_4O_3$

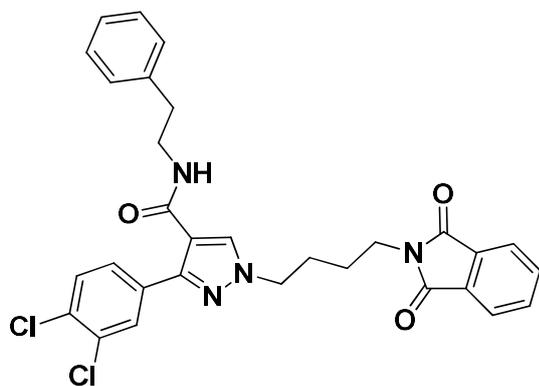
MW = 547.43 g/mol

Yield: 79%

1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ = 2.36 (quin, 2H, 3J = 6.4 Hz), 2.85 (t, 2H, 3J = 6.9 Hz), 3.60 (q, 2H, 3J = 6.9 Hz), 3.67 (t, 2H, 3J = 6.4 Hz), 4.20 (t, 2H, 3J = 6.6 Hz), 5.62 (m, 1H), 6.13-6.35 (m, 5H), 7.40 (d, 1H, 3J = 8.3 Hz), 7.45 (dd, 1H, 3J = 8.3 Hz, 4J = 1.9 Hz), 7.68-7.72 (m, 2H), 7.75 (d, 1H, 4J = 1.9 Hz), 7.76-7.80 (m, 2H), 7.85 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_2Cl_2): δ = 28.4 (CH_2), 35.4 (2 CH_2), 40.5 (CH_2), 50.4 (CH_2), 116.0 (C_{IV}), 123.0 (2 CH), 126.5 (CH), 127.9 (CH), 128.5 (2 CH), 128.6 (2 CH), 130.2 (CH), 130.4 (CH), 131.9 (2 C_{IV}), 132.2 (2 C_{IV}), 132.8 (C_{IV}), 133.1 (CH), 133.9 (2 CH), 138.9 (C_{IV}), 147.5 (C_{IV}), 162.6 (CO), 168.3 (2 CO).

3-(3,4-Dichlorophenyl)-1-(4-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)butyl)-N-phenethyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (42)



$\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_3$ MW = 561.46 g/mol

Yield: 31%

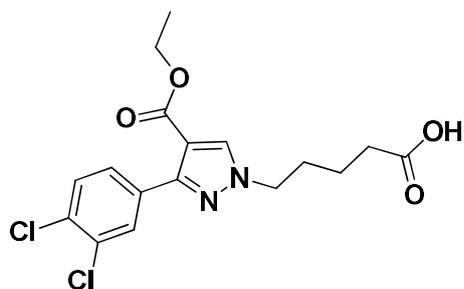
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.72 (quin, 2 H, 3J = 6.9 Hz), 1.95 (quin, 2 H, 3J = 6.9 Hz), 2.83 (t, 2 H, 3J = 6.9 Hz), 3.63 (q, 2 H, 3J = 6.6 Hz), 3.72 (t, 2 H, 3J = 7.0 Hz), 4.18 (t, 2 H, 3J = 6.9 Hz), 5.66 (t, 1 H, 3J = 5.1 Hz), 7.09 (m, 2 H), 7.21-7.30 (m, 6 H), 7.35 (s, 1 H), 7.68-7.77 (m, 2 H), 7.80-7.87 (m, 2 H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 25.6 (CH_2), 27.4 (CH_2), 35.4 (CH_2), 37.1 (CH_2), 40.6 (CH_2), 52.0 (CH_2), 116.3 (C_{IV}), 123.3 (2 CH), 126.6 (CH), 128.0 (CH), 128.5 (2 CH), 128.6 (2 CH), 130.5 (CH), 130.7 (CH), 131.9 (2 C_{IV}), 132.4 (C_{IV}), 132.8 (C_{IV}), 132.8 (C_{IV}), 133.2 (CH), 134.1 (2 CH), 138.6 (C_{IV}), 147.6 (C_{IV}), 162.9 (CO), 168.5 (2 CO).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 560.14, Found: 561.30, $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_{R} = 3.38 min.

5-(3-(3,4-Dichlorophenyl)-4-(ethoxycarbonyl)-1H-pyrazol-1-yl)pentanoic acid (43)

A solution of ethyl 1-(5-(tert-butoxy)-5-oxopentyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate (1 eq., 95 mg, 0.21 mmol) and TFA (25 eq., 0.42 mL, 5.38 mmol) in DCM (3 mL) was stirred overnight at room temperature. After washings with water, the organic phase was dried over magnesium sulfate and concentrated under vacuum. The residue dissolved in a small amount of MeOH was diluted with water and lyophilized.



$C_{17}H_{18}Cl_2N_2O_4$

MW = 385.24 g/mol

Yield: 80%

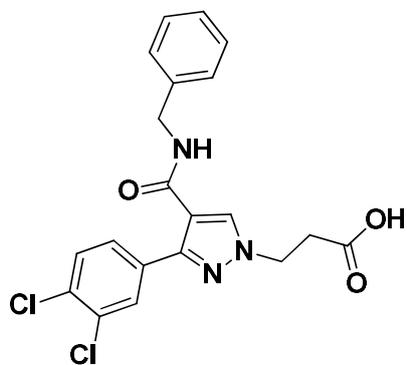
1H NMR (300 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 1.27 (t, 3 H, 3J = 7.0 Hz), 1.62 (quin, 2 H, 3J = 7.5 Hz), 2.04 (quin, 2 H, 3J = 7.2 Hz), 2.35 (t, 2 H, 3J = 7.4 Hz), 4.22 (q, 2 H, 3J = 7.1 Hz), 4.28 (t, 2 H, 3J = 5.2 Hz), 7.59 (d, 1 H, 3J = 8.5 Hz), 7.88 (dd, 1 H, 3J = 8.5 Hz, 4J = 2.0 Hz), 8.14 (d, 1 H, 4J = 2.0 Hz), 8.22 (brs, 1 H), 8.32 (s, 1 H).

^{13}C NMR (75 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 13.7 (CH_3), 21.6 (CH_2), 32.6 (CH_2), 39.9 (CH_2), 51.9 (CH_2), 29.8 (CH_2), 111.3 (C_{IV}), 128.9 (CH), 129.8 (CH), 130.8 (CH), 131.1 (C_{IV}), 131.1 (C_{IV}), 133.5 (C_{IV}), 136.1 (CH), 149.3 (C_{IV}), 162.5 (CO), 173.5 (CO).

General procedure for the synthesis of [4-(benzylcarbamoyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazol-1-yl]alkanoic acid

A solution of ethyl [4-(benzylcarbamoyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazol-1-yl]alkanoate (1 eq., 0.15 mmol) and NaOH (10 eq., 1.52 mmol) in EtOH (2 mL) was stirred at reflux for 16 h and concentrated under reduced pressure. The residue was taken up in water and extracted with DCM. The aqueous layer was acidified with aq. 1.0 M HCl solution and extracted with EtOAc. The organic phase was dried over magnesium sulfate and concentrated under vacuum.

3-(4-(Benzylcarbamoyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazol-1-yl)propanoic acid (44)



$C_{20}H_{17}Cl_2N_3O_3$

MW = 418.27 g/mol

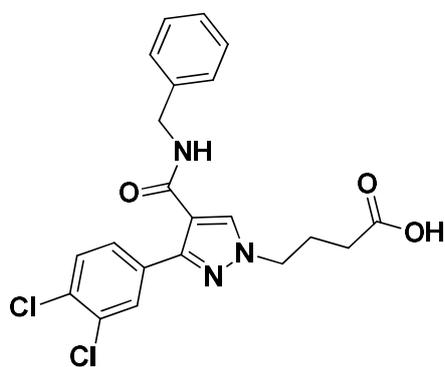
Yield: 43%

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.85 (t, 2 H, *J* = 6.6 Hz), 4.37 (m, 4 H), 7.28 (m, 5 H), 7.61 (d, 1 H, ³*J* = 8.4 Hz), 7.76 (dd, 1 H, ³*J* = 8.4 Hz, ⁴*J* = 2.0 Hz), 8.04 (d, 1 H, ⁴*J* = 2.0 Hz), 8.28 (s, 1 H), 8.66 (t, 1 H, ³*J* = 5.7 Hz, NH).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 34.6 (CH₂), 42.7 (CH₂), 48.2 (CH₂), 115.6 (C_{IV}), 127.2 (CH), 127.7 (2 CH), 128.8 (2 CH), 128.9 (CH), 130.4 (CH), 130.5 (CH), 130.7 (C_{IV}), 130.9 (C_{IV}), 131.0 (C_{IV}), 133.7 (CH), 134.1 (C_{IV}), 147.6 (C_{IV}), 160.0 (CO), 172.7 (CO).

HPLC: C₁₈ column *t*_R = 28.31 min, purity = 90%

4-(4-(Benzyloxycarbonyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazol-1-yl)butanoic acid (45)



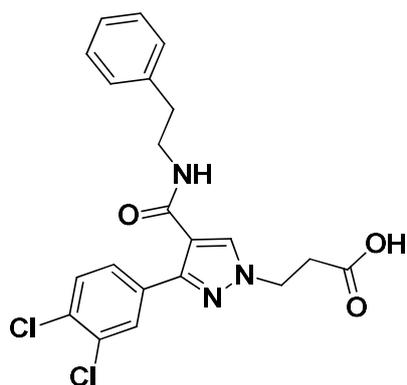
Yield: 91%

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.03 (m, 2 H), 2.26 (t, 2 H, ³*J* = 7.1 Hz), 4.18 (t, 2 H, ³*J* = 6.9 Hz), 4.39 (d, 2 H, ³*J* = 5.9 Hz), 7.30 (m, 5 H), 7.61 (d, 1 H, ³*J* = 8.3 Hz), 7.77 (dd, 1 H, ³*J* = 8.4 Hz, ⁴*J* = 2.0 Hz), 8.06 (d, 1 H, ⁴*J* = 2.0 Hz), 8.27 (s, 1 H), 8.66 (t, 1 H, ³*J* = 5.9 Hz, NH), 12.19 (brs, 1 H, OH).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 25.5 (CH₂), 30.9 (CH₂), 42.7 (CH₂), 51.4 (CH₂), 115.7 (C_{IV}), 127.2 (CH), 127.7 (2 CH), 128.7 (2 CH), 128.9 (CH), 130.4 (CH), 130.5 (CH), 130.7 (C_{IV}), 130.9 (C_{IV}), 133.5 (CH), 134.1 (C_{IV}), 140.0 (C_{IV}), 147.5 (C_{IV}), 163.1 (CO), 174.2 (CO).

HPLC: C₁₈ column *t*_R = 29.07 min, purity = 94%

3-(3-(3,4-Dichlorophenyl)-4-(phenethylcarbamoyl)-1H-pyrazol-1-yl)propanoic acid (46)



$C_{21}H_{19}Cl_2N_3O_3$

MW = 432.30 g/mol

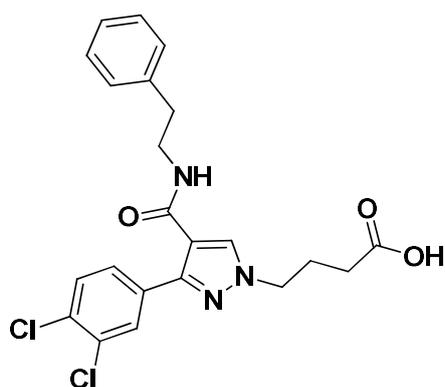
Yield: 64%

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2,68 (t, 2 H, 3J = 6.9 Hz), 2.80 (t, 2 H, 3J = 7.0 Hz), 3.39 (q, 2 H, 3J = 6.9 Hz), 4.30 (t, 2 H, 3J = 6.7 Hz), 7.14-7.32 (m, 5 H), 7.60 (d, 1 H, 3J = 8.4 Hz), 7.71 (dd, 1H, 3J = 8.4 Hz, 4J = 2.0 Hz), 8.02 (d, 1 H, 3J = 2.0 Hz), 8.16 (s, 1 H), 8.21 (t, 1 H, 3J = 5.7 Hz, NH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 34.3 (CH₂), 35.6 (CH₂), 49.2 (CH₂), 62.2 (CH₂), 116.1 (C_{IV}), 126.5 (CH), 128.0 (CH), 128.8 (2 CH), 129.1 (2 CH), 130.3 (CH), 130.5 (CH), 130.9 (C_{IV}), 132.3 (C_{IV}), 132.8 (C_{IV}), 133.4 (CH), 139.9 (C_{IV}), 146.0 (C_{IV}), 162.5 (CO), 170.4 (CO).

HPLC: C₁₈ column t_R = 29.04 min, purity = 99%

4-(3-(3,4-Dichlorophenyl)-4-(phenethylcarbamoyl)-1H-pyrazol-1-yl)butanoic acid (47)



$C_{22}H_{21}Cl_2N_3O_3$

MW = 446.33 g/mol

Yield: 55%

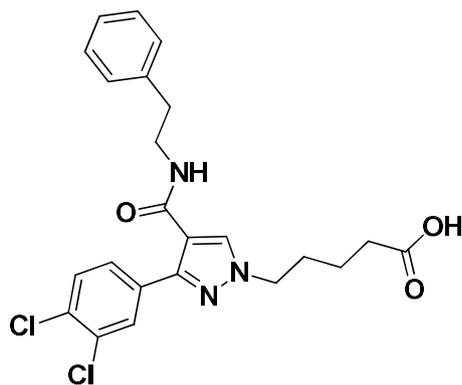
1H NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 2.02 (m, 2 H), 2.24 (t, 2 H, 3J = 6.8 Hz), 2.77 (t, 2 H, 3J = 7.1 Hz), 3.44 (m, 2 H), 4.07 (t, 2 H, 3J = 7.0 Hz), 7.08 (t, 1 H, 3J = 8.2 Hz), 7.12-7.30 (m, 5 H), 7.39 (dd, 1 H, 3J = 8.2 Hz, 4J = 2.0 Hz), 7,65 (d, 1 H, 3J = 8.2 Hz), 7.67 (d, 1 H, 4J = 2.0 Hz), 7.88 (s, 1 H).

¹³C NMR (75 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 24.9 (CH₂), 35.6 (CH₂), 40.3 (CH₂), 40.4 (CH₂), 48.3 (CH₂), 116.9 (C_{IV}), 126.1 (CH), 128.3 (2 CH), 128.6 (2 CH), 130.2 (C_{IV}), 130.3 (CH), 130.4 (CH), 131.7 (C_{IV}), 132.4 (CH), 132.6 (C_{IV}), 138.1 (CH), 139.6 (C_{IV}), 141.0 (C_{IV}), 161.8 (CO), 172.9 (CO).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 445.10, Found: 446.20, [M+H]⁺, *t_R* = 2.72 min.

HPLC: C₁₈ column *t_R* = 28.39 min, purity = 93%

5-(3-(3,4-Dichlorophenyl)-4-(phenethylcarbamoyl)-1H-pyrazol-1-yl)pentanoic acid (48)



C₂₃H₂₃Cl₂N₃O₃

MW = 460.35 g/mol

Yield: 60%

¹H NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 1.60 (quin, 2 H, ³*J* = 7,6 Hz), 1.94 (quin, 2 H, ³*J* = 7.8 Hz), 2.34 (t, 2 H, ³*J* = 7.4 Hz), 2.86 (t, 2 H, ³*J* = 7.1 Hz), 3.54 (m, 2 H), 4.21 (t, 2 H, ³*J* = 7.2 Hz), 7.14-7.31 (m, 5 H), 7.53 (d, 1 H, ³*J* = 8.3 Hz), 7.86 (dd, 1H, ³*J* = 8.3 Hz, ⁴*J* = 2.0 Hz), 8.07 (s, 1 H), 8.17 (d, 1 H, ⁴*J* = 2.0 Hz), 10.62 (brs, 1 H).

¹³C NMR (75 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 21.7 (CH₂), 32.6 (CH₂), 35.6 (CH₂), 40.5 (CH₂), 40.7 (CH₂), 51.8 (CH₂), 116.2 (C_{IV}), 126.1 (CH), 128.3 (2 CH), 128.4 (CH), 128.7 (2 CH), 129.9 (CH), 130.2 (CH), 130.8 (C_{IV}), 130.9 (C_{IV}), 131.2 (C_{IV}), 132.3 (CH), 134.1 (C_{IV}), 147.3 (C_{IV}), 162.9 (CO), 173.4 (CO).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 459.11, Found: 460.20, [M+H]⁺, *t_R* = 2.93 min.

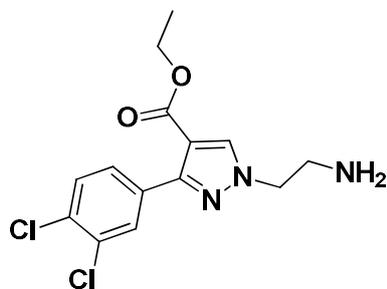
HPLC: C₁₈ column *t_R* = 29.80 min, purity = 95%

General procedure for the synthesis of Ethyl 1-(ω-aminoalkyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate ou 1-(ω-aminoalkyl)-N-benzyl-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide

Hydrazine monohydrate (10 eq., 0.33 g, 0.32 mL, 6.71 mmol) and *N*-benzyl or phenethyl-5-(3,4-dichlorophenyl)-1-[2-(1,3-dioxo-2,3,3a,7a-tetrahydro-1*H*-isoindol-2-yl)ethyl]-1*H*-pyrazole-4-carboxamide (1 eq., 0.67 mmol) were dissolved in EtOH (6 mL). The mixture was stirred at reflux for 3

hrs then concentrated under reduced pressure, taken up in EtOAc and washed with water. The organic layer was dried over MgSO₄, concentrated under vacuum and purified by column chromatography (DCM/MeOH 9/1) to give the desired product 50-58

Ethyl 1-(2-aminoethyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate (49)



C₁₄H₁₅Cl₂N₃O₂

MW = 328,19 g/mol

Yield: 88%

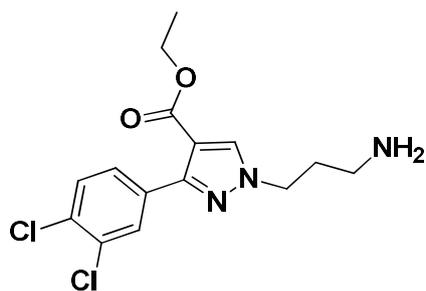
¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 1.31 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz), 3.14 (t, 2H, ³J = 5.5 Hz), 4.26 (t, 2H, ³J = 6.0 Hz), 4.26 (q, 2H, ³J = 7.1 Hz), 7.55 (d, 1H, ³J = 8.4 Hz), 7.75 (dd, 1H, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 8.00 (d, 1H, ⁴J = 2.0 Hz), 8.29 (s, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 14.6 (CH₃), 42.3 (CH₂), 55.6 (CH₂), 61.4 (CH₂), 112.7 (C_{IV}), 129.9 (CH), 130.9 (CH), 132.1 (CH), 132.6 (C_{IV}), 133.1 (C_{IV}), 134.1 (C_{IV}), 137.9 (CH), 151.6 (C_{IV}), 164.2 (CO).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 327.05, Found: 328.10, [M+H]⁺, t_R = 2.43 min.

HPLC: C₁₈ column t_R = 25.88 min, purity = 95%

Ethyl 1-(3-aminoethyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate (50)



C₁₅H₁₇Cl₂N₃O₂

MW = 342.22 g/mol

Yield: 83%

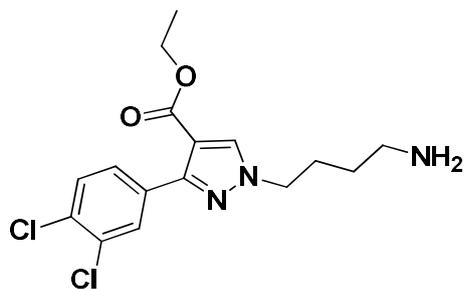
¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 1.29 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz), 2.05 (quin, 2H, ³J = 6.9 Hz), 2.68 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H), 4.26 (q, ³J = 7.2 Hz, 2H), 4.29 (t, ³J = 6.9 Hz, 2H), 7.56 (d, 1H, ³J = 8.4 Hz), 7.67 (dd, 1H, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.8 Hz), 7.94 (d, 1H, ⁴J = 1.8 Hz), 8.30 (s, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 14.3 (CH₃), 38.5 (CH₂), 41.0 (CH₂), 50.1 (CH₂), 60.3 (CH₂), 111.7 (C_{IV}), 128.6 (CH), 129.7 (CH), 131.1 (CH), 131.9 (C_{IV}), 132.4 (C_{IV}), 132.5 (C_{IV}), 135.4 (CH), 150.5 (C_{IV}), 162.8 (CO).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 341.07, Found: 342.10, [M+H]⁺, t_R = 2.48 min.

HPLC: C₁₈ column t_R = 25.91 min, purity = 99%

Ethyl 1-(4-aminobutyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate (51)



C₁₆H₁₉Cl₂N₃O₂

MW = 356.25 g/mol

Yield: 73%

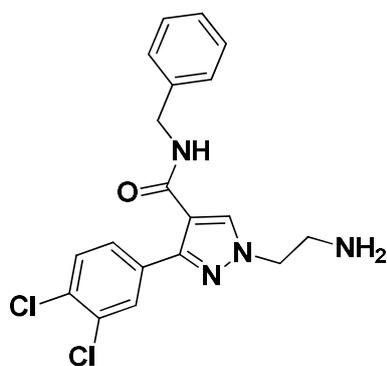
¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 1.23 (t, 3H, ³J = 7.1 Hz), 1.53 (quin, 2H, ³J = 6.9 Hz), 1.88 (quin, 2H, ³J = 6.9 Hz), 2.78 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz), 4.22 (t, ³J = 7.0 Hz, 2H), 4.26 (q, ³J = 7.2 Hz, 2H), 7.52 (d, 1H, ³J = 8.4 Hz), 7.76 (dd, 1H, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 8.03 (d, 1H, ⁴J = 2.0 Hz); 8.27 (s, 1H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ = 14.6 (CH₃), 28.5 (CH₂), 30.5 (CH₂), 41.9 (CH₂), 53.3 (CH₂), 61.4 (CH₂), 112.6 (C_{IV}), 130.0 (CH), 130.9 (CH), 132.2 (CH), 132.6 (C_{IV}), 133.2 (C_{IV}), 134.2 (C_{IV}), 137.4 (CH), 151.4 (C_{IV}), 164.3 (CO).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 355.09, Found: 356.10, [M+H]⁺, t_R = 2.55 min.

HPLC: C₁₈ column t_R = 25.99 min, purity = 99%

1-(2-Aminoethyl)-N-benzyl-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide (52)



C₁₉H₁₈Cl₂N₄O

MW = 389.28 g/mol

Yield: 27%

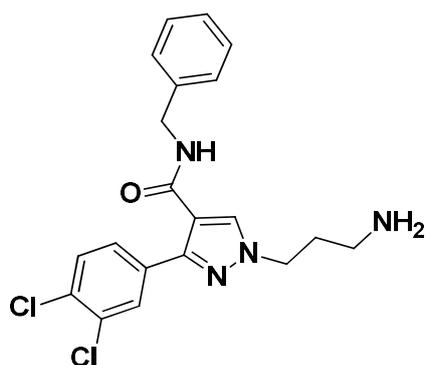
¹H NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 3.63 (t, 2 H, ³J = 6.1 Hz), 4.38 (t, 2 H, ³J = 6.1 Hz), 4.51 (d, 2 H, ³J = 6.0 Hz), 7.28 (m, 5 H), 7.52 (d, 1 H, ³J = 8.4 Hz), 7.75 (brs, 1 H), 7.86 (dd, 1 H, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 8.17 (s, 1 H), 8.18 (d, 1 H, ⁴J = 2.0 Hz).

¹³C NMR (75 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 42.6 (CH₂), 50.6 (CH₂), 53.4 (CH₂), 126.8 (CH), 127.5 (2 CH), 128.3 (2 CH), 128.5 (CH), 129.8 (CH), 130.4 (CH), 130.8 (C_{IV}), 131.1 (C_{IV}), 133.2 (CH), 133.3 (C_{IV}), 134.2 (C_{IV}), 139.7 (C_{IV}), 147.6 (C_{IV}), 162.8 (CO).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 388.09, Found: 389.20, [M+H]⁺, *t_R* = 2.52 min.

HPLC: C₁₈ column *t_R* = 25.24 min, purity = 99%

1-(3-Aminopropyl)-N-benzyl-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide (53)



C₂₀H₂₀Cl₂N₄O

MW = 403.30 g/mol

Yield: 97%

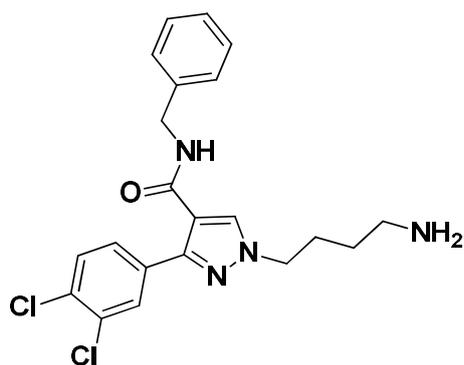
¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ = 2.00 (m, 2 H), 2.72 (t, 2H, ³J = 6.6 Hz), 4.26 (t, 2 H, ³J = 6.9 Hz), 4.51 (d, 2 H, ³J = 5.8 Hz), 6.02 (t, 1 H, ³J = 5.8 Hz), 7.25-7.93 (m, 5 H), 7.45 (d, 1 H, ³J = 8.3 Hz), 7.59 (dd, 1 H, ³J = 8.3 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 7.89 (d, 1 H, ⁴J = 2.0 Hz), 7.90 (s, 1 H) .

¹³C NMR (75 MHz, CD₂Cl₂): δ = 33.3 (CH₂), 38.7 (CH₂), 43.5 (CH₂), 50.0 (CH₂), 115.8 (C_{IV}), 127.4 (CH), 127.6 (2 CH), 128.2 (CH), 128.6 (2 CH), 130.3 (CH), 130.5 (CH), 132.2 (C_{IV}), 132.3 (C_{IV}), 132.6 (CH), 133.0 (C_{IV}), 138.4 (C_{IV}), 147.4 (C_{IV}), 162.7 (CO).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 402.10, Found: 403.20, [M+H]⁺, *t_R* = 2.54 min.

HPLC: C₁₈ column *t_R* = 25.43 min, purity = 99%

1-(4-Aminobutyl)-N-benzyl-3-(3,4-dichlorophenyl)-1H-pyrazole-4-carboxamide (54)



$C_{21}H_{22}Cl_2N_4O$

MW = 417.33 g/mol

Yield: 66%

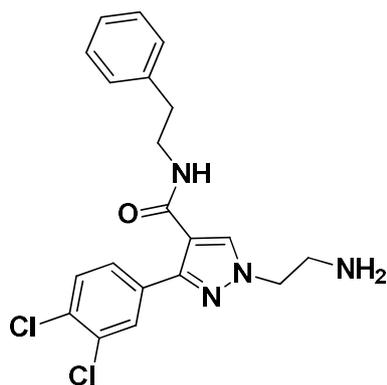
1H NMR (300 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 1.57 (m, 2 H), 1.95 (m, 2 H), 3.18 (t, 2 H, 3J = 6.7 Hz), 4.21 (t, 2 H, 3J = 7.0 Hz), 4.50 (m, 2 H), 7.15-7.42 (m, 5 H), 7.52 (d, 1 H, 3J = 8.4 Hz), 7.90 (dd, 1 H, 3J = 8.4 Hz, 4J = 2.0 Hz), 8.20 (m, 2 H), 8.72 (s, 1 H) .

^{13}C NMR (300 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 27.4 (CH_2), 27.9 (CH_2), 42.6 (CH_2), 49.9 (CH_2), 52.1 (CH_2), 115.9 (C_{IV}), 126.8 (CH), 127.6 (2 CH), 128.2 (C_{IV}), 128.3 (2 CH), 128.5 (C_{IV}), 129.9 (CH), 130.3 (CH), 130.4 (CH), 132.5 (CH), 134.2 (C_{IV}), 139.9 (C_{IV}), 147.4 (C_{IV}), 162.9 (CO).

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 416.12, Found: 417.30, $[M+H]^+$, t_R = 2.53 min.

HPLC: C_{18} column t_R = 25.85 min, purity = 90%

1-(2-Aminoethyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-N-phenethyl-1H-pyrazole-4-carboxamide (55)



$C_{20}H_{20}Cl_2N_4O$

MW = 403.30 g/mol

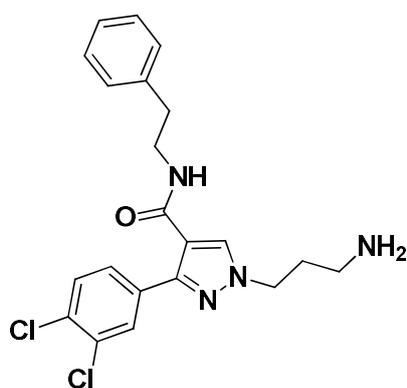
Yield: 22%

1H NMR (300 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 2.84 (t, 2 H, 3J = 6.9 Hz), 3.17 (t, 2 H, 3J = 6.1 Hz), 3.60 (t, 2 H, 3J = 6.5 Hz), 4.35 (t, 2 H, 3J = 6.1 Hz), 7.25-7.40 (m, 5 H), 7.52 (d, 1 H, 3J = 8.4 Hz), 7.86 (dd, 1 H, 3J = 8.4 Hz, 4J = 2.0 Hz), 8.10 (s, 1 H), 8.18 (d, 1 H, 4J = 2.0 Hz)

¹³C NMR (75 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 32.2 (CH₂), 43.6 (CH₂), 51.4 (CH₂), 55.7 (CH₂), 116.0 (C_{IV}), 126.1 (CH), 127.5 (2 CH), 128.3 (2 CH), 128.5 (CH), 129.9 (CH), 130.3 (CH), 132.3 (C_{IV}), 132.3 (C_{IV}), 132.5 (CH), 132.8 (C_{IV}), 138.4 (C_{IV}), 147.6 (C_{IV}), 162.7 (CO).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 402.10, Found: 403.20, [M+H]⁺, *t_R* = 2.63 min.

1-(3-Aminopropyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-*N*-phenethyl-1*H*-pyrazole-4-carboxamide (56)



C₂₁H₂₂Cl₂N₄O

MW = 417.33 g/mol

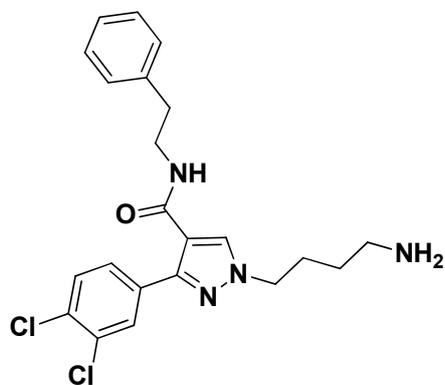
Yield: 63 %

¹H NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 2.06 (m, 2H); 2.86 (t, 2 H, ³*J* = 7.0 Hz), 3.19 (t, 2 H, ³*J* = 6.5 Hz), 3.55 (m, 2 H), 4.28 (t, 2 H, ³*J* = 7.0 Hz), 7.16-7.38 (m, 5 H), 7.53 (d, 1 H, ³*J* = 8.4 Hz), 7.86 (dd, 1 H, ³*J* = 8.4 Hz, ⁴*J* = 2.0 Hz); 8.04 (s, 1 H), 8.18 (d, 1 H, ⁴*J* = 2.0 Hz)

¹³C NMR (75 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 31.2 (CH₂), 35.5 (CH₂), 40.6 (CH₂), 47.4 (CH₂), 50.2 (CH₂), 116.0 (C_{IV}), 126.1 (CH), 128.6 (2 CH), 128.4 (CH), 128.7 (2 CH), 129.9 (CH), 130.2 (CH), 132.2 (C_{IV}), 132.3 (C_{IV}), 132.4 (CH), 132.8 (C_{IV}), 138.8 (C_{IV}), 147.6 (C_{IV}), 162.6 (CO).

HPLC: C₁₈ column *t_R* = 26.17 min, purity = 90%

1-(4-Aminobutyl)-3-(3,4-dichlorophenyl)-*N*-phenethyl-1*H*-pyrazole-4-carboxamide (57)



C₂₂H₂₄Cl₂N₄O

MW = 431.36 g/mol

Yield: 72%

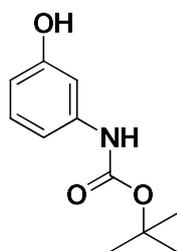
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.57 (quin, 2 H, ³J = 7.0 Hz), 1.94 (m, 2 H), 2.86 (m, 2 H), 3.17 (t, 2 H, ³J = 6.8 Hz), 3.54 (m, 2 H), 4.19 (t, 2 H, ³J = 7.0 Hz), 7.11-7.31 (m, 5 H), 7.52 (d, 1 H, ³J = 8.5 Hz), 7.90 (dd, 1 H, ³J = 8.5 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 8.06 (s, 1 H), 8.17 (d, 1 H, ⁴J = 2.0 Hz).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 26.4 (CH₂), 30.3 (CH₂), 35.2 (CH₂), 40.6 (CH₂), 42.4 (CH₂), 55.3 (CH₂), 116.0 (C_{IV}), 126.1 (CH), 127.6 (2 CH), 128.3 (2 CH), 128.4 (C_{IV}), 128.5 (CH), 129.9 (CH), 130.2 (CH), 132.3 (C_{IV}), 132.4 (CH), 133.0 (C_{IV}), 138.9 (C_{IV}), 147.5 (C_{IV}), 162.7 (CO).

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 430.13, Found: 431.20, [M+H]⁺, *t_R* = 3.34 min.

HPLC: C₁₈ column *t_R* = 24.10 min, purity = 90%

Synthesis of *tert*-butyl (3-hydroxyphenyl)carbamate (58)



C₁₁H₁₅NO₃

MW = 209.24 g/mol

To a solution of 3-aminophenol (1 eq., 1 g, 9.20 mmol) in THF (35 mL) was added a solution of Boc₂O (1.2 eq., 2.41 g, 11.04 mmol) in THF (35 mL). The reaction mixture was refluxed overnight. The solvent was evaporated under vacuum to afford a brown residue. The residue was dissolved in EtOAc and washed with H₂O, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel with Cyclohexane / EtOAc (50:50, v/v).

Yield: 93%

Aspect: Colorless oil

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.52 (s, 9 H), 6.47 (s, 1 H), 6.53 (ddd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, ⁵J = 0.8 Hz), 6.70 (ddd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, ⁵J = 0.8 Hz), 7.13 (m, 2 H)

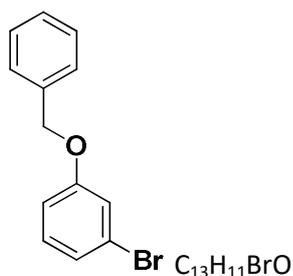
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 28.4 (CH₃), 80.9 (C_{IV}), 106.1 (CH), 110.4 (CH), 110.8 (CH), 129.9 (CH), 139.3 (C_{IV}), 153.0 (CO), 156.5 (CO)

General procedure for the synthesis of 1-(benzyloxy)benzenes

To an ice-cooled solution of NaH (1.2 eq., 25.50 mmol) in DMF (30 mL) under N₂ atmosphere was added phenol (1 eq., 21.25 mmol) and the resulting mixture was stirred for 20 min at the same

temperature. Benzyl bromide was added dropwise to this mixture (1 eq., 21.25 mmol). The ice bath was removed and the mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was quenched with a saturated aqueous ammonium chloride solution. The precipitate was filtered and extracted with ethyl ether. The organic layer was washed over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by chromatography on silica gel with Cyclohexane / EtOAc (80:20, v/v).

3-Benzyloxy-1-bromobenzene (59)



MW = 263.13 g/mol

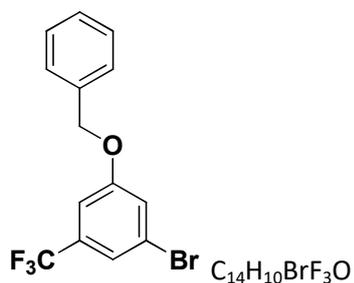
Yield: 72%

Aspect: White solid Mp = 59-63 °C

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.05 (s, 2 H), 6.92 (ddd, 1H, 3J = 7.8 Hz, 4J = 2.9 Hz, 4J = 1.6 Hz), 7.07-7.20 (m, 3 H), 7.30-7.47 (m, 5 H)

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 70.2 (CH_2), 113.8 (CH), 118.2 (CH), 122.8 (C_{IV}), 124.1 (CH), 127.5 (2 CH), 128.2 (CH), 128.7 (2 CH), 130.6 (CH), 136.4 (C_{IV}), 159.6 (C-O)

1-Benzyloxy-3-bromo-5-trifluoromethylbenzene (60)



MW = 331.13 g/mol

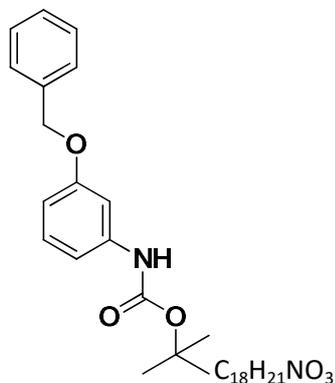
Yield: 87%

Aspect: colorless oil

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_2Cl_2): δ = 5.12 (s, 2 H), 7.21 (m, 1 H), 7.36 (t, 1 H, 4J = 1.8 Hz), 7.37-7.49 (m, 6 H)

^{13}C NMR (75 MHz, CD_2Cl_2): δ = 70.7 (CH_2), 111.1 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3.7$ Hz, CH), 120.7 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3.8$ Hz, CH), 123.0 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 272.5$ Hz, CF_3), 123.1 (C_{IV}), 126.4 (C_{IV}), 127.6 (2 CH), 128.4 (CH), 128.6 (2 CH), 132.8 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32.9$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{-CF}_3$), 135.7 (CH), 159.7 (C-O)

Tert-butyl(3-(benzyloxy)phenyl)carbamate (61)



MW = 299.36 g/mol

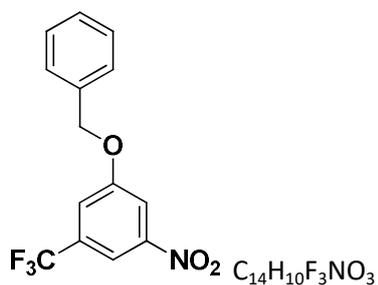
Yield: 39%

Aspect: Colorless oil

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.53 (s, 9 H), 5.07 (s, 2 H), 6.46 (br s, 1 H), 6.67 (dd, 1H, $^3J = 8.4$ Hz, $^4J = 2.4$ Hz), 6.86 (dd, 1H, $^3J = 7.6$ Hz, $^4J = 1.4$ Hz), 7.18 (m, 2 H), 7.29-7.48 (m, 5 H)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 28.4 (3 CH_3), 70.2 (CH_2), 79.5 (C_{IV}), 109.9 (CH), 110.2 (CH), 113.9 (CH), 127.5 (2 CH), 128.2 (CH), 128.7 (2 CH), 130.6 (CH), 136.4 (C_{IV}), 136.7 (C_{IV}), 152.5 (CO), 159.6 (CO)

1-Benzyloxy-3-nitro-5-trifluoromethylbenzene (62)



MW = 297.23 g/mol

Yield: 68%

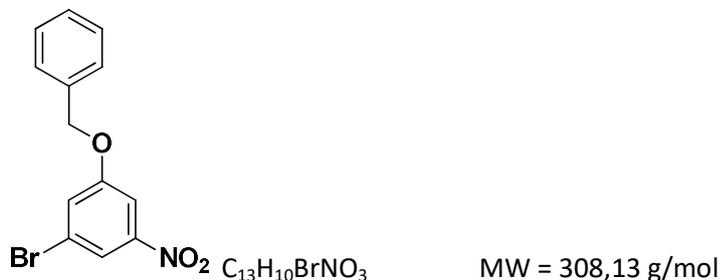
Aspect: Yellow solid

Mp = 42-43°C

^1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ = 5.22 (s, 2 H), 7.35-7.52 (m, 5 H), 7.60 (m, 1 H), 8.02 (t, 1 H, $^4J = 2.1$ Hz), 8.11 (m, 1 H)

¹³C NMR (75 MHz, CD₂Cl₂): δ=71.2 (CH₂), 112.6 (CH), 112.8 (q, ³J_{C-F} = 3.7 Hz, CH), 118.5 (q, ³J_{C-F} = 3.3 Hz, CH), 123.0 (q, ¹J_{C-F} = 272.7 Hz, CF₃), 127.7 (2 CH), 128.6 (CH), 128.8 (2 CH), 132.7 (q, ²J_{C-F} = 33.1 Hz, C-CF₃), 138.6 (C_{IV}), 149.4 (C_{IV}), 159.7 (C-O)

1-(benzyloxy)-3-bromo-5-nitrobenzene (63)



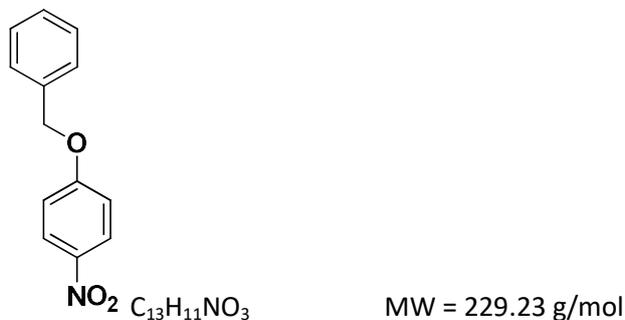
Yield: 60%

Aspect: Orange oil

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 5.15 (s, 2 H), 7.35-7.51 (m, 6 H), 7.78 (t, 1 H, ⁴J = 2.1 Hz), 8.00 (t, 1 H, ⁴J = 1.8 Hz)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ=71.1 (CH₂), 108.6 (CH), 119.2 (CH), 123.0 (C_{IV}), 124.7 (CH), 127.6 (2 CH), 128.6 (CH), 128.8 (2 CH), 135.1 (C_{IV}), 149.5 (C_{IV}), 159.7 (C-O)

1-Benzyloxy-4-nitrobenzene (64)



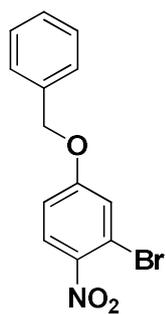
Yield: 97%

Aspect: Yellow solid Mp = 107-109 °C

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 5.18 (s, 2 H), 7.04 (d, 2 H, ³J = 9.2 Hz), 7.33-7.46 (m, 5 H), 8.22 (d, 2 H, ³J = 9.2 Hz)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 70.7 (CH₂), 114.9 (2 CH), 125.9 (2 CH), 127.5 (2 CH), 128.5 (CH), 128.8 (2 CH), 135.5 (C_{IV}), 141.7 (C_{IV}), 163.7 (C-O)

4-Benzyloxy-2-bromo-1-nitrobenzene (65)



$C_{13}H_{10}BrNO_3$

MW = 308.13 g/mol

Yield: 81%

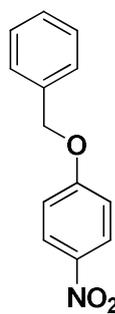
Aspect: Yellow solid

Mp = 46-47 °C

1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ = 5.16 (s, 2H), 7.03 (dd, 1H, 3J = 9.1 Hz, 4J = 2.7 Hz), 7.36 (d, 1H, 4J = 2.7 Hz), 7.4-7.5 (m, 5 H), 8.0 (d, 1H, 3J = 9.1 Hz)

^{13}C NMR (75 MHz, CD_2Cl_2): δ = 71.0 (CH_2), 114.2 (CH), 116.5 (C_{IV}), 121.1 (CH), 127.6 (2 CH), 127.9 (CH), 128.5 (CH), 128.7 (2 CH), 135.3 (C_{IV}), 142.6 (C_{IV}), 161.9 (C-O)

1-Benzyloxy-4-nitrobenzene (65)



$C_{13}H_{11}NO_3$

MW = 229.23 g/mol

Yield: 97%

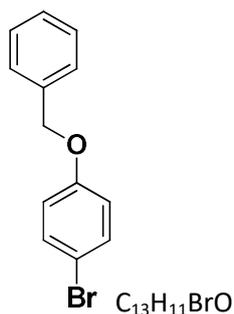
Aspect: Yellow solid

Mp = 107-109 °C

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.18 (s, 2 H), 7.04 (d, 2 H, 3J = 9.2 Hz), 7.33-7.46 (m, 5 H), 8.22 (d, 2 H, 3J = 9.2 Hz)

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 70.7 (CH_2), 114.9 (2 CH), 125.9 (2 CH), 127.5 (2 CH), 128.5 (CH), 128.8 (2 CH), 135.5 (C_{IV}), 141.7 (C_{IV}), 163.7 (C-O)

1-Benzyloxy-4-bromobenzene (66)



MW = 263.13 g/mol

Yield: 51%

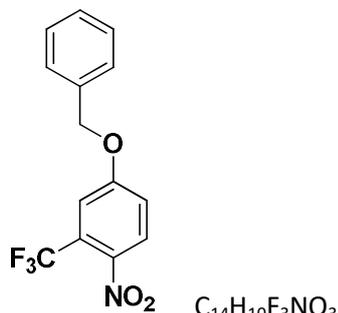
Aspect: White solid

Mp = 64-65 °C

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 5.05 (s, 2 H), 6.87 (d, 2 H, ³J = 8.6 Hz), 7.30-7.48 (m, 7 H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 70.2 (CH₂), 113.1 (C_{IV}), 116.7 (2 CH), 127.5 (2 CH), 128.1 (CH), 128.7 (2 CH), 132.3 (2 CH), 136.6 (C_{IV}), 157.9 (C-O)

4-(benzyloxy)-1-nitro-2-(trifluoromethyl)benzene (67)



MW = 297.23 g/mol

Yield: 97%

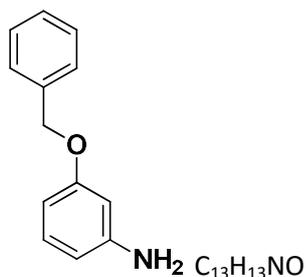
Aspect: Yellow oil

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 5.21 (s, 2 H), 7.19 (dd, 1 H, ³J = 9.0 Hz, ⁴J = 2.7 Hz), 7.30-7.48 (m, 6H), 8.03 (d, 1 H, ³J = 9.0 Hz)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 71.1 (CH₂), 115.2 (q, ³J_{C-F} = 5.9 Hz, CH), 117.0 (CH), 121.7 (q, ¹J_{C-F} = 273.3 Hz, CF₃), 126.2 (q, ²J_{C-F} = 33.9 Hz, C-CF₃), 127.6 (2 CH), 128.1 (CH), 128.8 (CH), 128.9 (2 CH), 134.8 (C_{IV}), 138.3 (C_{IV}), 161.6 (C-O)

Synthesis of 3-(benzyloxy)aniline(68)

4.0 M HCl solution in dioxane (10 eq., 2.5 mL, 10 mmol) was added slowly to a solution of *tert*-butyl-*N*-[3-(benzyloxy)phenyl]carbamate (1 eq., 300 mg, 1 mmol) in dioxane (2.5 mL). The reaction mixture was stirred for 2 hrs at room temperature. The mixture was concentrated under vacuum. The residue was taken up with aq. 1.0 M NaOH solution and extracted with DCM. The organic layer was concentrated under vacuum.



MW = 199.25 g/mol

Yield: 75%

Aspect: Brown solid Mp = 61-63 °C

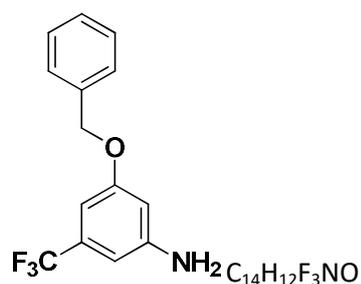
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 5.03 (s, 2 H), 6.35-6.50 (m, 3 H), 7.10 (t, 1H, ³J = 8.0 Hz), 7.29-7.47 (m, 5H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 70.2 (CH₂), 102.1 (CH), 104.1 (CH), 108.6 (CH), 127.5 (2 CH), 128.2 (CH), 128.7 (2 CH), 130.6 (CH), 138.5 (C_v), 148.3 (C_v), 159.8 (C-O)

General procedure for the synthesis of (benzyloxy)anilines

To a solution of 1-(benzyloxy)-nitrobenzene (1 eq., 1.0 mmol) in H₂O/THF (50:50, v/v, 15 mL) were successively added aq. 37% ammoniasolution (0.3 mL) and Na₂S₂O₄ (5 eq., 5.0 mmol). The solution was stirred at room temperature for 16 hrs. The solution was extracted with EtOAc. The organic layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography on silica gel with Cyclohexane / EtOAc (80:20, v/v).

3-(benzyloxy)-5-(trifluoromethyl)aniline (69)



MW = 267.25 g/mol

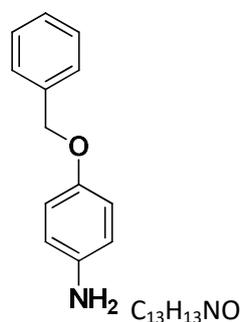
Yield: 46%

Aspect: colorless oil

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.05 (s, 2H), 6.45 (t, 1H, 4J = 2.0 Hz), 6.56 (t, 1H, 4J = 1.8 Hz), 6.66 (t, 1H, 4J = 1.5 Hz), 7.29-7.46 (m, 5H)

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 70.2 (CH_2), 102.0 (q, $^3J_{\text{C-F}}$ = 3.8 Hz, CH), 104.6 (CH), 104.8 (q, $^3J_{\text{C-F}}$ = 3.8 Hz, CH), 123.9 (q, $^1J_{\text{C-F}}$ = 274.5 Hz, CF_3), 127.5 (2 CH), 128.1 (CH), 128.6 (2 CH), 132.6 (q, $^2J_{\text{C-F}}$ = 32.1 Hz, C-CF_3), 136.4 (C_{IV}), 147.8 (C_{IV}), 160.1 (C-O)

4-(Benzyloxy)aniline (70)



MW = 199.25 g/mol

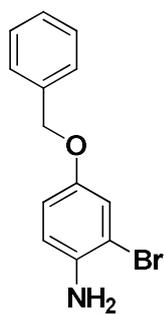
Yield: 22%

Aspect: brown powder Mp = 56-57 °C

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.01 (s, 2 H), 6.65 (m, 2 H), 6.82 (m, 2 H), 7.30-7.48 (m, 5 H)

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 70.8 (CH_2), 116.1 (2 CH), 116.4 (2 CH), 127.5 (2 CH), 127.8 (CH), 128.5 (2 CH), 135.5 (C_{IV}), 140.2 (C_{IV}), 152.0 (C-O)

4-(benzyloxy)-2-bromoaniline (71)



$C_{13}H_{12}BrNO$

MW = 278.14 g/mol

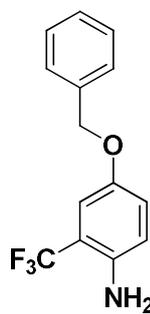
Yield: 39%

Aspect: white powder Mp = 63-65 °C

1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ = 4.99 (s, 2 H), 6.81-6.84 (m, 2 H), 7.12 (dd, 1 H, 4J = 2.2 Hz, 5J = 0.7 Hz), 7.3-7.5 (m, 5 H)

^{13}C NMR (75 MHz, CD_2Cl_2): δ = 70.9 (CH₂), 109.1 (C_{IV}), 116.0 (CH), 116.3 (CH), 118.8 (CH), 127.5 (2 CH), 127.8 (CH), 128.4 (2 CH), 137.2 (C_{IV}), 138.5 (C_{IV}), 152.1 (C-O)

4-(benzyloxy)-2-(trifluoromethyl)aniline (72)



$C_{14}H_{12}F_3NO$

MW = 267.25 g/mol

Yield: 56%

Aspect: white powder Mp = 51-52 °C

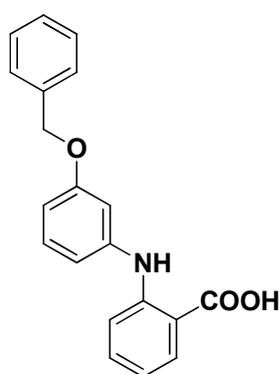
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.02 (s, 2 H), 6.72 (d, 1 H, 3J = 8.8 Hz), 6.99 (dd, 1 H, 3J = 8.8 Hz, 4J = 2.6 Hz), 7.10 (d, 1 H, 3J = 2.6 Hz), 7.30-7.46 (m, 5 H)

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 70.9 (CH₂), 112.6 (q, $^3J_{C-F}$ = 5.4 Hz, CH), 114.6 (q, $^2J_{C-F}$ = 30.5 Hz, C-CF₃), 118.8 (CH), 120.6 (CH), 124.5 (q, $^1J_{C-F}$ = 172.4 Hz, CF₃), 127.5 (2 CH), 128.1 (CH), 128.6 (2 CH), 138.6 (C_{IV}), 138.4 (C_{IV}), 150.9 (C-O)

General procedure for the synthesis of (((benzyloxy)phenyl)amino)benzoic acid

A solution of 1-(benzyloxy)-3-bromobenzene (2 eq., 2.48 mmol), anthranilic acid (1 eq., 1.24 mmol), CuI (0.2 eq., 0.25 mmol), L-Proline (0.2 eq., 0.25 mmol) and K₂CO₃ (1 eq., 1.24 mmol) in 3-methylbutan-1-ol (3 mL) was heated at 140°C for 1 hr under microwave. The mixture was concentrated under vacuum, taken up with water and extracted with DCM. The aqueous layer was acidified with aq. 1.0 M HCl solution and extracted with EtOAc. The organic layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography on silica gel with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

2-((3-(benzyloxy)phenyl)amino)benzoic acid (73)



C₂₀H₁₇NO₃

MW = 319.35 g/mol

Yield: 35%

Aspect: white powder Mp = 132-134 °C

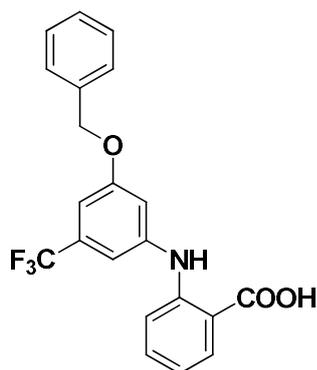
¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ = 5.10 (s, 2H), 6.75-6.94 (m, 4H), 7.23-7.50 (m, 8 H), 8.04 (ddd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, ⁴J = 0.3 Hz), 9.34 (br s, 1H)

¹³C NMR (75 MHz, CD₂Cl₂): δ = 69.9 (CH₂), 108.9 (CH), 110.3 (CH), 110.6 (C_{IV}), 114.4 (CH), 115.1 (CH), 117.4 (CH), 127.48 (2 CH), 127.9 (CH), 128.5 (2 CH), 130.1 (CH), 132.4 (CH), 135.1 (CH), 137.1 (C_{IV}), 141.7 (C_{IV}), 148.4 (C_{IV}), 159.7 (C-O), 172.3 (C=O)

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 319.12, Found: 320.2, [M+H]⁺, 318.3, [M-H]⁻, t_R = 3.22 min.

HPLC: C₁₈ column t_R = 32.13 min, purity = 99%

2-((3-(benzyloxy)-5-(trifluoromethyl)phenyl)amino)benzoic acid (74)



$C_{21}H_{16}F_3NO_3$

MW = 387.35 g/mol

Yield: 11%

Aspect: white powder

Mp = 167-169 °C

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 5.18 (s, 2H), 6.88-6.93 (m, 2 H), 7.06-7.13 (m, 2H), 7.24 (dd, 1H, 3J = 8.4 Hz, 5J = 0.6 Hz), 7.3-7.5 (m, 6H), 7.92 (dd, 1H, 3J = 8.0 Hz, 4J = 1.6 Hz)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 70.1 (CH₂), 105.7 (q, $^3J_{C-F}$ = 3.9 Hz, CH), 109.0 (q, $^3J_{C-F}$ = 4.0 Hz, CH), 109.6 (CH), 115.8 (C_{IV}), 115.9 (CH), 119.6 (CH), 124.3 (q, $^1J_{C-F}$ = 272.5 Hz, CF₃), 128.2 (2 CH), 128.4 (CH), 128.9 (2 CH), 131.6 (q, $^2J_{C-F}$ = 32.5 Hz, C-CF₃), 132.4 (CH), 134.4 (CH), 137.0 (C_{IV}), 143.9 (C_{IV}), 145.4 (C_{IV}), 160.1 (C-O), 170.0 (C=O)

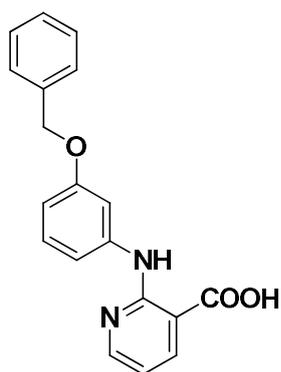
LC-MS (ESI): m/z Calculated: 387.11, Found: 386.3 [M-H]⁻, t_R = 3.43 min.

HPLC: C₁₈ column t_R = 34.46 min, purity = 90%

General procedure for the synthesis of (((benzyloxy)phenyl)amino)nicotinic acid

2-Chloronicotinic acid (1 eq., 0.6 mmol) was added to a solution of 3-(benzyloxy)aniline (2 eq. 1.2 mmol) in acetic acid (1.2 mL) at room temperature. The reaction mixture was heated at 100 °C for 6 hrs, then cooled to room temperature and extracted with EtOAc. The organic layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography on silica gel with Cyclohexane/EtOAc (70:30, v/v).

2-((3-(benzyloxy)phenyl)amino)nicotinic acid (75)



C₁₉H₁₆N₂O₃

MW = 320.34 g/mol

Yield: 35%

Aspect: brown powder Mp = 161-162 °C

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ = 5.11 (s, 2 H), 6.72 (ddd, 1H, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, ⁴J = 0.9 Hz), 6.82 (dd, 1H, ³J = 7.8 Hz, ³J = 4.8 Hz), 7.17 (ddd, 1H, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, ⁴J = 1.1 Hz), 7.26 (t, 1H, ³J = 8.0 Hz), 7.31-7.53 (m, 5H), 7.59 (t, 1H, ⁴J = 2.2 Hz), 8.35 (dd, 1H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 8.43 (dd, 1H, ³J = 4.8 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 10.12 (br s, 1H)

¹³C NMR (75 MHz, CD₂Cl₂): δ = 69.9 (CH₂), 106.2 (C_{IV}), 108.0 (CH), 109.3 (CH), 113.6 (CH), 113.8 (CH), 127.6 (2 CH), 127.9 (CH), 128.5 (2 CH), 129.4 (CH), 137.3 (C_{IV}), 140.5 (C_{IV}), 141.3 (CH), 153.6 (CH), 156.3 (C_{IV}), 159.3 (C-O), 170.6 (C=O)

¹H NMR (500 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 5.15 (s, 2 H), 6.70 (m, 1 H), 6.86 (dd, 1 H, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 4.8 Hz), 7.18-7.25 (m, 2 H), 7.34 (tt, 1 H, ³J = 7.2 Hz, ⁴J = 1.4 Hz), 7.41 (m, 2 H), 7.52 (m, 2 H), 7.80 (m, 1H), 8.35 (dd, 1 H, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 8.43 (ddd, ³J = 4.8 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, ⁵J = 0.5 Hz)

Pour le spectre ¹³C, on observe 5 signaux dédoublés d'égales intégrations qui laissent à penser qu'il existe en solution dans l'acétone-6d, deux formes en équilibre.

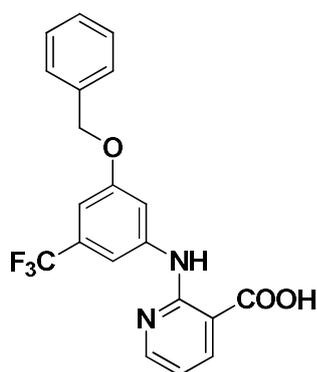
¹³C NMR (126 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 69.5 (CH₂), 106.7 (CH), 108.4 (CH), 112.4 (CH), 109.35 (C_{IV}), 113.6 (CH), 127.6 (2 CH), 127.7 (CH), 128.3 (2 CH), 129.3 (CH), 137.7 (C_{IV}), 140.6 (CH), 141.4 (C_{IV}), 152.9 (CH), 156.1 (C_{IV}), 159.4 (C-O), 168.8 (C=O)

δ = 69.5 (CH₂), 106.8 (CH), 108.4 (CH), 109.41 (C_{IV}), 112.5 (CH), 113.6 (CH), 127.6 (2 CH), 127.7 (CH), 128.3 (2 CH), 129.3 (CH), 137.7 (C_{IV}), 140.6 (CH), 141.5 (C_{IV}), 152.9 (CH), 156.2 (C_{IV}), 159.4 (C-O), 168.9 (C=O)

LC-MS (ESI): *m/z* Calculated: 320.1, Found: 321.2, [M+H]⁺, 319.2, [M-H]⁻, *t_R* = 2.77 min.

HPLC: C₁₈ column *t_R* = 25.34 min, purity = 99%

2-((3-(benzyloxy)-5-(trifluoromethyl)phenyl)amino)nicotinic acid (76)



$C_{20}H_{15}F_3N_2O_3$

MW = 388.34 g/mol

Yield: 3%

Aspect: white powder Mp = 228-229°C

1H NMR (500 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 5.27 (s, 2 H), 6.95-6.99 (m, 2 H), 7.36 (tt, 1 H, $^3J = 7.4$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz), 7.41-7.46 (m, 2 H), 7.53-7.58 (m, 2 H), 7.77 (br s, 1H), 7.92 (d, 1 H, $^4J = 1.8$ Hz), 8.41 (dd, 1 H, $^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 2.1$ Hz), 8.51 (ddd, 1 H, $^4J = 4.8$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz), 10.72 (br s, 1H)

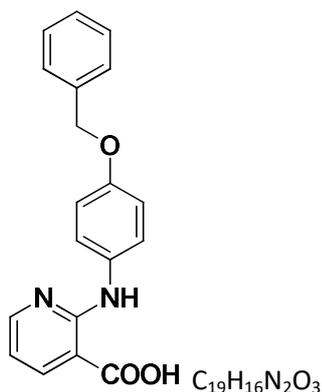
^{13}C NMR (126 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 70.1 (CH₂), 104.9 (q, $^3J_{C-F} = 3.4$ Hz, CH), 107.8 (C_{IV}), 108.70 (q, $^3J_{C-F} = 3.4$ Hz, CH), 109.35 (C_{IV}), 124.4 (q, $^1J_{C-F} = 271.2$ Hz, CF₃), 127.8 (2 CH), 127.9 (CH), 128.5 (2 CH), 131.3 (q, $^2J_{C-F} = 31.7$ Hz, C-CF₃), 136.9 (C_{IV}), 140.7 (CH), 142.2 (C_{IV}), 142.25 (C_{IV}), 152.9 (CH), 155.83 (C_{IV}), 159.7 (C-O), 168.69 (C=O)

δ = 70.1 (CH₂), 104.9 (q, $^3J_{C-F} = 3.4$ Hz, CH), 107.8 (C_{IV}), 108.81 (q, $^3J_{C-F} = 3.4$ Hz, CH), 109.41 (C_{IV}), 124.4 (q, $^1J_{C-F} = 271.2$ Hz, CF₃), 127.8 (2 CH), 127.9 (CH), 128.5 (2 CH), 131.3 (q, $^2J_{C-F} = 31.7$ Hz, C-CF₃), 136.9 (C_{IV}), 140.7 (CH), 142.2 (C_{IV}), 142.34 (C_{IV}), 152.9 (CH), 155.83 (C_{IV}), 159.7 (C-O), 168.74 (C=O)

LC-MS (ESI): m/z Calculated: 388.1, Found: 389.2, $[M+H]^+$, 387.3, $[M-H]^-$, $t_R = 3.09$ min.

HPLC: C₁₈ column $t_R = 33.47$ min, purity = 90%

2-((4-(benzyloxy)phenyl)amino)nicotinic acid (77)



MW = 320,34 g/mol

Yield: 2%

Aspect: brown powder Mp = 178-179°C

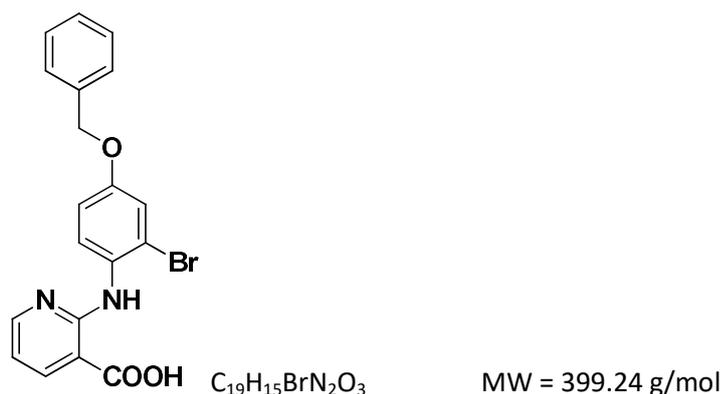
¹H NMR (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 5.12 (s, 2 H), 6.80 (dd, 1 H, ³J = 7.8 Hz, ⁴J = 4.8 Hz), 7.00 (d, 1 H, ³J = 9.0 Hz), 7.26-7.53 (m, 5 H), 7.62-7.66 (m, 2 H), 8.31 (dd, 1 H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 2.0 Hz), 8.38 (m, 1 H), 10.28 (br s, 1 H)

¹³C NMR (75 MHz, (CD₃)₂CO): δ = 69.8 (CH₂), 106.4 (C_{IV}), 112.9 (CH), 114.9 (2 CH), 121.9 (CH), 122.0 (CH), 127.5 (2 CH), 127.6 (CH), 128.4 (2 CH), 133.5 (C_{IV}), 137,8 (C_{IV}), 140.5 (CH), 153.2 (CH), 154.5 (C_{IV}), 156.5 (C_{IV}), 166.7 (C-O)

δ = 69.8 (CH₂), 106.4 (C_{IV}), 112.9 (CH), 114.9 (2 CH), 121.9 (CH), 122.0 (CH), 127.5 (2 CH), 127.6 (CH), 128.4 (2 CH), 133.6 (C_{IV}), 137,8 (C_{IV}), 140.5 (CH), 153.2 (CH), 154.6 (C_{IV}), 156.6 (C_{IV}), 166.8 (C-O)

HPLC: C₁₈ column t_R = 28.32 min, purity = 95%

2-((4-(benzyloxy)-2-bromophenyl)amino)nicotinic acid (78)



Yield: 19%

Aspect: brown powder Mp = 182-183 °C

1H NMR (500 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 5.16 (s, 2 H), 6.87 (t, 1 H, J = 5.4 Hz), 7.07 (dd, 1 H, 3J = 9.1 Hz, 4J = 2.8 Hz), 7.33 (d, 1H, 4J = 2.8 Hz), 7.35 (m, 1 H), 7.42 (m, 2 H), 7.52 (m, 2 H), 8.37 (m, 3 H), 10.43 (br s, 1 H)

^{13}C NMR (126 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ = 70.1 (CH₂), 113.8 (CH), 114.5 (CH), 115.3 (C_{IV}), 118.4 (CH), 124.7 (CH), 127.6 (2 CH), 127.9 (CH), 128.4 (2 CH), 131.8 (C_{IV}), 137.2 (C_{IV}), 140.6 (CH), 152.8 (CH), 154.8 (C_{IV}), 156.2 (C_{IV}), 168.6 (C=O)

δ = 70.1 (CH₂), 113.8 (CH), 114.5 (CH), 115.4 (C_{IV}), 118.4 (CH), 124.8 (CH), 127.6 (2 CH), 127.9 (CH), 128.4 (2 CH), 131.9 (C_{IV}), 137.2 (C_{IV}), 140.6 (CH), 152.8 (CH), 154.8 (C_{IV}), 156.3 (C_{IV}), 168.6 (C=O)

HPLC: C₁₈ column t_R = 26.56 min, purity = 98%

Protein production and purification

The cDNA coding the human TEAD2 sequence (residue 217 to 447) was ordered to Integrated DNA Technologies. This target protein was cloned in frame into a pDBHis-MBP between NdeI and XhoI sites to give the pDBHis-MBP-TEAD2 plasmid. In this construct TEAD2 is fused with a (his)₆-MBP N-terminal tag. This N-terminal tag is followed by the HRV 3C (3C) protease recognition site (Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln/Gly-Pro). Specific cleavage occurs between Gln and Gly, with Gly-Pro remaining at TEAD2 protein N terminus. The pDBHis-MBP-TEAD2 plasmid was transformed in *Escherichia coli*/BL21λDE3 cells and grown on LB agar plate with 50 µg/mL kanamycin at 37°C overnight. Transformed cells were grown overnight at 37°C in LB media, supplemented with 50 µg/mL kanamycin, until 0.6 OD₂₈₀, then the culture temperature was decreased to 16°C and production was induced with 0.2 mM IPTG overnight. Cells were harvested by 20 min centrifugation at 6000 x g at 4°C. The pellet was resuspended in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 600 mM NaCl and 2 mM 2-mercaptoethanol (buffer A) and stored at -80°C. Cells were supplemented with a Complete® EDTA free tablet (Roche, Meylan, France) lysed by sonication, insoluble proteins and cell debris were sedimented by centrifugation at 40.000 x g at 4°C for 30 min. Supernatant was supplemented with imidazole to a 10 mM final concentration, filtered through 0.45µm filters and loaded onto an affinity column (1 mL His Trap FF, Dutscher, Brumath, France), equilibrated with buffer B (buffer A + 10 mM imidazole). Columns were washed with 20 column volumes of buffer B and proteins eluted with a linear 0–100% gradient of buffer C (buffer A + 300 mM imidazole). The peak fractions were analysed by SDS-PAGE. Fractions containing tagged TEAD2-MBP were pooled. These fractions were dialysed overnight at 4°C against a conservation buffer containing 20 mM Tris pH 7.5, 600 mM NaCl, 2 mM DTT (Buffer D) and at the same time the (his)₆-MBP tag was separated from TEAD2 by 3C cleavage (ratio proteine/protease 1000/1 w/w). Uncleaved protein, (his)₆-MBP tag and 3C protease were removed by binding onto gravity column containing 2.5 mL Ni-sepharose and 0.5 mL Glutathione sepharose (3C protease being GST-Tagged). Purified TEAD2 did not bind this column and was directly collected in the flow through. Purified protein was analysed by SDS-PAGE, concentrated and injected onto gel filtration column (Superdex 75 Hiload 16/60 GE Lifescience) equilibrated with buffer E (20 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM TCEP and 5% glycerol). The peak fractions were analysed by SDS-PAGE and the fractions containing pure TEAD2 were pooled.

NanoDSF

NanoDSF assay was performed on PrometheusNT.48 from Nanotemper. For each experiment, Prometheus capillaries were filled with 10 µl of sample and subjected to a thermal ramp from 20 °C

to 95 °C with a heating rate of 2 °C/min. All experiments were conducted with the hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ protein (5 µM) in the purification buffer [20 mM TRIS (pH 8.0), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine), 5% glycerol]. Analyte solutions were prepared from stock solutions in DMSO and added to the protein solution to reach a final DMSO concentration of 2.5% and a 250-500 µM compound concentration range. To determine the melting temperature T_m for the protein, a Boltzmann model was used to fit protein unfolding curves using the GraphPad Prism[®] (v5.02) software.

Surface Plasmon Resonance

Surface plasmon resonance experiments were performed on a T200 instrument at 25°C using PBS-1X buffer containing 0.05% (v/v) non-ionic surfactant P20 (GE Healthcare) as running buffer. Recombinant hTEAD2 is immobilized on Fc2 in acetate buffer pH5, of a CM5S sensor chip surface at 4000-7300RU RU by amine coupling according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). The same chemistry was used for control Fc1 without protein. For screening all molecules were initially dissolved in 100% DMSO at 12.5 mM and diluted to 250µM in PBS-P20/3% DMSO for injection in the same flow buffer. Samples were injected for 60s followed by a 100 s dissociation phase at a flow rate of 30 µL/min. Results were analyzed by subtracting the signal of the reference flow cell from the signal of the TEAD-coated flow cell. Each experiment series included blanks (running buffer), injection of positive control ligand (YAP at 100nM) and molecules, and DMSO solvent corrections. The peptide ligand YAP was used as positive control of the TEAD coated surface injected at 100nM during 180s followed by a 400s dissociation step at the beginning and the end of the screening. For dose-effect measurements, increasing concentrations of molecules from 31 to 500 nM, were injected on Fc1 and Fc2 flowcells simultaneously.

MicroScale Thermophoresis

hYAP₅₀₋₁₀₂ was purchased from Xprochem[®] hTEAD2₂₁₇₋₄₄₇ was cloned into the peGFP-C1 expression vector and synthesized by ProteoGenix SAS yielding a N-terminal green fluorescent protein. CHO-K1 cells (ATCC[®] CCL-61[™]) were transfected with the Cell Line Nucleofector[®] Kit T, Program U-023. After three weeks of selective pressure, the population of cells strongly expressing eGFP-hTEAD₂₁₇₋₄₄₇ proteins was analysed using flow cytometry and retained for microscale thermophoresis analysis. CHO-K1 cells (ATCC[®] CCL-61) were cultured in Ham's F-12 Nutrient Mixture (F12, LifeTechnologies) with 1% PS (Penicillin-Streptomycin, Life Technologies) and 10% FBS (Foetal Bovine Serum,

LifeTechnologies). Cell lines were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were passaged every 3 days upon reaching confluence. Cells overexpressing eGFP-hTEAD₂₁₇₋₄₄₇ were suspended in 300 µL mPERbuffer supplemented with a protease inhibitor cocktail. The lysate was collected by centrifugation at 15,000 rpm at 4°C for 45 min. The whole process is intended to be purification-free⁹⁰. Experiments were performed on a NanoTemper® Monolith NT.115 instrument with blue filters. The quantity of cells for this protocol can vary from 10 to 40 million. The optimal fluorescence of lysate is situated between 200 and 1600 units of fluorescence (FI units). The fluorescence is measured using a small quantity of cell lysate within a capillary chosen from different types of available capillaries: standard, premium or hydrophilic. The concentration of the fluorescent protein can be determined using a GFP dosage kit (Abnova KA0911) or a calibration curve.

Samples were prepared in a PBS buffer (PBS 1X; 0.05% Tween 20) using dilution 1:1 and loaded into standard capillaries. For each compound, the measure was made in a concentration range from 15 nM to 500 µM with a constant concentration protein (\pm 30 nM). All measurements were performed at 22°C using 20% 40% or 60% MST power with laser off/on times of 5 s and 30 s, respectively. All experiments were repeated three times for each measurement. Data analyses were performed using the NanoTemper® analysis software. Data analysis was carried out using NTanalysis. The K_d constants between a protein and its ligand can be calculated using the saturation binding curve at equilibrium.

Co-cristallisation

Crystals of hTEAD₂₁₇₋₄₄₇ for ligand soaking were obtained by means of hanging drop vapour diffusion by mixing 1mL of hTEAD2 5.8 mg/mL and 1mL of Hepes 100 mM pH 7.2, formate 2.8M at 20 °C, equilibrated over 500 µL of the same solution. Crystals formed in about five days. A 1 µL DMSO stock solution of compound was added to the growing drop for 2 hours (short time) or 24h (long time) before flash freezing and data collection. X-ray diffraction data were collected in The European Synchrotron. Data were integrated and processed using MOSFLM and SCALA of the CCP4 suite. The crystals belong to the space group C2 (A= 123.78Å, B = 61.68Å, C = 80.00 Å) with two monomer in the asymmetric unit. The structures were solved by molecular replacement using PDB entry 3L15 as the search model. Bound ligand was manually identified and fitted into F_o-F_c electron density using Coot. The structures were refined by rounds of rebuilding in Coot and refinement using Refmac of the CCP4 suite.

Cell Cultures

HEK293T (kidney) cell line was purchased from the American Type Culture Collection and cultivated in DMEM media containing 10% of heat inactivated FBS, L-glutamine and penicillin/streptomycin. CHO-K1 cells (ATCC® CCL-61) were cultured in Ham's F-12 Nutrient Mixture (F12, Life Technologies) with 1% PS (Penicillin-Streptomycin, Life Technologies, Illkirch, France) and 10% FBS (Foetal Bovine Serum, Life Technologies). Cells were passaged every 3 days upon reaching confluence, and the absence of mycoplasma contamination was verified (MycoAlert™ Detection Kit, Lonza, Basel, Switzerland). Cell lines were cultured at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. MDA-MB-231 cell line was purchased from the American Type Culture Collection and cultivated in DMEM media containing 10% of heat inactivated FBS, L-glutamine and penicillin/streptomycin.

Luciferase Reporter Assay

HEK293T cells were seeded at a density of 1×10^5 cells in 24 well plates coated with polyethylenimine (10 µg/mL). Cells were transfected with the TEAD luciferase reporter plasmid 8XGTIIC-Luciferase (Addgene reference 34615) and a control β-galactosidase plasmid CMV-βGal using the lipofectamine 2000 Reagent (Life Technologies, Inc.) according to the manufacturer's instructions. Compounds were tested at different concentrations ranging from 0.25 to 20 µM. After 24 h post transfection, cells were lysed in Reporter Lysis Buffer (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and luciferase activity was measured on the Mithras LB940 plate reader and normalized to β-galactosidase. β-galactosidase control allowed us to qualitatively estimate the cytotoxicity of the tested compounds.

Western Blot

Total extracts of cells were obtained with a RIPA based buffer containing protease and phosphatase inhibitors (Roche). Western blots were carried out using 20 µg of protein lysates with the NuPage Electrophoresis and iBlot transfer systems (Life Technologies). β-Actin was used as loading control for total extracts.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Edgar, B. A. From Cell Structure to Transcription: Hippo Forges a New Path. *Cell***2006**, 124 (2), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.005>.
- (2) Halder, G.; Johnson, R. L. Hippo Signaling: Growth Control and Beyond. *Development***2011**, 138 (1), 9–22. <https://doi.org/10.1242/dev.045500>.
- (3) Zhao, B.; Wei, X.; Li, W.; Udan, R. S.; Yang, Q.; Kim, J.; Xie, J.; Ikenoue, T.; Yu, J.; Li, L.; et al. Inactivation of YAP Oncoprotein by the Hippo Pathway Is Involved in Cell Contact Inhibition and Tissue Growth Control. *Genes Dev.***2007**, 21 (21), 2747–2761. <https://doi.org/10.1101/gad.1602907>.
- (4) Boggiano, J. C.; Vanderzalm, P. J.; Fehon, R. G. Tao-1 Phosphorylates Hippo/MST Kinases to Regulate the Hippo-Salvador-Warts Tumor Suppressor Pathway. *Dev Cell***2011**, 21 (5), 888–895. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.028>.
- (5) Zhao, B.; Li, L.; Tumaneng, K.; Wang, C.-Y.; Guan, K.-L. A Coordinated Phosphorylation by Lats and CK1 Regulates YAP Stability through SCF β -TRCP. *Genes Dev.***2010**, 24 (1), 72–85. <https://doi.org/10.1101/gad.1843810>.
- (6) Xu, M.; Chan, S.; Liu, A.; Wong, K.; Fan, S.; Chen, J.; Poon, R.; Zender, L.; Lowe, S.; Hong, W.; et al. AXL Receptor Kinase Is a Mediator of YAP-Dependent Oncogenic Functions in Hepatocellular Carcinoma. *Oncogene***2011**, 30 (10), 1229–1240. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.504>.
- (7) Zhao, B.; Ye, X.; Yu, J.; Li, L.; Li, W.; Li, S.; Yu, J.; Lin, J. D.; Wang, C.-Y.; Chinnaiyan, A. M.; et al. TEAD Mediates YAP-Dependent Gene Induction and Growth Control. *Genes Dev.***2008**, 22 (14), 1962–1971. <https://doi.org/10.1101/gad.1664408>.
- (8) Piccolo, S.; Dupont, S.; Cordenonsi, M. The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond. *Physiol. Rev.***2014**, 94 (4), 1287–1312. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2014>.
- (9) Strano, S.; Munarriz, E.; Rossi, M.; Castagnoli, L.; Shaul, Y.; Sacchi, A.; Oren, M.; Sudol, M.; Cesareni, G.; Blandino, G. Physical Interaction with Yes-Associated Protein Enhances P73 Transcriptional Activity. *J. Biol. Chem.***2001**, 276 (18), 15164–15173. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010484200>.
- (10) Komuro, A.; Nagai, M.; Navin, N. E.; Sudol, M. WW Domain-Containing Protein YAP Associates with ErbB-4 and Acts as a Co-Transcriptional Activator for the Carboxyl-Terminal Fragment of ErbB-4 That Translocates to the Nucleus. *J. Biol. Chem.***2003**, 278 (35), 33334–33341. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305597200>.
- (11) Lian, I.; Kim, J.; Okazawa, H.; Zhao, J.; Zhao, B.; Yu, J.; Chinnaiyan, A.; Israel, M. A.; Goldstein, L. S. B.; Abujarour, R.; et al. The Role of YAP Transcription Coactivator in Regulating Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Genes Dev.***2010**, 24 (11), 1106–1118. <https://doi.org/10.1101/gad.1903310>.
- (12) Vassilev, A.; Kaneko, K. J.; Shu, H.; Zhao, Y.; DePamphilis, M. L. TEAD/TEF Transcription Factors Utilize the Activation Domain of YAP65, a Src/Yes-Associated Protein Localized in the Cytoplasm. *Genes Dev.***2001**, 15 (10), 1229–1241. <https://doi.org/10.1101/gad.888601>.
- (13) Oka, T.; Sudol, M. Nuclear Localization and Pro-Apoptotic Signaling of YAP2 Require Intact PDZ-Binding Motif. *Genes Cells***2009**, 14 (5), 607–615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01292.x>.
- (14) Gaffney, C. J.; Oka, T.; Mazack, V.; Hilman, D.; Gat, U.; Muramatsu, T.; Inazawa, J.; Golden, A.; Carey, D. J.; Farooq, A.; et al. Identification, Basic Characterization and Evolutionary Analysis of Differentially Spliced mRNA Isoforms of Human YAP1 Gene. *Gene***2012**, 509 (2), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.08.025>.
- (15) Overholtzer, M.; Zhang, J.; Smolen, G. A.; Muir, B.; Li, W.; Sgroi, D. C.; Deng, C.-X.; Brugge, J. S.; Haber, D. A. Transforming Properties of YAP, a Candidate Oncogene on the Chromosome

- 11q22 Amplicon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***2006**, *103* (33), 12405–12410. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605579103>.
- (16) Holden, J. K.; Cunningham, C. N. Targeting the Hippo Pathway and Cancer through the TEAD Family of Transcription Factors. *Cancers***2018**, *10* (3). <https://doi.org/10.3390/cancers10030081>.
- (17) Pobbati, A. V.; Chan, S. W.; Lee, I.; Song, H.; Hong, W. Structural and Functional Similarity between the Vgll1-TEAD and the YAP-TEAD Complexes. *Structure***2012**, *20* (7), 1135–1140. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.04.004>.
- (18) Pobbati, A. V.; Hong, W. Emerging Roles of TEAD Transcription Factors and Its Coactivators in Cancers. *Cancer Biol. Ther.***2013**, *14* (5), 390–398. <https://doi.org/10.4161/cbt.23788>.
- (19) Chen, H.-H.; Maeda, T.; Mullett, S. J.; Stewart, A. F. R. Transcription Cofactor Vgl-2 Is Required for Skeletal Muscle Differentiation. *Genesis***2004**, *39* (4), 273–279. <https://doi.org/10.1002/gene.20055>.
- (20) Zhang, W.; Gao, Y.; Li, P.; Shi, Z.; Guo, T.; Li, F.; Han, X.; Feng, Y.; Zheng, C.; Wang, Z.; et al. VGLL4 Functions as a New Tumor Suppressor in Lung Cancer by Negatively Regulating the YAP-TEAD Transcriptional Complex. *Cell Res***2014**, *24* (3), 331–343. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.10>.
- (21) Jiao, S.; Wang, H.; Shi, Z.; Dong, A.; Zhang, W.; Song, X.; He, F.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Wang, W.; et al. A Peptide Mimicking VGLL4 Function Acts as a YAP Antagonist Therapy against Gastric Cancer. *Cancer Cell***2014**, *25* (2), 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.010>.
- (22) Figeac, N.; Mohamed, A. D.; Sun, C.; Schönfelder, M.; Matallanas, D.; Garcia-Munoz, A.; Missiaglia, E.; Collie-Duguid, E.; De Mello, V.; Pobbati, A. V.; et al. Vgll3 Operates via Tead1, Tead3 and Tead4 to Influence Myogenesis in Skeletal Muscle. *J. Cell. Sci.***2019**. <https://doi.org/10.1242/jcs.225946>.
- (23) Anbanandam, A.; Albarado, D. C.; Nguyen, C. T.; Halder, G.; Gao, X.; Veeraraghavan, S. Insights into Transcription Enhancer Factor 1 (TEF-1) Activity from the Solution Structure of the TEA Domain. *Proc Natl Acad Sci U S A***2006**, *103* (46), 17225–17230. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607171103>.
- (24) Tian, W.; Yu, J.; Tomchick, D. R.; Pan, D.; Luo, X. Structural and Functional Analysis of the YAP-Binding Domain of Human TEAD2. *Proc. Natl. Acad. Sci.***2010**, *107* (16), 7293–7298. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000293107>.
- (25) Chen, Z.; Friedrich, G. A.; Soriano, P. Transcriptional Enhancer Factor 1 Disruption by a Retroviral Gene Trap Leads to Heart Defects and Embryonic Lethality in Mice. *Genes Dev.***1994**, *8* (19), 2293–2301. <https://doi.org/10.1101/gad.8.19.2293>.
- (26) Yoshida, T. MCAT Elements and the TEF-1 Family of Transcription Factors in Muscle Development and Disease. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.***2008**, *28* (1), 8–17. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.155788>.
- (27) Kaneko, K. J.; Kohn, M. J.; Liu, C.; DePamphilis, M. L. Transcription Factor TEAD2 Is Involved in Neural Tube Closure. *Genesis***2007**, *45* (9), 577–587. <https://doi.org/10.1002/dvg.20330>.
- (28) Zhou, Y.; Huang, T.; Cheng, A.; Yu, J.; Kang, W.; To, K. The TEAD Family and Its Oncogenic Role in Promoting Tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.***2016**, *17* (1), 138. <https://doi.org/10.3390/ijms17010138>.
- (29) Qi, Y.; Yu, J.; Han, W.; Fan, X.; Qian, H.; Wei, H.; Tsai, Y. S.; Zhao, J.; Zhang, W.; Liu, Q.; et al. A Splicing Isoform of TEAD4 Attenuates the Hippo–YAP Signalling to Inhibit Tumour Proliferation. *Nat. Commun.***2016**, *7* (1). <https://doi.org/10.1038/ncomms11840>.
- (30) Li, Z.; Zhao, B.; Wang, P.; Chen, F.; Dong, Z.; Yang, H.; Guan, K.-L.; Xu, Y. Structural Insights into the YAP and TEAD Complex. *Genes Dev.***2010**, *24* (3), 235–240. <https://doi.org/10.1101/gad.1865810>.
- (31) Hau, J. C.; Erdmann, D.; Mesrouze, Y.; Furet, P.; Fontana, P.; Zimmermann, C.; Schmelzle, T.; Hofmann, F.; Chène, P. The TEAD4-YAP/TAZ Protein-Protein Interaction: Expected Similarities

- and Unexpected Differences. *ChemBioChem***2013**, *14* (10), 1218–1225. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300163>.
- (32) Gibault, F.; Sturbaut, M.; Bailly, F.; Melnyk, P.; Cotellet, P. Targeting Transcriptional Enhanced Associate Domains (TEADs). *J. Med. Chem.***2018**, *61* (12), 5057–5072. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00879>.
- (33) Bokhovchuk, F.; Mesrouze, Y.; Izaac, A.; Meyerhofer, M.; Zimmermann, C.; Fontana, P.; Schmelzle, T.; Erdmann, D.; Furet, P.; Kallen, J.; et al. Molecular and Structural Characterization of a TEAD Mutation at the Origin of Sveinsson's Chorioretinal Atrophy. *FEBS J.***2019**. <https://doi.org/10.1111/febs.14817>.
- (34) Kaan, H. Y. K.; Chan, S. W.; Tan, S. K. J.; Guo, F.; Lim, C. J.; Hong, W.; Song, H. Crystal Structure of TAZ-TEAD Complex Reveals a Distinct Interaction Mode from That of YAP-TEAD Complex. *Sci Rep***2017**, *7*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02219-9>.
- (35) Chen, L.; Chan, S. W.; Zhang, X.; Walsh, M.; Lim, C. J.; Hong, W.; Song, H. Structural Basis of YAP Recognition by TEAD4 in the Hippo Pathway. *Genes Dev.***2010**, *24* (3), 290–300. <https://doi.org/10.1101/gad.1865310>.
- (36) Shi, Z.; He, F.; Chen, M.; Hua, L.; Wang, W.; Jiao, S.; Zhou, Z. DNA-Binding Mechanism of the Hippo Pathway Transcription Factor TEAD4. *Oncogene***2017**, *36* (30), 4362–4369. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.24>.
- (37) Morgunova, E.; Jolma, A.; Yin, Y.; Popov, A.; Taipale, J. TEAD1 Bound to DNA. (*unav*)**2017**. <https://doi.org/10.2210/pdb5nnx/pdb>.
- (38) Aravind, L.; Anantharaman, V.; Balaji, S.; Babu, M. M.; Iyer, L. M. The Many Faces of the Helix-Turn-Helix Domain: Transcription Regulation and Beyond. *FEMS Microbiol. Rev.***2005**, *29* (2), 231–262. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.008>.
- (39) Mesrouze, Y.; Hau, J. C.; Erdmann, D.; Zimmermann, C.; Fontana, P.; Schmelzle, T.; Chène, P. The Surprising Features of the TEAD4-Vgll1 Protein-Protein Interaction. *ChemBioChem***2014**, *15* (4), 537–542. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300715>.
- (40) Chan, S. W.; Lim, C. J.; Loo, L. S.; Chong, Y. F.; Huang, C.; Hong, W. TEADs Mediate Nuclear Retention of TAZ to Promote Oncogenic Transformation. *J. Biol. Chem.***2009**, *284* (21), 14347–14358. <https://doi.org/10.1074/jbc.M901568200>.
- (41) Chan, P.; Han, X.; Zheng, B.; DeRan, M.; Yu, J.; Jarugumilli, G. K.; Deng, H.; Pan, D.; Luo, X.; Wu, X. Autopalmitoylation of TEAD Proteins Regulates Transcriptional Output of the Hippo Pathway. *Nat. Chem. Biol.***2016**, *12* (4), 282–289. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2036>.
- (42) Noland, C. L.; Gierke, S.; Schnier, P. D.; Murray, J.; Sandoval, W. N.; Sagolla, M.; Dey, A.; Hannoush, R. N.; Fairbrother, W. J.; Cunningham, C. N. Palmitoylation of TEAD Transcription Factors Is Required for Their Stability and Function in Hippo Pathway Signaling. *Structure***2016**, *24* (1), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.11.005>.
- (43) Mesrouze, Y.; Meyerhofer, M.; Bokhovchuk, F.; Fontana, P.; Zimmermann, C.; Martin, T.; Delaunay, C.; Izaac, A.; Kallen, J.; Schmelzle, T.; et al. Effect of the Acylation of TEAD4 on Its Interaction with Co-Activators YAP and TAZ. *Protein Sci.***2017**, *26* (12), 2399–2409. <https://doi.org/10.1002/pro.3312>.
- (44) Moroishi, T.; Hansen, C. G.; Guan, K.-L. The Emerging Roles of YAP and TAZ in Cancer. *Nat. Rev. Cancer***2015**, *15* (2), 73–79. <https://doi.org/10.1038/nrc3876>.
- (45) Camargo, F. D.; Gokhale, S.; Johnnidis, J. B.; Fu, D.; Bell, G. W.; Jaenisch, R.; Brummelkamp, T. R. YAP1 Increases Organ Size and Expands Undifferentiated Progenitor Cells. *Curr. Biol.***2007**, *17* (23), 2054–2060. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.039>.
- (46) Zanconato, F.; Cordenonsi, M.; Piccolo, S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell***2016**, *29* (6), 783–803. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.005>.
- (47) Zhang, X.; George, J.; Deb, S.; Degoutin, J. L.; Takano, E. A.; Fox, S. B.; AOCs Study group; Bowtell, D. D. L.; Harvey, K. F. The Hippo Pathway Transcriptional Co-Activator, YAP, Is an Ovarian Cancer Oncogene. *Oncogene***2011**, *30* (25), 2810–2822. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.8>.

- (48) Avruch, J.; Zhou, D.; Bardeesy, N. YAP Oncogene Overexpression Supercharges Colon Cancer Proliferation. *Cell Cycle***2012**, *11* (6), 1090–1096. <https://doi.org/10.4161/cc.11.6.19453>.
- (49) Lu, L.; Li, Y.; Kim, S. M.; Bossuyt, W.; Liu, P.; Qiu, Q.; Wang, Y.; Halder, G.; Finegold, M. J.; Lee, J.-S.; et al. Hippo Signaling Is a Potent in Vivo Growth and Tumor Suppressor Pathway in the Mammalian Liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***2010**, *107* (4), 1437–1442. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911427107>.
- (50) Knight, J. F.; Shepherd, C. J.; Rizzo, S.; Brewer, D.; Jhavar, S.; Dodson, A. R.; Cooper, C. S.; Eeles, R.; Falconer, A.; Kovacs, G.; et al. TEAD1 and C-Cbl Are Novel Prostate Basal Cell Markers That Correlate with Poor Clinical Outcome in Prostate Cancer. *Br. J. Cancer***2008**, *99* (11), 1849–1858. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604774>.
- (51) Diepenbruck, M.; Waldmeier, L.; Ivanek, R.; Berninger, P.; Arnold, P.; Nimwegen, E. van; Christofori, G. Tead2 Expression Levels Control the Subcellular Distribution of Yap and Taz, Zyxin Expression and Epithelial–Mesenchymal Transition. *J Cell Sci***2014**, *127* (7), 1523–1536. <https://doi.org/10.1242/jcs.139865>.
- (52) Liu, Y.; Wang, G.; Yang, Y.; Mei, Z.; Liang, Z.; Cui, A.; Wu, T.; Liu, C.-Y.; Cui, L. Increased TEAD4 Expression and Nuclear Localization in Colorectal Cancer Promote Epithelial–Mesenchymal Transition and Metastasis in a YAP-Independent Manner. *Oncogene***2016**, *35* (21), 2789–2800. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.342>.
- (53) Landin Malt, A.; Cagliero, J.; Legent, K.; Silber, J.; Zider, A.; Flagiello, D. Alteration of TEAD1 Expression Levels Confers Apoptotic Resistance through the Transcriptional Up-Regulation of Livin. *Plos One***2012**, *7* (9), e45498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045498>.
- (54) Nowee, M. E.; Snijders, A. M.; Rockx, D. a. P.; Wit, R. de; Kosma, V. M.; Hämäläinen, K.; Schouten, J. P.; Verheijen, R. H. M.; Diest, P. van; Albertson, D. G.; et al. DNA Profiling of Primary Serous Ovarian and Fallopian Tube Carcinomas with Array Comparative Genomic Hybridization and Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *J. Pathol.***2007**, *213* (1), 46–55. <https://doi.org/10.1002/path.2217>.
- (55) Wang, Y.; Xu, X.; Maglic, D.; Dill, M. T.; Mojumdar, K.; Ng, P. K.-S.; Jeong, K. J.; Tsang, Y. H.; Moreno, D.; Bhavana, V. H.; et al. Comprehensive Molecular Characterization of the Hippo Signaling Pathway in Cancer. *Cell Reports***2018**, *25* (5), 1304–1317.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.001>.
- (56) Liu-Chittenden, Y.; Huang, B.; Shim, J. S.; Chen, Q.; Lee, S.-J.; Anders, R. A.; Liu, J. O.; Pan, D. Genetic and Pharmacological Disruption of the TEAD-YAP Complex Suppresses the Oncogenic Activity of YAP. *Genes Dev.***2012**, *26* (12), 1300–1305. <https://doi.org/10.1101/gad.192856.112>.
- (57) Wang, C.; Zhu, X.; Feng, W.; Yu, Y.; Jeong, K.; Guo, W.; Lu, Y.; Mills, G. B. Verteporfin Inhibits YAP Function through Up-Regulating 14-3-3 σ Sequestering YAP in the Cytoplasm. *Am J Cancer Res***2016**, *6* (1), 27–37.
- (58) Basu, D.; Lettan, R.; Damodaran, K.; Strellec, S.; Reyes-Mugica, M.; Rebbaa, A. Identification, Mechanism of Action, and Antitumor Activity of a Small Molecule Inhibitor of Hippo, TGF- β , and Wnt Signaling Pathways. *Mol Cancer Ther***2014**, *13* (6), 1457–1467. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0918>.
- (59) Oku, Y.; Nishiya, N.; Shito, T.; Yamamoto, R.; Yamamoto, Y.; Oyama, C.; Uehara, Y. Small Molecules Inhibiting the Nuclear Localization of YAP/TAZ for Chemotherapeutics and Chemosensitizers against Breast Cancers. *FEBS Open Bio***2015**, *5*, 542–549. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2015.06.007>.
- (60) Sorrentino, G.; Ruggeri, N.; Specchia, V.; Cordenonsi, M.; Mano, M.; Dupont, S.; Manfrin, A.; Ingallina, E.; Sommaggio, R.; Piazza, S.; et al. Metabolic Control of YAP and TAZ by the Mevalonate Pathway. *Nat. Cell. Biol.***2014**, *16* (4), 357–366. <https://doi.org/10.1038/ncb2936>.
- (61) Konradi, A. W.; Lin, T. T.-L. T. Non-Fused Tricyclic Compounds. WO2018204532 (A1), November 8, 2018.

- (62) Konradi, A. W.; Lin, T. T.-L. T. Benzosulfonyl Compounds. WO2019040380 (A1), February 28, 2019.
- (63) Konradi, A.; Lin, T. Benzocarbonyl Compounds. WO2019113236 (A1), June 13, 2019.
- (64) Song, S.; Xie, M.; Scott, A. W.; Jin, J.; Ma, L.; Dong, X.; Skinner, H. D.; Johnson, R. L.; Ding, S.; Ajani, J. A. A Novel YAP1 Inhibitor Targets CSC-Enriched Radiation-Resistant Cells and Exerts Strong Antitumor Activity in Esophageal Adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther***2018**, *17* (2), 443–454. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0560>.
- (65) Zhang, Z.; Lin, Z.; Zhou, Z.; Shen, H. C.; Yan, S. F.; Mayweg, A. V.; Xu, Z.; Qin, N.; Wong, J. C.; Zhang, Z.; et al. Structure-Based Design and Synthesis of Potent Cyclic Peptides Inhibiting the YAP–TEAD Protein–Protein Interaction. *ACS Med. Chem. Lett.***2014**, *5* (9), 993–998. <https://doi.org/10.1021/ml500160m>.
- (66) Zhou, Z.; Hu, T.; Xu, Z.; Lin, Z.; Zhang, Z.; Feng, T.; Zhu, L.; Rong, Y.; Shen, H.; Luk, J. M.; et al. Targeting Hippo Pathway by Specific Interruption of YAP-TEAD Interaction Using Cyclic YAP-like Peptides. *FASEB J.***2015**, *29* (2), 724–732. <https://doi.org/10.1096/fj.14-262980>.
- (67) Furet, P.; Salem, B.; Mesrouze, Y.; Schmelzle, T.; Lewis, I.; Kallen, J.; Chène, P. Structure-Based Design of Potent Linear Peptide Inhibitors of the YAP-TEAD Protein-Protein Interaction Derived from the YAP Omega-Loop Sequence. *Bioorg. Med. Chem. Lett.***2019**. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.06.022>.
- (68) Barth, M.; Contal, S.; Montalbetti, C.; Spitzer, L. New Compounds Inhibitors of the Yap/Taz-Tead Interaction and Their Use in the Treatment of Malignant Mesothelioma. WO2017064277 (A1), April 20, 2017.
- (69) Pobbati, A. V.; Han, X.; Hung, A. W.; Weiguang, S.; Huda, N.; Chen, G.-Y.; Kang, C.; Chia, C. S. B.; Luo, X.; Hong, W.; et al. Targeting the Central Pocket in Human Transcription Factor TEAD as a Potential Cancer Therapeutic Strategy. *Structure***2015**, *23* (11), 2076–2086. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.09.009>.
- (70) Bum-Erdene, K.; Zhou, D.; Gonzalez-Gutierrez, G.; Ghozayel, M. K.; Si, Y.; Xu, D.; Shannon, H. E.; Bailey, B. J.; Corson, T. W.; Pollok, K. E.; et al. Small-Molecule Covalent Modification of Conserved Cysteine Leads to Allosteric Inhibition of the TEAD·Yap Protein-Protein Interaction. *Cell Chem. Biol.***2019**, *26* (3), 378–389.e13. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.11.010>.
- (71) Wu, X. Tead Transcription Factor Autopalmitoylation Inhibitors. WO2017053706 (A1), March 30, 2017.
- (72) Kaan, H. Y. K.; Sim, A. Y. L.; Tan, S. K. J.; Verma, C.; Song, H. Targeting YAP/TAZ-TEAD Protein-Protein Interactions Using Fragment-Based and Computational Modeling Approaches. *Plos One***2017**, *12* (6), e0178381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178381>.
- (73) Smith, S. A.; Sessions, R. B.; Shoemark, D. K.; Williams, C.; Ebrahimighaei, R.; McNeill, M. C.; Crump, M. P.; McKay, T. R.; Harris, G.; Newby, A. C.; et al. Antiproliferative and Antimigratory Effects of a Novel YAP-TEAD Interaction Inhibitor Identified Using in Silico Molecular Docking. *J. Med. Chem.***2019**, *62* (3), 1291–1305. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01402>.
- (74) McCall, J.; Kelly, R. C.; Romero, D. L. Heterocyclic Compounds for the Inhibition of Pask. US2016235755 (A1), August 18, 2016.
- (75) Šenica, L.; Stopar, K.; Friedrich, M.; Grošelj, U.; Plavec, J.; Počkaj, M.; Podlipnik, Č.; Štefane, B.; Svete, J. Synthesis and Rotational Isomerism of 1-Substituted Methyl (S)-[5-(2-Nitrophenyl)-1H-Pyrazole-4-Carbonyl]Alaninates. *J. Org. Chem.***2016**, *81* (1), 146–161. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02467>.
- (76) Zhang, G.; Ni, H.; Chen, W.; Shao, J.; Liu, H.; Chen, B.; Yu, Y. One-Pot Three-Component Approach to the Synthesis of Polyfunctional Pyrazoles. *Org. Lett.***2013**, *15* (23), 5967–5969. <https://doi.org/10.1021/ol402810f>.
- (77) Augustine, J. K.; Bombrun, A.; Venkatachaliah, S.; Jothi, A. Titanium Mediated Olefination of Aldehydes with α -Haloacetates: An Exceptionally Stereoselective and General Approach to (Z)- α -Haloacrylates. *Org. Biomol. Chem.***2013**, *11* (46), 8065–8072. <https://doi.org/10.1039/c3ob41592a>.

- (78) Nunami, K.; Yamada, M.; Fukui, T.; Matsumoto, K. A Novel Synthesis of Methyl 1,5-Disubstituted Imidazole-4-Carboxylates Using 3-Bromo-2-Isocynoacrylates (BICA). *J. Org. Chem.***1994**, *59*, 7635–7642. <https://doi.org/10.1021/jo00104a018>.
- (79) Meng, T.; Zou, Y.; Khorev, O.; Jin, Y.; Zhou, H.; Zhang, Y.; Hu, D.; Ma, L.; Wang, X.; Shen, J. Synthesis of 3-Aminocoumarin and Derivatives via Copper Catalysis. *Synfacts***2011**, *2011* (07), 0717–0717. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1260516>.
- (80) Aguilar, A.; Zhou, H.; Chen, J.; Liu, L.; Bai, L.; McEachern, D.; Yang, C.-Y.; Meagher, J.; Stuckey, J.; Wang, S. A Potent and Highly Efficacious Bcl-2/Bcl-XL Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry***2013**, *56* (7), 3048–3067. <https://doi.org/10.1021/jm4001105>.
- (81) Yang, J.; Teng, Y.; Ara, S.; Rallapalli, S.; Cook, J. M. ChemInform Abstract: An Improved Process for the Synthesis of 4H-Imidazo[1,5-a][1,4]Benzodiazepines. *ChemInform***2009**, *40* (32). <https://doi.org/10.1002/chin.200932173>.
- (82) Collman, J. P.; Wang, Z.; Zhong, M.; Zeng, L. Syntheses and PKa Determination of 1-(o-Hydroxyphenyl)imidazole Carboxylic Esters. *J. Chem. Soc.***2000**, No. 8, 1217–1222. <https://doi.org/10.1039/b000119h>.
- (83) Bordessa, A.; Keita, M.; Maréchal, X.; Formicola, L.; Lagarde, N.; Rodrigo, J.; Bernadat, G.; Bauvais, C.; Soulier, J.-L.; Dufau, L.; et al. α - and β -Hydrazino Acid-Based Pseudopeptides Inhibit the Chymotrypsin-like Activity of the Eukaryotic 20S Proteasome. *European Journal of Medicinal Chemistry***2013**, *70*, 505–524. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.059>.
- (84) Hanan, E. J.; van Abbema, A.; Barrett, K.; Blair, W. S.; Blaney, J.; Chang, C.; Eigenbrot, C.; Flynn, S.; Gibbons, P.; Hurley, C. A.; et al. Discovery of Potent and Selective Pyrazolopyrimidine Janus Kinase 2 Inhibitors. *J. Med. Chem.***2012**, *55* (22), 10090–10107. <https://doi.org/10.1021/jm3012239>.
- (85) Vajda, S.; Beglov, D.; Wakefield, A. E.; Egbert, M.; Whitty, A. Cryptic Binding Sites on Proteins: Definition, Detection, and Druggability. *Current Opinion in Chemical Biology***2018**, *44*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.05.003>.
- (86) Cimermancic, P.; Weinkam, P.; Rettenmaier, T. J.; Bichmann, L.; Keedy, D. A.; Woldeyes, R. A.; Schneidman-Duhovny, D.; Demerdash, O. N.; Mitchell, J. C.; Wells, J. A.; et al. CryptoSite: Expanding the Druggable Proteome by Characterization and Prediction of Cryptic Binding Sites. *J. Mol. Biol.***2016**, *428* (4), 709–719. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.01.029>.
- (87) Wienken, C. J.; Baaske, P.; Rothbauer, U.; Braun, D.; Duhr, S. Protein-Binding Assays in Biological Liquids Using Microscale Thermophoresis. *Nat. Commun.***2010**, *1* (1). <https://doi.org/10.1038/ncomms1093>.
- (88) Marques, E. F.; Bueno, M. A.; Duarte, P. D.; Silva, L. R. S. P.; Martinelli, A. M.; dos Santos, C. Y.; Severino, R. P.; Brömme, D.; Vieira, P. C.; Corrêa, A. G. Evaluation of Synthetic Acridones and 4-Quinolinones as Potent Inhibitors of Cathepsins L and V. *Eur J Med Chem***2012**, *54*, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.04.002>.
- (89) Tang, Q.; Duan, Y.; Wang, L.; Wang, M.; Ouyang, Y.; Wang, C.; Mei, H.; Tang, S.; Xiong, Y.; Zheng, P.; et al. Synthesis and Antiproliferative Activity of Pyrrolo[2,3-b]Pyridine Derivatives Bearing the 1,8-Naphthyridin-2-One Moiety. *Eur J Med Chem***2018**, *143*, 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.034>.
- (90) Magnez, R.; Thiroux, B.; Taront, S.; Segoula, Z.; Quesnel, B.; Thuru, X. PD-1/PD-L1 Binding Studies Using Microscale Thermophoresis. *Sci. Rep.***2017**, *7* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17963-1>.