

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE FLANDRES ARTOIS

Année 1996

N° d'ordre :

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN CHIMIE ORGANIQUE ET MACROMOLECULAIRE

par

Karine BERTRAND-CAUMONT

**CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE N.C.E. (NEW CHEMICAL ENTITIES),
LIGANDS DES RECEPTEURS NK1 DE LA SUBSTANCE P**

présentée et soutenue publiquement le 29 octobre 1996

JURY

Président :	Dr. Axel COUTURE
Rapporteurs :	Dr. Luc DEBEER Pr. François LE GOFFIC
Membres :	Pr. Jean-Pierre HENICHART Dr. Raymond HOUSSIN Pr. Daniel LESIEUR



La nature est infiniment plus maligne que nous, elle invente des choses beaucoup plus compliquées que tout ce que nous pouvons imaginer.

Nous devons la regarder avec timidité.

Pierre-Gilles De Gennes

Je dédie cette thèse...

*A Manon, ma fille
pour tout le bonheur que tu m'apportes tous les jours*

*A Frédéric, mon époux
pour tout l'amour que tu me donnes*

*A mes parents
pour tous les sacrifices auxquels vous avez consentis et
consentissez encore*

*A mes beaux-parents
pour votre soutien permanent*

*A Laurence Goossens
irremplaçable au laboratoire, témoin d'un jour, amie pour
toujours
pour ton travail, ton aide et ton appui quotidiens*

A la mémoire de mon 'Papi'

A toute ma famille

A tous mes amis

A mon Directeur de thèse,

*Monsieur le Professeur Jean-Pierre Hénichart
Professeur de l'Université de Lille II - Droit et Santé*

Si, au cours de mes études, j'ai pu éprouver un profond respect pour certaines personnes, vous êtes de celles-là.

Vous m'avez accordé votre confiance et m'avez permis de travailler sous votre responsabilité. Pendant quatre ans, j'ai eu le privilège d'apprendre à vos côtés. Vous avez su m'initier à la Recherche avec passion et toujours dans le souci de la rigueur scientifique. Votre talent à savoir vous émerveiller devant le réel, entretenant ainsi une stimulante soif de connaissances, sera pour moi un modèle.

Que ces quelques mots, traces écrites indélébiles, constituent un témoignage de mon très grand respect, de ma sincère admiration et vous apportent tous mes remerciements.

A mes Juges,

*Monsieur le Docteur Axel Couture
Directeur de Recherche au CNRS*

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.

Veillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude.

*Monsieur le Docteur Luc Debeer
Responsable Project Management à UCB, Secteur Pharmaceutique,
Recherche et Développement*

C'est un très grand plaisir de vous compter parmi les membres de ce jury.

Vous avez accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur. Je voudrais vous remercier d'y apporter votre regard critique, éclairé de votre compétence dans le développement pharmaceutique.

*Monsieur le Professeur François Le Goffic
Professeur de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris*

J'ai eu le privilège d'assister à votre enseignement de biochimie où j'ai pu apprécier votre compétence et votre passion pour les phénomènes biologiques.

Vous me faites aujourd'hui l'honneur de juger ce travail.

Que ces quelques lignes me permettent de vous en remercier.

*Monsieur le Docteur Raymond Houssin
Maître de Conférences de l'Université de Lille II - Droit et Santé*

Vous avez pu suivre quotidiennement l'avancement de ce travail et l'avez toujours fait avec beaucoup de patience et de gentillesse.

Il m'est aujourd'hui particulièrement agréable de vous témoigner toute ma reconnaissance pour votre disponibilité permanente et pour tous les conseils que vous m'avez prodigués.

*Monsieur le Professeur Daniel Lesieur
Professeur de l'Université de Lille II - Droit et Santé
Directeur de l'Institut de Chimie Pharmaceutique de Lille*

Vous m'avez accueillie dans votre laboratoire et aujourd'hui vous me faites l'honneur de siéger dans ce jury.

Qu'il me soit permis de vous en remercier sincèrement et de vous assurer de ma profonde gratitude.

A toutes les personnes qui, par leur aide précieuse, ont permis la réalisation de ce travail,

Je tiens à remercier

Madame Marie-Agnès Lassoie-Culot, Monsieur Solo Goldstein, Monsieur Michel Neuwels

pour l'intérêt que vous avez porté à cette étude, pour les conseils et les idées qui ont contribué à tisser ce projet

Monsieur Jean-François Goossens

pour tout ce que tu as pu m'apprendre, avec pédagogie, en pharmacologie moléculaire

Monsieur Thierry Taverner

pour ton importante aide en informatique

Monsieur Habib Abdellaoui, Monsieur Stéphane Gadeau, Monsieur Régis Millet mais également Mademoiselle Corinne Audouin, Mademoiselle Anne Legrand, Mademoiselle Anne Maurin, Mademoiselle Emmanuelle Meulon, Monsieur Saïd Yous et tous les autres membres du laboratoire

pour le soutien technique ou moral que vous avez pu m'apporter

Toutes les personnes d'UCB, Secteur Pharmaceutique, et en particulier Monsieur Henri Blockerye, Monsieur Emile Cavoy, Monsieur Charles Dogimont, Monsieur Alain Fauconnier, Monsieur Jean-Claude Hayez, Madame Nathalie Mestdagh-Deschamps, Monsieur Guy Wattier

Les membres du Laboratoire d'application de RMN, Service Commun de Physico-Chimie de l'Université de Lille I.I.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

CHAPITRE I. LA SUBSTANCE P ET LES TACHYKININES

A. GENERALITES	4
A.1. DECOUVERTE ET STRUCTURE	4
A.2. METABOLISME	4
A.3. LES RECEPTEURS	5
A.3.1. Sous-types de récepteurs	5
A.3.2. Récepteurs couplés à une protéine G	6
B. LES TACHYKININES, CLES DE VOUTE DE NOUVELLES STRATEGIES THERAPEUTIQUES	8
B.1. IMPLICATIONS PHYSIOLOGIQUES DES TACHYKININES	8
B.1.1. Action des tachykinines au niveau central	8
B.1.2. Action des tachykinines au niveau périphérique	8
B.1.2.1. Effets généraux.....	8
B.1.2.2. Rôles physiologiques au niveau bronchique	9
B.2. IMPLICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DES TACHYKININES ET POTENTIALITE THERAPEUTIQUE DES LIGANDS DE LEURS RECEPTEURS	9
B.2.1. Tachykinines et douleur	9
B.2.2. Tachykinines et vomissement	10
B.2.3. Tachykinines et asthme	10
B.2.4. Tachykinines et migraine	11
B.2.5. Tachykinines et arthrite rhumatoïde	12

CHAPITRE II. N.C.E. LIGANDS DES RECEPTEURS NK1 DE LA SUBSTANCE P

A. ARRIERE-PLAN BIBLIOGRAPHIQUE : FONDEMENT D'UNE STRATEGIE DE DRUG DESIGN	14
A.1. ETUDE DES ANTAGONISTES DE LA SUBSTANCE P : MISE EN EVIDENCE DE DEUX CLASSES DE COMPOSES	14
A.1.1. Revue des principaux antagonistes connus	14

A.1.1.1. Antagonistes peptidiques.....	14
A.1.1.2. Antagonistes non peptidiques.....	17
a. Antagonistes issus de l'optimisation d'une structure identifiée par screening.....	17
i. Dérivés de type diamine.....	17
ii. Dérivés de type aminoéther.....	18
iii. Dérivés de type perhydroisoindole.....	18
iv. Dérivés du tryptophane.....	18
v. Dérivés de type diacylpipérazine.....	19
vi. Structures diverses.....	19
b. Antagonistes issus de l'optimisation d'un lead peptidique.....	21
c. Autres structures.....	23
A.1.2. Etude des relations structure-affinité : mise en évidence de deux classes distinctes d'antagonistes.....	24
A.1.2.1. Etude du CP96345 et du L709-210, deux 2-(diphénylméthyl)-1-azabicyclo[2.2.2]octanes.....	24
a. Etude du CP 96345.....	24
i. Le noyau quinuclidine.....	24
ii. Le groupement benzhydryle.....	25
iii. La chaîne benzylaminée.....	25
iv. Mise en évidence d'une conformation bioactive possible du CP96345.....	26
b. Le L709-210.....	26
i. La chaîne benzyloxy.....	26
ii. Le noyau quinuclidine.....	27
iii. Le groupement benzhydryle.....	27
iv. Mise en évidence d'une conformation bioactive possible du L709-210.....	27
c. Comparaison du CP96345 et du L709-210 et conclusions : possibilité de deux classes distinctes d'antagonistes.....	28
A.1.2.2. Etude du CP99994 et du L733-060, deux 2-phénylpipéridines.....	29
a. Etude du CP99994.....	29
i. Mise en évidence d'une conformation bioactive possible du CP99994.....	29
ii. Le noyau pipéridine.....	31
iii. Le groupement phényle.....	31
iv. La chaîne benzylaminée.....	31
b. Etude du L733-060.....	31
i. Le noyau pipéridine.....	31
ii. La chaîne 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyloxy.....	33

iii. Mise en évidence d'une conformation bioactive possible du L733-060	33
c. Comparaison du CP99994 et du L733-060 et conclusions : définition de deux modes de liaisons possibles des antagonistes au récepteur	33
A.1.2.3. Etude du LY303-870 et du L732-138, deux structures issues du tryptophane	33
a. Etude du LY303-870	34
i. Etude de la partie C-terminale	34
ii. Etude de la nature de l'acide aminé précurseur	34
iii. Etude de la chaîne N-terminale	35
b. Etude du L732-138	35
i. Etude de la nature de l'acide aminé	35
ii. Etude de la liaison ester	35
iii. Etude de l'extrémité N-terminale	36
iv. Mise en évidence d'une conformation bioactive possible du L732-138	36
c. Comparaison du LY303-870 et du L732-138	36
A.1.2.4. Etude du FK888	37
a. Etude de l'acide aminé C-terminal	37
i. Nature de l'acide aminé	37
ii. Substituant C-terminal	37
b. Etude de l'acide aminé N-terminal	38
i. Nature de l'acide aminé	38
ii. Substituant N-terminal	38
iii. Importance de l'acide aminé N-terminal	39
c. Mise en évidence d'une conformation bioactive possible du FK888	39
d. Conclusion	40
A.1.2.5. Tableaux récapitulatifs des relations structure-affinité des antagonistes étudiés	40
A.2. BIOLOGIE MOLECULAIRE DES RECEPTEURS NK1	62
A.2.1. Liaison des antagonistes aux récepteurs	62
A.2.1.1. Etudes sur récepteurs de rat	62
a. Mise en évidence d'un site de liaison commun aux antagonistes	62
b. Mise en évidence de différences dans le mode d'interaction entre les antagonistes et les récepteurs	63
A.2.1.2. Etudes sur récepteurs humains	64
a. Etude des acides aminés impliqués dans l'interaction du CP96345 et du récepteur NK1 humain	64
b. Implication de l'histidine 197 et de l'histidine 265 dans la liaison de différents antagonistes	65

i. Interaction avec His197	66
ii. Interaction avec His265	66
A.2.2. Liaison de la SP aux récepteurs	67
A.2.3. Comparaison des sites de liaison des agonistes et des antagonistes	68
A.2.3.1. Notion de "compétitivité allostérique"	68
A.2.3.2. Mutations et mesure de l'affinité	69
A.2.4. Conclusions	72

B. ELABORATION D'UNE STRATEGIE DE DRUG DESIGN : MISE EN EVIDENCE DE N.C.E.

LIGANDS DES RECEPTEURS NK1	73
B.1. SCHEMA GENERAL DE LA STRATEGIE	73
B.2. IDENTIFICATION D'UN LEAD PEPTIDIQUE AFFIN POUR LES RECEPTEURS NK1	75
B.2.1. Identification d'un lead peptidique par recherche dans une banque de structures et optimisation	75
B.2.1.1. Mise en évidence d'une première structure tripeptidique affine	75
B.2.1.2. Etude et optimisation de l'ucb16101	75
a. Etude de l'influence de la stéréochimie sur l'affinité	75
b. Simplification de la structure tripeptidique	76
B.2.1.3. Conclusion	77
B.2.2. Identification d'un lead peptidique représentant une classe d'antagonistes différente de celle du FK888	78
B.2.2.1. Hypothèse de travail	78
B.2.2.2. Mesure de l'affinité du composé 1 pour les récepteurs NK1 humains	79
B.2.2.3. Relations structure-affinité pour le composé 1	79
a. Importance relative des noyaux aromatiques dans la liaison de 1 au récepteur	79
b. Importance de la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline dans la liaison du composé 1	80
B.2.2.4. Comparaison du FK888 et du composé 1	81
B.2.2.5. Conclusion : mise en évidence de deux classes d'antagonistes se développant sur la base de deux pharmacophores distincts	82
B.3. LE FK888 ET LE DIPEPTIDE 1 , DEUX LEADS PEPTIDIQUES A ANALYSER PARALLELEMENT :	
MODIFICATIONS STRUCTURALES ET PHARMACOMODULATIONS	84
B.3.1. Modification structurale du FK888 : recherche d'un squelette adapté au pharmacophore de type I	84
B.3.1.1. Hypothèse de travail	84
B.3.1.2. Recherche d'un squelette adapté au pharmacophore de type I par liaison des pharmacons du FK888	85
a. Conception du squelette	85

b. Evaluation du potentiel pharmacologique du dérivé 4 et interprétation	85
c. Vérification de l'hypothèse de travail	86
d. Pharmacomodulations autour du squelette 1-benzyl-3-(2-aminoéthyl)indole	86
i. Modification de la chaîne aminoéthyle	86
ii. Modification des pharmacocons	86
e. Conclusion	87
B.3.1.3. Analyse de molécules hybrides	89
a. Conception d'une molécule hybride FK888 / CP99994	89
b. Evaluation du potentiel pharmacologique de 17 et interprétation	90
c. Conclusion	90
B.3.2. Modification structurale directe du composé 1 : recherche d'un squelette adapté au pharmacophore de type II	91
B.3.2.1. Hypothèse de travail	91
B.3.2.2. Recherche d'un squelette adapté au pharmacophore de type II par rigidification de la chaîne principale sur la chaîne principale du composé 1	91
a. Conception du squelette	91
b. Evaluation du potentiel pharmacologique du composé 18 et interprétation	92
c. Conclusion	92
B.3.3. Etude de 1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines N-benzylées	92
B.3.3.1. Les 1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines N-benzylées et le pharmacophore de type II	92
a. Conception du squelette	92
b. Resultats pharmacologiques et conclusion	93
B.3.3.2. Les 1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines N-benzylées et le pharmacophore de type I	93
a. Passage du pharmacophore de type II au pharmacophore de type I	93
b. Optimisation du noyau 1-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline, modeste représentant du pharmacophore de type I -complété dans l'annexe I-	94
B.3.3.3. Conclusion	94
B.3.4. Etude du noyau pipérazine -complété dans l'annexe II-	94
B.3.5. Autre modification structurale du dérivé 1 : mise en évidence de N.C.E. pour le pharmacophore de type II	94
B.3.5.1. Conception du squelette	94
B.3.5.2. Evaluation du potentiel pharmacologique du dérivé 26 et interprétation	95
B.3.5.3. Pharmacomodulations autour du noyau 1-amino-2-[3,5-bis(trifluoromé- thyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène	96
B.3.5.4. Conclusion	98
B.4. CONCLUSION	98

CHAPITRE III. STRATEGIE DE SYNTHESE

A. SYNTHESSES DES DERIVES PEPTIDIQUES	102
A.1. GENERALITES	102
A.2. SYNTHESE DES TRIPEPTIDES N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl ET DES DIPEPTIDES N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-OBzl ET N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Sar-OBzl	103
A.2.1. Synthèse des tripeptides N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl	103
A.2.1.1. Synthèse de N ϵ -Bz-N α -Z-Lys	103
A.2.1.2. Synthèse du tripeptide N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale	103
A.2.1.3. Synthèse du tripeptide N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale	105
A.2.1.4. Conclusion	105
A.2.1.5. Remarques concernant l'analyse par RMN des tripeptides	106
A.2.2. Synthèse des dipeptides N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-OBzl et N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Sar-OBzl	106
A.3. SYNTHESE DU N-{1-[(1-METHYLINDOL-3-YL)CARBONYL](S)-PROLYL}(S)-TRYPTOPHANATE DE 3,5-BIS-(TRIFLUOROMETHYL)BENZYLE 1 ET DES DIPEPTIDES APPARENTES 2 ET 3	108
A.3.1. Synthèse du synthon N-{1-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl](S)-proline 30	109
A.3.2. Synthèse du tryptophanate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle 36 et de l'alaninate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle 37	109
A.3.3. Synthèse du composé 1	110
A.3.4. Préparation des dipeptides 2 et 3	110
B. SYNTHESE DES DERIVES NON PEPTIDIQUES ISSUS DE L'ANALYSE DES LEADS PEPTIDIQUES	111
B.1. SYNTHESE DES DERIVES POSSEDANT UN SQUELETTE INDOLIQUE	111
B.1.1. Préparation des dérivés du 3-{2-[1-(4-méthyl-1,2,5,6-tétrahydro)pyridinoéthyl]}indole 5 et 8 , et mise au point des conditions de substitution de l'atome d'azote indolique	111
B.1.1.1. Acylation de l'atome d'azote indolique du composé 40	111
B.1.1.2. Alkylation de l'atome d'azote indolique du composé 40	112
B.1.2. Synthèse du dérivé 4	113
B.1.3. Synthèse des dérivés possédant un squelette 1-alkyl-3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]indole ou 1-alkyl-3-[2-(2-méthoxybenzylamino)éthyl]indole	113
B.2. SYNTHESE D'UNE MOLECULE HYBRIDE FK888 / CP99994, LE COMPOSE 17	117
B.2.1. Stratégie de synthèse envisagée	117
B.2.2. Synthèse du dérivé 51 , intermédiaire dans la synthèse du CP99994 et de l'hybride 17	118

B.2.2.1. Préparation du mélange des diastéréoisomères cis et trans de 51	118
B.2.2.2. Protection de la fonction amine et séparation des diastéréoisomères de 51	119
B.2.2.3. Bilan	119
B.2.3. Synthèse du (±)CP99994 et du composé 17	120
B.2.3.1. Synthèse du (±) CP99994	120
B.2.3.2. Synthèse du composé 17	120
B.3. SYNTHÈSE DE DERIVES POSSEDANT UN SQUELETTE 2-OXO-3-BENZYL-1,2,3,4- TETRAHYDROQUINOXALINE -complété dans l'annexe III-	122
B.3.1. Stratégie de synthèse	122
B.3.2. Préparation de la 2-oxo-3-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 58	124
B.3.3. Acylation de la 2-oxo-3-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 58	124
B.3.4. Benzylolation de la 2-oxo-3-benzyl-4-acyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 59	125
B.4. SYNTHÈSE DE 1,2,3,4-TETRAHYDROQUINOXALINES -complété dans l'annexe IV-	126
B.4.1. Stratégie de synthèse envisagée	126
B.4.2. Préparation des N-acyl-N'-alkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines	127
B.4.2.1. Alkylation d'une tétrahydroquinoxaline monoacylée : mise en évidence de difficultés opératoires lors de l'alkylation par un dérivé pouvant subir une déhydrohalogénéation	127
B.4.2.2. Nouvelle stratégie pour la préparation de 1-acyl-4-alkyl-1,2,3,4- tétrahydroquinoxalines	128
a. Préparation de 1-alkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines	128
b. Préparation de la 1-acyl-4-alkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 63	129
c. Préparation de la 1-acyl-4-alkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline possédant la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]propyle (19 , 20 et 21)	129
B.4.3. Préparation de 1,4-dialkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines	130
B.5. SYNTHÈSE DE DERIVES POSSEDANT UN SQUELETTE PIPERAZINE -reporté en intégralité en annexe V-	131
B.6. SYNTHÈSE DE DERIVES A SQUELETTE 1-AMINO-2-[3,5-BIS(TRIFLUORO METHYL)BENZYLOXY]-1,2,3,4-TETRAHYDRONAPHTALENE	132
B.6.1. Stratégie de synthèse	132
B.6.2. Préparation de trans-1-amino-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène-2-ol	132
B.6.3. Benzylolation des composés 74 , 75 et 76	134

CHAPITRE IV. PHARMACOLOGIE

CONCLUSION

PARTIE EXPERIMENTALE

A. APPAREILLAGES ET TECHNIQUES ANALYTIQUES	141
B. PROTOCOLES CHIMIQUES	143
B.1. SYNTHÈSE DES TRIPEPTIDES N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl ET DES DIPEPTIDES N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-OBzl ET N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Sar-OBzl	143
Synthèse de la N ϵ -benzoyl-Lysine (N ϵ -Bz-Lys)	143
Synthèse de la N ϵ -benzoyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine (N ϵ -Bz-N α -Z-Lys)	143
Synthèse du N-tert-butoxycarbonyl-Alanine-Sarcosinate de benzyle (N-Boc-Ala-Sar-OBzl)	144
Synthèse de l'Alanine-Sarcosinate de benzyle (Ala-Sar-OBzl) (chlorhydrate)	145
Synthèse des isomères (R,R), (S,R) et (R,S) du N ϵ -benzoyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine-Alanine-Sarcosinate de benzyle (N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl)	146
Synthèse du N ϵ -benzoyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine-Alaninate de méthyle (N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-OMe).....	147
Synthèse de la N ϵ -benzoyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine-Alanine (N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala)	148
Synthèse de l'isomère (S,S) du N ϵ -benzoyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine-Alanine-Sarcosinate de benzyle (N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl)	149
Synthèse de la N ϵ -tert-butoxycarbonyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine (N ϵ -Boc-N α -Z-Lys)	150
Synthèse du N ϵ -tert-butoxycarbonyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine-Alaninate de benzyle (N ϵ -Boc-N α -Z-Lys-Ala-OBzl) et du N ϵ -tert-butoxycarbonyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine-sarcosinate de benzyle (N ϵ -Boc-N α -Z-Lys-Sar-OBzl)	151
Synthèse des quatre stéréoisomères du N ϵ -benzoyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine-Alaninate de benzyle (N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-OBzl)	152
Synthèse des deux stéréoisomères du N ϵ -benzoyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine-Sarcosinate de benzyle (N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Sar-OBzl)	153
B.2. SYNTHÈSE DU N-{1-[(1-METHYLINDOL-3-YL)CARBONYL](S)-PROLYL}(S)-TRYPTOPHANATE DE 3,5-BIS(TRIFLUOROMETHYL)BENZYLE 1 ET DES DIPEPTIDES APPARENTES 2 ET 3	154
Synthèse du 1-méthylindol-3-yl carboxylate de méthyle 31	154
Synthèse de l'acide 1-méthyl-3-indole carboxylique 32	154
Synthèse du N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl](S)-prolinate de tert-butyle 33	155
Synthèse de la N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl](S)-proline 30	155
Synthèse du N-tert-butoxycarbonyltryptophanate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle 34	156
Synthèse du N-tert-butoxycarbonylalaninate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle 35	156
Synthèse du tryptophanate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle 36 (chlorhydrate)	157
Synthèse de l'alaninate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle 37 (chlorhydrate)	158
Synthèse du {N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl](S)-prolyl}-(S)-tryptophanate de 3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyle 1	158

Synthèse du {N-[(1-méthyl-indol-3-yl)carbonyl](S)-prolyl}(S)-alaninate de 3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyle 2	159
Synthèse du {N-[(1-méthyl-indol-3-yl)carbonyl](S)-prolyl}(S)-tryptophanate de méthyle 3	160
B.3. SYNTHÈSE DES DERIVES POSSEDANT UN SQUELETTE INDOLIQUE	162
Synthèse du 3-(2-bromoéthyl)indole 38	162
Synthèse du bromure de 3-{2-[1-(4-méthyl)pyridinio]éthyl}indole 39	162
Synthèse du 3-{2-[1-(4-méthyl)-1,2,5,6-tétrahydropyridino]éthyl}indole 40	163
Synthèse du 1-(2-méthoxybenzoyl)-3-{2-[1-(4-méthyl)-1,2,5,6-tétrahydropyridino]éthyl}-indole 8 (chlorhydrate)	163
Synthèse du bromure de 2-méthoxybenzyle 41	164
Synthèse du 1-(2-méthoxybenzyl)-3-{2-[1-(4-méthyl)-1,2,5,6-tétrahydropyridino]éthyl}indole 5 (chlorhydrate)	164
Synthèse du 3-({[N-(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]prolyl}aminoéthyl)indole 42	165
Synthèse du 1-benzyl-3-({[N-(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]prolyl}aminoéthyl)indole 4	166
Synthèse du 3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]indole 43	167
Synthèse du 3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]-5-méthoxyindole 44	167
Synthèse du 3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]-5-benzyloxyindole 45	168
Synthèse du 1-benzyl-3-(2-(2-méthoxybenzamido)éthyl)indole 6	168
Synthèse du 1-méthyl-3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]indole 9	169
Synthèse du 1-benzyl-3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]-5-méthoxyindole 11	170
Synthèse du 1-méthyl-3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]-5-méthoxyindole 12 et du 1-méthyl-3-[2-[N-méthyl(2-méthoxybenzamido)éthyl]-5-méthoxyindole 46	170
Synthèse du 1-benzyl-3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]-5-benzyloxyindole 13	171
Synthèse du 1-méthyl-3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]-5-benzyloxyindole 14	172
Synthèse du 1-benzyl-3-(2-(2-méthoxybenzylamino)éthyl)-5-méthoxyindole 15 (chlorhydrate)	173
Synthèse du 1-méthyl-3-(2-(2-méthoxybenzylamino)éthyl)-5-méthoxyindole 16 (maléate)	174
Synthèse du 3-(2-(2-méthoxybenzylamino)éthyl)indole 47 (bromhydrate)	174
Synthèse du 3-(2-(N-tert-butoxycarbonyl-N-(2-méthoxybenzyl)amino)éthyl)indole 48	175
Synthèse du 1-benzyl-3-(2-(N-tert-butoxycarbonyl-N-(2-méthoxybenzyl)amino)éthyl)indole 49	175
Synthèse du 1-méthyl-3-(2-(N-tert-butoxycarbonyl-N-(2-méthoxybenzyl)amino)éthyl)indole 50	176
Synthèse du 1-benzyl-3-(2-(2-méthoxybenzyl)amino)éthyl)indole 7 (chlorhydrate)	176
Synthèse du 1-méthyl-3-(2-(2-méthoxybenzyl)amino)éthyl)indole 10 (chlorhydrate)	177
B.4. SYNTHÈSE D'UNE MOLECULE HYBRIDE FK888 / CP99994, LE COMPOSE 17	178
Synthèse de la 5-nitro-6-phénylpipéridin-2-one 52	178
Synthèse de la 5-oxo-6-phénylpipéridin-2-one 53	178
Synthèse de la 5-oximino-6-phénylpipéridin-2-one 54	179
Synthèse de la 5-amino-6-phénylpipéridin-2-one 55	179
Synthèse de la 5-[(2-méthoxybenzyl)amino]-6-phénylpipéridin-2-one 51 (sous forme de mélange de diastéréoisomères : 51 cis / 51 trans) et de 51 trans	179
Synthèse de la 5-[(2-méthoxybenzyl)amino]-6-phénylpipéridin-2-one 51 cis	180

Synthèse de la 2-phényl-3-[(2-méthoxybenzyl)amino]pipéridine (\pm) CP99994 (dichlorhydrate)	181
Synthèse de la 1-[(N-(1-méthylindol-3-yl)carbonyl)prolyl]-2-phényl-3-[(2-méthoxybenzyl)amino]pipéridine 17	182
B.5. SYNTHÈSE DE DERIVES POSSEDANT UN SQUELETTE 2-OXO-3-BENZYL-1,2,3,4-TETRAHYDROQUINOXALINE -complété dans l'annexe VI-	184
Synthèse de la 2-oxo-3-benzyl-1,2-dihydroquinoxaline 57	184
Synthèse de la 2-oxo-3-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 58	184
Synthèse de la 2-oxo-3-benzyl-4-[(N-(1-méthylindol-3-yl)carbonyl)prolyl]-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 58	185
Synthèse de la 1-[3,5-bis(trifluorométhyl)benzyl]-2-oxo-3-benzyl-4-[(N-(1-méthylindol-3-yl)carbonyl)prolyl]-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 18	186
B.6. SYNTHÈSE DE 1,2,3,4-TETRAHYDROQUINOXALINES -complété dans l'annexe VII-	187
Synthèse de la 1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 60	187
Synthèse de la 1-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzoyl]-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 64	187
Synthèse de la 1-benzoyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 65	188
Synthèse de la 1-phénacétyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 66	188
Synthèse de la 1-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyl]-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 67	189
Synthèse de la 1-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 68	190
Synthèse de la 1-phénéthyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 69	190
Synthèse de la 1-[(N-(1-méthylindol-3-yl)carbonyl)prolyl]-4-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyl]-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 19	191
Synthèse de la 1-[(N-(1-méthylindol-3-yl)carbonyl)prolyl]-4-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 20	192
Synthèse de la 1-[(N-(1-méthylindol-3-yl)carbonyl)prolyl]-4-(2-(phényl)éthyl)-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 21	193
B.7. SYNTHÈSE DE DERIVES POSSEDANT UN SQUELETTE PIPERAZINE -reporté dans l'annexe VIII-	194
B.8. SYNTHÈSE DES DERIVES A SQUELETTE 1-AMINO-2-[3,5-BIS-(TRIFLUOROMETHYL)BENZYLOXY]-1,2,3,4-TETRAHYDRONAPHTALÈNE	194
Synthèse du 2-bromo-1,2,3,4-tétrahydronaphtalén-1-ol 72	194
Synthèse du 1,2-époxy-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène 73	194
Synthèse du 1-diméthylamino-1,2,3,4-tétrahydronaphtalèn-2-ol 74 (sous forme de chlorhydrate)	195
Synthèse du 1-[(N-méthyl-N-carboxamidométhyl)amino]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalèn-2-ol 75	195
Synthèse du 1-[2-(carboxamido)pyrrolidino]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalèn-2-ol 76	196
Synthèse du 1-(diméthylamino)-2-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène 26 (sous forme de chlorhydrate)	197
Synthèse du 1-[(N-méthyl-N-carboxamidométhyl)amino]-2-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène 27	197

Synthèse du 1-[2-(carboxamido)pyrrolidino]-2-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène 28 (sous forme de chlorhydrate) et du 1-{2-[N-(3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyl)carboxamido]pyrrolidino}-2-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène 29 (sous forme de chlorhydrate).....	198
---	-----

C. PROTOCOLES PHARMACOLOGIQUES 201

C.1. BINDING SUR RECEPTEURS NK1 EXPRIMES DANS DES CELLULES IM-9 201

C.2. BINDING SUR RECEPTEURS NK1 EXPRIMES DANS DES CELLULES CHO 202

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

Abréviations biologiques :

AC	adénylate cyclase
ACE	angiotensin converting enzyme
ADN	acide désoxyribonucléique
AMP	adénosine monophosphate
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine triphosphate
DAG	diacylglycérol
G	protéine G
IP ₃	inositol 1,4,5-triphosphate
NANC	non adrénergique, non cholinergique
NANCe	non adrénergique, non cholinergique excitateur
NEP	neutral endopeptidase
NKA	neurokinine A
NKB	neurokinine B
NPK	neuropeptide K
NP _γ	neuropeptide γ
PIP ₂	phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PL	phospholipase
PPT	préprotachykinine
SNC	système nerveux central
SP	Substance P

Abréviations chimiques:

Ac	acétyl
Ar	aromatique
Boc	tert-butoxycarbonyl
BOP	hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yl-oxy-tris(diméthylamino)phosphonium
Bu	butyl
Bz	benzoyl
Bzl	benzyl
CCM	chromatographie sur couche mince
conf	conformère / conformation
DCC	1,3-dicyclohexylcarbodiimide
DCU	1,3-dicyclohexylurée
DEA	diéthylamine

diast	diastéréoisomère
DIPEA	diisopropyléthylamine
DME	diméthoxyéthane
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
EDCI	1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
Et	éthyl
F	point de fusion
HOBT	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	high pressure liquid chromatography
Ind	indole
IR	infra-rouge
Me	méthyl
NBS	N-bromosuccinimide
N.C.E.	new chemical entity
Ph	phényl
PyBOP	hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidinophosphonium
Rf	retention factor
RMN	résonance magnétique nucléaire
	s singulet
	d doublet
	t triplet
	q quadruplet
	m massif
	l large
RX	rayons X
sol	solution
SM	spectrométrie de masse
	EI electronic impact
	FAB fast atom bombardment
TEA	triéthylamine
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
t _R	temps de rétention
UV	ultra-violet
Z	benzyloxycarbonyl

PREFACE

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du Département Pharmacochimie de l'Institut de Chimie Pharmaceutique de Lille, sous la responsabilité scientifique de Monsieur le Professeur Jean-Pierre Hénichart. Ils ont été menés en collaboration avec la firme UCB S.A., Secteur Pharmaceutique à laquelle nous tenons à adresser nos plus vifs remerciements.

Ils appartiennent au domaine de la chimie thérapeutique et avaient pour objectifs la conception et la synthèse de molécules originales à potentialité thérapeutique. Certaines pourraient désormais faire l'objet d'investigations plus poussées de la part de notre partenaire industriel qui a tenu à leur conserver un caractère confidentiel.

Ce mémoire comporte donc une partie annexe à laquelle n'ont accès que les membres du jury et qui reprend toutes les informations concernant les structures soumises à la clause de confidentialité.

I N T R O D U C T I O N

Depuis une trentaine d'années, ont été mises en évidence des molécules de nature peptidique ayant un rôle de neuromédiateurs. Parmi elles, la Substance P (SP), membre de la famille des tachykinines, a largement été étudiée. Son implication dans la régulation physiologique de nombreuses fonctions biologiques est visible tant au niveau central (médiation des messages nociceptifs,...) qu'au niveau périphérique (contraction des muscles lisses,...). Mais c'est l'importance des tachykinines dans l'établissement, le maintien, voire l'amplification de plusieurs dysfonctionnements pathologiques (asthme, migraine, douleur,...) qui a induit de nombreuses recherches pour la mise en évidence d'antagonistes de leurs récepteurs. Le nombre sans cesse croissant de brevets pris sur le sujet -figure 1- est révélateur de l'intérêt médical que peuvent présenter ces "anti-neurokinines" (intérêt qui attend néanmoins, pour être confirmé, une évaluation clinique des produits dans les indications citées).

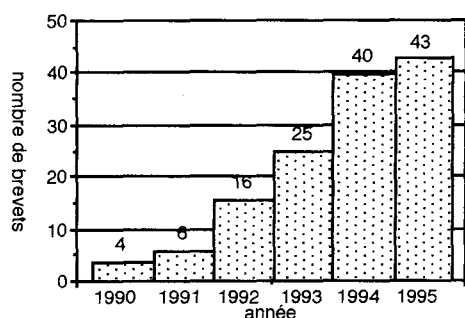


figure 1 : nombre de brevets publiés par an sur les antagonistes des tachykinines (adapté de Swain, 1996)

Le choix d'une niche thérapeutique scientifiquement adaptée à la potentialité des substances recherchées et dans laquelle ces dernières pourraient apporter un bénéfice, doit souvent être réalisé.

Or, la prévalence de l'asthme (10% de la population mondiale affectée) et le manque de traitement étiologique suscitent un large besoin de thérapies nouvelles.

Par ailleurs,

- rationalisée

- par les résultats montrés par des antagonistes de la SP à réduire l'inflammation des voies respiratoires dans des modèles animaux (Lowe, 1996)

- par des premières données cliniques concernant un antagoniste mixte des récepteurs NK1 de la SP et NK2 de la Neurokinine A (NKA), autre tachykinine, et ayant confirmé le bénéfice thérapeutique que pouvait apporter un tel produit dans le traitement de l'asthme (Ichinose et al., 1992)

- et confortée par le fait que ce ligand NK1 / NK2 soit désormais remplacé en développement par un antagoniste NK1 sélectif (Swain, 1996),

la recherche de structures "anti-SP" peut s'inscrire dans le cadre de la thérapie de cette maladie.

Nous nous sommes donc attachés à la mise en évidence d'antagonistes potentiels des récepteurs NK1 de la SP avec, en filigrane, leur application possible dans la thérapie anti-asthmatique.

Nous avons cherché à mettre au point une stratégie rationnelle visant d'abord à élaborer des structures originales (N.C.E. : New Chemical Entity), ligands des récepteurs NK1. La connaissance des mécanismes de reconnaissance moléculaire apparaît alors comme un outil nécessaire à une meilleure approche du problème, qu'il nous est possible de forger du fait des nombreuses études déjà réalisées autour d'antagonistes de la SP.

Dans ce mémoire, après une rapide présentation de la SP et des tachykinines permettant, en outre, de clarifier les potentialités thérapeutiques des antagonistes, nous détaillerons la mise en évidence de N.C.E. ligands des récepteurs NK1.

Dans cette optique, nous reviendrons sur les connaissances bibliographiques qui nous ont permis de fonder nos hypothèses de travail. Elles s'articulent autour :

- des résultats d'études comparées de relations structure-affinité qui révèlent la possibilité d'existence de deux classes distinctes de composés
- des données concernant la biologie moléculaire des récepteurs NK1 qui corroborent les notions précédentes.

Par ailleurs, nous suivrons pas-à-pas le déroulement de la stratégie en confrontant nos hypothèses de travail aux résultats pharmacologiques obtenus pour les produits élaborés.

Les synthèses des différents composés réalisées seront développées dans une troisième partie.

Enfin, un quatrième chapitre, court, aura pour objet de résumer les travaux de pharmacologie qui ont été effectués sur les produits préparés.

CHAPITRE I :

*LA SUBSTANCE P
ET
LES TACHYKININES*

A. GENERALITES

A.1. DECOUVERTE ET STRUCTURE

La SP est un undécapeptide isolé en 1931 par Von Euler et Gaddum (1931) à partir de cerveau et d'intestin de cheval. Si sa nature peptidique est établie depuis 1934 (Gaddum et Schild, 1934), sa séquence n'a été mise en évidence qu'en 1971 (Chang et Leeman, 1971), séquence confirmée aussitôt par la synthèse de la molécule (Tregear et al., 1971). La SP est désormais la mieux décrite de la famille des tachykinines -figure 2- qui comprend également la neurokinine A (NKA ou substance K), la neurokinine B (NKB ou neuromédine K) et les neuropeptides K et γ .

Les membres de la famille des tachykinines sont caractérisés par une séquence carboxyterminale identique: Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ où X est, soit un acide aminé aromatique (Phe, Tyr), soit un acide aminé aliphatique branché (Val, Ile).

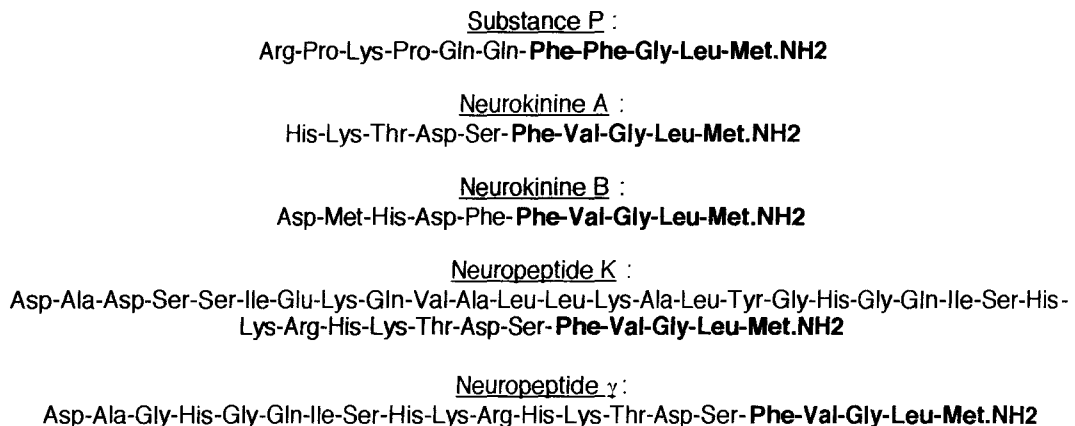


figure 2: séquences en amino-acides des tachykinines

Aujourd'hui, un nombre sans cesse croissant d'articles est dédié aux tachykinines, parmi lesquels quelques revues récentes : (Maggi et al., 1993 ; Regoli et al, 1994 a; Maggi, 1995) ou ouvrage complet (Buck, 1994).

A.2. METABOLISME

□ Chez les mammifères, les tachykinines sont issues de deux gènes différents -figure 3- :

- le gène de la préprotachykinine A (gène PPT-A) qui donne naissance à la SP et à la NKA en particulier
- le gène de la préprotachykinine B (gène PPT-B) qui, lui, donne la NKB.

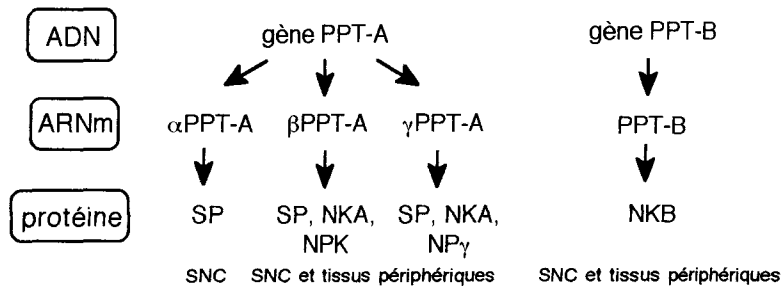


figure 3 : biosynthèse des tachykinines (adapté de Regoli et al., 1994 a)

Quant au catabolisme, les tachykinines sont dégradées par deux enzymes principalement -figure 4- :

- l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE -Angiotensin Converting Enzyme-)
- l'endopeptidase neutre (NEP -Neutral EndoPeptidase-)

mais le clivage par l'endopeptidase reste la voie de dégradation majeure dans les tissus.

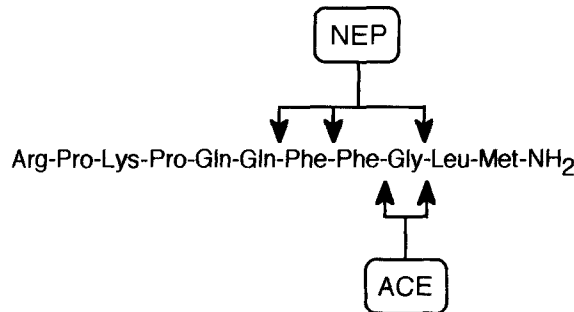


figure 4 : dégradation de la SP (adapté de Piédimonte., 1995)

A.3. LES RECEPTEURS

A.3.1. Sous-types de récepteurs

Au niveau des cellules cibles, les tachykinines exercent leurs effets biologiques par interaction avec des récepteurs membranaires appelés NK1, NK2, NK3 spécifiques à la famille. Même si elles peuvent se fixer sur les trois sous-types de récepteurs -figure 5-, la SP présente une affinité préférentielle pour le récepteur NK1, la NKA pour le récepteur NK2 et la NKB pour le récepteur NK3 -tableau 1-.

Par ailleurs, des données pharmacologiques ont clairement mis en évidence l'existence de différences inter-espèces pour les trois types de récepteurs (Regoli et al., 1994 a et b; Watling et al. 1994 pour revues). Ainsi peut-on déjà classer les récepteurs NK1 en deux sous-groupes :

- ceux du type cobaye / homme
- ceux du type rat / souris.

Notons, par ailleurs, qu'il a été récemment mis en évidence une grande similitude entre les récepteurs NK1 (et même NK2) de l'homme et du lapin (Coge et Regoli, 1994)

figure 5 : affinités des tachykinines pour les récepteurs NK1, NK2, NK3

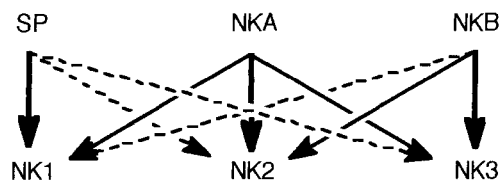


tableau 1 : affinités des tachykinines pour les récepteurs NK1, NK2, NK3 (Garret et al., 1993)

	Ki (nM)		
	NK1 (cerveau de rat)	NK2 (duodenum de rat)	NK3 (cortex de cobaye)
SP	0,16	139	14
NKA	207	2,7	72
NKB	264	11,4	1,7

A.3.2. Récepteurs couplés à une protéine G

□ Il a été montré, après clonage des séquences d'ADN codant pour les récepteurs NK1, NK2 et NK3 que ces derniers présentaient la structure classique des récepteurs couplés à une protéine G : ils possèdent sept unités hydrophobes transmembranaires de tailles comparables formant une cavité dans la membrane. Elles sont séparées entre elles par des chaînes hydrophiles extra- et intra-cellulaires -figure 6-. Par ailleurs, on retrouve sur les première et deuxième boucles extra-cellulaires deux résidus de cystéine probablement reliés entre eux par un pont disulfure. Une autre cystéine sur la chaîne carboxyterminale intra-cellulaire peut permettre un ancrage de la protéine dans la membrane, après palmitoylation.

□ Deux mécanismes de transduction ont été mis en évidence pour les récepteurs aux tachykinines -figure 7- :

- la stimulation du récepteur induit, via la protéine G, l'activation d'une phospholipase C qui permet l'hydrolyse du phosphatidylinositol biphosphate en diacylglycérol et inositol triphosphate

- par ailleurs, les récepteurs des tachykinines peuvent être également couplés à une protéine Gs, protéine induisant l'activation d'une adénylate cyclase. Toutefois, la mise en route de cette chaîne

de transduction ne s'opère qu'à des concentrations plus élevées en ligand (jusqu'à dix fois supérieures aux concentrations requises pour l'activation de la cascade à phosphoinositol).

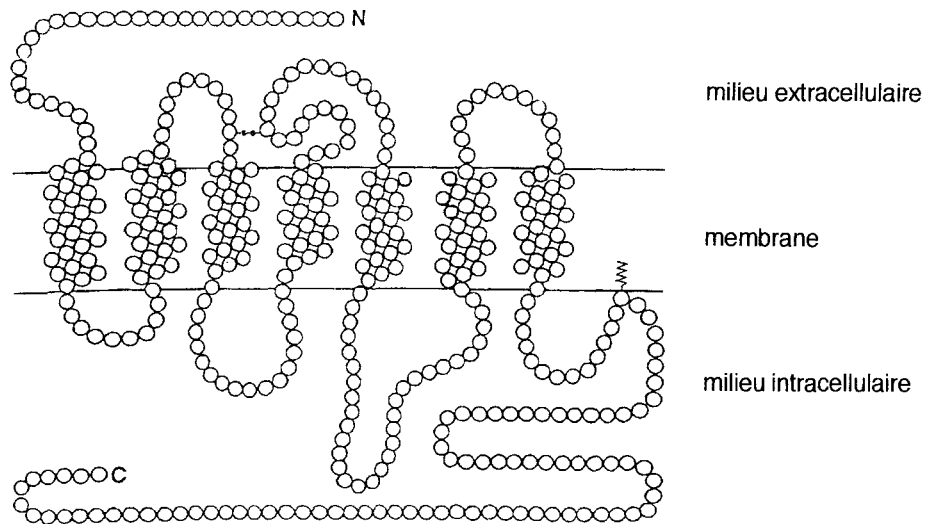


figure 6 : structure d'un récepteur de tachykinines

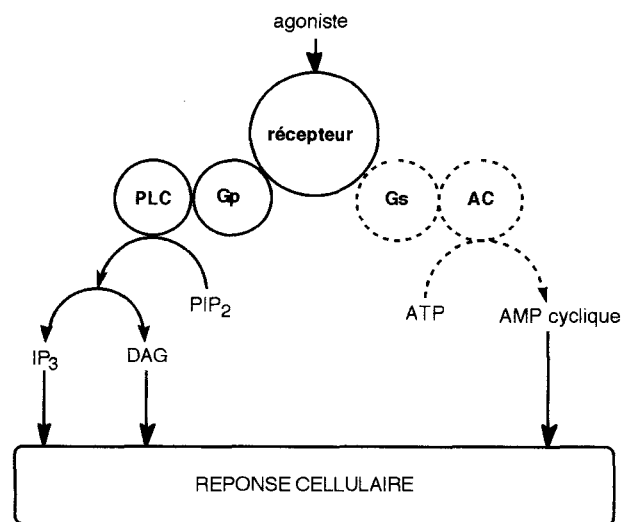


figure 7 mécanisme de transduction d'un récepteur de tachykinines
 Gs, Gp : protéine G; PLC : phospholipase C; AC : adénylate cyclase; PIP₂ : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate; DAG : diacylglycérol; IP₃ : inositol-1,4,5-triphosphate
 (adapté de Nakanishi et al., 1993)

B. LES TACHYKININES, CLES DE VOUTE DE NOUVELLES STRATEGIES THERAPEUTIQUES

B.1. IMPLICATIONS PHYSIOLOGIQUES DES TACHYKININES

Les tachykinines sont largement distribuées au niveau des systèmes nerveux central et périphérique où elles agissent en tant que neurotransmetteurs ou neuromodulateurs (Maggi et al, 1993; Regoli et al, 1994 a). Elles sont principalement localisées dans les fibres C non myélinisées des afférents primaires de la corne dorsale de la moëlle épinière et dans les neurones entériques du tractus gastro-intestinal et sont libérées au niveau central ou dans les tissus périphériques.

B.1.1. Action des tachykinines au niveau central

La SP et la NKA ont pu être caractérisées comme des neurotransmetteurs participant à la médiation périphérique de la douleur (Buck, 1994) : elles permettent la transmission du message douloureux vers le cerveau via les fibres C qui font synapses sur des récepteurs NK1 et NK2 dans la corne dorsale de la moëlle : un stimulus cutané douloureux induit la libération de NKA ; la libération de SP demande des stimuli de plus forte intensité et maintenus pendant de plus longues périodes.

Par ailleurs, la SP pourrait être impliquée dans la voie réflexe induisant le vomissement (via sa libération de fibres afférentes vagales dans le noyau du tractus solitaire) et dans la modulation des voies dopaminergiques.

Les implications physiologiques de la NKB, quant à elle, ne sont pas encore bien élucidées mais on a pu montrer que le récepteur NK3 était exprimé dans de nombreuses zones du cerveau, souvent distinctes de celles contenant les récepteurs NK1 et NK2.

B.1.2. Action des tachykinines au niveau périphérique

B.1.2.1. Effets généraux

A côté de leurs rôles au niveau central, les neurokinines exercent également de nombreuses actions biologiques au niveau périphérique (Buck, 1994) : elles sont impliquées dans la vasodilatation, l'extravasation plasmatique, la contraction des muscles lisses (rappelons que c'est par son action stimulante sur les fibres musculaires lisses du tractus gastro-intestinal que la SP a d'abord été identifiée et que, par ailleurs, les tachykinines doivent leur nom à leurs rapides effets spasmogènes sur les muscles lisses).

Pour ces effets périphériques, le rôle de la NKB semble plus limité.

B.1.2.2. Rôles physiologiques au niveau bronchique

(Joos et al., 1994, Piedimonte, 1995, Maggi et al., 1995)

Les effets contractiles de la SP et de la NKA sur les muscles lisses bronchiques ont largement été étudiés et sont principalement imputables à l'activation des récepteurs NK2 (Frossard et Advenier, 1991). Outre la bronchoconstriction, un des effets les plus marquants des tachykinines au niveau pulmonaire, est l'augmentation de la perméabilité vasculaire résultant dans l'extravasation des protéines plasmatiques. Par ailleurs, les neurokinines stimulent la sécrétion de mucus dans les bronches et elles ont un rôle pro-inflammatoire tel que le chimiotactisme des éosinophiles et des neutrophiles, l'adhésion des neutrophiles et l'activation des lymphocytes, macrophages et mastocytes. Pour tous ces effets, il semble que ce soit le récepteur NK1 qui soit plus particulièrement impliqué (Frossard et Advenier, 1991).

B.2. IMPLICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DES TACHYKININES ET POTENTIALITE THERAPEUTIQUE DES LIGANDS DE LEURS RECEPTEURS

Dans les conditions physiologiques, les neuropeptides sont d'importants modulateurs. Ce n'est que dans les cas pathologiques, souvent caractérisés par l'exacerbation d'un phénomène biologique, qu'ils deviennent des facteurs aggravants qu'il peut être intéressant de contrer.

Au niveau central, leur rôle de neurotransmetteurs dans les voies réflexes de la douleur ou du vomissement ouvre deux premières niches thérapeutiques. Par ailleurs, la connaissance des phénomènes physiopathologiques de maladies telles que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde ou la migraine qui se développent autour d'un mécanisme d'inflammation neurogène révèle la position clé des tachykinines à l'interface entre le système immunitaire et le système nerveux. L'intérêt de leurs antagonistes dans ces indications apparaît donc clairement (Longmore et al., 1995).

Nous regarderons ces diverses indications en mettant un léger accent sur la pathologie asthmatique.

B.2.1. Tachykinines et douleur

L'implication des tachykinines dans la transmission des messages nociceptifs a rapidement laissé transparaître le rôle possible de leurs antagonistes dans l'analgésie : certaines études, par exemple, ont déjà pu montrer que la potentialisation de mécanismes réflexes induits par activation des récepteurs nociceptifs pouvait être bloquée par des antagonistes NK1 sans que soit modifié le réflexe (protecteur) primaire.

B.2.2. Tachykinines et vomissement

Au niveau central, on a également pu mettre en évidence la capacité des antagonistes de la SP à empêcher les vomissements induits par divers produits émétiques d'où leur utilité potentielle dans le traitement des nausées post-opératoires ou associées à une chimiothérapie.

B.2.3. Tachykinines et asthme

Dans le cas de l'asthme, une interdépendance étroite entre inflammation chronique des bronches et dysfonctionnement de certains mécanismes neuronaux impliqués dans les fonctions des voies aériennes contribue au déséquilibre pathologique : chez un sujet asthmatique, la dégradation de l'épithélium met à nu la terminaison de fibres C non myélinisées qui peuvent ainsi être stimulées par des médiateurs tels que la bradykinine ou les prostaglandines libérés par les cellules inflammatoires. Cette stimulation entraîne, via un réflexe d'axone, la libération des neuromédiateurs qui, ensemble, induisent les symptômes de la maladie (bronchoconstriction, hypersécrétion de mucus dans les bronches, extravasation plasmatique...) et contribuent à accroître l'infiltration et l'activation de cellules inflammatoires ; c'est l'inflammation neurogène -figure 8-. Par ailleurs, cette desquamation de l'épithélium induit une baisse de l'activité métabolique de l'endopeptidase neutre, exacerbant encore la réponse aux tachykinines.

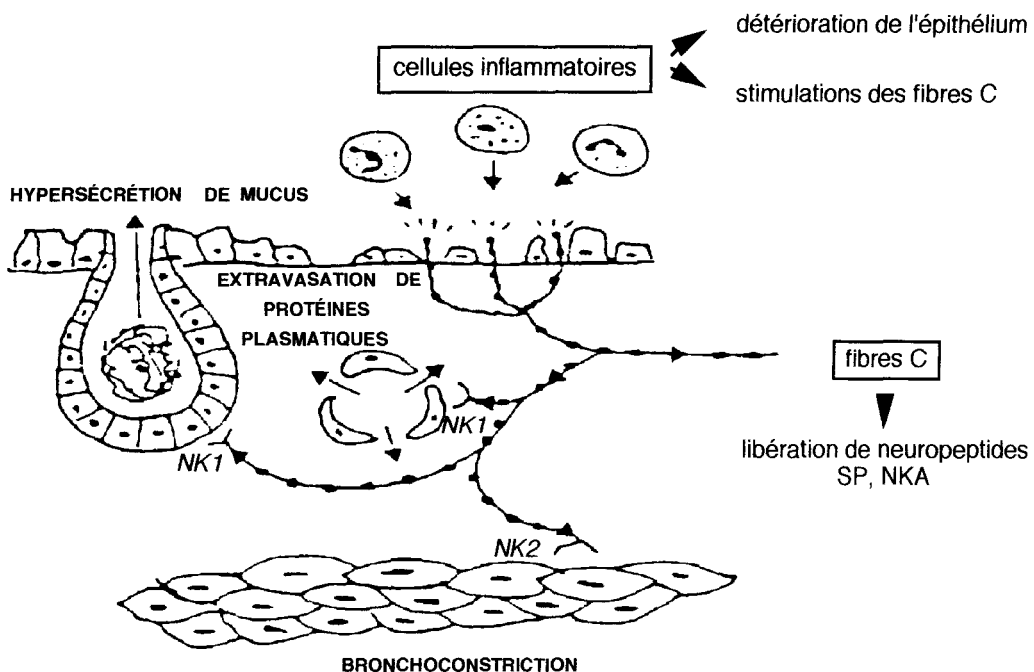


figure 8 : mécanisme de l'inflammation neurogène (adapté de Barnes, 1987)

Il s'instaure donc un cercle vicieux dans lequel l'inflammation entraîne la libération de neuromédiateurs excitateurs qui aggravent l'inflammation -figure 9-.

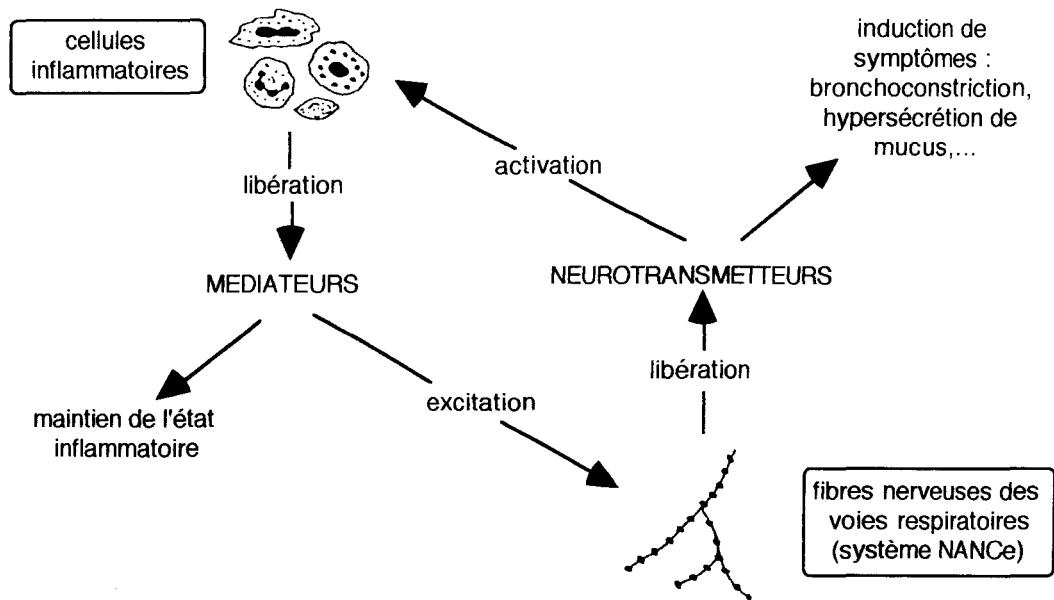


figure 9 : relation entre cellules inflammatoires et système neuronal (adapté de Barnes, 1989)

L'intérêt des antagonistes NK1 et / ou NK2 apparaît donc dans leur potentialité à réduire les symptômes de la maladie mais également à enrayer son aggravation.

B.2.4. Tachykinines et migraine

L'utilisation des antagonistes NK1 dans le traitement de la migraine a également été avancé.

La migraine est caractérisée par une douleur intracrânienne intense probablement d'origine vasculaire -figure 10-. D'abord, une réaction inflammatoire liée à une vasodilatation et à une extravasation plasmatique conduit à une activation des fibres C périvasculaires. Cette stimulation des nerfs sensitifs induit alors, par un mécanisme antidromique, la libération de SP (d'où une perméabilité vasculaire et une extravasation plasmatique accrues et donc l'aggravation du phénomène) ; par ailleurs, elle active les voies centrales de la douleur. Là encore, l'intérêt des antagonistes NK1 est fondé sur leur capacité à réduire la vasodilatation excessive et l'extravasation plasmatique provoquées par la SP mais également à bloquer les voies nociceptives.

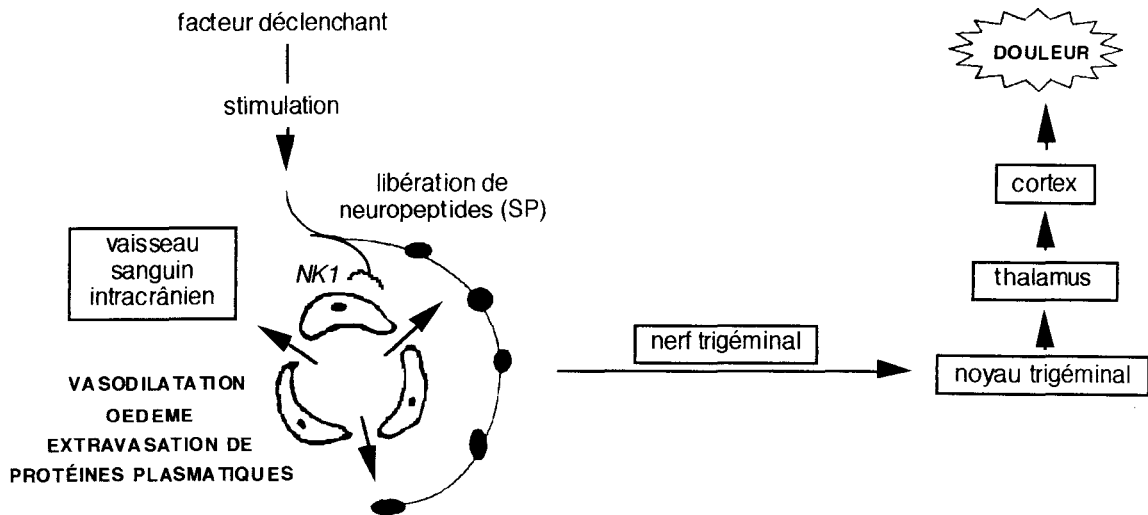


figure 10 : mécanisme étiologique de la migraine (adapté de Beattie et al., 1995)

B.2.5. Tachykinines et arthrite rhumatoïde

Dans le cas du traitement de l'arthrite rhumatoïde également, les antagonistes des tachykinines pourraient se révéler utiles en enrayant l'inflammation au niveau de l'articulation elle-même et en s'opposant au développement de l'hyperalgésie et à la sensibilisation des neurones centraux nociceptifs.

CHAPITRE II :

N.C.E. LIGANDS DES
RECEPTEURS NK1 DE LA
SUBSTANCE P

A. ARRIERE-PLAN BIBLIOGRAPHIQUE : FONDEMENT D'UNE STRATEGIE DE DRUG-DESIGN

A.1. ETUDE DES ANTAGONISTES DE LA SUBSTANCE P : MISE EN EVIDENCE DE DEUX CLASSES DE COMPOSES

(Pour revues, Maggi et al, 1993 ; Lowe III et McLean, 1994 ; Regoli et al., 1994 a ; Longmore et al., 1995; Carruthers et Kaminski, 1996 ; Swain, 1996)

Au vu des implications de la SP dans de nombreuses régulations biologiques et du rôle indéniable d'antagonistes de la SP dans le traitement de maladies graves, de nombreuses études ont été entreprises pour découvrir des ligands des récepteurs NK1. A côté des recherches sur les antagonistes peptidiques qui ont permis de fournir des outils pharmacologiques importants, des études pour élaborer des antagonistes non peptidiques se sont rapidement développées et ont engendré l'identification de structures très variées affines pour les récepteurs NK1.

Ainsi, essaierons-nous dans un premier temps, de passer en revue les principales molécules décrites en distinguant les antagonistes peptidiques ou pseudo-peptidiques des antagonistes non peptidiques et en rappelant quelle a été la stratégie mise en oeuvre pour les identifier. Les nombreuses études réalisées sur la plupart de ces "leads" nous permettront dans un deuxième temps de relever quelques relations structure-activité importantes et nous nous attarderons plus particulièrement sur quelques antagonistes-clés, afin de mettre en évidence la possibilité d'existence de deux classes de composés

A.1.1. Revue des principaux antagonistes connus

A.1.1.1. Antagonistes peptidiques

Plusieurs stratégies ont été couronnées de succès dans l'élaboration d'antagonistes peptidiques dérivés de la SP.

□ Une première approche, "linéaire", a conduit le groupe de Folkers à la découverte du Spantide ($pA_2 = 7,1$) -figure 11- qui garde le squelette de base de la SP mais dans lequel certains L-amino-acides ont été remplacés par leurs énantiomères (Folkers et al., 1984). La faible spécificité de ce produit ainsi que ses effets secondaires neurotoxiques ont conduit à l'élaboration du Spantide II ($pA_2 = 8,1$) -figure 11- dans lequel la plupart des résidus originaux de la SP ont été échangés (Folkers et al., 1990).

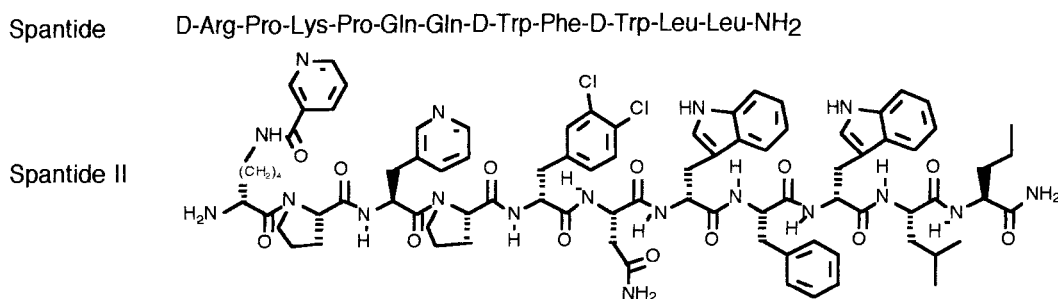


figure 11 : Spantide et Spantide II

□ A côté de ces approches linéaires, d'autres groupes ont cherché à imposer des contraintes conformationnelles au peptide endogène.

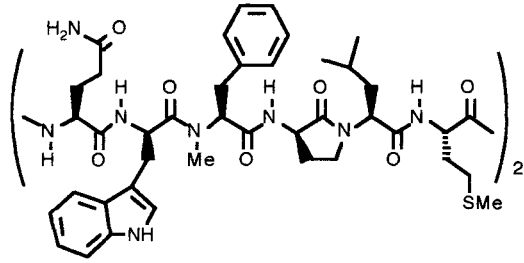
Le groupe Merck Sharp and Dohme a ainsi préparé un cyclodimère, le L668-169 -figure 12- (Williams et al., 1993).

Par ailleurs, le groupe Glaxo, dans une démarche rationnelle, a élaboré le GR71251 ($pK_B = 7,7$) -figure 12- (Ward et al., 1990) qui se caractérise par un fragment N-terminal analogue à celui de la SP et un fragment C-terminal comportant une spirolactame de configuration S. Cette contrainte conformationnelle empêche le peptide d'adopter la conformation bioactive et lui confère donc un caractère antagoniste. Par la suite, l'instabilité métabolique du composé a conduit cette équipe à greffer la partie C-terminale du GR71251 sur la partie N-terminale de la physalaemine pour créer le GR82334 ($pK_B = 7,6$) -figure 12- (Hagan et al., 1991), antagoniste NK1 de plus grande stabilité.

□ Une troisième approche, adoptée par le groupe Fujisawa Pharmaceutical Company consiste à ne garder du peptide initial (SP) que la partie essentielle à la reconnaissance par le récepteur; l'adjonction de substituants adéquats permet de conférer au produit des propriétés antagonistes. Ainsi le FR113-680 -figure 12- a-t-il été élaboré : à partir d'études de tripeptides issus d'un octapeptide antagoniste connu (D-Pro-Gln-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-D-Trp-Phe-NH₂; $IC_{50} = 600$ nM), Hagiwara et ses collaborateurs (1992 a) ont pu mettre en évidence que le Boc-Gln-D-Trp(CHO)-Phe-OBzl est un antagoniste plus puissant ($IC_{50} = 90$ nM). De modifications de la glutamine (non essentielle à l'affinité) et de l'ester benzylique (qui conférait une instabilité métabolique), a découlé le FR113-680 ($IC_{50} = 5,8$ nM) (Hagiwara et al. 1992 b). La poursuite des travaux à partir de ce composé a permis aux auteurs de concevoir d'autres tripeptides également antagonistes (Hagiwara et al., 1993 a) pour finalement décrire le FK888 -figure 12- ($IC_{50} = 1,7$ nM) (Hagiwara et al., 1993 b; Hagiwara et al., 1994), antagoniste NK1 actif à la fois *in vitro* et *in vivo* (Fujii et al., 1992).

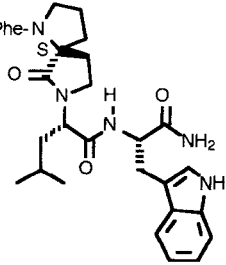
D'autres études ont été mises en place à partir du FK888 et ont débouché sur des pseudopeptides voire sur des antagonistes non-peptidiques sur lesquels nous reviendrons ultérieurement.

L668-169 :



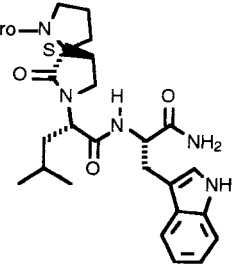
GR71251

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-N

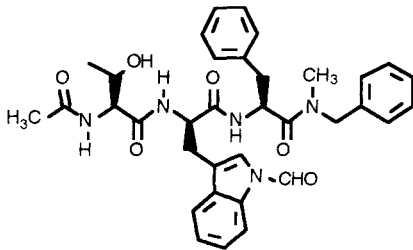


GR82334

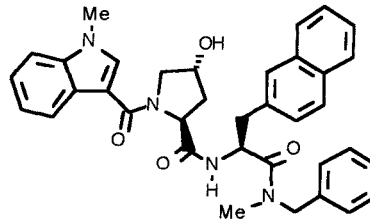
Glp-Ala-Asp-Pro-Asn-Lys-Phe-Tyr-D-Pro-N



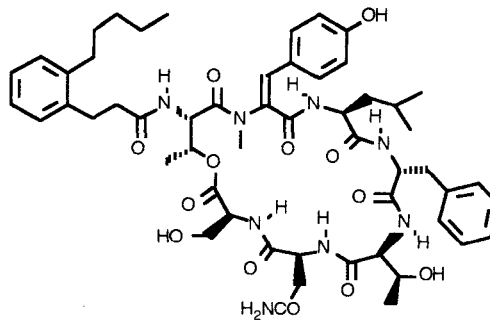
FR113-680



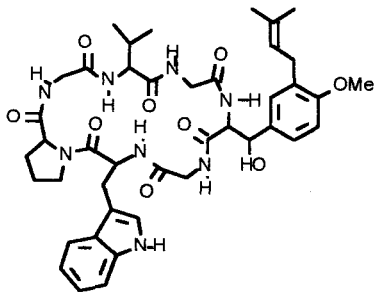
FK888



FK224 :



dérivé méthylé du WIN 66306



S16474

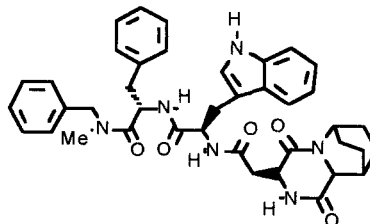


figure 12 : antagonistes peptidiques

□ Une autre approche peptidique a également été adoptée Fujisawa;. Elle consiste à réaliser une pharmacomodulation à partir d'un chef de file issu d'un screening de produits naturels et a conduit à l'élaboration du FK224 -figure 12- (Hashimoto et al., 1992). Le FK224 s'est révélé antagoniste NK1 / NK2.

□ D'autres dérivés peptidiques ont été décrits :

- le dérivé méthylé du WIN66306 ($K_i = 120$ nM) -figure 12- (Barrow et al., 1994).
- des pseudo-tétrapeptides comme le S16474, élaboré par le groupe Servier -figure 12-, (Kucharczyk et al., 1993) et non sélectif des récepteurs NK1 et NK2 ($K_i(\text{NK1}) = 85$ nM et $K_i(\text{NK2}) = 129$ nM) (Robineau et al., 1995).

A.1.1.2. Antagonistes non peptidiques

A côté de ces recherches sur des antagonistes peptidiques, se sont rapidement développées des études pour élaborer des antagonistes non peptidiques. Plusieurs firmes ont proposé des antagonistes puissants dont beaucoup sont issus d'une stratégie qui consiste à identifier un chef de file par un screening et à optimiser cette structure. D'autres produits découlent de l'étude et de la modification d'un lead peptidique.

a. Antagonistes issus de l'optimisation d'une structure identifiée par screening

L'utilisation par de nombreuses firmes de cette stratégie, au départ aléatoire, a engendré une grande diversité dans les structures revendiquées. Celle-ci oblige à un classement selon des similitudes appréciées arbitrairement.

i. Dérivés de type diamine

□ Le groupe Pfizer Inc. a décrit le premier antagoniste non peptidique puissant possédant une structure quinuclidine substituée en position 3 par une amine secondaire, le CP96345 -figure 13- (Snider et al., 1991 a; Lowe III et al., 1991; Lowe III et al., 1992; Lowe III et al., 1993 a). Des études de binding ont pu montrer sa grande affinité et sa sélectivité pour le récepteur NK1 ($K_i = 0,77$ nM sur cellules IM9 humaines). Par ailleurs, elles ont permis de mettre en évidence des différences inter-espèces (Beresford et al., 1991; Snider et al., 1991 a; Snider et al., 1993) : le CP96345 présente une affinité cent fois moindre pour les sites NK1 de rat ou de souris, comparée à celle pour les sites humains.

Une caractérisation fonctionnelle sur carotide isolée de chien (précontractée à la noradrénaline et relaxée à la SP) a révélé le caractère antagoniste compétitif du CP96345 (Snider et al., 1991 a). Des études *in vivo* ont également permis de confirmer cette caractéristique : par exemple, le CP96345 est capable de bloquer la salivation induite par la SP chez le rat (Snider et al., 1991 b); de même, il inhibe l'extravasation plasmatique (Lembeck et al., 1992).

□ Ce même groupe a par ailleurs décrit un autre antagoniste plus puissant, le CP99994 ($K_i = 0,17$ nM) -figure 13- (Desai et al., 1992; Desai et al., 1993 b) également sélectif pour le récepteur NK1.

Ces molécules ont largement été étudiées ; elles ont fait l'objet de nombreuses pharmacomodulations sur lesquelles nous reviendrons dans l'étude des relations structure-activité.

ii. Dérivés de type aminoéther

Le groupe Merck Sharp and Dohme a revendiqué, quant à lui, des éthers aminés comme le L709-210 ($IC_{50} = 1,3$ nM) (Swain et al., 1993) ou le L733-060 ($IC_{50} = 0,87$ nM) (Harrison et al., 1994 a) -figure 13-. Leurs structures pourraient être considérées comme analogues des précédentes citées ; toutefois les travaux qu'elles ont engendrés permettent d'en faire une classe à part entière et d'avoir une bonne vision de l'influence de certaines modifications structurales sur l'affinité.

iii. Dérivés de type perhydroisoindole

□ Parallèlement à ces recherches sur les diamines ou les amino-éthers, le groupe Rhône-Poulenc Rorer a décrit une série de perhydroisoindoles également issus d'un screening et dont l'optimisation a conduit au RP67580 -figure 13-, antagoniste NK1 sélectif et compétitif (Garret et al., 1991) : dans une expérience de binding, le RP67580 déplace la SP tritiée des sites NK1 avec un K_i de 4,2 nM. Par ailleurs, des études fonctionnelles ont prouvé son caractère antagoniste compétitif (il inhibe les contractions induites sur iléon de cobaye par la SP) ; de même que le CP96345, le RP67580 inhibe également l'extravasation plasmatique induite par la SP. Il est tout de même à noter que le RP67580 s'est révélé plus affiné sur récepteur NK1 de rat ($K_i = 2,9$ nM) que sur récepteur humain ($K_i = 12,0$ nM) ce qui lui confère un profil différent de celui du CP96345 ($K_i(\text{rat}) = 34$ nM; $K_i(\text{homme}) = 0,23$ nM pour le racémique) (Fardin et al., 1993).

□ La découverte du RP67580 a également initié de nombreuses recherches. La modification de la fonction cétone a finalement abouti au RPR100-893 ($IC_{50} = 13$ nM) (Tabart et Peyronel, 1994) cent fois plus affiné pour les récepteurs humains que pour les récepteurs de rat -figure 13-.

iv. Dérivés du tryptophane

□ Issu d'une même démarche d'optimisation de produits issus de screening, un ester benzylique de N-acyl-L-tryptophane, le L732-138 -figure 13- élaboré par les laboratoires Merck Sharp and Dohme a révélé un caractère antagoniste NK1 (McLeod et al., 1993; McLeod et al., 1994) d'affinité caractérisée par une $IC_{50} = 1,6$ nM sur cellules CHO. Comme le CP96345, il présente une affinité préférentielle pour les récepteurs NK1 humains. Par ailleurs, son caractère antagoniste compétitif a été révélé par inhibition de la synthèse d'inositol phosphate induite par la SP (Cascieri et al., 1994).

Là encore, de nombreuses relations structure-activité sont désormais disponibles.

□ Les laboratoires Lilly ont optimisé des structures du même type (amide ou ester de N-acyl-tryptophane) pour décrire récemment le LY303-870 ($IC_{50} = 0,15$ nM) (Hipskind et al., 1995 ; Hipskind et al., 1996) -figure 13-.

v. Dérivés de type diacylpipérazine

□ A côté de leur travaux sur les amino-éthers et sur les dérivés du tryptophane, le groupe Merck Sharp and Dohme a également identifié une série de 1,4-diacylpipérazines comme des antagonistes NK1 puissants et sélectifs (Mills et al. 1993) ayant permis la description du L161-664 -figure 13-. Les études de binding sur récepteur NK1 humain ont donné une $IC_{50} = 11$ nM.

□ Notons par ailleurs que le groupe Fujisawa revendique aussi une diacylpipérazine -figure 13- (Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd. EP 655442.A, 1995 dans Swain, 1996)

vi. Structures diverses

□ Les laboratoires de la firme Takéda Chemical Industries ont exploité leurs connaissances sur les antagonistes de la cholecystokinine pour élaborer des structures de type N-benzylcarboxamidopyrido [3,4-b]pyridine (Natsugari et al., 1995). Notons par exemple le dérivé illustré sur la figure 13 dont l' IC_{50} a été évalué à 0,34 nM.

□ De la même manière, des connaissances sur le β .D-glucose ont été utilisées et ont permis de mettre en avant la structure représentée sur la figure 13 ($IC_{50} = 60$ nM) (Hirschmann et al., 1992).

□ Finalement, cette démarche, au départ aléatoire, a été mise à profit par les laboratoires Eastman Kodak pour décrire plusieurs séries d'antagonistes hétérocycliques d'affinité modeste -figure 13-:

- des imidazoquinoxalines ($IC_{50} = 350$ nM) (Appell et al., 1991)

- des androstano pyrimidobenzimidazoles ($IC_{50} = 50$ nM sur cellules de cerveau de rat) (Venepalli et al., 1992)

- des napht-1*H*-imidazoliums ($IC_{50} = 310$ nM) (Lawrence et al., 1992).

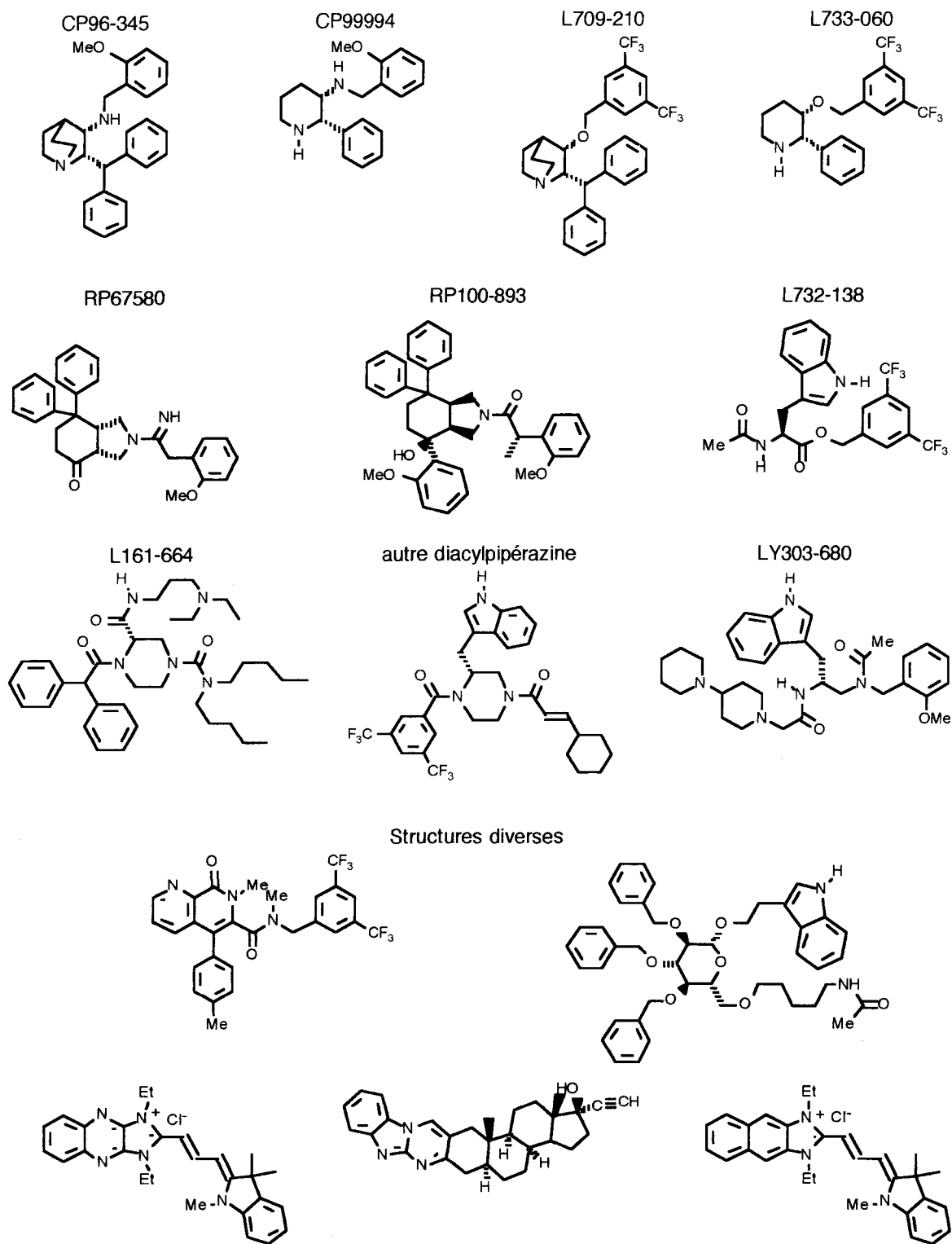


figure 13 : antagonistes non peptidiques issus de l'optimisation d'une structure identifiée par screening

b. Antagonistes issus de l'optimisation d'un lead peptidique

□ Les laboratoires Ciba Geigy Ltd ont combiné une démarche exploratoire qui a permis de mettre en évidence un simple acide aminé protégé, Z-Phe-OBn, faible antagoniste NK1 et une démarche rationnelle se fondant sur l'élaboration d'un pharmacophore, pour décrire le CGP47899, antagoniste NK1 ($IC_{50} = 10$ nM sur cellules de rétine de bovin) (Schilling et al., 1993) et le CGP49823 ($IC_{50} = 11$ nM) (Ciba-Geigy AG EP532456 A., 1992 dans Swain, 1996) -figure 14-.

□ Les chercheurs des laboratoires Parke-Davis, quant à eux, ont adopté une démarche rationnelle partant d'un lead peptidique (issu de l'étude du peptide endogène et de ses groupements nécessaires à l'affinité). De l'optimisation de ce composé et de l'arrangement spatial de ses substituants, leur rationnel débouche sur la conception d'un ligand non peptidique, le PD154-075 -figure 14- (Boyle et al, 1994 ; Howson, 1995). Celui-ci présente un K_i de 0,35 nM dans un essai de binding sur cellules humaines IM-9. Notons que c'est par les laboratoires Warner-Lambert qu'est revendiquée une structure analogue (Warner-Lambert Co. WO9404494., 1994 dans Swain, 1996) -figure 14-

□ Le FK888, peptide antagoniste des récepteurs NK1, a suscité beaucoup de travaux. Ainsi, les équipes de Boehringer Ingelheim ont transformé la structure peptidique en un composé non peptidique par liaison de l'aromatique central à l'amide terminal ; ils ont revendiqué la structure illustrée sur la figure 14 ($IC_{50} = 1,7$ nM) (Boehringer Ingelheim KG. WO9405693., 1994).

De la même manière, la transformation de l'amide terminal en phénylpipérazine -figure 14- (Boehringer Ingelheim DE 4445939 A1., 1995 dans Swain, 1996) leur permet d'accéder à une autre structure affine mais qui ne présente pas de sélectivité NK1 / NK2 ($IC_{50} (NK1) = 0,7$ nM ; $IC_{50} (NK2) = 19$ nM).

Le groupe Menarini a, joué sur la possibilité de remplacement de la proline par un cycloalkyl aminoacide pour accéder au MEN10725 ($pK_i = 8$) (Sisto et al., 1995) et le MEN10930 (Astolfi et al., 1995 dans Swain, 1996) -figure 14-.

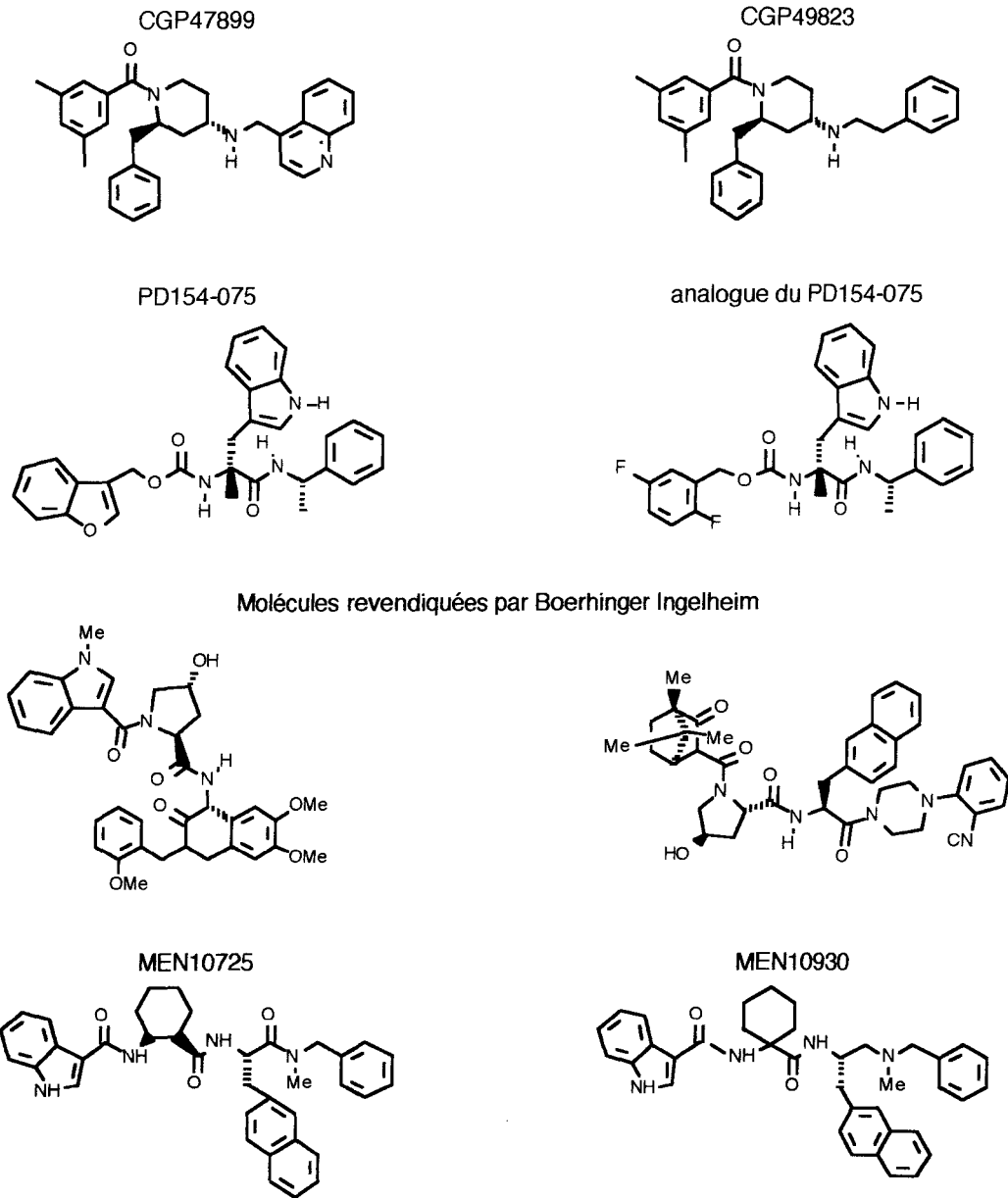


figure 14 : antagonistes non peptidiques issus de l'optimisation d'un lead peptidique

c. Autres structures

D'autres produits ont été décrits par diverses firmes -figure 15-. Citons

- le MDL105-212 par le groupe Hoechst Marion Roussel (Burkholder et al., 1996) issu d'une étude de modélisation moléculaire et qui présente une forte affinité pour les récepteurs NK1 ($IC_{50} = 3,1$ nM) et NK2 ($IC_{50} = 8,4$ nM)

- le SR140333 par le groupe Sanofi ($K_i = 0,019$ nM sur cellules IM9) (Emonds-Alt et al., 1993) ; il ne paraît pas reconnaître de différence entre les récepteurs humains et de rat (Oury-Donat et al., 1994)

- le WIN64821, par le groupe Sterling Winthrop (Barrow et al., 1993), antagoniste NK1 / NK2 (Oleynek et al., 1994).

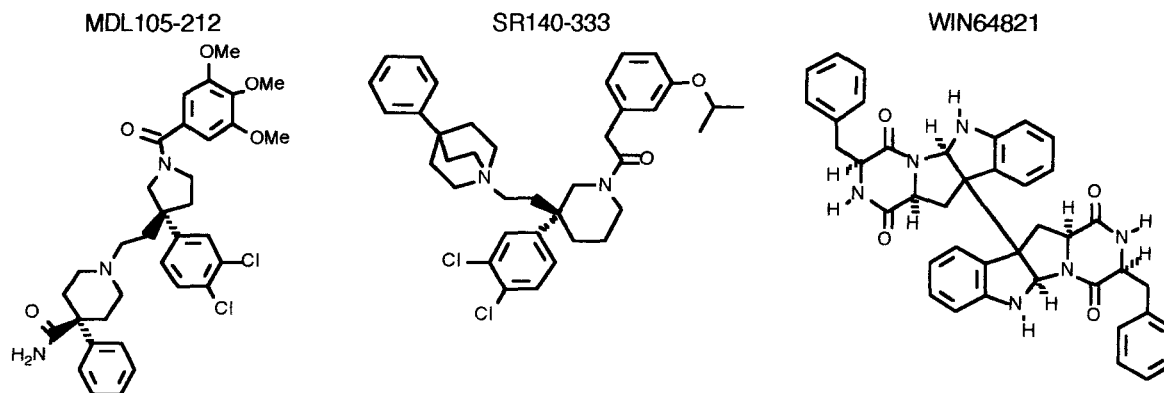


figure 15 : autres structures

A.1.2. Etude des relations structure-affinité : mise en évidence de deux classes distinctes d'antagonistes

L'identification de la plupart des antagonistes cités a demandé l'optimisation de leads. Ceci a engendré la mise en évidence de nombreuses relations structure-affinité / activité que nous détaillerons. Nous articulerons cependant l'étude autour de trois paires d'antagonistes-clés :

- le CP96345 -tableau 2, pages 41 à 43- et le L709-210 -tableau 3, pages 44 à 46-
- le CP99994 -tableaux 4 et 5, pages 47 à 49- et le L733-060 -tableau 6, pages 50 à 52-
- le LY303-680 -tableau 7, pages 53 à 54- et le L732-138 -tableau 8, pages 55 à 57-

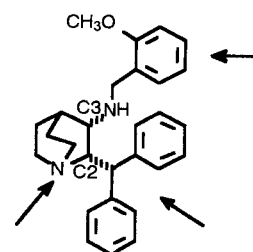
ce qui nous permettra de mettre l'accent sur les différences que peut engendrer le fait que l'antagoniste possède un benzyle ortho-substitué voire non substitué ou un benzyle méta-disubstitué.

Nous étudierons par ailleurs le FK888 -tableaux 9 à 13, pages 58 à 61-.

A.1.2.1. Etude du CP96345 et du L709-210, deux 2-(diphénylméthyl)-1-azabicyclo[2.2.2]octanes

a. Etude du CP 96345

Les premières études de relations structure-activité réalisées autour des quinuclidines et ayant débouché sur la mise en évidence du CP96345 (Lowe et al., 1992) ont souligné trois caractéristiques importantes pour la liaison de l'antagoniste : l'atome d'azote en tête de pont, le substituant benzhydryle sur le carbone C2 de la quinuclidine et la chaîne benzylaminée ortho-substituée, sur le carbone C3. Puis de nombreuses variations, tant sur le cycle quinuclidine que sur les substituants benzylaminé ou benzhydryle ont été réalisées afin de mesurer l'importance de chaque groupement dans l'interaction avec le récepteur, non seulement au niveau électronique, mais également au niveau stérique ou conformationnel.



i. Le noyau quinuclidine

Trois points ont été étudiés :

- les caractéristiques stériques avec l'influence de l'encombrement sur l'affinité
- l'importance de la stéréochimie au niveau des atomes de carbone C2 et C3
- le rôle joué par l'atome d'azote intracyclique.

□ En ce qui concerne les caractéristiques stériques, il a été montré qu'un agrandissement de cycle, en analogue [3.2.2]bicyclique, induit une baisse de l'affinité pour le récepteur NK1 -tableau 2, ligne 3-.

L'adjonction d'un troisième cycle par contre, n'induit pas une forte modification de l'affinité -tableau 2, ligne 4-.

□ La reconnaissance stéréosélective du ligand par le récepteur NK1 a été montrée : alors que le CP96345 de configuration (2S, 3S) est caractérisé par une IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire, son

énantiomère ne conserve aucune affinité. Par ailleurs, la stéréochimie relative cis sur les atomes de carbone C2 et C3 est requise -tableau 2, lignes 5 et 6-.

□ L'importance de l'atome d'azote a dès le départ été mise en évidence : le remplacement de cet hétéroatome par CH induit la perte d'affinité du produit -tableau 2, ligne 7-. Il a été supposé que l'atome d'azote, protoné au pH physiologique ($pK_a = 8,5$), pouvait intervenir via une interaction ionique avec le récepteur. Le potentiel pharmacologique de divers quinuclidiniums a alors été évalué -tableau 2, lignes 8, 9 et 10- : seule l'alkylation par un groupement carboxamidométhyle permet de conserver une bonne affinité ce qui a poussé les auteurs à conclure que dans le CP96345, l'atome d'azote protoné intervenait dans l'induction d'une bonne orientation de la molécule dans le récepteur sans forcément être en contact intime avec lui.

ii. Le groupement benzhydryle

Le groupement benzhydryle du CP96345 a été impliqué dans l'interaction avec le récepteur (Lowe et al., 1992). D'autres substituants du carbone C2 (phényle, benzyle, biphenylméthyle) ont été éprouvés mais ont impliqué une baisse sensible de l'affinité -tableau 2, lignes 11 à 15-.

iii. La chaîne benzylaminée

La chaîne benzylaminée est également apparue comme une caractéristique importante du CP96345 (Lowe et al., 1992).

□ L'influence de l'hétéroatome a d'abord été étudiée (Seward et al., 1993) et, afin de s'affranchir d'éventuelles interactions intramoléculaires, les auteurs ont analysé des analogues non substitués sur le cycle aromatique. Ainsi ont-ils pu montrer que l'atome d'azote pouvait être remplacé par un atome d'oxygène sans engendrer de diminution notable de l'affinité -tableau 2, lignes 16 et 17- : le caractère basique de l'atome en cette position ne semble donc pas jouer un rôle crucial.

□ Puis, la longueur de la chaîne et sa géométrie ont été considérées grâce à respectivement, des homologations et des changements d'hybridation -tableau 2, lignes 18 et 19-. Ces variations induisent de fortes chutes d'affinité.

□ En ce qui concerne la substitution du groupement aromatique, deux types de composés ont parallèlement fait l'objet de pharmacomodulations : les 2-(diphénylméthyl)-3-benzylaminoquinuclidine et 2-(diphénylméthyl)-3-benzyloxyquinuclidine. Ceux-ci, parmi lesquels le L709-210, seront analysés ultérieurement.

Pour la première catégorie de produits, il a été montré que la substitution en position ortho par un groupement électrodonneur (OMe) était nécessaire à une bonne affinité -tableau 2, lignes 20 à 23-. La possibilité d'une liaison hydrogène intramoléculaire a alors été avancée (Swain et al., 1995 a) : la méthylation de l'atome d'azote ou son remplacement par un oxygène qui suppriment cette alternative font chuter l'affinité -tableau 2, lignes 24 et 25-. Il a, par la suite été établi qu'il était possible de substituer les

deux positions méta (par des groupements trifluorométhyle) sans jouer sur le binding -tableau 2, lignes 26 et 27-

iv. Mise en évidence d'une conformation bioactive possible du CP96345

Le CP96345 peut adopter différentes conformations et il est impossible de connaître, par étude du produit seul (c'est-à-dire non lié au récepteur), quelle est celle qu'il adopte quand il est fixé à la protéine. Toutefois, l'analyse des formes énergétiquement permises donne accès à des informations qu'il est intéressant d'utiliser en tant qu'éléments de comparaison.

L'analyse des conformations accessibles pour le CP96345 a été réalisée à l'état solide par diffraction des rayons X (Lowe et al., 1992), en solution par RMN (Swain et al., 1995 a) et par modélisation moléculaire (Swain et al., 1995 a). Les spectres de diffraction des RX révèlent deux conformations différentes selon le degré de protonation du produit (base libre ou dimésylate). Les résultats de RMN et ceux de modélisation moléculaire sont en faveur d'un arrangement dans lequel l'aromatique de la chaîne benzylaminée et un aromatique du benzhydryle sont en vis-à-vis et qui oriente les deux cycles parallèlement -figure 16-. Notons que les analyses de RMN ne révèlent pas de fortes différences entre le produit où le benzyle est orthosubstitué et celui où il n'est pas substitué.

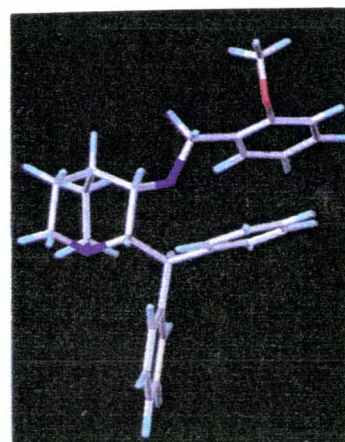


figure 16 : conformation possible du CP96345 (adaptée de Swain et al., 1995 a)

b. Le L709-210

Le L709-210 peut apparaître comme un analogue étheré du CP96345. Toutefois il est intéressant de le considérer indépendamment car les relations structure-affinité qu'il révèle diffèrent, pour certaines, de celles du CP96345 (Swain et al., 1995 a).

i. La chaîne benzyloxy

L'influence de la substitution du groupement aromatique a largement été étudiée ; de nombreuses variations ont été réalisées tant sur la position que sur le caractère (stérique, électronique,...) des substituants.

Ainsi a-t-il pu être montré que :

- quelle que soit sa nature, un groupement en position para induit une baisse d'affinité -tableau 3, lignes 3 et 4-
- la substitution en position 2 (même par un méthoxy) améliore peu le binding -tableau 3, ligne 5-
- la disubstitution en positions 3 et 5 induit (quelle que soit la nature des substituants) une très forte augmentation de l'affinité; seule la 3,5-disubstitution par des fluor ne joue pas sur la liaison -tableau

3, lignes 6 à 8-. On peut dès lors se demander si les groupements en positions méta n'interviennent pas simplement par leur encombrement, réduisant la liberté conformationnelle du benzyle

ii. Le noyau quinuclidine

□ Les impératifs stéréochimiques au niveau des deux carbones asymétriques ont été analysés. Seule la configuration du carbone C3 est cruciale : les deux épimères cis-(2S,3S) et trans-(2R,3S) se lient avec une affinité comparable au récepteur, de l'ordre du nanomolaire -tableau 3, lignes 9 à 11-.

□ Par ailleurs, une série d'analogues acycliques a été étudiée (Williams et al., 1994) : malgré une liberté conformationnelle accrue, ces amino-éthers conservent un binding similaire aux benzyloxyquinuclidines, suggérant que même en l'absence des contraintes imposées par le squelette quinuclidine, les dérivés acycliques peuvent atteindre la conformation bioactive.

On retrouve en outre la moindre importance de la stéréochimie au niveau du carbone C2 : l'affinité ne varie que d'un facteur 3 entre les deux énantiomères du dérivé N-diméthylé -tableau 3, lignes 15 et 16-.

Notons enfin que l'alkylation de l'amine primaire par un groupement carboxamidométhyle induit une augmentation du potentiel de liaison d'un facteur 10 -tableau 3, lignes 12 et 13-.

iii. Le groupement benzhydryle

□ Dans cette série, de nombreuses pharmacomodulations ont été réalisées autour du groupement benzhydryle : la suppression d'un des deux aromatiques provoque une chute de l'affinité -tableau 3, ligne 17-. Il est à noter que l'introduction d'une double liaison (via un benzylidène) induit la formation de deux isomères d'affinités très différentes -tableau 3, lignes 18 et 19- suggérant que dans le L709-210, seul un des aromatiques du benzhydryle joue dans la liaison, le second ne servant qu'à bloquer le premier dans une position adéquate.

□ L'influence du benzhydryle a également été mise en évidence sur des analogues acycliques : son remplacement par un indolylméthyle ou un naphtylméthyle induit une chute d'affinité d'un facteur 200 ; seul son changement par un groupement phényl a peu d'influence sur le binding -tableau 3, lignes 20 à 23-.

iv. Mise en évidence d'une conformation bioactive possible du L709-210

De la même manière que pour le CP96345, l'analyse des conformations accessibles pour le L709-210 a été réalisée par cristallographie, RMN et modélisation moléculaire (Swain et al., 1995 a). Cette dernière technique a mis en évidence une conformation dans laquelle l'aromatique de la chaîne étherée et un aromatique du benzhydryle seraient en vis-à-vis mais dans des plans orthogonaux. Ce résultat est alors en accord avec ceux de RMN ainsi qu'avec ceux de diffraction de RX -figure 17-.

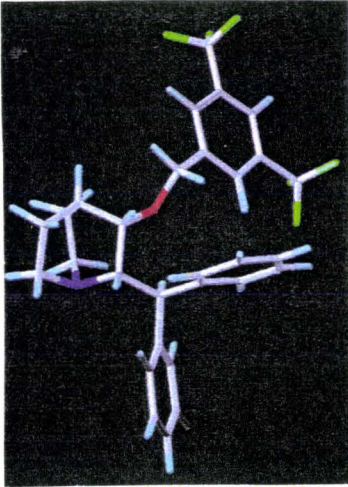


figure 17 : conformation possible du L709-210 (adapté de Swain et al., 1995 a)

c. Comparaison du CP96345 et du L709-210 et conclusions : possibilité de deux classes distinctes d'antagonistes

La mise en parallèle des relations structure-affinité trouvées pour le CP96345 et le L709-210, deux 2-diphénylméthylquinuclidines ne se distinguant que par la chaîne portée par le carbone C3 (2-méthoxybenzylamino ou 3,5-bis trifluorométhylbenzyloxy) révèle plusieurs différences pour ces composés :

- les substituants du benzyle interviennent différemment sur le binding selon la série (étherée ou aminée) : la substitution en position 2 est très influente en série aminée, beaucoup moins en série étherée

- inversement, les hétéroatomes de la chaîne latérale n'ont pas le même rôle selon les substituants du benzyle : si celui-ci porte un groupement ortho-méthoxy, seule une amine secondaire est tolérée en position C3 ; s'il est 3,5-disubstitué par un groupement trifluorométhyle, O et NH sont permis

- alors que la stéréochimie du carbone C2 a peu d'influence sur l'affinité du L709-210, elle est cruciale pour celle du CP96345

- parmi les conformations permises, le CP96345 semble favoriser une forme dans laquelle on relève un parallélisme entre deux noyaux aromatiques, alors que le L709-210 préfère un arrangement orthogonal de ces mêmes cycles.

Ces résultats suggèrent qu'il puisse y avoir deux modes de liaison au récepteur différents pour le CP96345 et le L709-210, induits par les chaînes 2-méthoxybenzylamino ou 3,5-bistrifluorométhylbenzyloxy. Apparaît donc la possibilité d'existence de deux classes distinctes d'antagonistes.

A.1.2.2. Etude du CP99994 et du L733-060, deux 2-phénylpipéridines

a. Etude du CP99994

L'élaboration du CP99994 a été réalisée à partir du CP96345 et est fondée sur l'hypothèse que, dans ce composé, l'angle dièdre entre la chaîne benzylaminée et un noyau aromatique du benzhydryle est critique pour l'activité (Desai et al., 1992). Ainsi retrouve-t-on, dans la *cis* 3-[(2-méthoxybenzyl)amino]-2-phénylpipéridine CP99994, un angle dièdre comparable entre le noyau phényle et la chaîne benzylaminée -figure 18-.

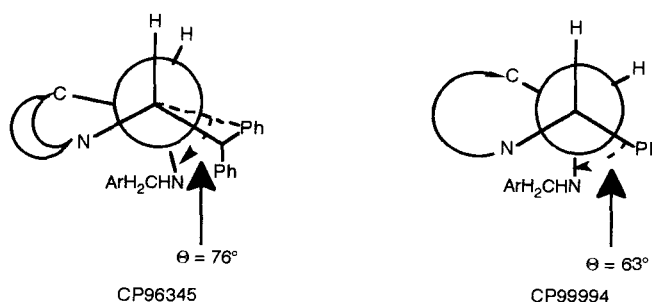


figure 18

i. Mise en évidence d'une conformation bioactive possible du CP99994

Il a été montré qu'un seul énantiomère du couple de produits *cis* est reconnu par le récepteur : le composé (+)-(2*S*, 3*S*) est en effet plus de 1000 fois plus affiné que son isomère optique -tableau 4, lignes 1 et 3-.

Par ailleurs, de nombreuses études se sont attachées à décrire une conformation bioactive possible du CP99994.

Une étude à l'état solide sur le dichlorhydrate a d'abord révélé un parallélisme entre les deux noyaux aromatiques (Desai et al., 1992) ; cette forme est apparue comme celle de plus basse énergie dans des études de modélisation moléculaire.

Puis, par introduction de contraintes conformationnelles, tant au niveau du cycle pipéridine qu'au niveau des substituants, il a été possible de bloquer la structure dans sa conformation bioactive et donc d'avoir des précisions quant au positionnement des divers substituants.

□Ridifications imposées à la pipéridine

Des dérivés d'indolizidines (Chan et al., 1996) et du morphane (Cocker et Davies, 1996) permettent de figer la pipéridine dans une conformation chaise. Seul le dérivé *cis* du morphane, qui amène le phényle en équatorial et la benzylamine en axial, présente alors une affinité comparable à celle du CP99994 -tableau 4, lignes 4 à 6- ; la comparaison des spectres de diffraction de RX pour ces deux produits indique le recouvrement possible des deux structures et confirme l'arrangement relatif du phényle et de la benzylamine.

D'autres contraintes conformationnelles ont été imposées:

- la liaison, sur le dérivé *cis*, des deux atomes d'azote par un pont méthylénique induit le placement du noyau benzénique en équatorial alors que la benzylamine reste axiale ; les composés ainsi préparés présentent une affinité comparable à celle du CP99994 -tableau 5, ligne 1-.

- des 2-azabicyclo[3.3.1]nonane sont également décrits (Desai et Lefkowitz, 1994 c) mais leurs résultats pharmacologiques ne sont pas divulgués

L'atome d'azote intracyclique, les groupements phényle et benzy'aminé ont par ailleurs été disposés sur des cycles à cinq chaînons :

- des 3-phényl-4-(2-méthoxybenzylamino)-2-azabicyclo[3.3.0]octanes permettent, dans ce cas de présenter le bon positionnement relatif des groupements -tableau 4, ligne 7-

- par contre, des 2-phényl-3-(2-méthoxybenzylamino)-1-azabicyclo[3.4.0]nonanes -tableau 4, ligne 8-, ne donnent pas accès à la bonne conformation.

□ Rigidification du groupement phényle

Le groupement phényle a été bloqué dans une spiropipéridine. Cette contrainte induit une chute d'affinité d'un facteur 100 par rapport au CP99994 -tableau 5, ligne 2-. Pourtant, l'analyse de la conformation en solution (par RMN) et par modélisation moléculaire indique que les formes monoprotonnées (sur l'azote intracyclique) de la spiropipéridine et du CP99994 placent la benzylamine en axial et le phényle en équatorial. Ceci laisse possibles deux conclusions :

- l'encombrement induit par le nouveau cycle destabilise l'interaction

- l'espèce bioactive est une espèce diprotonnée (et dans ce cas, les conformations pour le CP99994 et la spiropipéridine sont différentes : le CP99994 garde la benzylamine axiale et le phényle équatorial tandis que la spiropipéridine oriente le phényle en axial et la benzylamine en équatorial) ; toutefois, les pKa des fonctions amines du CP99994 (8,4 et 4,7) (Armour et al., 1995) ne vont pas dans le sens de cette conclusion.

□ Rigidification de la chaîne benzylaminée

L'inclusion de la chaîne benzylaminée dans une spiropipéridine induit une perte d'affinité -tableau 5, ligne 3- imputable, selon les auteurs à l'impossibilité pour les aromatiques de s'orienter parallèlement. Les études qu'ils ont menées ultérieurement leur ont permis d'atteindre à nouveau la conformation bioactive -tableau 4, ligne 4-: l'homologation du cycle d'un chaînon méthylénique induit le bon positionnement des deux aromatiques sans jouer sur la distance entre les deux atomes d'azote.

□ Conclusion

Les études menées autour de la conformation bioactive du CP99994 permettent donc d'avancer que :

- sur le cycle pipéridine, le phényle se place en équatorial et la benzylamine en axial

- ces deux groupements s'orientent parallèlement.

La distance entre les deux atomes d'azote apparaît également comme une caractéristique critique.

ii. Le noyau pipéridine

Le cycle a pu subir, outre les transformations effectuées en vue de le contraindre, des alkylations sur l'atome d'azote. Sa substitution par un benzyle a été décrite (Diez et al., 1995) mais les résultats pharmacologiques n'ont pas été donnés. Par contre, l'alkylation par un groupement carboxamidométhyle induit une chute d'affinité d'un facteur 400 -tableau 4, ligne 9- ; notons que cette alkylation joue non seulement sur l'encombrement de l'atome d'azote, mais également sur son caractère basique qui diminue fortement.

iii. Le groupement phényle

Concernant ce groupement, il est simplement reporté que sa substitution en position 3 par un diazirinyle ou un acétyle (réalisée en vue de la préparation d'analogues photoactivables) induisait une perte d'affinité -tableau 4, lignes 10 et 11-.

iv. La chaîne benzylaminée

L'aromatique de la chaîne benzylaminée a été diversement substitué en position 5 sans que ceci n'induisse une diminution de la reconnaissance -tableau 4, lignes 12 et 13-. Le GR203040 portant un groupement tétrazole a émergé de ces études.

b. Etude du L733-060

Là encore, le L733-060, qui pourrait être considéré comme analogue du CP99994, mérite une étude séparée.

i. Le noyau pipéridine

□ L'effet de la stéréochimie relative et absolue des substituants de la pipéridine a d'abord été étudiée. Non seulement l'arrangement cis est nécessaire à une bonne reconnaissance du récepteur, mais la configuration (+)-(2S, 3S) retient toute l'affinité -tableau 6, lignes 1 à 4-.

Il est cependant à noter que, comme dans le cas du L709-210, la stéréochimie du carbone portant la chaîne oxygénée est cruciale alors que celle de l'autre centre asymétrique semble moins influencer. Une étude de la stéréosélectivité sur des analogues morpholiniques du L733-060 -tableau 6, lignes 5 à 8- montre ce résultat.

□ En ce qui concerne l'atome d'azote pipéridinique, son rôle reste ambigu. Les études tendent à prouver qu'il joue sur l'affinité en favorisant la bonne orientation de la molécule dans le site, sans toutefois instaurer de liaisons indispensables au binding. De fait,

- son importance a pu être établie : le remplacement du NH par O ou CH₂ induit la chute voire la quasi suppression de l'affinité -tableau 6, lignes 9 et 10- ;

- mais il ne s'avère pas indispensable à la liaison avec le récepteur. En effet, son caractère basique peut être altéré : si le L733-060 apparaît protoné au pH physiologique ($pK_a = 8,3$), la diminution de la basicité de la fonction amine (par alkylation par un groupement carboxamidométhyle conférant un pK_a de 5,4) n'influe pas sur l'affinité -tableau 6, ligne 11-. De même, l'introduction d'un second hétéroatome sur le cycle (via la morpholine) qui diminue également la basicité, joue peu sur la reconnaissance -tableau 6, ligne 5-.

De plus, cet atome d'azote pipéridinique peut être supprimé à condition que le méthylène qui le remplace soit substitué par une chaîne portant un groupement polaire -tableau 6, ligne 12-.

Il peut être alkylé par diverses chaînes polaires plus ou moins longues -tableau 6, lignes 13 à 15- ; l'amide terminal peut alors intervenir par son caractère accepteur de proton dans une liaison hydrogène (Harrison et al., 1995). Ceci suggère que cette chaîne polaire pointe vers le milieu extracellulaire plutôt que vers les domaines transmembranaires.

□ Quant au cycle lui-même, il apparaît, là encore, comme un simple squelette positionnant correctement les divers groupements. De fait,

- il a d'abord pu être modifié : son remplacement par son homologue inférieur (pyrrolidine) n'engendre pas de fortes modifications de l'affinité -tableau 6, ligne 16-

- par ailleurs, il a été supprimé : l'analyse de dérivés acycliques a permis à des auteurs de mettre en évidence un phénylglycinol O-benzylé qui peut être vu comme le pharmacophore minimum requis pour une bonne affinité au récepteur NK1 (Owens et al., 1995) -tableau 6, ligne 17-. Cette structure est alors retrouvée dans des pipéridines 2-gemdisubstituées -tableau 6, ligne 18-.

□ Cette notion de pharmacophore minimum (au départ décrit comme "un groupement polaire -ici l'amine- et deux aromatiques en vis-à-vis, correctement substitués, et reliés par un groupement espaceur possédant un accepteur de liaison hydrogène") nous permet de revenir sur la fonction de l'atome d'azote. En effet, il peut être alkylé par un groupement carboxamidométhyle qui renforce l'affinité -tableau 6, ligne 19- ; par ailleurs, il peut être éloigné du reste de la molécule comme le prouve la pipéridine disubstituée en position para -tableau 6, ligne 20-.

Nous pouvons alors supposer que, dans ces molécules possédant une chaîne benzyloxy substituée en positions méta, l'atome d'azote en α du phényle n'est pas indispensable à condition qu'il y ait dans la molécule un autre groupement polaire capable de pointer vers le milieu extracellulaire et de bien orienter la chaîne benzyloxy et le phényle dans le domaine transmembranaire.

ii. La chaîne 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyloxy

Elle a peu été étudiée ; toutefois, il a pu être montré, en série morpholinique, que la suppression de l'hétéroatome exocyclique induisait une diminution déterminante de l'affinité -tableau 6, ligne 21-.

iii. Mise en évidence d'une conformation bioactive possible du L733-060

Les études des conformations accessibles du L733-060 ont été réalisées par cristallographie et par modélisation moléculaire (Harrison et al., 1994 a) : on peut relever un arrangement dans lequel les noyaux aromatiques sont en vis-à-vis mais orientés dans des plans orthogonaux .

c. Comparaison du CP99994 et du L733-060 et conclusions : définition de deux modes de liaisons possibles des antagonistes au récepteur

La comparaison de ces deux 2-phénylpipéridines qui ne se distinguent là encore que par la chaîne portée par le carbone C3 du cycle (2-méthoxybenzylamine ou 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyloxy) nous conforte dans l'idée qu'il existe deux modes de liaisons différents, dépendant de la nature du substituant. Nous pouvons en effet rappeler que pour ces produits :

- les conformations de plus basse énergie révèlent pour le CP99994 un stacking des aromatiques tandis que pour le L733-060, une orientation orthogonale des plans des cycles semble préférée

- le L733-060 supporte l'alkylation de l'atome d'azote par une chaîne carboxamidométhyle tandis que cette même substitution, dans le cas du CP99994, induit une perte d'affinité.

Ces résultats, appuyés par ceux sur les quinuclidines, nous poussent à supposer que

- dans le cas des dérivés possédant une chaîne benzylique substituée en ortho (voire non substituée), qui constitueraient une première classe d'antagonistes, une interaction entre le récepteur et les deux aromatiques est nécessaire mais l'hétéroatome du cycle intervient également dans la liaison, probablement grâce au fait qu'il peut être chargé positivement

- dans le cas des dérivés possédant une chaîne benzylique substituée en positions 3 et 5, qui représenteraient une deuxième catégorie d'antagonistes, l'interaction entre le récepteur et les deux aromatiques est nécessaire et suffisante mais demande pour être réalisée une bonne orientation de la molécule (via un groupement polaire pointant vers le milieu extracellulaire).

A.1.2.3. Etude du LY303-870 et du L732-138, deux structures issues du tryptophane

L'identification par les équipes des laboratoires Merck Sharp and Dohme (McLeod et al., 1993) et Lilly (Hipskind et al., 1996) d'esters benzyliques de tryptophane comme antagonistes des récepteurs NK1 a servi de point de départ à des études de relations structure-affinité.

Elles se déploient autour d'un squelette constant caractérisé par le caractère aromatique du résidu de l'acide aminé et la présence d'un groupement benzylique à l'extrémité C-terminale -figure 19-.

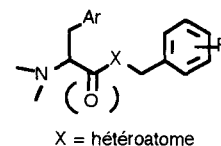


figure 19

a. Etude du LY303-870

Le LY303-870 a été élaboré à partir d'un 3-aryl-1,2-diacétamidopropane, lui-même issu de l'optimisation de l'ester benzylique du N-acétyltryptophane (Hipskind et al., 1996). Les relations structure-activité peuvent s'articuler autour du composé (a) -figure 20- et peuvent être classées en considérant l'étude de la partie C-terminale, l'étude de la nature de l'acide aminé et l'étude de la chaîne N-terminale.

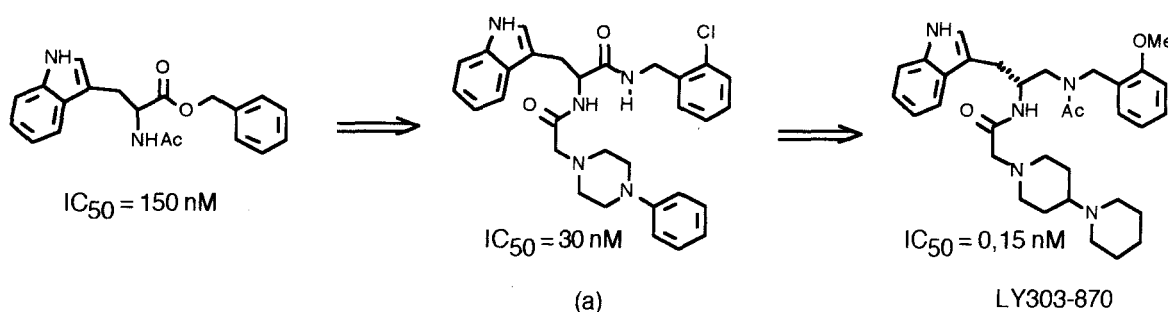


figure 20 : élaboration du LY303-870

i. Etude de la partie C-terminale

□ Le remplacement de la fonction amide terminale par une amine acétylée a dès le départ révélé une forte augmentation d'affinité -tableau 7, lignes 5 et 6- et a conduit les auteurs à prendre cette fonction terminale comme une constante. Plusieurs acylants de l'amine ont néanmoins pu être évalués et de nombreux groupements, tel le benzyle, sont tolérés -tableau 7, lignes 7 et 8-.

□ L'importance du benzyle sur ces composés a été confirmée : son remplacement par un cyclohexylméthyle (non aromatique) ou un phényle et sa suppression induisent la chute voire l'annulation de l'affinité -tableau 7, lignes 9 à 12-. Par ailleurs, la substitution de l'aromatique semble n'avoir que peu d'influence sur la reconnaissance du récepteur : il est possible de substituer les positions ortho, méta ou para par un méthoxy ou de substituer la position ortho par une large variété de substituants (Cl, Me) sans engendrer de fortes modifications de l'affinité -tableau 7, lignes 6, 13, 14, 15-.

ii. Etude de la nature de l'acide aminé précurseur

□ Plusieurs groupements ont été comparés au 3-indolylméthyle : les substituants arylméthyle conservent une bonne affinité ; par contre, l'homologation supérieure ou inférieure de la chaîne portant le noyau benzénique ou la suppression du caractère aromatique du substituant induit la chute voire la suppression du binding -tableau 7, lignes 16 à 18-.

□ L'énantiospécificité relevée pour la série est également à souligner : la comparaison du pouvoir inhibiteur de deux énantiomères montre que l'affinité réside essentiellement dans l'isomère R -tableau 7, lignes 19 et 20-

iii. Etude de la chaîne N-terminale

L'intervention de la chaîne N-terminale dans la liaison au récepteur n'est pas clairement établie. Une étude a été entreprise sur le groupement 2-(4-phénylpipérazin-1-yl)acétyle (remplacement du phényle, suppression de l'atome d'azote N4 de la pipérazine, ...) ; elle permet à ses auteurs (Hipskind et al., 1996) d'avancer l'importance d'un atome d'azote basique pour l'activité et le rôle du groupement substituant cet hétéroatome -tableau 7, lignes 21 et 23-

b. Etude du L732-138

Une nette augmentation de l'affinité induite par une 3,5-bis-substitution de l'aromatique C-terminal a dès le départ été relevée par les chercheurs du groupe de McLeod (1993) à la fois sur des N-Boc-tryptophanes et sur des N-benzoyltryptophanes et a conduit à conserver le benzyle substitué en positions méta comme une constante dans leurs études -tableau 8, lignes 5 à 9-. Ainsi, pouvons-nous regarder les produits élaborés autour du L732-138 comme indépendamment des précédents.

i. Etude de la nature de l'acide aminé

□ Plusieurs groupements aromatiques ont été étudiés. Le système indolique apparaît alors comme la meilleure alternative (avec le 3,4-dichlorophényle) -tableau 8, lignes 10 et 11-

□ Notons par ailleurs qu'une seule configuration de l'acide aminé confère au produit son affinité : l'inversion de configuration sur un 3,5-diméthylbenzylate de L-tryptophane peut induire une chute d'affinité d'un facteur 250 -tableau 8, ligne 12-

ii. Etude de la liaison ester

□ La liaison ester a successivement été remplacée par des amide, éther ou cétone -tableau 8, lignes 13 à 16- : seule la fonction cétone permet de conserver l'affinité du produit et il est particulièrement à noter la chute importante d'affinité relevée suite à un remplacement de la fonction ester par une fonction amide: remarquons toutefois que l'amide tertiaire qui permet la stabilisation du rotamère cis présente un binding légèrement meilleur -tableau 8, lignes 13 et 14-

□ La fonction ester a également été introduite dans un cycle incluant l'amine terminale. Différents squelettes à cinq ou six chaînons ont été examinés : la cyclisation du L732-138 en pipérazinedione, analogue rigide direct, induit la perte d'affinité -tableau 8, ligne 17- ; d'autres pipérazines plus ou moins oxydées ne permettent pas de restaurer une bonne liaison au récepteur -tableau 8, ligne 18-. Seule

l'inclusion de la fonction ester dans un cycle oxazolidinedione permet un binding correct, sans pour autant atteindre le niveau du L732-138 -tableau 8, ligne 19-.

iii. Etude de l'extrémité N-terminale

□ Partant du 3,5-diméthylbenzylate de tryptophane, le passage d'une amine primaire à une amine tertiaire puis à l'ammonium quaternaire induit une augmentation d'affinité allant jusqu'à un facteur 12 -tableau 8, lignes 20 à 22-. En outre, l'acylation de l'amine soit par un acétyle (ou mieux par un benzoyle) procure son accroissement d'un facteur 23 (respectivement d'un facteur 70) -tableau 8, lignes 3 et 9-.; le caractère basique de l'atome d'azote ne semble donc pas intervenir pour la liaison des molécules au récepteur.

□ Le groupement acylant de l'azote a été examiné plus en détail mais cette étude a été menée sur les dérivés cétoniques du L732-138. Ainsi, l'acylation du N-terminal par une chaîne aminoalkyle permet d'augmenter l'affinité des produits. La présence d'un atome d'azote séparé par trois chaînons méthyléniques du groupement carbonyle induit alors le plus fort accroissement ; il est donc là encore à noter que l'azote ne semble pas intervenir par son caractère basique : la modification du pKa de l'amine n'a que peu d'influence sur le binding -tableau 8, lignes 23 à 28-.

iv. Mise en évidence d'une conformation bioactive possible du L732-138

Des études cristallographiques ont d'abord été réalisées sur cette famille de composés (McLeod et al., 1994) ; elles ont permis de mettre en évidence sur l'analogue du L732-138 (dont le benzyle est substitué en positions méta par des méthyles) le fait que, dans une même molécule, le noyau indolique et le phényle étaient orthogonaux mais séparés de 8,2Å. L'étude de la conformation à l'état solide du L732-138 n'a pas été réalisée ; par contre, une analyse conformationnelle révèle un stacking entre les deux aromatiques, mais les résultats sont encore sujets à controverse.

c. Comparaison du LY303-870 et du L732-138

En ce qui concerne ces deux composés, supportés par un même squelette mais se distinguant toujours par la nature de la chaîne benzylique (2-méthoxybenzylamine ou 3,5-bis-trifluorométhylbenzyloxy), certaines différences de comportement sont à souligner :

- d'abord la stéréochimie du centre asymétrique requise pour une bonne affinité est inverse entre les deux produits

- par ailleurs, alors que pour le précurseur du LY303-870, le passage d'une fonction amide à une fonction amine induit une amélioration de l'affinité, pour le L732-138, le changement de l'ester en éther amène la baisse de reconnaissance du récepteur ; par contre, le passage à la fonction cétone ne joue pas sur l'affinité.

Ces deux produits constituent donc d'autres exemples appuyant les conclusions tirées à l'issue des comparaisons du CP96345 et du L709-210, du CP99994 et du L733-060.

A.1.2.4. Etude du FK888

Le FK888 (Hagiwara et al., 1994) a été élaboré à partir d'une étude des relations structure-activité faite sur le composé n°6 -tableau 9- (Hagiwara et al., 1993 a), lui-même conçu à partir du FR113-680 (Hagiwara et al., 1992 b).

a. Etude de l'acide aminé C-terminal

L'étude de la partie C-terminale a d'abord été réalisée sur des tripeptides précurseurs du FR113-680 et a été optimisée ensuite sur le FK888.

i. Nature de l'acide aminé

□ Le changement de la L-phénylalanine par des acides aminés aliphatiques (Leu, Pro, Val) dans le composé Boc-Gln-D-Trp(CHO)-Phe-OBzl induit des chutes importantes de l'affinité -tableau 10, lignes 4 à 6-. Par contre, un acide aminé aromatique (acide 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-3-carboxylique, N-méthylphénylalanine) permet de conserver des affinités du même ordre de grandeur -tableau 10, lignes 2 à 3-. Par ailleurs, l'épimérisation provoque également une baisse de l'inhibition de la SP -tableau 10, ligne 7-. Le caractère aromatique et la configuration S de l'acide aminé ont donc été pris comme constantes par le groupe de Fujisawa. Dans le FK888, différents aryles ont été étudiés -tableau 9, lignes 1 à 3- ; le groupement naphthyle a été retenu afin d'augmenter le caractère lipophile du composé (Hagiwara et al., 1994).

□ La firme Boehringer Ingelheim a inclus cet acide aminé dans une contrainte conformationnelle en cyclisant le noyau aromatique sur l'amide C-terminale et conserve une bonne affinité -figure 14-. Il est cependant à noter une différence d'un facteur 10 entre l'affinité des épimères : le plus affin est celui dont la stéréochimie de l'acide aminé C-terminal est inverse de celle du FK888.

□ L'importance du caractère aromatique de l'acide aminé C-terminal a par la suite été réévaluée :

- d'abord sur le tripeptide FR113-680, pour lequel il a été montré que le remplacement de la phénylalanine par l'acide (3aS,7aS)-octahydroindole-2-carboxylique (non aromatique) induisait une augmentation de l'activité -tableau 11, ligne 2-.

- puis sur un analogue du FK888 lui-même dans lequel le remplacement du benzyle par un cyclohexylméthyle ne modifie l'affinité que d'un facteur 6 -tableau 9, ligne 5-.

Ainsi peut-on penser que l'intervention de ce résidu se fait plutôt par son caractère lipophile que par son caractère aromatique.

ii. Substituant C-terminal

□ Le N,N-méthylbenzylamide terminal est dès le départ apparu comme une constante. De fait, ce groupement a été choisi après les études des relations structure-affinité sur le dérivé Boc-Gln-D-

Trp(CHO)-Phe-OBzl (Hagiwara et al., 1992 b). Là encore, le caractère aromatique s'est révélé important -tableau 10, ligne 8-.

□ Le FR113-680 a également été modifié sur son amide C-terminal : ainsi le remplacement de $N(CH_3)CH_2Ph$ par $N(CH_3)CH(CH_3)Ph$ (de configuration R ou S) améliore l'activité ; par contre, le passage à un amide secondaire induit une chute importante de l'affinité - tableau 11, lignes 3 à 6-. Les auteurs attribuent ce résultat au fait que les amides secondaires adoptent, contrairement aux tertiaires, une configuration trans qui ne serait pas la conformation bioactive.

Notons que cette même diminution de la reconnaissance du récepteur induite par le passage d'une amide tertiaire à un amide secondaire a également été montrée pour les précurseurs du FR113-680 (Hagiwara et al., 1992 b).

Remarquons pour finir que les études récentes ayant abouti au LY303870 font référence à la même chute d'affinité lors du changement du N,N-méthylbenzylamide au N-benzylamide puis à l'ester benzylique -tableau 12-.

b. Etude de l'acide aminé N-terminal

i. Nature de l'acide aminé

□ La modification du résidu lysine du composé n°6 -tableau 9- qui possède déjà l'acide aminé C-terminal optimisé a été le premier souci des auteurs (Hagiwara et al., 1994) : ils l'ont remplacé par divers acides aminés naturels ou synthétiques -tableau 9, ligne 7 à 10-. La L-proline apparaît alors comme la meilleure alternative (remarquons qu'une seule configuration de l'acide aminé confère au dipeptide son affinité). Par ailleurs, le groupement hydroxyle porté par la proline sur le FK888 ne semble pas intervenir dans l'affinité ; il n'a été ajouté qu'en vue d'augmenter l'hydrosolubilité du produit.

□ D'autres modifications ont été réalisées sur la proline :

- le cycle à cinq chaînons a d'abord été translaté vers le C-terminal sans engendrer de diminution de l'affinité -tableau 9, ligne 12-

- plus récemment, il a été remplacé par un cycle à six chaînons grâce à l'acide 2-aminocyclohexanecarboxylique -tableau 9, ligne 11- et la conservation du potentiel de liaison est conditionnée par la stéréochimie (1R, 2S) de l'acide aminé.

ii. Substituant N-terminal

□ Les études concernant le substituant acylant N-terminal, réalisées sur le FK888 (ou sur des dérivés analogues) n'ont mis en jeu que des groupements aromatiques plus ou moins éloignés du carbonyle (Hagiwara et al., 1994).

Il apparaît alors l'importance de la longueur de la chaîne entre l'atome d'azote de la proline et l'aromatique -tableau 9, lignes 9 et 13- : un allongement induit une baisse d'affinité.

Par ailleurs, si l'aromatique est un indole, il est possible d'alkyler son atome d'azote -tableau 9, lignes 14 à 16- : l'alkylation par une chaîne aminoéthyle améliore l'affinité, au contraire de la chaîne

carboxyméthyle. Notons que la société ADIR a revendiqué des structures analogues au FK888 dont l'atome d'azote indolique porte un groupement 5-tétrazolylbutyle et présentant une bonne affinité -tableau 9, ligne 17-.

Le groupement 1-méthyl(indol-3-yl)carbonyl a également été remplacé par des acides aminés non naturels tels l'acide 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-3-carboxylique ou l'acide indoline-2-carboxylique ce qui induit une chute de l'activité -tableau 9, lignes 21 et 22-.

□ L'importance du caractère aromatique du substituant avait été étudiée lors de l'analyse des relations structure-affinité du composé n°18 -tableau 13- (Hagiwara et al., 1993 a) et il avait été montré que le remplacement du groupement 1-indol-3-ylcarbonyl par un tert-butoxycarbonyl, un hydrogène, un acétyle ou un benzoyl induisait une forte baisse de la liaison -tableau 9, lignes 19 et 20-; les auteurs avaient donc choisi l'acylant indolique comme point de départ pour d'autres pharmacomodulations mais il n'est pas prouvé que le caractère aromatique du substituant soit une caractéristique indispensable.

iii. Importance de l'acide aminé N-terminal

En comparant les différentes études, il est possible d'analyser l'importance de la proline acylée par le groupement indolique pour la liaison du FK888 (ou d'analogues possédant en C-terminal un tryptophane amidifié ou estérifié par un benzyle). En effet, alors que Ac-Trp-N(Me)Bzl possède une affinité caractérisée par une IC_{50} de 150nM, l'adjonction de la proline acylée par l'indole N-méthylé la multiplie par un facteur 100 -tableau 11-.

c. Mise en évidence d'une conformation bioactive possible du FK888

A côté de ces recherches concernant les relations structure-affinité, une analyse de la conformation que peut adopter l'antagoniste quand il se lie au récepteur a été entreprise par plusieurs équipes. Les techniques utilisées font appel à la modélisation moléculaire même s'il est noté qu'une analyse du produit par RMN est en cours. Elles permettent d'obtenir des conformations énergétiquement possibles de l'antagoniste.

□ Deux modèles ont été élaborés par une analyse conformationnelle comparative qui ne prend en compte que des points des ligands pour les superpositions :

- le premier, élaboré par l'équipe d'UCB, secteur pharmaceutique, (Goldstein et al., 1995 a) fait ressortir un β -turn mettant en vis-à-vis l'indole et le groupement benzyle -figure 21-.

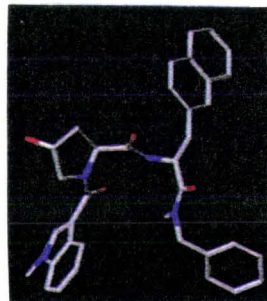


figure 21 : conformation du FK888 révélant un β -turn (adapté de Goldstein et al., 1995 b)

- le second, par Sisto et collaborateurs (1995) s'appuie sur un stacking entre l'indole et le naphthyle -figure 22-. La synthèse de pseudopeptides analogues du FK888 ayant à la place de l'hydroxyproline un acide 2-aminocyclohexane carboxylique et révélant (d'après des analyses de modélisation moléculaire et des études de mesure d'absorption UV et de fluorescence) un stacking entre l'indole et le naphthyle ont amené les auteurs à conclure à l'importance de ce face-à-face entre les groupements aromatiques pour la liaison des antagonistes au récepteur.

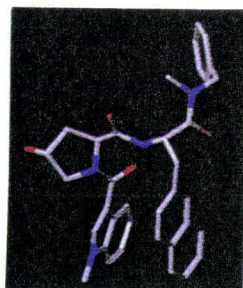


figure 22 : conformation du FK888 révélant un stacking entre le naphthyle et l'indole (adapté de Goldstein et al., 1995 b)

□ Une étude ultérieure de Goldstein et collaborateurs (1995 b), utilisant une méthode qui prend en compte, pour les comparaisons, des points des ligands et des sites du récepteur fait ressortir deux solutions privilégiées correspondant à celles précédemment citées. Ces deux conformations apparaissent donc comme deux formes probables du FK888 dans son site récepteur.

d. Conclusion

Au vu de tous ces résultats, il est particulièrement à noter pour ces pseudopeptides possédant un benzyle non substitué en position C-terminale :

- le rôle joué par l'amide tertiaire terminal qui ne peut être remplacé par l'ester benzylique correspondant
- l'importance de la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline ; rappelons qu'un simple acide aminé aromatique N-acylé et benzylé en C-terminal ne possède pas une forte affinité.

A.1.2.5. Tableaux récapitulatifs des relations structure-affinité des antagonistes étudiés

tableau 2 : relations structure-affinité pour le CP96345


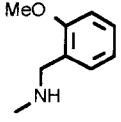
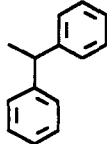

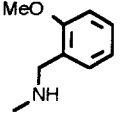
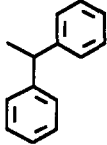
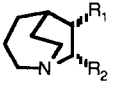
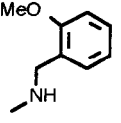
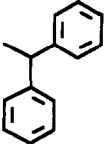
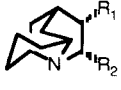
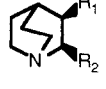
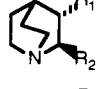
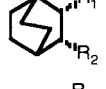
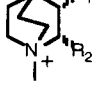
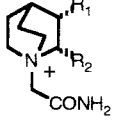
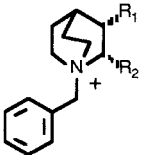
N° ligne	stéréo chimie	noyau	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (nM)	réf.
1	(-)-(2S,3S) CP96345				0,77	(a)
2	(±)-cis				2,2	(a)
variation sur le noyau quinuclidine						
3	(±)-cis				34,3	(b)
4	(±)-cis		"	"	4,1	(c)
5	(+)-(2R,3R)		"	"	81000	(d)
6	(±)-trans		"	"	41	(a)
7	(±)-cis		"	"	>32000	(a)
8	(2S,3S)		"	"	12,2	(e)
9	(2S,3S)		"	"	1,3	(e)
10	(2S,3S)		"	"	332	(e)

tableau 2 -suite- : relations structure-affinité pour le CP96345


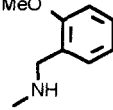
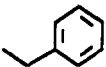

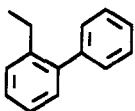
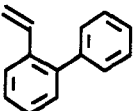
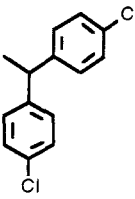

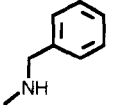
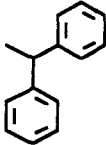
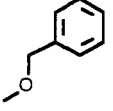
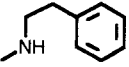
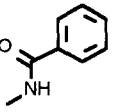

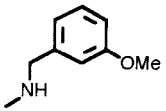
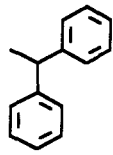
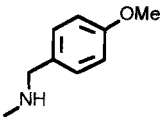
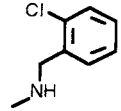
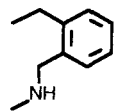
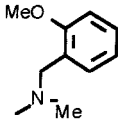
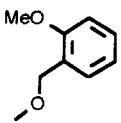
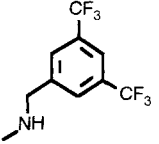
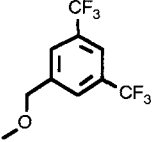
N° ligne	stéréo chimie	noyau	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (nM)	réf.
variation du groupement benzhydryle, R ₂						
11	(±)-cis				487	(a)
12	(±)-cis	"	"		140	(f)
13	(±)	"	"		18% d'inhibition à 10 ⁻⁵ M	(g)
14	(±)	"	"		20% d'inhibition à 10 ⁻⁵ M	(g)
15	(±)-cis	"	"		67,7	(a)
variation sur la chaîne benzylaminée, R ₁						
16	(±)-cis				16	(a)
17	"	"		"	150	(h)
18	"	"		"	700	(h)
19	"	"		"	>1000	(h)

tableau 2 -suite- : relations structure-affinité pour le CP96345

N° ligne	stéréo chimie	noyau	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (nM)	réf.
20	(±)-cis				20	(a)
21	"	"		"	343	(a)
22	"	"		"	33	(a)
23	"	"		"	16,7	(a)
24	"	"		"	383	(a)
25	"	"		"	150	(i)
26	"	"		"	2	(j)
27	"	"		"	1,3	(j)

a) Lowe et al., 1992 ; (b) Lowe et al., 1993b ; (c) Lowe et al., 1994c ; (d) Snider et al., 1991a ; (e) Lowe et al., 1994b ; (f) Lowe et al., 1994a ; (g) Caliendo et al., 1993 ; (h) Seward et al., 1993 ; (i) Howson et al., 1992 ; (j) Fong et al., 1994a

tableau 3 : relations structure-affinité pour le L709-210

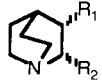
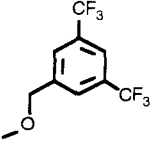
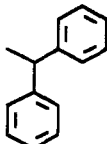
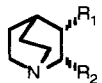
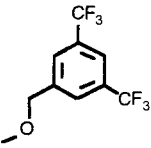
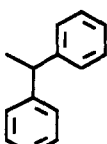
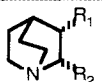
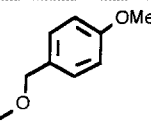
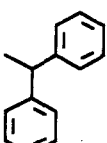
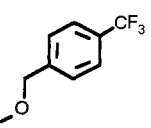
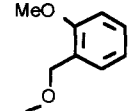
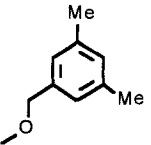
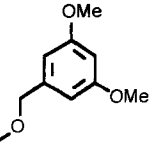
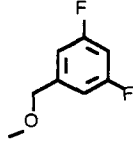

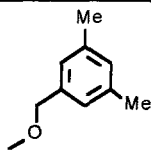
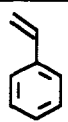

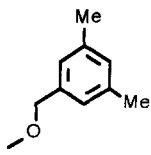
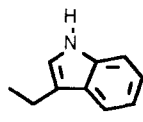
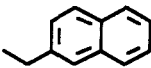


N° ligne	stéréo chimie	noyau	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (nM)	réf.
1	(2S,3S)				1,3	(a)
2	(±)-cis				1,6	(b)
variation sur la chaîne benzyloxy, R ₁						
3	(±)-cis				1113	(c)
4	"	"		"	370	(c)
5	"	"		"	150	(d)
6	"	"		"	0,9	(c)
7	"	"		"	9,3	(c)
8	"	"		"	33	(c)

tableau 3 -suite-: relations structure-affinité pour le L709-210

N° ligne	stéréo chimie	noyau	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (nM)	réf.
variation sur le noyau quinuclidine						
9	(2R,3R)				570	(a)
10	(2R,3S)		"	"	0,7	(a)
11	(2S,3R)		"	"	270	(a)
12	(±)		"	"	10,7	(e)
13	(±)		"	"	0,85	(e)
14	(±)				9,3	(f)
15	(S)		"	"	5,5	(e)
16	(R)		"	"	14	(e)
variation du groupement benzhydryle, R ₂						
17	(±)-cis				292	(b)
18		"	"		129	(b)

tableau 3 -suite-: relations structure-affinité pour le L709-210

N° ligne	stéréochimie	noyau	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (nM)	réf.
19	(±)-cis				8200	(b)
20	(±)				2333	(f)
21	(±)	"	"		2333	(f)
22	(S)	"	"		55	(f)
23	(R)	"	"		2500	(f)

(a) Swain et al., 1993 ; (b) Swain et al., 1995b ; (c) Swain et al., 1995a ; (d) Howson et al., 1992 ; (e) Williams et al., 1994 ; (f) Swain et al., 1994

tableau 4 : relations structure-affinité pour le CP99994

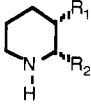
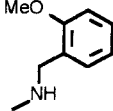

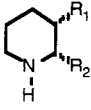
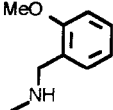

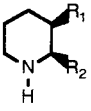
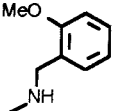

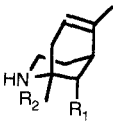
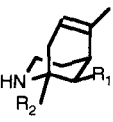
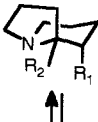
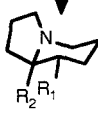
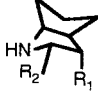
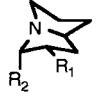
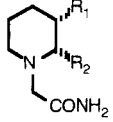
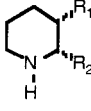
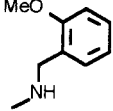
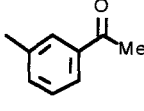
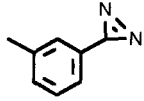

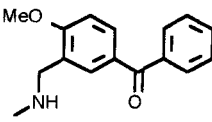

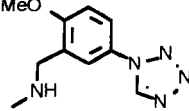
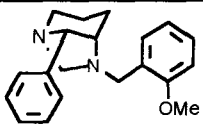
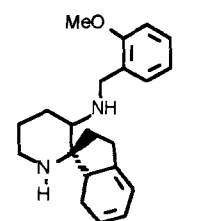
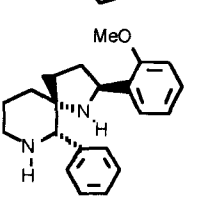
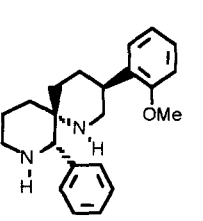
N° ligne	stéréochimie	noyau	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (nM) K _i (nM)	réf.
1	(2S,3S) CP99994				<u>0.17</u>	(a)
2	(±)-cis				<u>0.48</u>	(a)
variation sur le noyau pipéridine						
3	(2R,3R)				<u>≥10000</u>	(a)
4	(±)		"	"	<u>0.63</u>	(b)
5	(±)		"	"	<u>≥3000</u>	(b)
6	(±)	 ↕ 	"	"	<u>≥100</u>	(c)
7	(±)		"	"	<u>2.4</u>	(d)
8	(±)		"	"	>1000	(e)
9	(±)		"	"	227	(f)

tableau 4 -suite-: relations structure-affinité pour le CP99994

N° ligne	stéréo chimie	noyau	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (nM) K _i (nM)	réf.
				variation du groupement phényle, R ₂		
10	(±)				<u>250</u>	(g)
11	(±)	"	"		<u>12,6</u>	(g)
			variation de la chaîne benzylaminée, R ₁			
12	(±)				<u>0,39</u>	(g)
13	(±)	"		"	<u>0,05</u>	(h)

(a) Desai et al., 1992 ; (b) Cocker et Davies, 1996 ; (c) Chan et al., 1996 ; (d) Desai et al., 1994a ; (e) Cordero et al., 1994 ; (f) Harrison et al., 1995 ; (g) Kersey et al., 1995 ; (h) Ward et al., 1995

tableau 5 : affinité de structures rigides issues du CP99994

N° ligne	stéréo chimie	noyau	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (nM) K _i (nM)	réf.
1	(±)				0,6	(a)
2	(±)				<u>40</u>	(b)
3	(±)				>10000	(c)
4	(±)				<u>2</u>	(d)

(a) Howard et al., 1995 ; (b) Armour et al., 1995 ; (c) Desai et Lefkowitz, 1993a ; (d) Desai et al., 1994b

tableau 6 : relations structure-affinité pour le L733-060

N° ligne	stéréo chimie	noyau	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (nM)	réf.
1	(+)-(2S,3S)				1,4	(a)
2	(±)-cis				1,0	(a)
variation sur le noyau pipéridine						
3	(-)-(2R,3R)				350	(a)
4	(±)		"	"	300	(a)
5	(2S,3S)		"	"	2,4	(b)
6	(2R,3R)		"	"	287	(b)
7	(2S,3R)		"	"	59	(b)
8	(2R,3S)		"	"	376	(b)
9	(±)		"	"	2632	(c)
10	(±)		"	"	881	(c)

tableau 6 -suite-: relations structure-affinité pour le L733-060

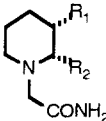
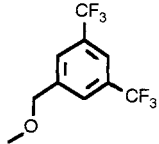

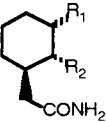
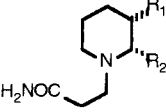
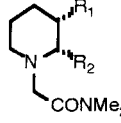
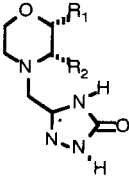
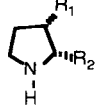
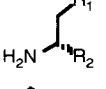
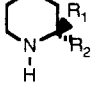
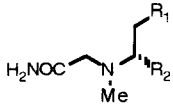
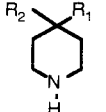
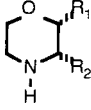
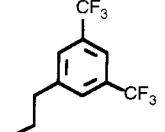

N° ligne	stéréo chimie	noyau	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (nM)	réf.
11	(±)				1,3	(d)
12	(±)		"	"	3	(c)
13	(±)		"	"	2,7	(d)
14	(±)		"	"	0,3	(d)
15	(±)		"	"	0,09	(b)
16	(±)		"	"	7	(a)
17	(S)		"	"	13	(e)
18	(S)		"	"	1	(f)
19	(S)		"	"	5,8	(e)
20			"	"	0,95	(g)

tableau 6 -suite-: relations structure-affinité pour le L733-060

N° ligne	stéréo chimie	noyau	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (nM)	réf.
variation sur la chaîne benzyloxy, R ₁						
21	(±)				1530	(h)

(a) Harrison et al., 1994a ; (b) Hale et al., 1996 ; (c) Mills et al., 1995 ; (d) Harrison et al., 1995 ; (e) Owens et al., 1995 ; (f) Harrison et al., 1994b ; (g) Stevenson et al., 1995 ; (h) Ladduwahetty et al., 1994

tableau 7 : relations structure-affinité pour le LY303-870

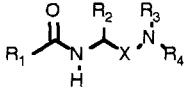
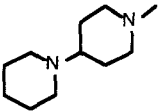
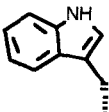

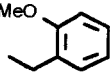
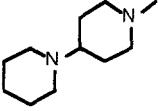
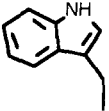

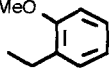
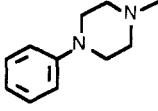
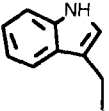

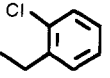

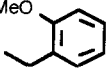
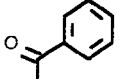


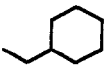


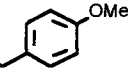

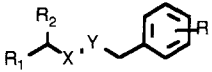


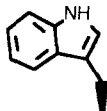
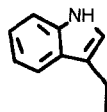
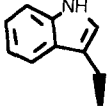
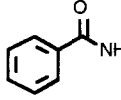
						
N° ligne	R ₁	R ₂	X	R ₃	R ₄	IC ₅₀ (nM)
1 LY303-870			CH ₂			0,15
2			CH ₂			0,23
Variation de la partie C-terminale						
5				H		30
6	"	"	CH ₂		"	1,9
7	"	"	"	"		1,1
8	"	"	"		"	2
9	"	"	"			2,2
10	"	"	"	"		21,9
11	"	"	"	"		>5000
12	"	"	"	"	Me	>5000
13	"	"	"	"		4,6
14	"	"	"	"		2,5
15	"	"	"	"		3,2

tableau 7 -suite- : relations structure-affinité pour le LY303-870

$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1 - \text{N} - \text{C} - \text{R}_2 \\ \\ \text{H} \\ \text{X} \\ \text{R}_3 - \text{N} - \text{R}_4 \end{array} $						
N° ligne	R ₁	R ₂	X	R ₃	R ₄	IC ₅₀ (nM)
Variation sur l'acide aminé précurseur						
16			CH ₂			8,3
17	"		"	"	"	474
18	"		"	"	"	>5000
19	"		"	"	"	0,85
20	"		"	"	"	358
variation de la partie N-terminale						
21			CH ₂			0,98
22		"	"	"	"	4,5
23		"	"	"	"	5,3

d'après Hipskind et al., 1996

tableau 8 : relations structure-affinité pour le L732-138

						
N° ligne	R ₁	X-Y	R ₂	R	IC ₅₀ (nM)	Réf.
1 L732- 138				3,5-(CF ₃) ₂	1,6	(a)
2	"	"		"	2,5	(b)
3	"	"		3,5-Me ₂	67	(a)
5	BocNH	"	"	H	413	(c)
6	"	"	"	2-OMe	280	(c)
7	"	"	"	3,5-Me ₂	133	(c)
8		"	"	2-OMe	>100	(a)
9	"	"	"	3,5-Me ₂	22	(a)

Variation de la
nature de l'acide
aminé




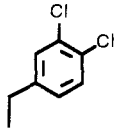
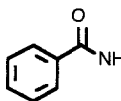
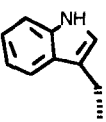
10				3,5-Me ₂	433	(a)
11	"	"		"	30	(a)
12		"		"	5500	(a)

tableau 8 -suite- : relations structure-affinité pour le L732-138

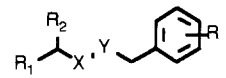
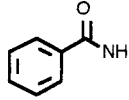

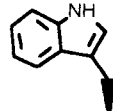

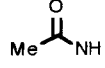


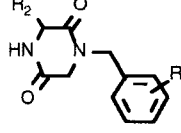
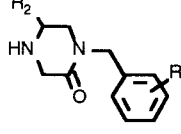
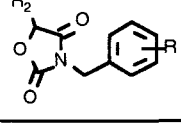

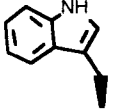
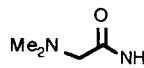

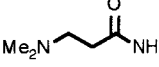
						
N° ligne	R ₁	X-Y	R ₂	R	IC ₅₀ (nM)	Réf.
Variation de la liaison ester						
13				3,5-Me ₂	1467	(d)
14	"		"	"	1033	(d)
15			"	3,5-(CF ₃) ₂	31	(d)
16	"		"	3,5-Me ₂	767	(d)
17		"	"	3,5-(CF ₃) ₂	4333	(b)
18		"	"	"	243	(b)
19		"	"	"	22	(b)
Variation de la partie N-terminale						
20	H ₂ N			3,5-Me ₂	1533	(a)
21	Me ₂ N	"	"	"	553	(a)
22	Me ₃ N ⁺	"	"	"	125	(a)
23			"	3,5-(CF ₃) ₂	5,0	(d)
24		"	"	"	1,8	(d)

tableau 8 -suite- : relations structure-affinité pour le L732-138

N° ligne	R ₁	X-Y	R ₂	R	IC ₅₀ (nM)	Réf.
25				3,5-(CF ₃) ₂	0,6	(d)
26		"	"	"	0,9	(d)
27		"	"	"	0,47	(d)
28		"	"	"	0,37	(d)

(a) McLeod et al., 1994 ; (b) Lewis et al., 1995 ; (c) McLeod et al., 1993 ; (d) McLeod et al., 1995

tableau 9 : relations structure-affinité pour le FK888

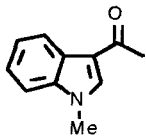
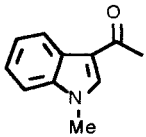
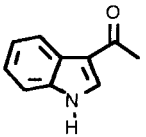
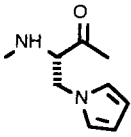
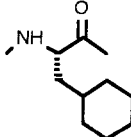
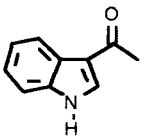
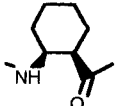
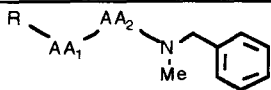
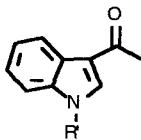
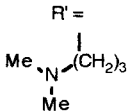
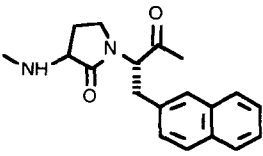
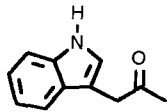
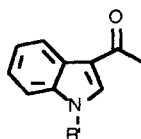
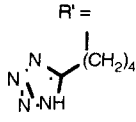
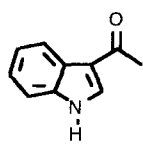
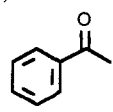
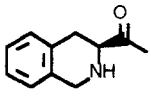
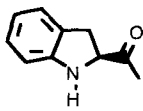
$R - \text{AA}_1 - \text{AA}_2 - \text{N}(\text{Me}) - \text{C}_6\text{H}_5$					
N° ligne	R	AA ₁	AA ₂	IC ₅₀ ou K _i (nM)	Réf.
1 FK888		(2S,4R)Hyp ⁽ⁱ⁾	Nap ⁽ⁱ⁾	1,7 pA ₂ =9,1	(a) (b)
Variation de l'acide aminé C-terminal					
2		(2S,4R)Hyp ⁽ⁱ⁾	Phe	6,4	(a)
3	"	"	Trp	1,7	(a)
4		"		60	(c)
5	"	"		45	(d)
Variation de l'acide aminé N-terminal					
6		Lys	Phe	14	(a)
7	"	L-Pro	"	5,4	(a)
8	"	D-Pro	"	(k)	(a)
9	"	(2S,4R)Hyp ⁽ⁱ⁾	"	7,4	(a)
10	"	(2S,4S)Hyp ⁽ⁱ⁾	"	4,6	(a)
11	"		Nap ⁽ⁱ⁾	10	(e)

tableau 9 -suite- : relations structure-affinité pour le FK888

N° ligne	R	AA ₁	AA ₂	IC ₅₀ ou K _i (nM)	Réf.
					
12		R' = 		1,36	(f)
Variation du substituant N-terminal					
13		(2S,4R)Hyp (i)	Phe	(l)	(a)
14		R' = Me	"	6,4	(a)
15	"	R' = (CH ₂) ₂ NMe ₂	"	3,5	(a)
16	"	R' = CH ₂ CO ₂ H	"	49,7	(a)
17	"	R' = 	"	Nap (j)	0,04 (g)
18		Ne(Ac-Thr)-Lys	Phe	13	(h)
19	H, Boc ou Ac	"	"	(k)	(h)
20		"	"	(k)	(h)
21		(2S,4R)Hyp (i)	Nap (j)	pA ₂ =4,9	(b)
22		"	"	pA ₂ =4,9	(b)

(a) Hagiwara et al., 1994 ; (b) Caliendo et al., 1996 ; (c) Boehringer Ingelheim KG. DE. 4243496, 1994 dans Swain, 1996 (d) Boehringer Ingelheim KG. WO. 9405693, 1994 ; (e) : Sisto et al., 1995 ; (f) Fugisawa WO. 9314113, 1993 dans Swain, 1996 ; (g) ADIR et Compagnie FR. 2719312 (1995) dans Swain, 1996 ; (h) Hagiwara et al., 1993a ; (i) : 4-hydroxyproline ; (j) : (napht-2-yl)alanine ; (k) : pas d'inhibition à 100 ng/ml ; (l) : 55% d'inhibition à 100 ng/ml

tableau 10 : relations structure-affinité pour
Boc-Gln-D-Trp(CHO)-Phe-O-Bzl

Boc-Gln-D-Trp(CHO)-AA-O-R				
N° ligne	AA	R	IC₅₀ (nM)	Réf.
1	Phe	Bzl	900	(a)
2	Tic (c)	Bzl	140	(a)
3	N-Me-Phe	Bzl	220	(a)
4	Leu	Bzl	>10000	(a)
5	Pro	Bzl	>10000	(a)
6	Val	Bzl	>10000	(a)
7	D-Phe	Bzl	770	(a)
8	Phe	CH ₂ -C ₆ H ₁₁	400	(b)

(a) Hagiwara et al., 1992a ; (b) Hagiwara et al., 1992b ;
(c) acide 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-3-carboxylique

tableau 11 : relations structure-affinité pour
AcThr-D-Trp(CHO)-Phe-N(CH₃)-CH₂-Ph

AcThr-D-Trp(CHO)-AA-R				
N° ligne	AA	R	pA₂	Réf.
1	Phe	N(CH ₃)-CH ₂ -Ph	8	(a)
2	Oic (c)	N(CH ₃)-CH ₂ -Ph	9,3	(a)
3	Phe	N(CH ₃)-CH(CH ₃)-Ph (R)	9,1	(b)
4	Phe	N(CH ₃)-CH(CH ₃)-Ph (S)	8,8	(b)
5	Phe	NH-CH(CH ₃)-Ph (R)	5,2	(b)
6	Phe	NH-CH(CH ₃)-Ph (S)	5,0	(b)

(a) Caliendo et al., 1995a ; (b) Caliendo et al., 1995b ; (c) acide (3aS,
7aS)octahydroindole-2-carboxylique

tableau 12

Ac-Trp-R		
N° ligne	R	IC₅₀ (nM)
1	O-Bzl	4900
2	NH-Bzl	450
3	N(Me)Bzl	150

d'après Hipskind et al., 1996

tableau 13

R₁-Trp-R₂				
N° ligne	R₁	R₂	IC₅₀ (nM)	Réf.
1	H	O-Bzl	>10000	(a)
2	Ac	O-Bzl	140	(b)
3	Ac	N(Me)Bzl	150	(b)
4	(d)	N(Me)Bzl	1,7	(c)

(a) McLeod et al., 1994 ; (b) Hipskind et al., 1996 ;

(c) Hagiwara at al., 1994 ;

(d) (4R)-4-hydroxy-1-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]prolyl

A.2. BIOLOGIE MOLECULAIRE DES RECEPTEURS NK1

A.2.1. Liaison des antagonistes aux récepteurs

Dès la mise en évidence d'antagonistes non-peptidiques puissants et sélectifs, de nombreuses recherches se sont rapidement orientées vers une meilleure connaissance du mécanisme de reconnaissance moléculaire des différentes molécules. La construction et l'utilisation de récepteurs chimères ou de récepteurs dans lesquels des acides aminés ponctuels ont été changés, ont permis d'établir des zones critiques pour la reconnaissance des antagonistes. Compte-tenu des différences inter-espèces pour les récepteurs NK1, NK2 et NK3 observées pour certains antagonistes, il est important de faire la distinction entre les études réalisées sur récepteurs de rat et celles réalisées sur récepteurs humains.

Nous analyserons donc ces deux types d'études en nous focalisant sur les antagonistes qui ont plus particulièrement servi de base à notre travail (CP96345 et L709-210, CP99994 et L733-060, L732-138, FK888).

A.2.1.1. Etudes sur récepteurs de rat

a. Mise en évidence d'un site de liaison commun aux antagonistes

□ Une première approche utilisant des récepteurs chimères a été utilisée par Gether et son équipe, ce qui a d'abord permis de mettre en évidence un domaine de liaison commun aux différents antagonistes.

La méthode consiste à comparer l'affinité de la petite molécule pour le récepteur natif à celle pour le récepteur chimère (NK1 / NK2 ou NK1 / NK3) construit, ce qui permet de conclure quant à l'importance de la zone modifiée pour l'interaction. Notons que la comparaison est autorisée du fait de la forte homologie de séquence dans les régions transmembranaires pour les trois protéines (laissant présager un arrangement comparable des hélices) et des profils pharmacologiques différents des récepteurs induisant les modifications du binding.

□ Ainsi, après avoir montré, par l'étude de macromolécules NK1 / NK3, que la liaison du CP96345 impliquait toute la partie C-terminale du récepteur, située au delà de la quatrième hélice transmembranaire, Gether et ses collaborateurs (1993 b) ont précisé le domaine d'interaction en montrant que ce ligand se liait à des épitopes situés près de la surface autour des hélices V et VI - figure 23 -. Ces résultats ont été confirmés grâce à des récepteurs chimères NK1 / NK2 (Gether et al., 1993 d).

□ Une étude similaire à celle réalisée pour le CP96345 sur chimères NK1 / NK3 a été entreprise pour d'autres ligands et en particulier pour le FK888 (Gether et al., 1994 a). Elle a permis de localiser un même domaine d'interaction pour ces antagonistes de structures chimiques complètement différentes.

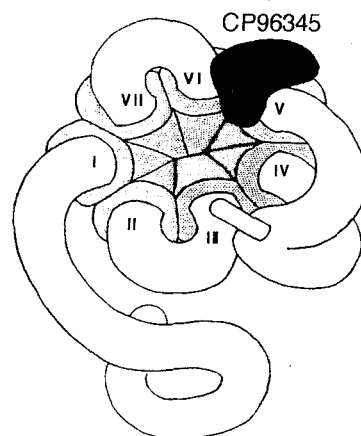


figure 23 : domaine d'interaction du CP 96345 sur le récepteur NK1

□ L'identité du domaine d'interaction des antagonistes est par ailleurs supportée par des résultats issus des études de la sélectivité inter-espèces. En effet, il a pu être montré pour le CP96345 (Fong et al., 1992b ; Sachais et al., 1993), pour le FK888 (Jensen et al., 1993) ou un dipeptide apparenté (Pradier et al., 1995) et pour le CP99994 (Pradier et al., 1995), que la substitution (sur le récepteur NK1 de rat) des résidus Ser²⁹⁰ et Leu¹¹⁶ par les acides aminés correspondants trouvés sur le récepteur humain (respectivement Ile et Val) permettait de restaurer l'affinité trouvée sur le récepteur NK1 humain (probablement en modifiant la conformation de la macromolécule au niveau du site de liaison). Cette ressemblance de comportement des antagonistes vis-à-vis des mutants permet de conforter la conclusion du recouvrement des domaines d'interaction.

b. Mise en évidence de différences dans le mode d'interaction entre les antagonistes et les récepteurs

□ L'étude de l'affinité des antagonistes CP96345 et FK888 pour les récepteurs chimères NK1 / NK3 a également permis de révéler des modes de liaison différents (Gether et al., 1994 a). De fait, l'échange d'un petit segment du récepteur NK1 situé sur la deuxième boucle extracellulaire (juste avant l'hélice transmembranaire V) par l'analogue NK3 diminue fortement l'affinité du CP96345 (d'un facteur 200) et modifie faiblement (d'un facteur 8) celle du FK888. Par contre, le changement de l'extrémité C-terminale de l'hélice V induit la perte d'affinité du FK888 sans jouer sur la liaison du CP96345. Ceci tend à prouver qu'il s'établit des interactions spécifiques différentes selon les antagonistes.

□ Afin de déterminer si ces modifications d'affinité sont imputables au changement d'un acide aminé directement impliqué dans l'interaction ou à la modification de la conformation du récepteur, la même équipe a réalisé des mutations ponctuelles sur le récepteur NK1 de rat dans les zones précitées (Gether et al., 1994 b) mais seule l'affinité du CP96345 pour les mutants a été évaluée, ce qui ne permet pas d'aller plus loin dans les conclusions sur la différence de mode de liaison.

A.2.1.2. Etudes sur récepteurs humains

A côté des études sur récepteurs de rat qui ont conduit à la localisation d'un site de liaison commun aux antagonistes, en soulevant le problème de l'établissement d'interactions spécifiques différentes, les analyses du récepteur humain qui utilisent des mutants où certains résidus sont échangés ponctuellement, amènent à caractériser plus finement les points d'interaction des ligands et du récepteur mais sans toutefois permettre de distinguer sans ambiguïté les acides aminés impliqués dans une liaison directe avec la petite molécule de ceux jouant de manière déterminante sur la conformation du récepteur (Schwartz et al., 1995).

a. Etude des acides aminés impliqués dans l'interaction du CP96345 et du récepteur NK1 humain

□ Fong et ses collaborateurs ont largement utilisé cette technique de mutagenèse dirigée et ont mis en évidence plusieurs acides aminés importants pour la liaison du CP96345 au récepteur.

La méthode consiste à comparer l'affinité de l'antagoniste pour le récepteur natif à celle pour un récepteur muté (dans lequel l'acide aminé étudié est remplacé par l'alanine) ; ceci permet de conclure à l'importance du résidu pour l'interaction. La nature de la liaison peut alors être étudiée par changement du caractère électronique de l'acide aminé. Finalement, le groupement, dans la petite molécule, important pour l'interaction est déterminé en comparant l'influence de la mutation sur les dérivés dans lesquels ce groupement est modifié.

□ Ainsi ont-ils pu montrer qu'il se crée une interaction spécifique entre le groupement benzhydryle du CP96345 et l'histidine 197 située à l'extrémité de l'hélice transmembranaire V (Fong et al., 1993) -figure 24-. Cette interaction serait du type électrostatique entre les électrons π ($\delta(-)$) des groupements phényle et l'atome d'azote $\delta(+)$ de l'imidazole.

□ L'importance d'un deuxième résidu d'histidine (His²⁶⁵) a également été mise en évidence (Fong et al., 1994 a) -figure 24- mais son intervention reste plus ambiguë et mérite d'être analysée plus en détail. De fait, alors que l'interconversion de His²⁶⁵ en alanine réalisée sur récepteur de rat fait chuter l'affinité du CP96345 d'un facteur 35, elle n'induit pas de changement de binding si elle est faite sur le récepteur humain. Ainsi, dans ce dernier, l'histidine 265 n'interagirait pas avec le CP96345 ; on peut simplement supposer sa proximité avec un groupement clé de l'antagoniste (probablement le benzyle orthosubstitué mis en cause par ailleurs et sur lequel nous reviendrons ultérieurement).

Le même type de constatations peut être fait quant à la tyrosine 272, qui entre en jeu dans l'interaction du CP96345 avec le récepteur de rat (Gether et al., 1994 b) mais pas avec le récepteur humain (Huang et al., 1994 b) -figure 24-.

□ L'implication d'autres acides aminés dans le binding de cet antagoniste a été relevée :

- la glutamine 165 située sur l'hélice V a indéniablement un rôle important du fait de la forte chute d'affinité notée quand elle est remplacée par l'alanine (Fong et al., 1994 b) -figure 24-. Les auteurs de l'étude avancent la possibilité d'une liaison hydrogène entre l'amide du résidu et l'azote extracyclique de l'antagoniste mais cela peut rester sujet à controverse. De fait, alors que la mutation Gln¹⁶⁵Ala a une influence faible sur le dérivé N-méthylé du CP96345 (qui n'est que donneur de doublets électroniques dans la liaison hydrogène contrairement au CP96345), elle influe beaucoup sur le dérivé où l'azote est remplacé par l'oxygène (également donneur de doublets) ; toutefois, pour ce composé, la substitution du benzyle est différente. Il reste donc difficile de conclure sans ambiguïté quant au rôle joué par la glutamine 165 dans le binding du CP96345.

- Gether et ses collaborateurs ont également souligné l'importance de deux résidus aromatiques (Phe²⁶⁷ et Phe²⁶⁸) suggérant une interaction directe entre Phe²⁶⁸ et CP96345, et un rôle de stabilisation de cette interaction pour Phe²⁶⁷ (Gether et al., 1995). -figure 24- Cependant, l'article (revue) ne précise pas s'il s'agit d'un travail sur récepteur humain ou sur récepteur de rat ; les conclusions sont donc à considérer avec prudence.

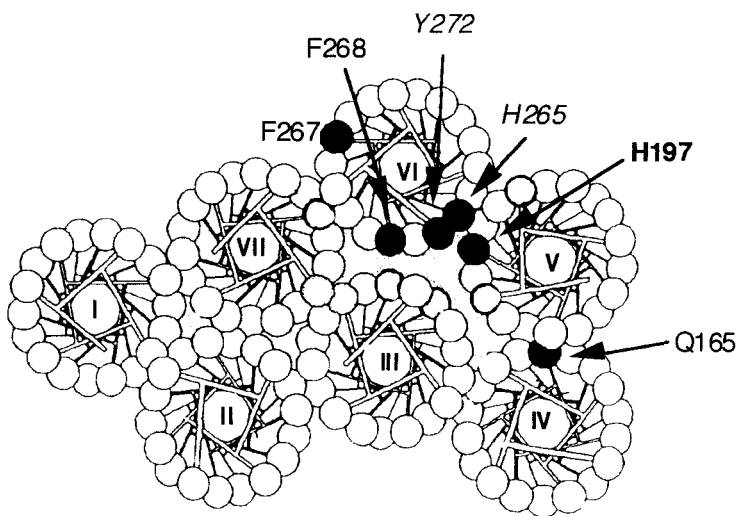


figure 24 :
acides aminés impliqués dans la
liaison du CP96345 sur le
récepteur NK1 humain

b. Implication de l'histidine 197 et de l'histidine 265 dans la liaison de différents antagonistes

L'étude de l'importance de ces résidus a été complétée par l'analyse du comportement face aux mutants d'autres antagonistes en particulier du FK888 et du L732-138 mais également du L709-210 ou du L733-060. Les résultats concernant le RP67580, sélectif pour le récepteur de rat (Fong et al., 1994 a ; Fong et al., 1994 b ; Huang et al., 1994 b), le SR140-333 ne présentant pas de sélectivité inter-espèces (Zoffmann et al., 1993) ne sont pas reportés ici.

i. Interaction avec His¹⁹⁷

L'histidine 197, cruciale pour le binding du CP96345, influe également sur la liaison du L732-138 (Cascieri et al., 1994) puisque sa substitution par l'alanine diminue d'un facteur 10 l'affinité de l'antagoniste -tableau 14-. Les auteurs avancent une interaction aromatique-aromatique ou amino-aromatique entre les résidus imidazole et indole. Les analogues du L732-138 étudiés pour la mise en évidence du groupement impliqué dans l'interaction n'apportent pas d'informations supplémentaires mais n'infirment pas les hypothèses de modèle de liaison.

L'étude des analogues éthers du CP96345 (L709-210) (Swain et al., 1995 ; Cascieri, 1996) ou du CP99994 (L733-060) (Cascieri, 1996) révèle également l'importance de cette histidine dans la liaison -tableau 14-.

Quant au rôle de cet acide aminé dans le binding du FK888, aucun résultat n'est actuellement disponible. Rappelons tout de même qu'il a été montré qu'il partageait le même domaine de liaison que le CP96345.

L'interaction des antagonistes avec l'histidine 197 apparaît donc comme une constante.

ii. Interaction avec His²⁶⁵

L'intervention de l'histidine 265 dans la liaison des antagonistes est moins univoque.

- Pour le FK888, d'abord, il a été montré sa faible influence sur le binding (Zoffmann et al., 1993).

- Le L732-138, par contre, perd son affinité pour le récepteur quand His²⁶⁵ est remplacée par Ala -tableau 14- (Cascieri et al., 1994) et les auteurs de l'étude proposent un modèle dans lequel le benzyle 3,5-disubstitué interagirait avec le résidu imidazole.

- Le L733-060 qui possède un 3,5-bistrifluorométhylbenzyle, montre également une forte sensibilité à la mutation His²⁶⁵Ala -tableau14-.

- Par ailleurs, les résultats concernant le L709-210 comparés à ceux du CP96345 ou de ses dérivés, amènent à des conclusions intéressantes. De fait, alors que l'histidine 265 n'intervenait pas dans le binding du CP96345, son importance est indéniable dans la liaison du L709-210 -tableau14- (Swain et al., 1995). Il apparaît donc que l'introduction de la substitution en positions 3 et 5 du groupement benzylique confère aux antagonistes une forte sensibilité à la mutation His²⁶⁵Ala, c'est-à-dire la possibilité d'interagir avec cet acide aminé.

On peut donc avancer qu'il peut exister pour des composés très voisins deux modes de liaison différents au récepteur :

- si l'antagoniste possède un benzyle 3,5-disubstitué, l'histidine 265 a une grande influence sur son binding,

- par contre, si son groupement benzylique est 2-monosubstitué voire non substitué, His²⁶⁵ n'interagit pas avec lui ; il est probable qu'alors, un autre acide aminé, non identifié, vienne compenser cette lacune.

tableau 14 : interaction d'antagonistes NK1 avec His¹⁹⁷ et His²⁶⁵ (adapté de Cascieri, 1996)

	IC ₅₀ (nM) et (IC ₅₀ -hNK1 mut- / IC ₅₀ -hNK1-)		
	hNK1	His ¹⁹⁷ Ala	His ²⁶⁵ Ala
SP	0,6	0,6	0,6
CP96345 (a)	0,5	17 (x34)	0,7 (x1)
L709-210	5	700 (x140)	360 (x72)
L733-060	1	17 (x17)	36 (x36)
L732-138	3	31 (x10)	766 (x250)

(a) : valeurs issues de Fong et al., 1994 a

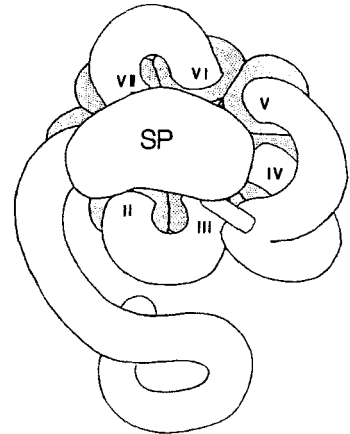
A.2.2. Liaison de la SP aux récepteurs

□ Parallèlement à ces études sur les petites molécules antagonistes, la mise en évidence du site d'interaction de la SP avec le récepteur engendre beaucoup de travaux et les approches envisagées sont également fondées sur la construction de récepteurs chimères ou de mutants ponctuels, mais aussi sur l'utilisation d'analogues photoréactifs de la SP. Certaines études ne sont consacrées qu'aux peptides endogènes mais il est à noter que les travaux sur les antagonistes font également référence aux neuromédiateurs.

□ Il est désormais établi que la SP interagit avec plusieurs épitopes situés sur le fragment N-terminal et sur les boucles extracellulaires de la macromolécule -figure 25- (Fong et al., 1992 a ; Fong et al., 1992 c ; Gether et al., 1993 c ; Li et al., 1995 ; Boyd et al., 1996).

□ Par ailleurs, certains résidus (Asn⁸⁵, Asn⁸⁹, Asn⁹⁶, Tyr⁹² sur l'hélice II et Tyr²⁸⁷ sur l'hélice VII) ont été impliqués dans la liaison de la SP (Huang et al., 1994 a). Mais ces résultats sont à considérer avec prudence. En effet, des études ultérieures mettant en vis-à-vis des expériences de compétition soit avec la SP marquée, soit avec un antagoniste marqué, tendent à montrer que les mutations jouent non pas sur la liaison du peptide mais sur la possibilité qu'a le récepteur d'adopter la conformation bioactive selon le type de ligands en compétition (Rosenkilde et al., 1994).

figure 25 : domaine d'interaction de la SP sur le récepteur NK1



A.2.3. Comparaison des sites de liaison des agonistes et des antagonistes

A.2.3.1. Notion de "compétitivité allostérique"

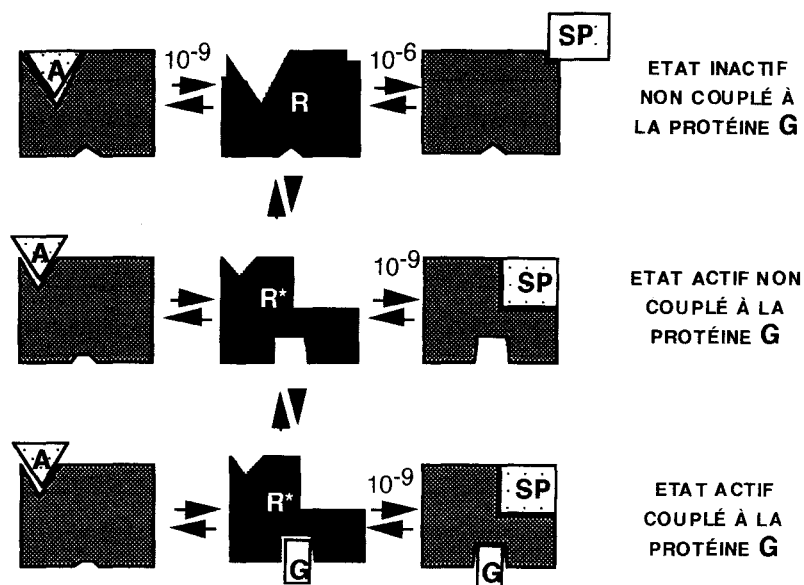
La comparaison des résultats avancés pour le peptide agoniste et les petites molécules antagonistes révèle que ces deux catégories de ligands agissent via des sites de liaison différents. Si un effet d'exclusion (avec un recouvrement partiel des deux domaines) a d'abord été avancé pour expliquer le caractère compétitif des antagonistes (Huang et al., 1994a), un mécanisme de "compétition allostérique" mettant en jeu trois conformations possibles du récepteur apparaît comme une autre interprétation probable, préférée par l'équipe de Gether (1995).

Dans ce modèle -figure 26-, le récepteur nu est considéré comme une structure dynamique qui peut apparaître sous trois états :

- un état inactif non couplé à la protéine G
- un état actif ayant une forte affinité pour la protéine G mais non couplé à la protéine G
- un état actif couplé à la protéine G.

L'agoniste présente une forte affinité pour ces deux dernières formes et stabilisent donc le récepteur dans sa conformation active. Les antagonistes, quant à eux, stabilisent la forme inactive et par là même, déplacent l'équilibre vers l'état de faible affinité pour l'agoniste. Ainsi, agonistes et antagonistes peuvent sélectivement se lier à deux populations complémentaires de récepteurs et la liaison de l'un à son site de haute affinité empêche le binding de l'autre en éliminant son site d'interaction.

figure 26 :
modèle de compétition
allostérique pour la liaison
d'agonistes et d'antagonistes à
leur récepteur
(adapté de Rosenkilde *at al.*,
1994)



Ces conclusions sont appuyées par les résultats de Rosenkilde et collaborateurs (1994) qui notent que l'effet de certaines mutations sur la liaison de la SP est visible si celle-ci est en compétition avec un antagoniste marqué mais pas si l'expérience utilise la forme marquée du peptide. Ceci peut trouver une explication dans le modèle de compétition allostérique mais pas dans le modèle de compétition pour des sites identiques ou qui se recouvrent ; de fait, dans le premier cas, la capacité de la SP à entrer en compétition avec l'antagoniste radioactif dépend de la possibilité qu'a le récepteur de changer de conformation pour adopter la forme active. Certaines mutations empêchent, une fois que l'antagoniste marqué est lié, cette interconversion -figure 27 cas c- ; par contre, si le radioligand est agoniste, la population active du récepteur est stabilisée et l'effet de la mutation, si elle n'est pas directement impliquée dans la liaison de l'agoniste, est invisible .

Malgré ces divergences d'interprétation, le fait que la SP et que les antagonistes non-peptidiques ne partagent pas le même site d'interaction reste établi et nous incitera à une certaine prudence dans la conception d'antagonistes nouveaux, quant à la prise en compte notamment, des informations concernant la SP ou ses analogues.

A.2.3.2. Mutations et mesure de l'affinité

Au vu de ces considérations sur le modèle de compétition allostérique, il est important de s'attarder sur l'effet d'une mutation sur la mesure de l'affinité d'un ligand -figure 27-

Si la mutation envisagée diminue l'affinité du ligand (de l'antagoniste par exemple -figure 27 cas b-) alors, quelle que soit la substance marquée mise en jeu dans l'expérience de compétition, l'équilibre entre les conformations du récepteur sera déplacé vers l'état de forte affinité pour l'agoniste ; la liaison apparente de l'antagoniste sera diminuée alors que celle de l'agoniste restera inchangée.

Par contre, si la mutation empêche un changement conformationnel (par exemple l'isomérisation de la forme inactive vers la forme active -figure 27 cas c-), alors, face à un antagoniste marqué qui va bloquer le récepteur dans son état inactif, l'agoniste paraîtra avoir une faible affinité (celle de l'antagoniste restera inchangée). Dans l'expérience de compétition avec l'agoniste marqué qui stabilise la forme active (forme qui a la possibilité de s'isomériser), les affinités de l'agoniste et des antagonistes demeureront inchangées (l'effet de la mutation est invisible).

figure 27 : effet d'une mutation sur l'affinité apparente d'un agoniste et d'un antagoniste selon le radioligand utilisé, dans le modèle de compétition allostérique

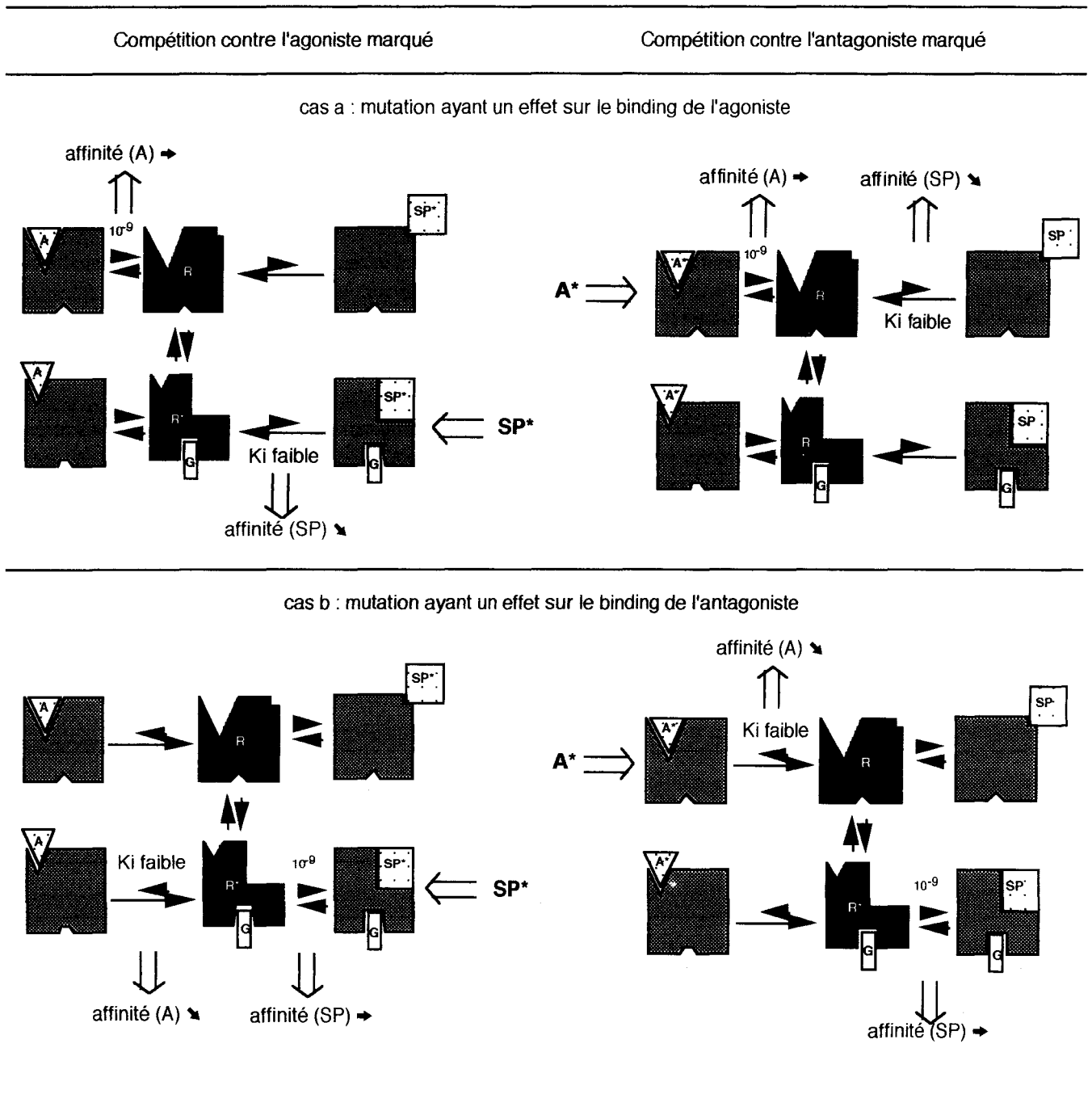
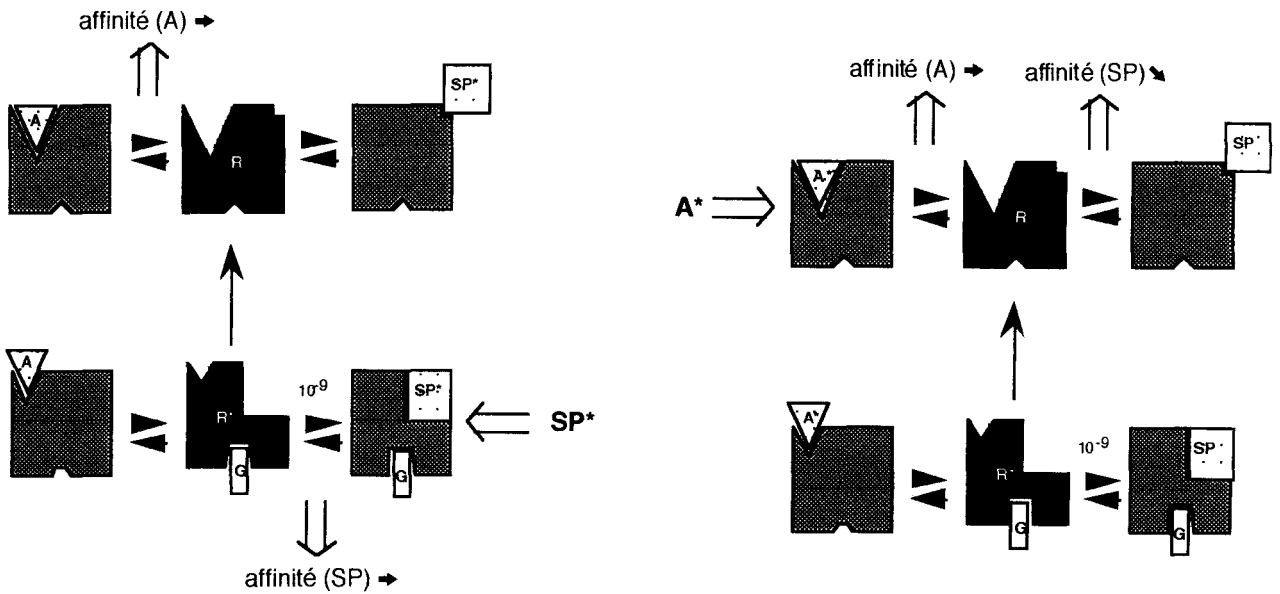


figure 27 -suite- : effet d'une mutation sur l'affinité apparente d'un agoniste et d'un antagoniste selon le radioligand utilisé, dans le modèle de compétition allostérique

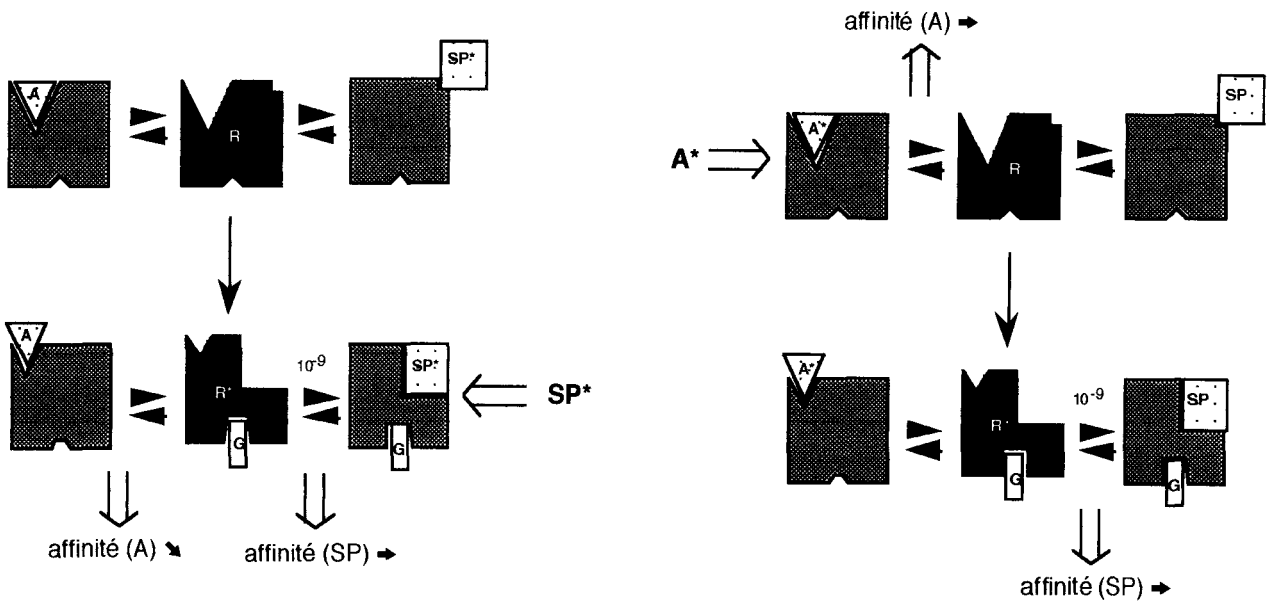
Compétition contre l'agoniste marqué

Compétition contre l'antagoniste marqué

cas c : mutation ayant un effet sur la possibilité d'isomérisation de la forme inactive vers la forme active



cas d : mutation ayant un effet sur la possibilité d'isomérisation de la forme active vers la forme inactive



A : antagoniste ; R : récepteur ; G : protéine G

Remarquons alors que les études mettant en avant l'importance d'un acide aminé dans le binding d'un antagoniste sont à reconsidérer. En effet, si l'expérience ne met en jeu que la SP marquée, il est impossible au vu des résultats (diminution de l'affinité de l'antagoniste sans modification de l'affinité de l'agoniste) de distinguer si la mutation joue directement sur le binding de l'antagoniste ou empêche la transconformation de la forme active vers la forme inactive.

Quoi qu'il en soit, la comparaison des antagonistes entre-eux reste une source sûre d'informations et il est encore possible de conclure à des modes de liaisons différents pour des petites molécules de structures très voisines ne variant que par un groupement benzylique.

A.2.4. Conclusions

Ces travaux de biologie moléculaire, malgré les questions qu'ils soulèvent, nous permettent quelques conclusions à prendre en considération pour la conception d'antagonistes nouveaux des récepteurs NK1 :

- les antagonistes étudiés (CP96345 et L709-210, CP99994 et L733-060, FK888, L732-138) partagent un même site d'interaction sans pour autant établir des interactions identiques avec le récepteur
- ce domaine d'interaction est différent de celui de la SP, agoniste, et apparaît sur une forme du récepteur différente de la forme active liant la SP
- L'histidine 265 sur la V^e hélice transmembranaire a un rôle discriminatoire dans la liaison des antagonistes au récepteur et intervient dans la modification d'interaction observée pour des structures très proches.

B. ELABORATION D'UNE STRATEGIE DE DRUG DESIGN : MISE EN EVIDENCE DE N.C.E. LIGANDS DES RECEPTEURS NK1

La démarche que nous avons choisi d'adopter pour la mise en évidence d'antagonistes nouveaux des récepteurs NK1 s'inspire d'une stratégie générale en Drug Design peptidique et permet de créer des N.C.E., structures clés qu'il conviendra d'optimiser ensuite -figure 28-.

Elle s'articule autour de deux étapes :

- l'identification d'une structure peptidique simple, présentant de l'affinité pour les récepteurs
- sa modification structurale directe suivie de pharmacomodulations afin de mettre en évidence un squelette non peptidique (N.C.E.) reconnaissant les récepteurs.

Notons que la baisse d'affinité souvent occasionnée par le passage du peptide au non peptide peut être le prix à payer pour l'amélioration potentielle du profil pharmacocinétique de la molécule.

B.1. SCHEMA GENERAL DE LA STRATEGIE

Classiquement, une démarche de Drug Design peptidique démarre par l'identification dans le peptide endogène lui-même d'acides aminés responsables de l'affinité. Cette sous-structure est conservée et sert à la mise en évidence d'un lead peptidique antagoniste.

Toutefois, dans le cas des récepteurs NK1, il a été établi que la SP ne partage pas le même site de haute affinité que les antagonistes. Ainsi, même si l'on peut concevoir que l'agoniste, peptide de grande liberté conformationnelle puisse adopter deux formes (une de haute affinité pour le site agoniste qui induit la réponse cellulaire, une de basse affinité pour un site antagoniste) et choisir le rationnel précédemment décrit, nous avons préféré le modifier. Au vu des nombreux résultats déjà établis sur le sujet, dont certains, il faut bien l'avouer ont plutôt complété nos hypothèses sans en servir de base, nous avons choisi de bâtir notre stratégie sans nous fonder directement sur la SP mais en étudiant les antagonistes -figure 28-.

□ Le FK888, antagoniste peptidique puissant des récepteurs NK1, actuellement développé dans le cadre de la maladie asthmatique, apparaît alors comme un modèle synthétique susceptible de représenter un point de départ de la stratégie : il a servi de base pour l'identification d'un lead peptidique original selon une technique, mise en oeuvre dans les laboratoires d'UCB Secteur Pharmaceutique, et qui fait appel à des recherches informatiques dans des banques de données. La structure dipeptidique simple issue de ces recherches reste moins affine que le FK888 pour le récepteur NK1.

□ Par ailleurs, nous nous sommes fondés sur l'hypothèse qu'il peut exister deux classes distinctes d'antagonistes adoptant des modes de liaison différents au récepteur (la première est illustrée par le CP96345, le CP99994, le LY303-680 et le FK888 et la seconde par le L709-210, le L733-060 et le L732-138) ; nous avons pu concevoir un lead peptidique original s'inscrivant dans la seconde classe et permettant de vérifier notre supposition.

Ce résultat nous a conduit ensuite à travailler parallèlement sur les deux types de composés. Nous pouvons envisager des modifications structurales directes puis des pharmacomodulations donnant accès à des NCE originales, pour chacun d'eux.

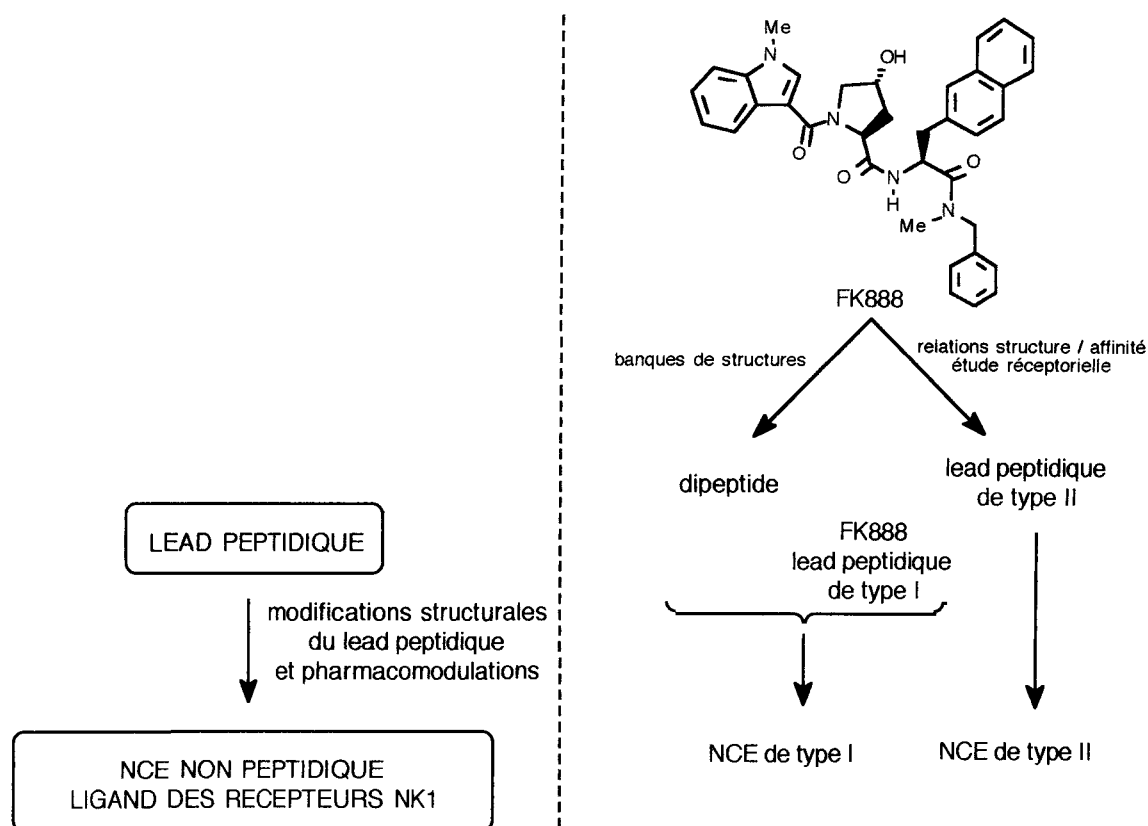


figure 28 : schéma général de la stratégie adoptée pour la mise en évidence de N.C.E. affines pour les récepteurs NK1

□ Afin d'évaluer le potentiel pharmacologique des différents produits que nous avons synthétisés au fur et à mesure du déroulement de la stratégie, des tests de liaison au récepteur ont été développés ; ils utilisent, soit des lignées de cellules humaines IM-9 exprimant le récepteur de la SP, soit des cellules CHO transfectées par le gène humain codant pour la protéine NK1.

B.2. IDENTIFICATION D'UN LEAD PEPTIDIQUE AFFIN POUR LES RECEPTEURS NK1

B.2.1. Identification d'un lead peptidique par recherche dans une banque de structures et optimisation

B.2.1.1. Mise en évidence d'une première structure tripeptidique affine

La première technique que nous avons utilisée fait appel à une approche originale de "Data Base Mining": l'étude des antagonistes FK888, CP96345, L732-138 et GR71251 par analyse conformationnelle comparative a d'abord permis de déduire une conformation probable du FK888 dans son site récepteur et d'émettre une première hypothèse de pharmacophore -figure 29- (Goldstein et al., 1995). Celui-ci a alors servi de base à une recherche de similitudes tridimensionnelles dans des banques de structures internes à la firme UCB, Secteur Pharmaceutique. Ainsi a-t-on pu faire ressortir un premier composé, l'ucb16101 -figure29- qui révèle une affinité modeste pour les récepteurs NK1 ($pK_i = 5,52$).

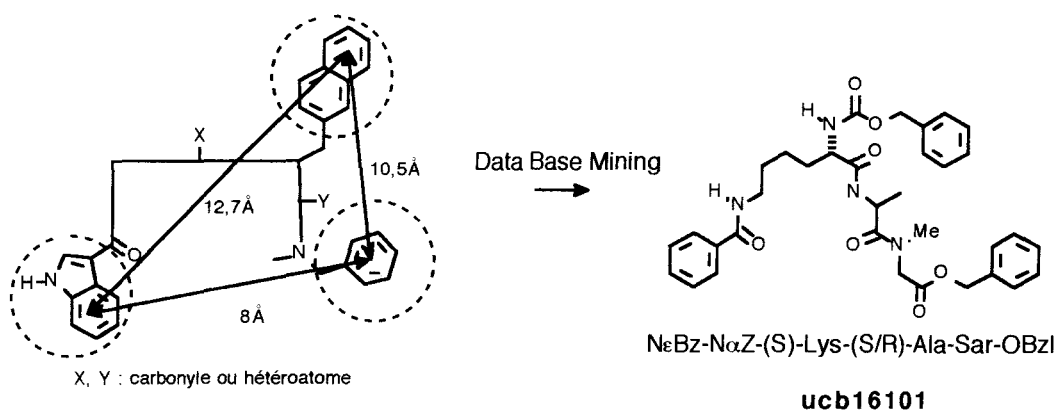


figure 29 : mise en évidence de l'ucb16101

B.2.1.2. Etude et optimisation de l'ucb16101

L'ucb16101 est un tripeptide (Lys-Ala-Sar) protégé à la fois aux extrémités de sa chaîne principale et sur sa chaîne latérale par des groupements aromatiques (qui appartiennent au pharmacophore). Il est répertorié comme un mélange (dans les proportions 1 : 1) de deux diastéréoisomères ($N_{\epsilon}Bz-N_{\alpha}Z-(S)Lys-(S)Ala-Sar-OBzl$ et $N_{\epsilon}Bz-N_{\alpha}Z-(S)Lys-(R)Ala-Sar-OBzl$)

a. Etude de l'influence de la stéréochimie sur l'affinité

La préparation et l'évaluation du potentiel pharmacologique des quatre stéréoisomères du tripeptide, optiquement purs, a d'abord permis de mettre en évidence une énantiosélectivité modeste puisque le dérivé (R,R) présente une affinité supérieure pour le récepteur à celle des autres stéréoisomères

-tableau 15-. La stéréochimie n'est cependant pas un critère crucial pour la sélectivité, ce qui peut probablement être mis sur le compte de la grande flexibilité des chaînes.

tableau 15:

affinité des stéréoisomères du tripeptide
N ϵ Bz-N α Z-Lys-Ala-Sar-OBzl

N ϵ Bz-N α Z-Lys-Ala-Sar-OBzl		
Lys	Ala	IC ₅₀ (μ M) (a)
ucb16101 :		
S	R / S	5,01 \pm 0,26
R	R	1,48 \pm 0,11
R	S	2,60 \pm 0,34
S	S	4,08 \pm 0,38
S	R	3,27 \pm 0,42

(a) : déplacement de la [4,5-³H-Leu¹⁰]SP du récepteur NK1 exprimé dans des cellules IM-9

b. Simplification de la structure tripeptidique

La structure tripeptidique a alors été simplifiée par suppression d'un acide aminé ne supportant pas d'élément du pharmacophore (Ala ou Sar). En effet nous avons pensé pouvoir conserver l'affinité du tripeptide à condition de garder les trois chromophores aromatiques sur une structure voisine de celle de départ (ucb16101). Nous avons donc préparé les différents stéréoisomères des dipeptides Lys-Ala et Lys-Sar correctement fonctionnalisés -figure 30-.

La mesure de l'affinité de ces composés -tableau 16- permet de confirmer l'hypothèse que le raccourcissement de la chaîne n'induit pas de changement de l'affinité ; il est donc possible de simplifier la structure tripeptidique en une structure dipeptidique. Par ailleurs, la légère influence de la stéréochimie peut être, dans le cas des dipeptides préparés, également remarquée.

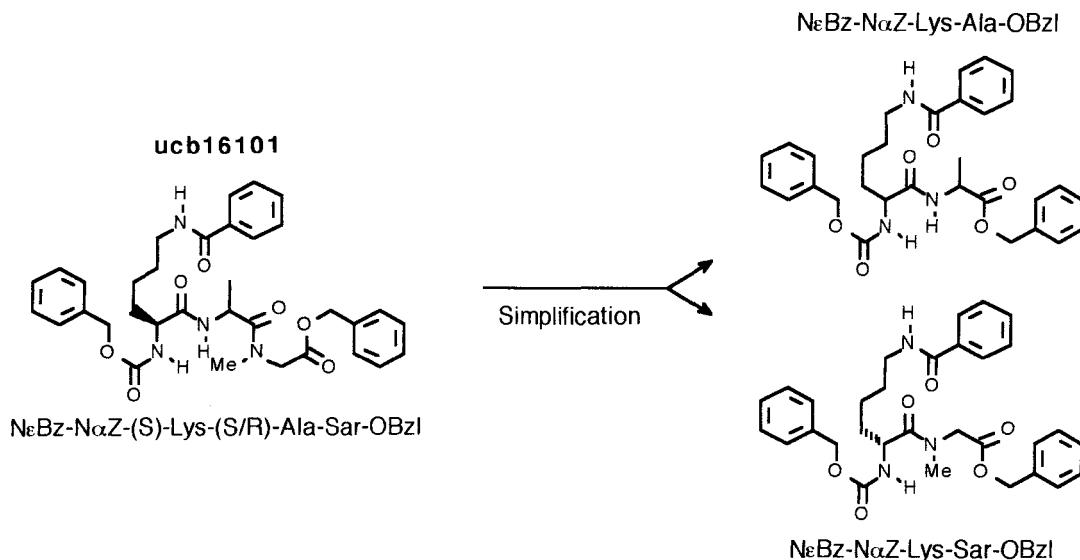


figure 30 : simplification de la structure tripeptidique ucb16101

tableau 16:

affinité des stéréoisomères des dipeptides *N ϵ Bz-N α Z-Lys-Ala-OBzl* et *N ϵ Bz-N α Z-Lys-Sar-OBzl*

NϵBz-NαZ-Lys-Ala-OBzl			NϵBz-NαZ-Lys-Sar-OBzl	
Lys	Ala	IC₅₀ (μM) (a)	Lys	IC₅₀ (μM) (a)
R	R	1,43 ± 0,02		
R	S	5,31 ± 0,08	R	1,19 ± 0,09
S	R	1,87 ± 0,03		
S	S	3,13 ± 0,09	S	2,84 ± 0,04

(a) : déplacement de la [4,5-³H-Leu¹⁰]SP du récepteur NK1 exprimé dans des cellules IM-9

B.2.1.3. Conclusion

Le composé *N ϵ Bz-N α Z-(R)Lys-Sar-OBzl* (pK_i = 6) émerge de cette recherche dans des banques de structures et valide la méthode utilisée ; il peut être considéré comme un premier lead peptidique. Toutefois, son affinité (modeste par rapport à celle du FK888) et le fait qu'il supporte un groupement benzylique non substitué (comme le FK888) doit nous faire garder en mémoire la structure-mère.

B.2.2. Identification d'un lead peptidique représentant une classe d'antagonistes différente de celle du FK888

B.2.2.1. Hypothèse de travail

L'analyse et la comparaison des résultats de relations structure-affinité pour trois paires de petites molécules non peptidiques et de ceux de mutagénèse dirigée, nous ont poussés aux conclusions suivantes :

- il peut exister deux modes de liaisons des antagonistes au récepteur selon qu'ils possèdent une chaîne benzylique monosubstituée en position ortho (voire non-substituée) ou une chaîne benzylique disubstituée en positions méta

- cette discrimination peut être induite par l'histidine 265 du récepteur.

Par ailleurs, les rares études d'interaction avec le récepteur faites pour le FK888 ont révélé qu'il avait un comportement face à l'histidine 265 identique à celui des molécules non peptidiques possédant une chaîne 2-méthoxybenzylamino.

Nous pouvons donc faire l'hypothèse qu'il est possible de concevoir une molécule apparentée au FK888, d'affinité comparable (voire meilleure) à celle du FK888 mais ayant un comportement différent face au récepteur, en lui adjoignant une chaîne 3,5-bistrifluorométhylbenzyloxy.

Le composé **1** répond à ce concept -figure 31- : il possède un squelette N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl](L)-proline(L)-tryptophane mais se distingue essentiellement du FK888 par son extrémité C-terminale. Le remplacement de l'hydroxyproline par la proline ou du naphthalène par l'indole n'ont pas engendré, sur le FK888, de modification d'affinité ; il sera donc possible de mettre en parallèle le dérivé **1** et le FK888.

Le choix de la proline et de l'indole a été préféré simplement pour des raisons d'accessibilité chimique :

- les dérivés du tryptophane sont commerciaux tandis que la 2-naphtylalanine doit être préparée
- par ailleurs, la suppression du groupement hydroxyle permet de s'affranchir d'un centre de chiralité.

L'analyse des relations structure-affinité que l'on pourra entreprendre autour du composé **1** comparée à celle du FK888 nous permettra alors de vérifier notre hypothèse.

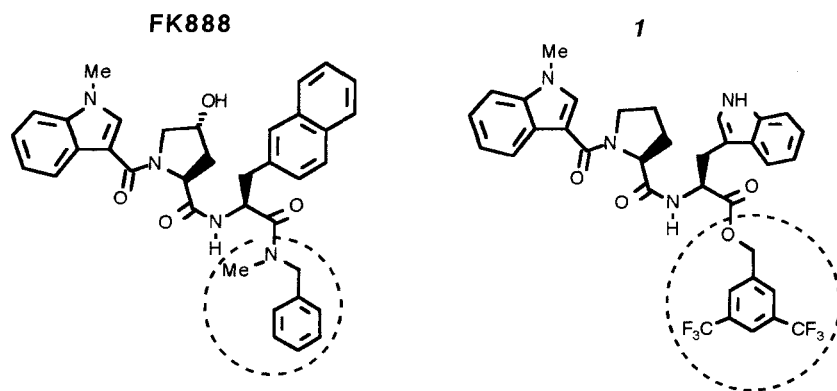


figure 31

B.2.2.2. Mesure de l'affinité du composé **1** pour les récepteurs NK1 humains

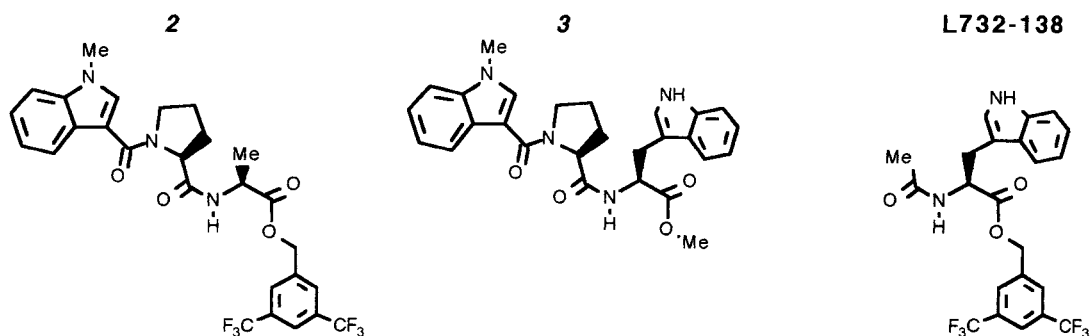
1 a pu être préparé et son potentiel pharmacologique évalué ; il représente une structure très affine pour les récepteurs NK1 avec un pKi de 8,8 mesuré sur des cellules CHO -tableau 17-. Son pouvoir d'inhibition de la liaison de la SP à son récepteur est donc identique à celui du FK888 et nous pouvons d'ores et déjà considérer le dipeptide comme un lead peptidique.

B.2.2.3. Relations structure-affinité pour le composé **1**

a. Importance relative des noyaux aromatiques dans la liaison de **1** au récepteur

Afin d'évaluer l'importance de chacun des aromatiques dans la liaison du composé **1**, nous avons envisagé de préparer des dipeptides dans lesquels chaque cycle est successivement supprimé -figure 32- :

- les dérivés **2** dans lequel le cycle indolique de la chaîne latérale a été omis et **3** dans lequel l'ester benzylique est remplacé par un ester méthylique ont été programmés dans cette optique
- par ailleurs, le L732-138 représente le composé dans lequel manque le N-méthylindole N-terminal.

figure 32 : modulations du composé **1**

La mesure de l'affinité de ces différentes molécules -tableau 17- révèle que la suppression de l'indole latéral ou du benzyle C-terminal induit une chute (d'un facteur 660 pour **2**) voire la quasi annulation (pour **3**) de la liaison au récepteur ; par contre, le L732-138 a une affinité comparable à celle de **1**.

Nous pouvons donc conclure que seuls deux noyaux aromatiques du composé **1** ont un rôle pour la liaison du peptide au récepteur : l'indole de la chaîne latérale et le benzyle substitué en positions 3 et 5. Le fait que ces groupements agissent via leur caractère aromatique n'a pas été montré, ni sur **1**, ni sur le L732-138 (si l'on se réfère aux relations structure-affinité établies pour ce produit).

tableau 17:
influence des noyaux aromatiques dans la
liaison du composé **1**

composé	IC ₅₀ (nM)
1	3,3 ± 0,4 (a)
2	2180 ± 220 (b)
3	(c)
L732-138	1,6 ± 0,7 (d)

(a) : déplacement de la [4,5-³H-Leu¹⁰]SP du récepteur NK1 exprimé dans des cellules CHO ;
(b) : déplacement de la [4,5-³H-Leu¹⁰]SP du récepteur NK1 exprimé dans des cellules IM-9 ;
(c) pas d'inhibition à 10⁻⁶M ; (d) McLeod et al, 1994 : déplacement de la [¹²⁵I]-SP du récepteur NK1 exprimé dans des cellules CHO

b. Importance de la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline dans la liaison du composé **1**

La comparaison de l'affinité du composé **1**, du L732-138 et de son analogue non acylé -tableau 18- révèle que, sur la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline qui existe dans le dérivé **1**, seul le groupement carbonyl C-terminal intervient dans la liaison au récepteur. On peut cependant souligner que, même si elle semble ne pas agir sur le binding, cette chaîne ne le modifie pas et n'introduit pas d'interactions (stérique, électronique,...) défavorables.

B.2.2.4. Comparaison du FK888 et du composé **1**

La mise en parallèle des résultats prouvés pour le FK888 et pour le **1**, deux structures qui se distinguent essentiellement par leur chaîne carboxy-terminale (N-méthyl-N-benzylamino ou 3,5-bistrifluorométhylbenzyloxy) révèle deux différences importantes de comportement face au récepteur :

- alors qu'une fonction ester C-terminale (à la place d'une amide tertiaire) induit une chute d'affinité pour le FK888 (ou un précurseur), elle n'altère pas la bonne reconnaissance du récepteur quand le benzyle est disubstitué en positions méta

- la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline ne paraît pas intervenir dans la liaison de **1** alors qu'elle est cruciale dans celle du FK888.

tableau 18 : influence des noyaux aromatiques dans la liaison du composé **1**

N° ligne	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (nM)
1	H	3,5-Me ₂	1533 ± 462 (a)
2	Me	3,5-Me ₂	67 ± 10 (a)
3	Me	3,5-(CF ₃) ₂	1,6 ± 0,7 (a)
4	<div style="text-align: center;"> </div>	3,5-(CF ₃) ₂	3,3 ± 0,4 (b)

(a) McLeod et al, 1994 : déplacement de la [¹²⁵I]-SP du récepteur NK1 exprimé dans des cellules CHO ; (b) : déplacement de la [4,5-³H-Leu¹⁰]SP du récepteur NK1 exprimé dans des cellules CHO

B.2.2.5. Conclusion : mise en évidence de deux classes d'antagonistes se développant sur la base de deux pharmacophores distincts

En modifiant la chaîne benzylique C-terminale, il nous a été possible de concevoir une molécule qui s'apparente au FK888 mais qui se distingue de ce pseudopeptide affiné connu par son mode de liaison au récepteur.

Par ailleurs, la vérification de notre hypothèse confirme le fait que, même s'ils possèdent une structure voisine, des antagonistes se différenciant par un groupement benzylique 3,5-disubstitué ou 2-monosubstitué, voire non substitué, appartiennent à des classes qu'il convient de distinguer et agissent selon des modèles de liaison différents :

- pour les antagonistes possédant une chaîne benzylaminée monosubstituée par un méthoxy (voire non substituée), on peut avancer un premier mode de binding se faisant via
 - i. l'intervention de deux aromatiques, nécessaire mais non suffisante
 - ii. l'intervention essentielle d'un hétéroatome.

Notons que, si le FK888 qui possède trois aromatiques appartient à cette classe, il est difficile de définir clairement le rôle joué par chacun des aromatiques

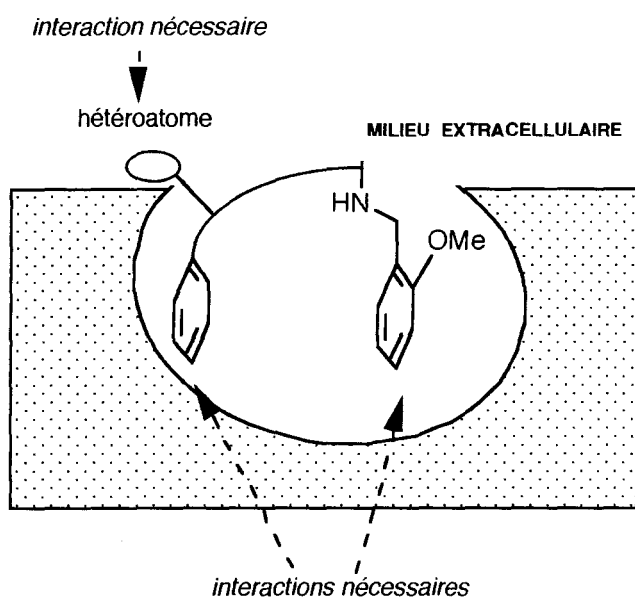
- pour les antagonistes possédant une chaîne 3,5-bistrifluorométhylbenzyloxy, la liaison au récepteur pourrait faire intervenir deux aromatiques de manière nécessaire et suffisante à condition que la molécule possède un groupement polaire susceptible d'induire le bon positionnement des noyaux.

Pour le dérivé **1**, qui possède également trois aromatiques, le rôle des différents noyaux est clairement établi et le composé s'inscrit parfaitement dans ce modèle.

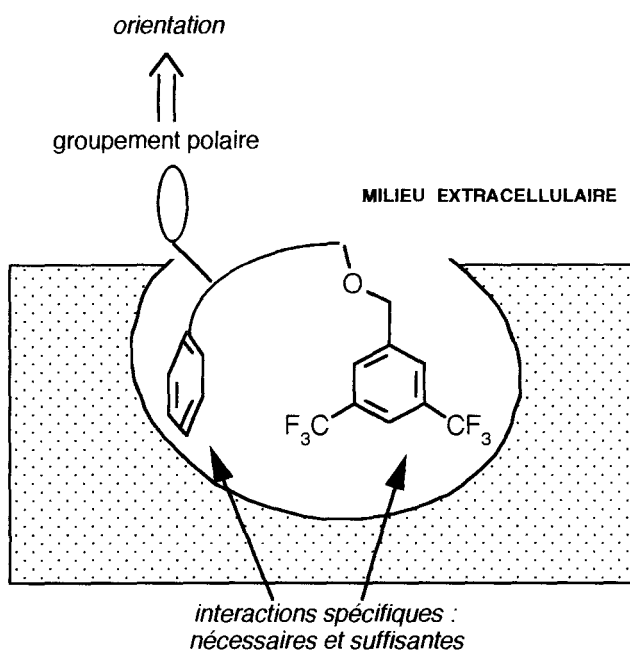
Ces deux classes d'antagonistes se développent donc autour de deux pharmacophores différents dont nous avons déjà pu supposer l'existence -figure 33- :

- le pharmacophore de type I pour la première classe d'antagonistes
- le pharmacophore de type II pour la seconde classe.

Si deux groupements aromatiques interviennent dans les deux, ceux-ci ne doivent adopter des positions relatives similaires au niveau du récepteur et développer des interactions différentes avec lui. Par ailleurs, alors qu'un hétéroatome semble crucial pour le premier type d'antagonistes, il ne paraît intervenir que dans l'orientation de la molécule pour la deuxième classe.



pharmacophore de type I



pharmacophore de type II

figure 33 : représentation schématique des deux types de pharmacophores dans le site récepteur

B.3. LE FK888 ET LE DIPEPTIDE **1**, DEUX LEADS PEPTIDIQUES A ANALYSER PARALLELEMENT : MODIFICATIONS STRUCTURALES ET PHARMACOMODULATIONS

Les résultats énoncés précédemment démontrant l'existence de deux pharmacophores nous poussent à développer la suite de notre stratégie en considérant deux leads peptidiques, chacun illustrant une classe d'antagonistes.

En ce qui concerne la première catégorie, le FK888 a été pris comme exemple-type et préféré au dipeptide N ϵ Bz-N α Z-(R)Lys-Sar-OBzl que nous avons mis en évidence car son affinité est supérieure ; par ailleurs, il peut être directement comparé au composé **1** qui sert de base à la deuxième classe.

Des modifications structurales suivies de pharmacomodulations seront donc envisagées sur les deux dipeptides analogues ; grâce à elles, nous essaierons de mettre en évidence des N.C.E. illustrant chaque pharmacophore mais nous pouvons envisager de mieux comprendre la liaison du FK888 au récepteur.

B.3.1. Modification structurale du FK888 : recherche d'un squelette adapté au pharmacophore de type I

B.3.1.1. Hypothèse de travail

Les résultats quant au rôle joué par chacun des groupements aromatiques du FK888 restent, nous l'avons dit, flous et il est dangereux de superposer de manière univoque le pharmacophore (type I) et le pseudo-peptide. En effet, trois possibilités s'offrent à nous pour le choix des aromatiques inclus dans le pharmacophore :

- cycle N-méthylindole (cycle A) et cycle naphthalène (cycle B)
- cycle N-méthylindole (cycle A) et cycle benzyle (cycle C)
- cycle naphthalène (cycle A) et cycle benzyle (cycle C).

-figure 34-

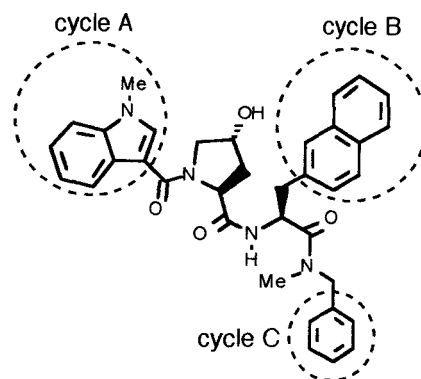


figure 34 : FK888

La première configuration est certes séduisante puisque des études de modélisation (Goldstein et al., 1995) ainsi que des travaux réalisés sur des analogues du FK888 (Sisto et al., 1995) font état de la possibilité de stacking entre les deux groupements cités, stacking que l'on pourrait retrouver dans des molécules telles que le CP96345. Toutefois, elle ne prend pas en compte le fait qu'il y ait, sur le FK888,

un N-méthyl-N-benzyle ; or, d'après l'étude des relations structure-affinité, ce groupement ne peut être remplacé par son bioisostère O-benzyle. Nous n'avons donc pas retenu cette hypothèse.

La prise en compte des résultats trouvés pour le composé **1** dans lequel les cycles B et C correspondants -figure 35- sont cruciaux, nous poussent alors à opter pour la troisième hypothèse afin d'envisager des modifications structurales.

Il faut toutefois rester conscient de deux limitations à ce choix :

- le FK888 et le dérivé **1** ne font pas forcément intervenir les mêmes aromatiques dans leur pharmacophore respectif
- dans le FK888, le caractère aromatique du naphthalène ne semble pas avoir un rôle prépondérant.

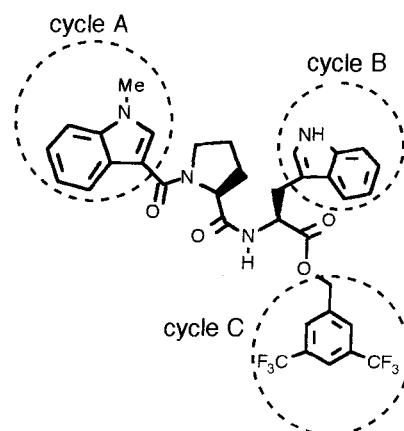


figure 35 : composé **1**

B.3.1.2. Recherche d'un squelette adapté au pharmacophore de type I par liaison des pharmaco- du FK888

a. Conception du squelette

Partant de l'hypothèse que les cycles B et C du FK888 (ou de son analogue) sont des pharmacogroupements (*i.e.* des groupements appartenant au pharmacophore) de type I, nous avons envisagé de les relier et de supprimer ainsi l'enchaînement peptidique -figure 36-. Le dérivé **4** a été préparé dans cette optique.

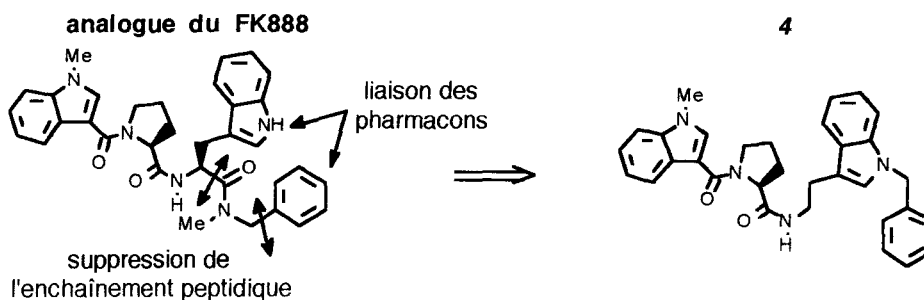


figure 36 : élaboration d'un squelette adapté au pharmacophore de type I par liaisons des pharmaco-

b. Evaluation du potentiel pharmacologique du dérivé **4** et interprétation

L'affinité du dérivé **4** est caractérisée par un pKi de 5,8 mesuré sur des cellules CHO -tableau 19-. La liaison, modeste de ce composé peut être attribuée au fait que les éléments du pharmacophore sont mal positionnés l'un par rapport à l'autre et n'induisent pas une liaison optimale au récepteur.

c. Vérification de l'hypothèse de travail

Si le dérivé **4** a été conçu dans l'hypothèse où les pharmacocons du FK888 sont les cycles B et C, il possède néanmoins les trois aromatiques du pseudopeptide. Nous avons donc envisagé de mesurer l'importance de la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline et de vérifier son éventuelle intervention dans le pharmacophore en préparant le composé **5** dans lequel on ne retrouve que deux cycles aromatiques et une chaîne aminoéthyle.

La suppression du groupement N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline n'induit pas de modification notable de l'affinité -tableau 19- ce qui conforte notre hypothèse de travail : dans le FK888, les cycles naphthalène et benzylique s'inscrivent dans le pharmacophore et la chaîne N-terminale supporte un hétéroatome indispensable à la reconnaissance du récepteur.

d. Pharmacomodulations autour du squelette 1-benzyl-3-(2-aminoéthyl)indole

Le squelette 1-benzyl-3-(2-aminoéthyl)indole apparaît donc comme une nouvelle structure modestement affine pour les récepteurs NK1 de la SP. Afin d'évaluer l'importance relative de chacun des groupes de ce squelette, plusieurs modifications ont été envisagées :

- modification de la chaîne aminoéthyle permettant l'évaluation du rôle de l'atome d'azote pour la liaison au récepteur
- modification des pharmacocons (suppression, encombrement, changement d'hybridation,...).

i. Modification de la chaîne aminoéthyle

Dans le pharmacophore de type I était apparue la présence d'un hétéroatome que l'on retrouve, selon notre hypothèse, sur le cycle tétrahydropyridine du composé **5** ; le caractère de celui-ci a donc été modifié : le remplacement de l'amine tertiaire par un amide aromatique (dérivé **6**) ou un amine secondaire (dérivé **7**) n'induit pas de modification importante de l'affinité -tableau 19-. Ceci conforte le fait que, dans le pharmacophore de type I, un hétéroatome est important pour le binding de la molécule mais la façon dont il intervient n'est pas clairement définie.

ii. Modification des pharmacocons

Le changement d'hybridation du chaînon méthylénique du groupement benzylique, qui induit une modification de l'arrangement relatif des deux pharmacogroupements hypothétiques, provoque une diminution de l'affinité (dérivé **8**) -tableau 19-. Par ailleurs, la suppression du groupement N-benzyle sur les dérivés **6** et **7** induit également l'annulation de la reconnaissance du récepteur -tableau 19, composés **9** et **10**. L'intervention du N-benzyle est ainsi confirmée.

L'implication dans le pharmacophore du noyau benzénique de l'indole a été réévaluée sur les composés **6** et **7** par encombrement de la position 5 du cycle -tableau 19, composés **12** à **16**-. Il a pu être montré que la substitution du cycle par un méthoxy ou un benzyloxy provoquait la chute de l'affinité : le volume

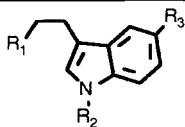
disponible au niveau du récepteur apparaît donc restreint. Notons que ceci rejoint les remarques faites par Kersey et ses collaborateurs (1995) sur l'impossibilité d'encombrer le noyau phényle du CP99994.

e. Conclusion

-La liaison des pharmacocons du FK888 donnant accès à un squelette 1-benzyl-3-(2-aminoéthyl)indole révèle une première N.C.E. adaptée au pharmacophore de type I (dérivé **7**), modestement affine pour les récepteurs NK1.

- Par ailleurs, les pharmacomodulations réalisées autour de cette structure permettent de clarifier le rôle des différents groupements du FK888 dans le pharmacophore de type I : les cycles naphthalène et benzylique représentent deux pharmacocons ; quant à la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline, elle contient l'hétéroatome présent dans le pharmacophore et dont l'intervention n'est pas encore éclaircie, ou un groupement qui le compense.

tableau 19 : affinité des structures à squelette 1-benzyl-3-(2-aminoéthyl)indole



Composé	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM)	n _H	pK _i (a)
4			H	3,45 ± 0,27 (b)	1,4	5,8
5			"	5,19 ± 0,67 (c)	1,0	5,6
6			"	4,12 ± 0,53 (c)	1,7	
7		"	"	1,58 ± 0,02 (c)	1,0	6
8			"	(d)		
9		Me	"	(d)		
10		"	"	(d)		
11			OMe	(d)		
12	"	Me	"	(d)		
13	"			(d)		
14	"	Me	"	(d)		
15			OMe	(d)		
16	"	Me	"	(d)		

(a) calculé si le coefficient de Hill est inférieur à 1,5 ; (b) : déplacement de la [4,5-³H-Leu¹⁰]SP du récepteur NK1 exprimé dans des cellules CHO ; (c) : déplacement de la [4,5-³H-Leu¹⁰]SP du récepteur NK1 exprimé dans des cellules IM-9 ; (d) pas d'inhibition à 10⁻⁶M

B.3.1.3. Analyse de molécules hybrides

a. Conception d'une molécule hybride FK888-CP99994

Parallèlement à ces recherches de N.C.E. originales, nous avons essayé d'analyser s'il était possible de créer des molécules hybrides reprenant des éléments de plusieurs antagonistes (peptidiques et non peptidiques) du même type. La préparation de molécules hybrides affines pour les récepteurs NK1 permettrait en effet de clarifier le rôle des divers groupements des antagonistes et de mieux les situer par rapport au pharmacophore. La molécule **17**, hybride FK888-CP99994 -figure 37- a été conçue dans cette optique. Nous avons pris en considération :

- notre hypothèse selon laquelle les cycles B et C du FK888 appartiennent au pharmacophore de type I ; l'acide aminé C-terminal du pseudo-peptide peut donc être remplacé par le CP99994 qui contient tous les pharmacons nécessaires à une bonne reconnaissance du récepteur

- la remarque selon laquelle la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline du FK888 contient l'hétéroatome présent dans le pharmacophore de type I ou un groupement qui le compense.

Il faut cependant rester conscient du fait qu'il a été établi la moindre affinité pour le composé n°9 -tableau 4-, CP99994 alkylé sur l'atome d'azote intracyclique par un groupement carboxamidométhyle. Si cette chaîne influe défavorablement de par son encombrement, la préparation de **17** est vouée à l'échec; si elle intervient en induisant diminution une du caractère basique de l'azote, nous espérons pouvoir compenser ce manque grâce à la chaîne du FK888.

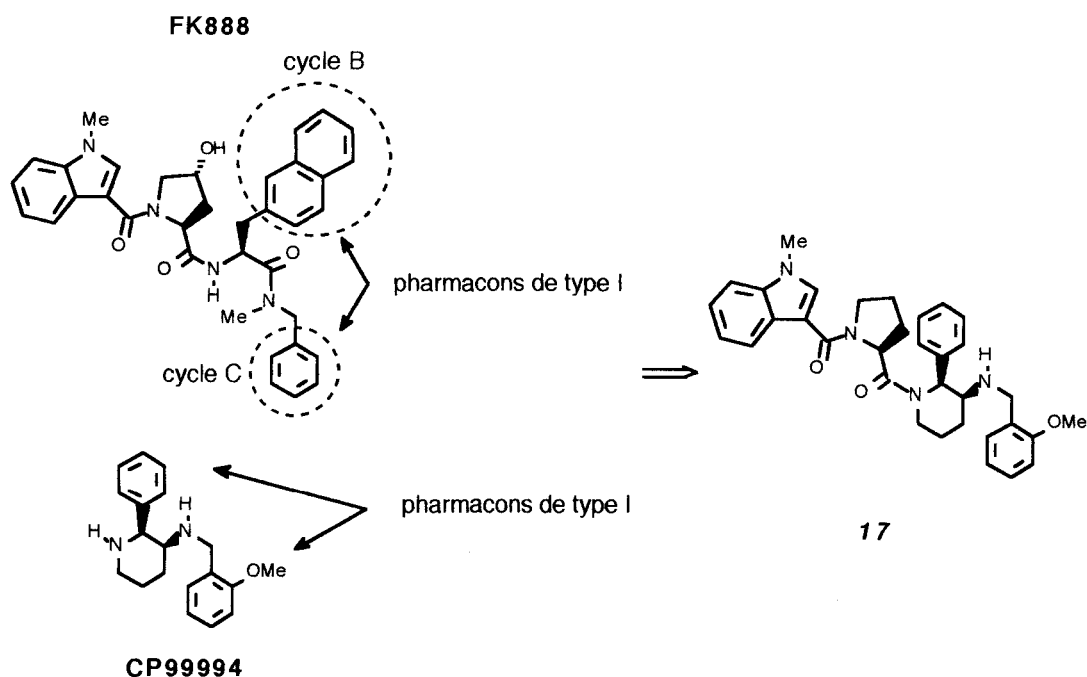


figure 37 : élaboration d'une molécule hybride (**17**)

b. Evaluation du potentiel pharmacologique de 17 et interprétation

Une synthèse non stéréospécifique du composé **17** a été réalisée et la méthode utilisée ne nous permet pas de conclure si le composé testé est optiquement pur ((S)Pro-(2S,3S)pipéridine ou (S)Pro-(2R,3R)pipéridine) ou s'il se présente sous forme d'un mélange de diastéréoisomères ((S)Pro-(2S,3S)pipéridine et (S)Pro-(2R,3R)pipéridine). Son affinité a tout de même été évaluée et caractérisée par un pKi de 6,9 -tableau 20-.

tableau 20: affinité du CP99994 et du composé **17**

Composé	IC ₅₀ (nM) (a)	n _H	pKi
(±)-CP99994	0,94 ± 0,04	1,1	9,5
17	520 ± 0,07	1,1	6,9

(b) : déplacement de la [4,5-³H-Leu¹⁰]SP du récepteur NK1 exprimé dans des cellules CHO

Au vu de ce résultat, plusieurs conclusions peuvent être tirées :

- **17** possède une affinité modeste pour les récepteurs NK1 ; il est donc peu probable qu'il se présente sous la forme (S)Pro-(2R,3R)pipéridine pure (rappelons que le composé (2R,3R)-CP99994 ne reconnaît pas le récepteur NK1)

- acyler l'atome d'azote intracyclique du CP99994 par la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline fait chuter l'affinité d'un facteur 250 ; il est donc impossible d'encombrer cet hétéroatome sans induire une perte de reconnaissance.

Notons qu'il reste difficile de conclure quant à la cause de diminution de l'affinité ; elle peut être due à la chaîne elle-même qui empêche le placement optimal des pharmacocons du CP99994 ou au fait que l'on perd le caractère basique de l'atome d'azote sans que la chaîne du FK888 ne puisse procurer une interaction compensatoire valable.

c. Conclusion

La préparation de cette molécule hybride ne nous permet donc pas de clarifier la façon dont intervient l'hétéroatome dans le pharmacophore ni de compléter les conclusions concernant le FK888, tirées suite à l'étude des molécules à squelette 1-benzyl-3-(2-aminoéthyl)indole.

B.3.2. Modification structurale directe du composé **1** : recherche d'un squelette adapté au pharmacophore de type II

B.3.2.1. Hypothèse de travail

L'intervention des différents groupements du composé **1** dans le pharmacophore de type II est plus claire que dans le cas du premier type d'antagonistes. Rappelons :

- les cycles B et C de **1** -figure 35 - représentent des pharmacons nécessaires et suffisants pour la bonne reconnaissance du récepteur

- la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline semble intervenir simplement via la liaison amide Pro-Trp et n'induit pas d'interaction (stérique, électronique,...) défavorable.

C'est donc dans ce cadre que nous avons pu envisager des modifications structurales du dérivé **1**.

B.3.2.2. Recherche d'un squelette adapté au pharmacophore de type II par rigidification de la chaîne principale sur la chaîne principale du composé **1**

a. Conception du squelette

La première modulation que nous avons envisagée sur le composé **1** consiste à contraindre la molécule via une cyclisation de la chaîne principale sur la chaîne principale pour former des 1-[3,5-(bistrifluorométhyl)]benzyl-2-oxo-3-benzyl-4-acyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines (composé **18**). Notons que le cycle indole a été remplacé par un cycle benzénique simplement pour des raisons d'accessibilité chimique -figure 38-.

Cette rigidification sous-entend que, dans la molécule non-peptidique, les pharmacons sont représentés par le benzyle latéral (cycle B'₁) et le benzyle substitué, alkylant l'atome d'azote N1 (cycle C').

Il faut cependant rester conscient du fait que l'adjonction d'un autre cycle aromatique (via le noyau tétrahydroquinoxaline -cycle B'₂-) peut venir contredire cette hypothèse ; en effet, une "compétition" entre les cycles B'₁ et B'₂ pour devenir éléments du pharmacophore n'est pas exclue.

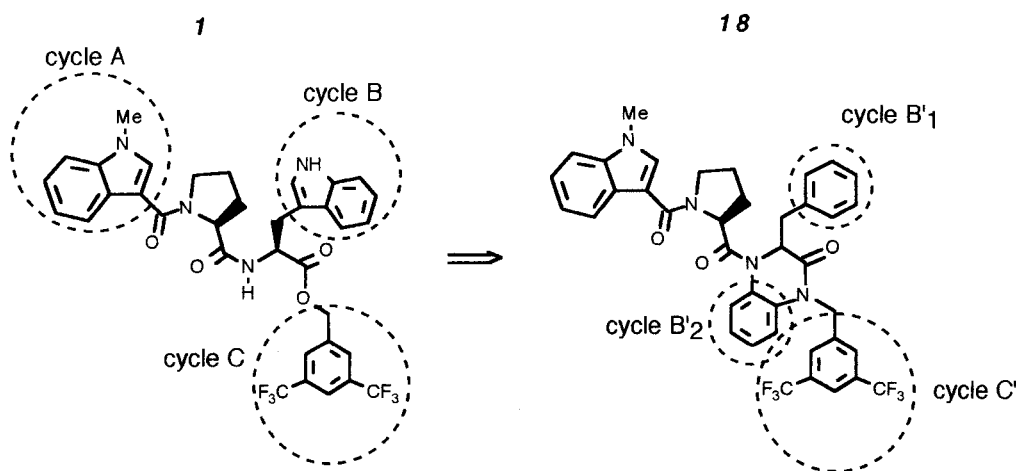


figure 38 :
rigidification
du composé **1**

b. Evaluation du potentiel pharmacologique du composé **18** et interprétation

Le composé **18** a été testé dans des expériences de déplacement de la SP tritiée et ne présente aucune capacité de reconnaissance du récepteur (pas de déplacement de la [4,5-³H-Leu¹⁰]SP du récepteur NK1 exprimé dans des cellules IM-9 à 10⁻⁶M).

Plusieurs interprétations peuvent être données à ce résultat :

- les pharmacocons représentés dans **18** soit par le couple cycle B'₁ / cycle C', soit par le couple cycle B'₂ / cycle C' sont mal positionnés et ne donnent pas accès au pharmacophore
- les cycles B'₁ ou B'₂ représentent des gênes stériques et empêchent le bon positionnement du pharmacophore dans le site récepteur.

c. Conclusion

Quelle que soit l'interprétation, le squelette 1-[3,5-(bistrifluorométhyl)benzyl]-2-oxo-3-benzyl-4-acyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline ne permet donc pas d'atteindre, comme escompté, le pharmacophore de type II, mais la raison de ce résultat demande encore à être éclaircie.

B.3.3. Etude de 1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines N-benzylées

B.3.3.1. Les 1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines N-benzylées et le pharmacophore de type II

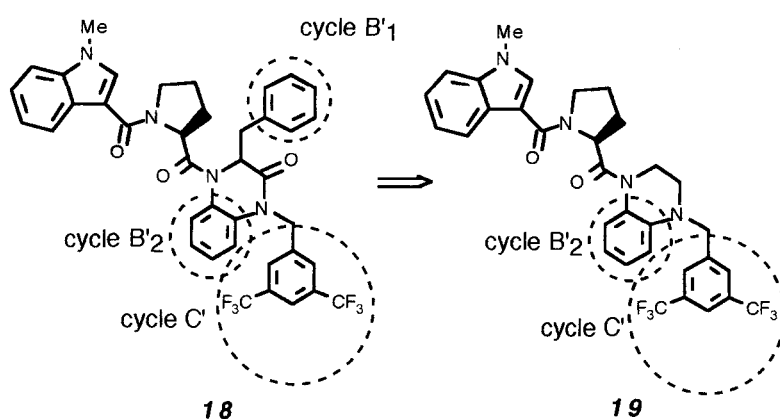
a. Conception du squelette

Nous avons voulu vérifier si la mauvaise affinité du composé **18** était due au fait

- que le pharmacophore de type II n'était pas présent dans la structure (mauvais positionnement relatif des pharmacocons)
- que, bien que représenté dans la molécule, il ne pouvait pas se positionner correctement dans le site récepteur.

La molécule **19** dans laquelle le benzyle latéral (cycle B'₁) a été supprimé a été conçue dans cette optique -figure 39-.

figure 39 :
élaboration de 1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines
comme N.C.E. pour le
pharmacophore de type II



b. Resultats pharmacologiques et conclusion

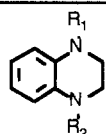
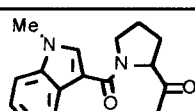
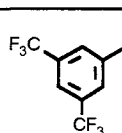
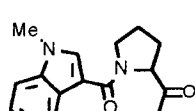
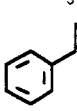
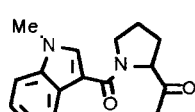
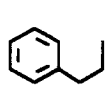
Les études de l'affinité des composés **19** -tableau 21- révèle que l'omission du benzyle latéral (cycle B₁) de la molécule **18** n'entraîne aucune amélioration du potentiel de liaison ce qui nous permet de conclure que le squelette 1-[3,5-(bistrifluorométhyl)]benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline est mal adapté au pharmacophore de type II du fait d'un mauvais positionnement des pharmacons représentés ici par les cycles B₂ et C'.

B.3.3.2. Les 1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines N-benzylées et le pharmacophore de type I

a. Passage du pharmacophore de type II au pharmacophore de type I

Conscients du fait que le noyau 1-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline est mal adapté au pharmacophore de type II, nous avons voulu évaluer sa potentialité à s'inscrire dans le pharmacophore de type I. La mesure de l'affinité du dérivé **20** que nous avons préparé dans cet objectif indique une légère amélioration de la reconnaissance -tableau 21-(notons que la faible affinité des composés et les variations minimales constatées ne permettent que des conclusions prudentes).

tableau 21: affinité des structures à squelette 1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline

					
Composé	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (μM) ^(a)	n _H	pKi ^(b)
19			(c)		
20			(d)		
21			(d)		
22	reporté en annexe confidentielle (l)		(c)		
23	"	"	2,06 ± 0,27	1,1	5,9
24	"	"	(c)		
25	"	"	2,6 ± 0,34	2,2	

(a) : déplacement de la [4,5-³H-Leu¹⁰]SP du récepteur NK1 exprimé dans des cellules IM-9 ;
 (b) calculé si le coefficient de Hill est inférieur à 1,5 ; (c) inhibition inférieure à 20% à 10⁻⁶M ;
 (d) inhibition comprise entre 20% et 50% à 10⁻⁶M

b. Optimisation du noyau 1-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline, modeste représentant du pharmacophore de type I -complété dans l'annexe I-

Plusieurs pharmacomodulations ont été envisagées à partir du composé **18** et ont permis d'optimiser le noyau 1-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline (composés **22** à **25** -tableau 21-). Les structures élaborées ont un caractère confidentiel et sont reportées dans l'annexe I. Au vu des résultats, nous pouvons néanmoins avancer que, même s'il est mieux adapté au type I, le noyau 1-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline ne reste qu'un modeste support pour ce pharmacophore.

B.3.3.3. Conclusion

L'étude de 1-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines nous a donc permis de mettre en évidence un nouveau type de squelette modestement affiné pour les récepteurs NK1 et capable de s'inscrire dans le pharmacophore de type I mais pas dans le pharmacophore de type II.

B.3.4. Etude du noyau pipérazine -complété dans l'annexe II-

Au vu de la nouvelle structure de type I (dérivé **23**) mise en évidence, la suite des travaux s'est orientée vers l'étude de composés possédant un noyau pipérazine. Là encore, les dérivés préparés restent propriété industrielle et sont reportés dans l'annexe II. Certains se distinguent comme N.C.E. de type I ligands modestes des protéines NK1 ($pK_i = 6,5$) et les pharmacomodulations réalisées révèlent de nouveaux exemples de différences de comportement face au récepteur.

B.3.5. Autre modification structurale du dérivé 1 : mise en évidence de N.C.E. pour le pharmacophore de type II

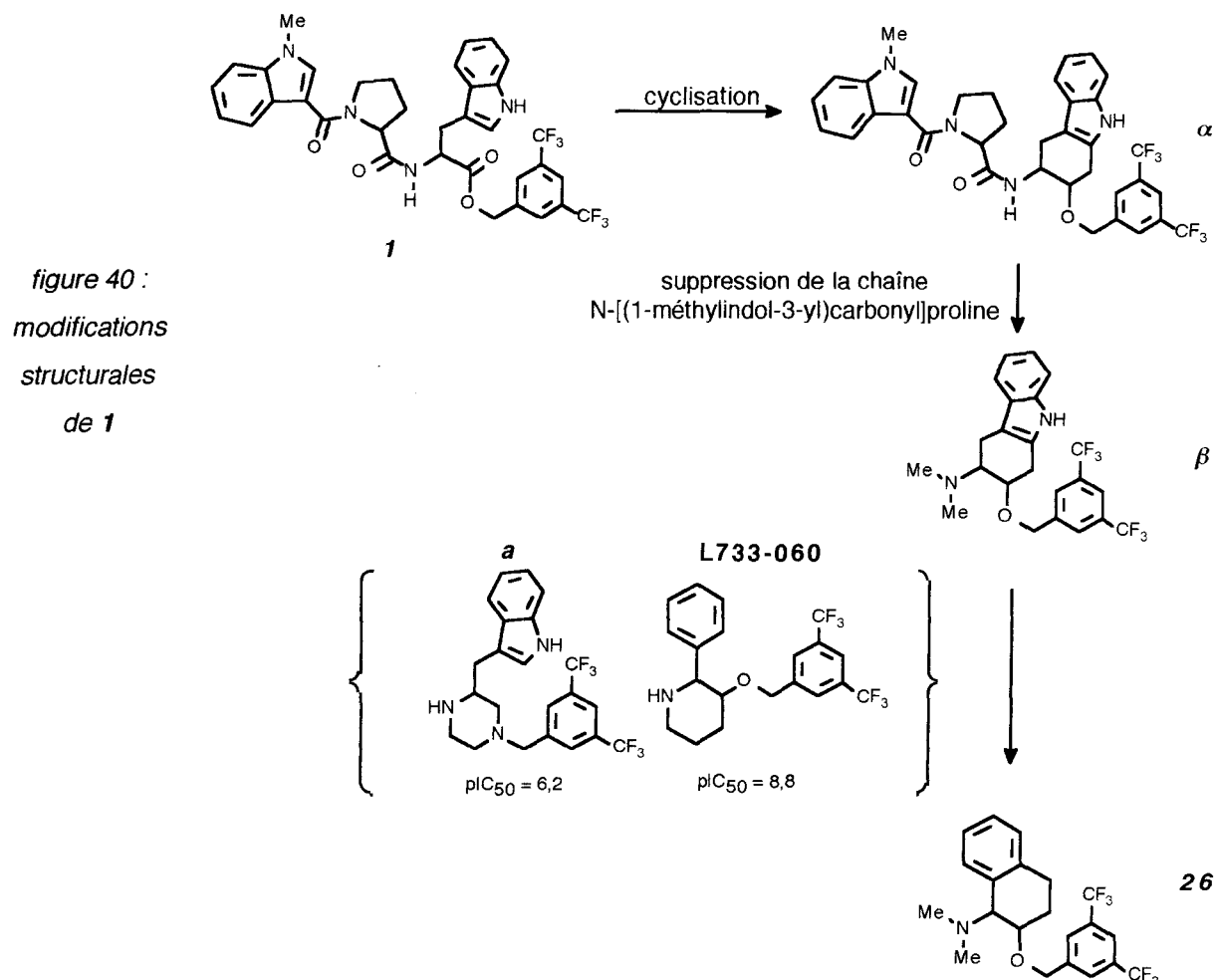
B.3.5.1. Conception du squelette

Se fondant toujours sur les mêmes hypothèses quant au rôle des aromatiques du composé **1** dans le pharmacophore, nous avons encore cherché à contraindre le squelette peptidique -figure 40-.

- Dans cette optique, nous avons considéré une cyclisation de la chaîne latérale sur la chaîne principale (composé α).

- Par ailleurs, conscients du fait que dans le dérivé **1**, la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline n'intervient pas de manière prépondérante pour la liaison au récepteur, nous avons choisi de préparer des composés moins encombrés au niveau de l'atome d'azote N-terminal (composé β).

- Enfin, considérant l'affinité modeste du composé **a** ($pK_i = 6,2$ (Lewis et al., 1995)) comparée à celle du L733-060 ($pK_i = 8,8$), nous avons imaginé des structures de type 1-amino-2-[3,5-bis(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène (dérivé **26**).



B.3.5.2. Evaluation du potentiel pharmacologique du dérivé **26** et interprétation

La mesure de l'affinité de **26** -tableau 22- met en évidence une structure capable d'inhiber assez efficacement la liaison de la SP. Nous pouvons donc considérer le noyau 1-amino-2-[3,5-bis(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène comme une N.C.E. adaptée au pharmacophore de type II.

□ Cette structure peut être comparée au pharmacophore minimum décrit par Owens et ses collaborateurs (1995) (composé **c** -tableau 22-) ; il apparaît que la cyclisation du phénylglycinol O-benzylé (**c**) en 1-amino-2-benzyloxy-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène induit une perte d'affinité d'un facteur 10. Notons que cette légère diminution de reconnaissance peut être simplement due au fait que **26** est sous forme racémique tandis que le produit testé par Owens présente une chiralité bien définie.

□ Par ailleurs, nous pouvons remarquer la moindre affinité du composé **26** par rapport à celle du L733-060 (qui peut également être considéré comme une forme cyclisée du pharmacophore minimum de Owens). Ceci peut trouver une explication dans la stéréochimie relative des groupements portant les hétéroatomes. De fait, alors qu'il a été montré que la conformation bioactive du CP99994 positionnait les deux atomes d'azote en cis l'un par rapport à l'autre, la stéréochimie relative des groupements azoté et oxygéné du dérivé **26** est trans -figure 41-. Il faut néanmoins rester prudent face à cette interprétation ; en effet,

- d'abord CP99994 et **26** n'appartiennent pas à la même catégorie d'antagonistes et l'importance du positionnement relatif des hétéroatomes n'a pas été démontrée sur le L733-060, analogue du CP99994 mais de type II

- par ailleurs, la place de l'atome d'azote dans la pharmacophore de type II ne joue pas de manière prépondérante.

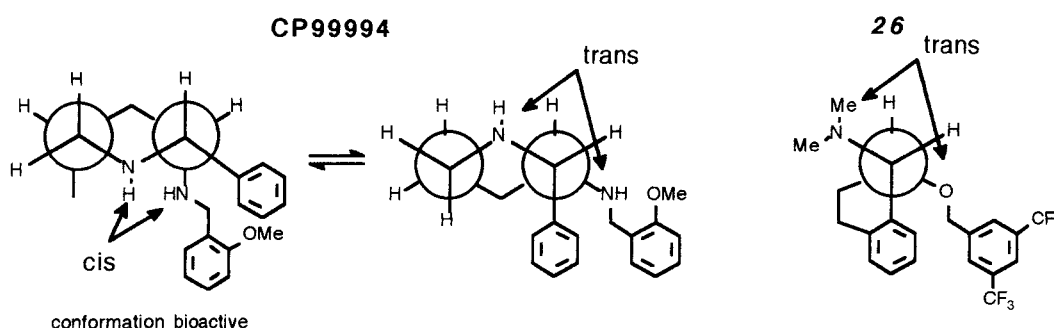


figure 41 : comparaison de la stéréochimie relative des groupements portant les hétéroatomes sur le CP99994 et sur le dérivé **26**

B.3.5.3. Pharmacomodulations autour du noyau 1-amino-2-[3,5-bis(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène

Les modulations envisagées autour du noyau 1-amino-2-[3,5-bis(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène concernent le groupement aminé qui, dans le pharmacophore de type II, possède assez de degrés de liberté.

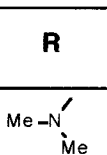

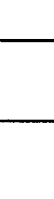
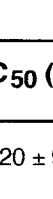
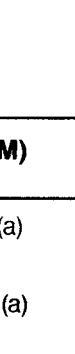
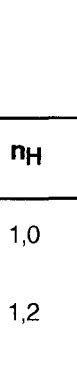

Ainsi, sa substitution par un carboxamidométhyle a, dans un premier temps, été choisie (composé **27**) ; elle induit une perte d'affinité d'un facteur 3 -tableau 22-. Notons que ce fait s'oppose au résultat trouvé pour les analogues ouverts (Owens et al., 1995) qui montrait une légère augmentation de la liaison au récepteur -tableau 22, composés **c** et **d**.

Par ailleurs, l'amine a été incluse dans un cycle et le composé **28** substitué en position 1 par la proline-amide, a été préparé. Deux diastéréoisomères ont été isolés : alors que pour l'un des deux on ne décèle pas de modifications importantes du binding par rapport au dérivé **26**, le second possède une affinité 3 fois moindre. Ceci peut conforter notre hypothèse suivant laquelle, dans le pharmacophore de type II, un

hétéroatome (qui doit pointer vers le milieu extracellulaire) est nécessaire pour permettre le bon positionnement de la molécule dans son site sans intervenir directement dans le binding.

L'amide terminal du substituant proline-amide a en outre été encombré (par un 3,5-(bistrifluorométhyl)benzyle (**29**) ce qui provoque la chute d'affinité -tableau 22- ; on peut penser que le pharmacophore ne peut plus se positionner dans son site.

tableau 22: affinité des structures à squelette 1-amino-2-[3,5-bis(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène et d'analogues ouverts

Composé	R	IC ₅₀ (nM)	n _H	pK _i
26		120 ± 9 (a)	1,0	7,4
27		410 ± 40 (a)	1,2	6,7
28 diast. A / diast. B 0 : 10		250 ± 30 (b)	1,1	7,1
28 diast. A / diast. B 9 : 1		794 ± 90 (b)	1,34	6,5
29		2580 ± 240 (a)	1,5	5,9
				
Composé	R	IC ₅₀ (nM)		
c	H ₂ N	13 ± 4 (d)		
d		5,8 ± 2,2 (d)		

(a) : déplacement de la [4,5-³H-Leu¹⁰]SP du récepteur NK1 exprimé dans des cellules CHO ; (b) : déplacement de la [4,5-³H-Leu¹⁰]SP du récepteur NK1 exprimé dans des cellules IM-9 ; (c) pas d'inhibition à 10⁻⁶M ; (d) : Owens et al., 1995 : déplacement de la [¹²⁵I]-SP du récepteur NK1 exprimé dans des cellules CHO

B.3.5.4. Conclusion

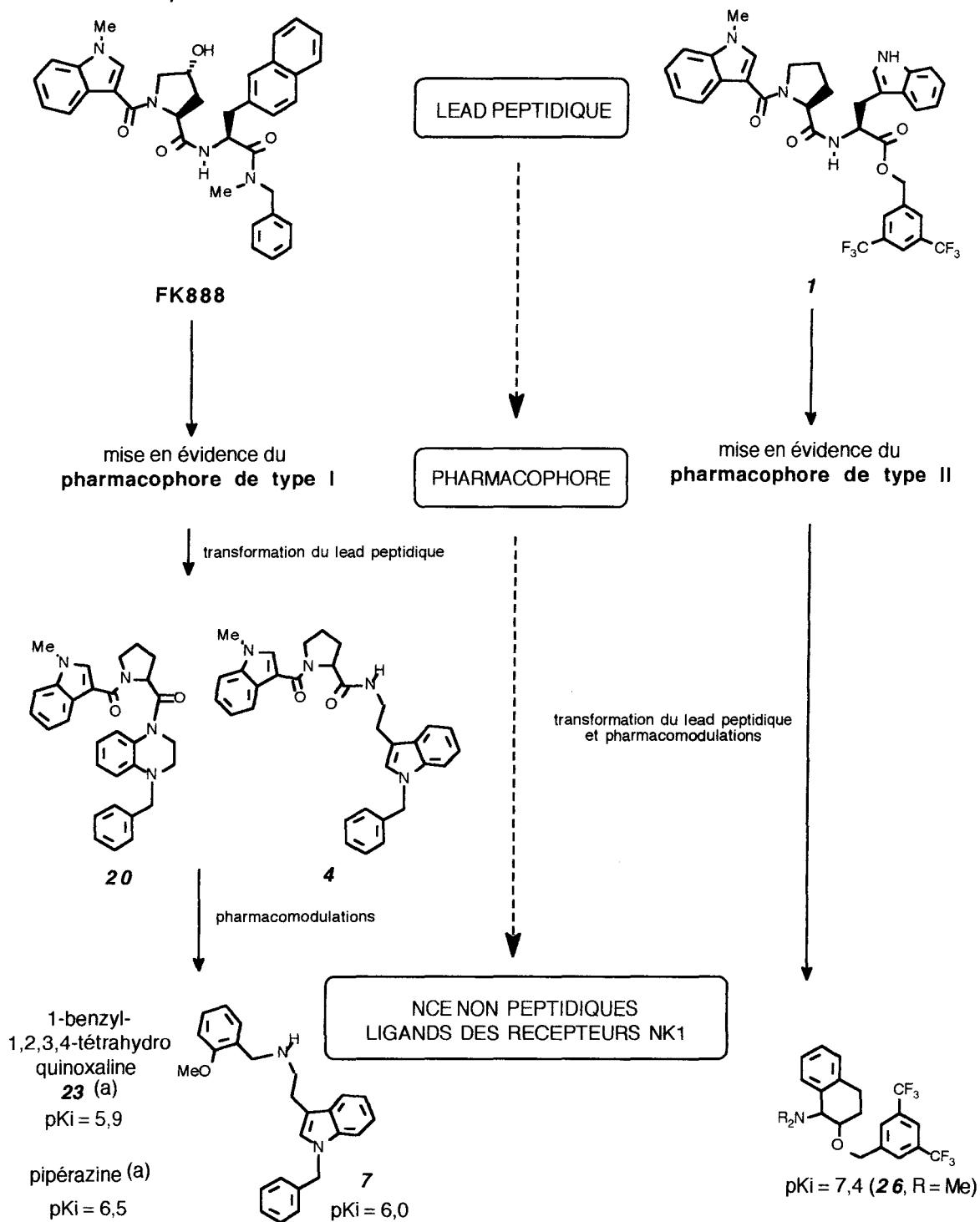
Le noyau 1-amino-2-[3,5-bis(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène apparaît désormais comme NCE ligand des récepteurs NK1 adapté au pharmacophore de type II. Par ailleurs, les pharmacomodulations réalisées autour de ce squelette clarifient l'intervention de l'hétéroatome dans ce modèle.

B.4. CONCLUSION

Le choix d'une stratégie adaptée du Drug-Design peptidique et fondée sur l'étude d'antagonistes nous a permis de mettre clairement en évidence l'existence de deux catégories d'antagonistes qui se développent autour de deux pharmacophores différents. La discrimination entre ces deux types de composés est essentiellement liée à la nature du groupement benzylique qu'ils contiennent.

De l'étude parallèle de deux structures peptidiques appartenant à chacune des classes, il nous a alors été possible de mettre en évidence des N.C.E. adaptés à chacun des pharmacophores -figure 42-. De leur optimisation peut découler la meilleure compréhension de l'intervention des différents pharmacocons et le raffinement du pharmacophore mais surtout de nouvelles structures, candidats potentiels à un développement thérapeutique.

figure 42 : bilan de la stratégie adoptée pour la mise en évidence de N.C.E. ligands des récepteurs NK1



(a) : structures confidentielles reportées en annexe



CHAPITRE III :

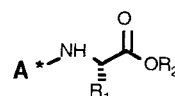
STRATEGIE DE SYNTHESE

Nous détaillons, dans ce chapitre, les synthèses des différents composés que nous avons préparés -figure 43-. Nous avons, dans un premier temps, envisagé la préparation des peptides puis celle des dérivés non peptidiques.

figure 43 : récapitulatif des composés préparés et renvoi aux paragraphes (§) concernant leur synthèse

STRUCTURES PEPTIDIQUES

Tripeptides : $N\epsilon$ Bz- $N\alpha$ Z-Lys-Ala-Sar-OBzl
§ A.2.1.



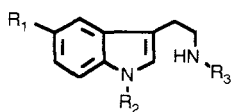
Dipeptides : $N\epsilon$ Bz- $N\alpha$ Z-Lys-Ala-OBzl
§ A.2.2.

Dipeptides : $N\epsilon$ Bz- $N\alpha$ Z-Lys-Sar-OBzl
§ A.2.2.

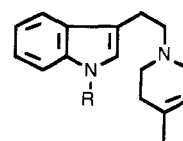
N°	R ₁	R ₂	§
1	CH ₂ Ind	CH ₂ [3,5-(CF ₃) ₂ Ph]	A.3.3.
2	Me	CH ₂ [3,5-(CF ₃) ₂ Ph]	A.3.4.
3	CH ₂ Ind	Me	A.3.4.

STRUCTURES NON PEPTIDIQUES

Dérivés à squelette indolique :



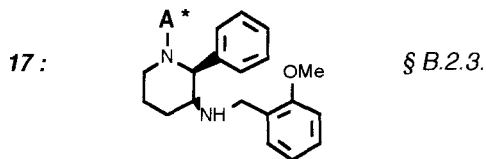
N°	R ₁	R ₂	R ₃	§
4	H	CH ₂ Ph	A*	B.1.2.
6	H	CH ₂ Ph	CO[2-(OMe)Ph]	B.1.3.
7	H	CH ₂ Ph	CH ₂ [2-(OMe)Ph]	B.1.3.
9	H	Me	CO[2-(OMe)Ph]	B.1.3.
10	H	Me	CH ₂ [2-(OMe)Ph]	B.1.3.
11	OMe	CH ₂ Ph	CO[2-(OMe)Ph]	B.1.3.
12	OMe	Me	CO[2-(OMe)Ph]	B.1.3.
13	OCH ₂ Ph	CH ₂ Ph	CO[2-(OMe)Ph]	B.1.3.
14	OCH ₂ Ph	Me	CO[2-(OMe)Ph]	B.1.3.
15	OMe	CH ₂ Ph	CH ₂ [2-(OMe)Ph]	B.1.3.
16	OMe	Me	CH ₂ [2-(OMe)Ph]	B.1.3.



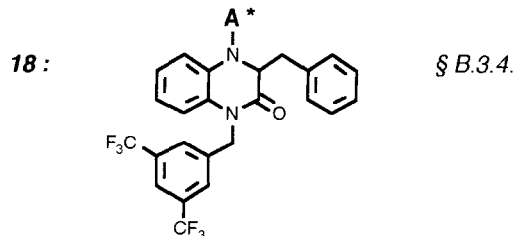
N°	R	§
5	CH ₂ [2-(OMe)Ph]	B.1.1.
8	CO[2-(OMe)Ph]	B.1.1.

figure 43 - suite-

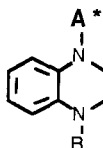
Dérivé hybride FK888 / CP99994



Dérivés à squelette 2-oxo-3-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoline

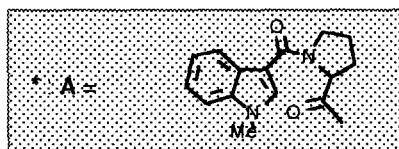
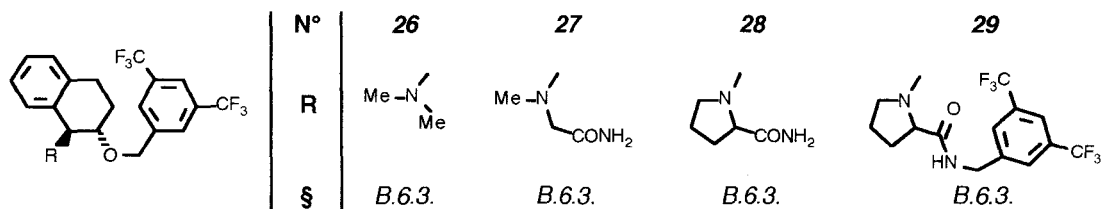


78 : confidentiel *annexe III*

Dérivés à squelette
1,2,3,4-tétrahydroquinolineDérivés à squelette
pipérazine

Autres 1,2,3,4-tétrahydroquinolines			Dérivés à squelette pipérazine			
N°	R	§	N°	§	N°	§
19	CH ₂ [3,5-(CF ₃) ₂ Ph]	B.4.2.	22	confidentiel <i>annexe IV</i>	77	confidentiel <i>annexe V</i>
20	CH ₂ Ph	B.4.2.	23	confidentiel <i>annexe IV</i>	79	confidentiel <i>annexe V</i>
21	(CH ₂) ₂ Ph	B.4.2.	24	confidentiel <i>annexe IV</i>	80	confidentiel <i>annexe V</i>
			25	confidentiel <i>annexe IV</i>	81	confidentiel <i>annexe V</i>
					82	confidentiel <i>annexe V</i>

Dérivés à squelette 1-amino-2-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène



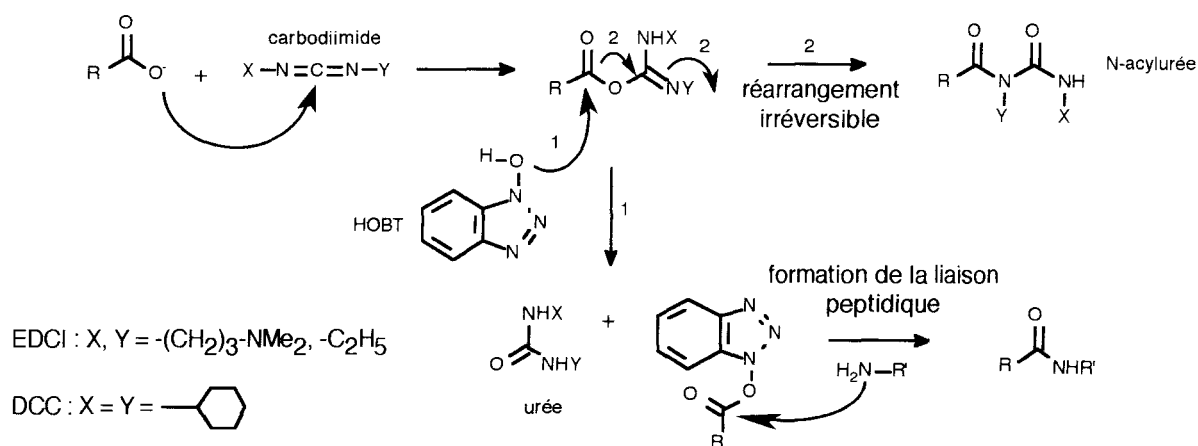
A. SYNTHÈSE DES DERIVES PEPTIDIQUES

A.1. GENERALITES

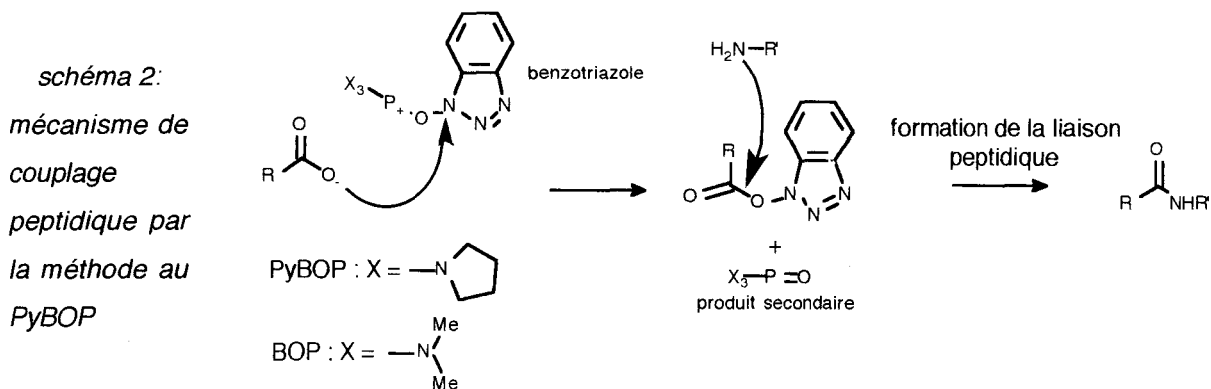
La synthèse peptidique consiste à coupler successivement des acides aminés correctement protégés soit sur leur fonction acide, soit sur leur fonction amine, voire sur leur chaîne latérale. Nous avons utilisé pour réaliser ces couplages deux méthodes :

- la méthode à l'EDCI / HOBT ; elle procède par activation *in situ* de la fonction acide par le carbodiimide -schéma 1-. Le caractère hydrosoluble de l'EDCI et de l'urée qui se forme facilite la purification du produit ; c'est pourquoi ce réactif est souvent préféré à la DCC, autre carbodiimide. Par ailleurs, l'utilisation de l'HOBT permet de s'affranchir des risques de réarrangement qui forme une N-acylurée et induit la perte de l'acide de départ -schéma 1-.

schéma 1 : mécanisme de couplage peptidique par la méthode à l'EDCI / HOBT



- la méthode au PyBOP qui utilise comme agent de couplage un benzotriazole -schéma 2- ; notons que le PyBOP a, la plupart du temps, été préféré au BOP, autre benzotriazole, car les produits secondaires qu'il génère sont, contrairement au BOP, non toxiques.



A.2. SYNTHÈSE DES TRIPEPTIDES N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl ET DES DIPEPTIDES N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-OBzl ET N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Sar-OBzl

A.2.1. Synthèse des tripeptides N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl

Pour la préparation des quatre stéréoisomères optiquement purs des tripeptides N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl, deux voies de synthèse ont été éprouvées. La première forme le peptide de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale, tandis que la seconde le forme de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Les deux demandent la préparation préalable de N ϵ -Bz-N α -Z-Lys.

A.2.1.1. Synthèse de N ϵ -Bz-N α -Z-Lys

N ϵ -Bz-N α -Z-Lys est préparée en deux étapes à partir de la lysine prise optiquement pure -schémas 3 et 4-

La chaîne latérale de la lysine est d'abord benzoylée sélectivement avec 40% de rendement. Ceci demande trois réactions qui sont réalisées successivement sans purifier les produits intermédiaires :

- protection de l'amine fonctionnelle sous forme d'un complexe cuivrique par action du carbonate de cuivre en milieu basique (Greene et Wuts, 1991)
- acylation par le chlorure de benzoyle dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium de la fonction amine libre de la chaîne latérale
- clivage du chélate de cuivre effectué directement par traitement du milieu réactionnel par l'EDTA.

L'amine fonctionnelle régénérée est alors protégée sous forme d'un carbamate par action du chloroformiate de benzyle pour obtenir N ϵ -Bz-N α -Z-Lys avec 95% de rendement.

La pureté optique de l'acide aminé obtenu a été vérifié *a posteriori* après la synthèse des tripeptides N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl.

Une autre méthode en une étape a été éprouvée pour la préparation de N ϵ -Bz-N α -Z-Lys ; elle consiste à acyler N α -Z-Lys, commercial, par le chlorure de benzoyle dans la pyridine. Toutefois, le rendement de la réaction est faible (de l'ordre de 10%) ; la méthode n'a donc pas été retenue.

A.2.1.2. Synthèse du tripeptide N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale

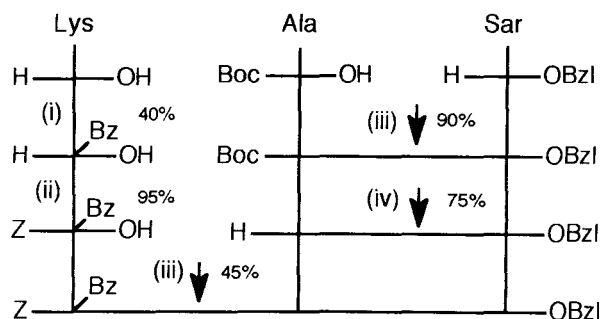
Cette première stratégie -schéma 3- a été utilisée pour la préparation des dérivés (R,S), (S, R) et (R,R). Elle est réalisée à partir d'acides aminés optiquement purs : sarcosinate de benzyle et N-tert-butoxycarbonylalanine, commerciaux ; lysine protégée sur sa chaîne latérale par un benzoyle et sur sa fonction amine par un groupement benzyloxycarbonyle qui a été préparée préalablement -paragraphe A.2.1.1. -.

Elle inclut

- deux étapes de couplage peptidique : celles-ci procèdent de façon classique selon la méthode EDCI / HOBT.

- la libération de la fonction amine de l'alanine, protégée par le groupement acido-sensible N-tert-butoxycarbonyle : ceci est réalisé par action de l'acide chlorhydrique dans le dioxane.

schéma 3 :
Synthèse du tripeptide N_ϵ -Bz- N_α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale



(i) : a. CuCO_3 , $\text{Cu}(\text{OH})_2$, H_2O ; b. chlorure de benzoyle, NaOH 2N ; c. EDTA, H_2O ; (ii) : chloroformiate de benzyle, NaOH 2N ; (iii) : EDCI, HOBT, TEA, CH_2Cl_2 ; (iv) : HCl, dioxane

La pureté optique des produits a été vérifiée par analyse par HPLC sur gel de silice chiral et confirmée par comparaison des pouvoirs rotatoires -tableau 23- .

tableau 23 : données prouvant la pureté optique des tripeptides
 N_ϵ -Bz- N_α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl

N_ϵ -Bz- N_α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl			
Lys	Ala	t_R (a) (min)	$[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}}$ (b)
R	R	11,02	31,32°
S	S	15,03	-31,31°
R	S	19,04	-14,46°
S	R	10,64	13,39°

(a) : temps de rétention mesuré en HPLC sur gel de silice chiral (Chiralpak AD) (éluant : EtOH ; débit 1 ml / min) ; (b) pouvoir rotatoire spécifique mesuré dans EtOH

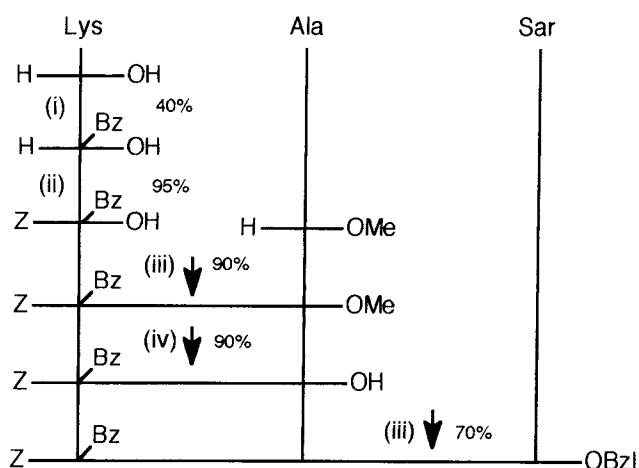
Il apparaît alors que la méthode mise au point n'induit aucune racémisation et permet la préparation des différents stéréoisomères à partir d'acides aminés optiquement purs. Par ailleurs, ces résultats corroborent *a posteriori* le fait que la préparation de la N_ϵ -Bz- N_α -Z-Lys est énantiospécifique.

A.2.1.3. Synthèse du tripeptide N_{ϵ} -Bz- N_{α} -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale

La préparation du composé N_{ϵ} -Bz- N_{α} -Z-(S)Lys-(S)Ala-Sar-OBzl a fait appel à une seconde méthode consistant à coupler les différents amino-acides (N_{ϵ} -Bz- N_{α} -Z-(S)-Lys, (S)-Ala-OMe et Sar-OBzl) de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale -schéma 4-. Cette voie de synthèse demande également deux étapes de couplage peptidique réalisées comme précédemment selon la méthode EDCI/HOBT et une étape de saponification.

schéma 4 :

Synthèse du tripeptide N_{ϵ} -Bz- N_{α} -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale



- (i) : a. CuCO_3 , $\text{Cu}(\text{OH})_2$, H_2O ; b. chlorure de benzoyle, NaOH 2N ;
 c. EDTA, H_2O ; (ii) : chloroformiate de benzyle, NaOH 2N ;
 (iii) : EDCI, HOBT, TEA, CH_2Cl_2 ; (iv) : NaOH 2N, EtOH

L'analyse de la pureté optique du tripeptide obtenu révèle la présence de deux diastéréoisomères (N_{ϵ} -Bz- N_{α} -Z-(S)-Lys-(S)-Ala-Sar-OBzl, diastéréoisomère attendu et N_{ϵ} -Bz- N_{α} -Z-(S)Lys-(R)Ala-Sar-OBzl (résultant de la racémisation du centre chiral de l'alanine) dans les proportions 76 : 24. Le mélange a pu être résolu par purification selon une technique de HPLC sur gel de silice chiral.

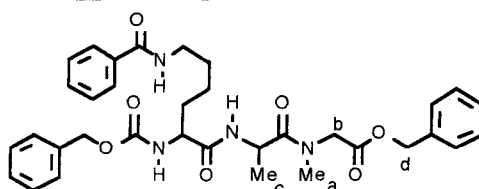
A.2.1.4. Conclusion

Deux voies de synthèse ont donc été mises au point pour la préparation des tripeptides N_{ϵ} -Bz- N_{α} -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl : la première fournit les stéréoisomères optiquement purs sans étape de purification et avec un rendement global de 35% ; la seconde demande la mise en oeuvre d'une technique de HPLC préparative sur gel de silice chiral pour donner le stéréoisomère avec un rendement global de 45%.

A.2.1.5. Remarques concernant l'analyse par RMN des tripeptides

Les différents produits préparés (tripeptides et intermédiaires de synthèse) ont été analysés par RMN. Il n'est pas remarqué de différences entre les spectres de diastéréoisomères. Par contre, pour tous les composés qui incluent la sarcosine dans leur structure, la présence de deux conformères stables est particulièrement à noter. Sur les tripeptides N_ϵ -Bz- N_α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl, elle est visible par un dédoublement des signaux correspondant à la résonance des protons de la sarcosine mais également des protons benzyliques de l'ester ou des protons méthyliques du résidu de l'alanine -tableau 24-. Elle est probablement imputable à l'existence des deux formes (cis et trans) de la liaison amide Ala-Sar. Néanmoins, la stabilité des deux conformères diffèrent selon le solvant dans lequel est enregistré le spectre : si le tripeptide est en solution dans le DMSO, les deux conformères apparaissent dans les proportions 75 : 25 ; par contre, pour le même dérivé solubilisé dans le chloroforme, les quantités relatives sont 80 : 20.

tableau 24 : déplacements chimiques (en ppm) des protons résonant différemment sur les deux conformères visibles du tripeptide N_ϵ -Bz- N_α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl



	Ha		Hb		Hb'		Hc		Hd	
	conf. 1	conf. 2	conf. 1	conf. 2	conf. 1	conf. 2	conf. 1	conf. 2	conf. 1	conf. 2
DMSO :	3,05	2,8	4,0	4,25	4,3	4,6	1,1	1,05	5,1	5,15
conf.1 /										
conf.2	s	s	d	d	d	d	d	d	s	s
75 : 25			J= 17,2Hz	J= 18,0Hz	J= 17,2Hz	J= 18,0Hz	J= 6,75Hz	J= 6,7Hz		
CDCl₃ :	3,1	2,95	3,9	4,0	4,3	4,4	1,3	1,25	5,15	5,2
conf.1 /										
conf.2	s	s	d	d	d	d	d	d	s	s
80 : 20			J= 17,3Hz	J= 17,25Hz	J= 17,25Hz	J= 17,25Hz	J= 6,85Hz	J= 6,85Hz		

conf : conformère

A.2.2. Synthèse des dipeptides N_ϵ -Bz- N_α -Z-Lys-Ala-OBzl et N_ϵ -Bz- N_α -Z-Lys-Sar-OBzl

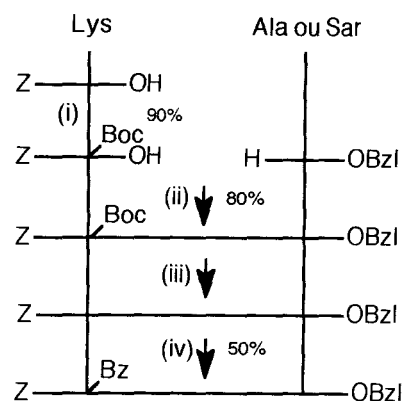
La méthode utilisée consiste à coupler la lysine protégée définitivement sur son amine terminale par un benzyloxycarbonyle et sur l'amine de la chaîne latérale par un tert-butoxycarbonyle à l'alaninate de benzyle (respectivement le sarcosinate de benzyle). Ceci est encore réalisée par utilisation de l'EDCI en présence de HOBT -schéma 5-.

La déprotection sélective du groupement Boc est effectuée dans des conditions d'acidolyse moyenne (acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane). L'amine latérale peut alors être acylée par le chlorure de benzoyle dans le dichlorométhane en présence de DIPEA.

schéma 5 :

Synthèse des dipeptides N_ϵ -Bz- N_α -Z-Lys-Ala-OBzl et N_ϵ -Bz- N_α -Z-Lys-Sar-OBzl

(N.B. Les rendements sont indicatifs du fait des différents produits préparés selon le même protocole)



(i) : Boc_2O , DMF, H_2O ;

(ii) : EDCI, HOBT, TEA, CH_2Cl_2 ;

(iii) : TFA, CH_2Cl_2 ;

(iv) : chlorure de benzoyle, DIPEA, CH_2Cl_2

La pureté optique a, là encore, été analysée par HPLC sur gel de silice chiral et confirmée par comparaison des pouvoirs rotatoires -tableau 25-. Notons qu'en ce qui concerne le dipeptide N_ϵ -Bz- N_α -Z-Lys-Ala-OBzl, aucune des conditions chromatographiques éprouvées n'a permis la séparation du diastéréoisomère N_ϵ -Bz- N_α -Z-(S)-Lys-(R)-Ala-OBzl. Néanmoins, la comparaison de son pouvoir rotatoire à celui de N_ϵ -Bz- N_α -Z-(R)-Lys-(S)-Ala-OBzl permet de prouver sa pureté.

tableau 25 : données prouvant la pureté optique des dipeptides N_ϵ -Bz- N_α -Z-Lys-Ala-OBzl et N_ϵ -Bz- N_α -Z-Lys-Sar-OBzl

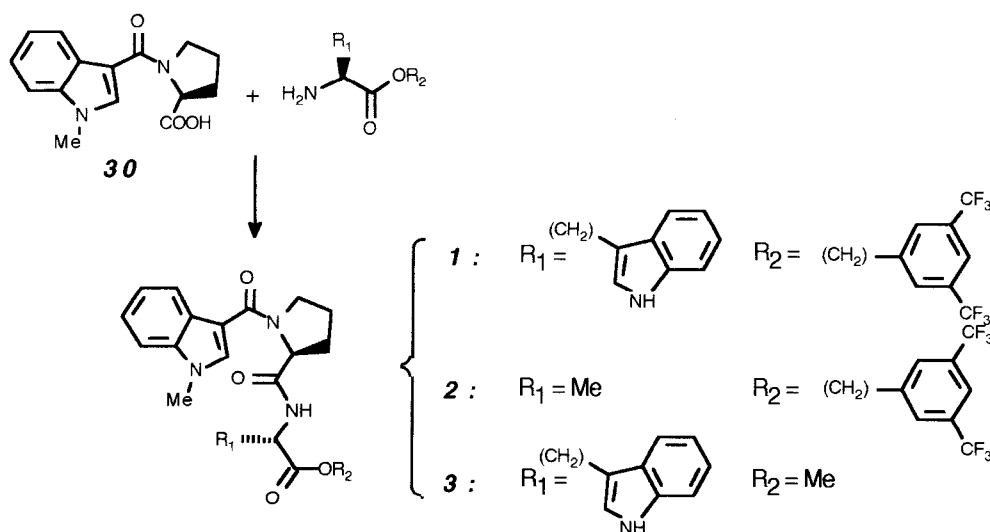
N_ϵ -Bz- N_α -Z-Lys-Ala-OBzl				N_ϵ -Bz- N_α -Z-Lys-Sar-OBzl	
Lys	Ala	t_R (a) (min)	$[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}}$	Lys	$[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}}$ (b)
R	R	4,7	25,85° (b)	R	15,75°
S	S	7,35	-27,1° (b)		
R	S	5,7	-8,0° (c)	S	-15,2°
S	R	7,15	7,6° (c)		

(a) : temps de rétention déterminé en HPLC sur gel de silice chiral (Chiralpak AD) (éluant : MeOH / EtOH 8 : 2 ; débit 1 ml / min) ; (b) : pouvoir rotatoire spécifique mesuré dans EtOH ; (c) : pouvoir rotatoire spécifique mesuré dans MeOH

A.3. SYNTHESE DU N-{1-[(1-METHYLINDOL-3-YL)CARBONYL](S)-PROLYL}(S)-TRYPTOPHANATE DE 3,5-BIS-(TRIFLUOROMETHYL)BENZYLE **1** ET DES DIPEPTIDES APPARENTES **2** ET **3**

La synthèse envisagée pour la synthèse du dipeptide **1** et de ses analogues **2** et **3** consiste à coupler le tryptophane ou l'alanine correctement estérifié au dérivé N-{1-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl](S)-proline **30** possédant une fonction acide -schéma 6-. La préparation préalable de **30** permet, en effet, d'en faire un synthon réutilisable dans la synthèse d'autres composés.

schéma 6 : schéma général pour la synthèse des dérivés **1**, **2**, et **3**

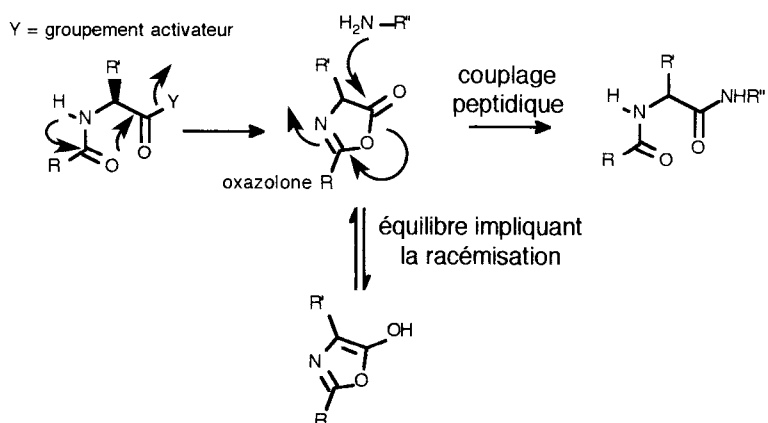


Cette stratégie qui demande la condensation d'un acide aminé acylé sur une fonction amine libre est envisageable sans risque de racémisation seulement grâce au fait que l'acide aminé acylé utilisé est une proline. De fait, pour tout autre acide aminé (outre la glycine non chirale) une racémisation est théoriquement possible via le passage par une oxazolone -schéma 7-.

schéma 7 :

mécanisme induisant la racémisation lors d'un couplage d'un acide aminé acylé et activé sur la fonction acide et d'une amine libre

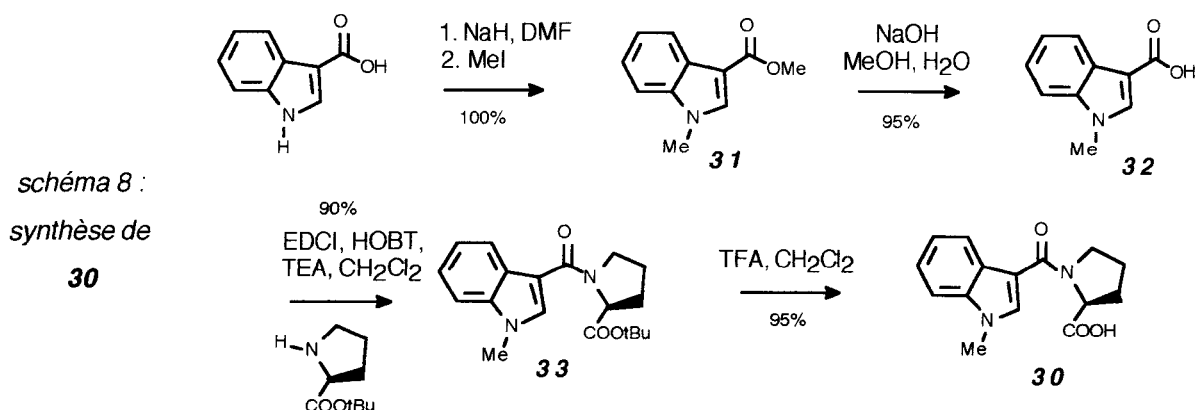
Si l'acide aminé est une proline (qui ne possède pas d'hydrogène mobile sur l'atome d'azote fonctionnel) la racémisation ne peut avoir lieu



A.3.1. Synthèse du synthon N-{1-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]}(S)-proline **30**

La synthèse envisagée consiste en un couplage peptidique entre l'acide 3-(N-méthyl)indolecarboxylique **32** et la L-proline correctement protégée sur sa fonction acide -schéma 8-. Il est réalisé de façon classique par activation *in situ* de l'acide par un carbodiimide, là encore l'EDCI.

La synthèse de **32** requiert la N-alkylation de l'acide 3-indolecarboxylique. Cette alkylation est réalisée par substitution de l'iodure de méthyle par l'anion indolique généré *in situ* par action de l'hydrure de sodium. Une étape de saponification est alors nécessaire, puisque les conditions de méthylation induisent également la formation de l'ester méthylique.



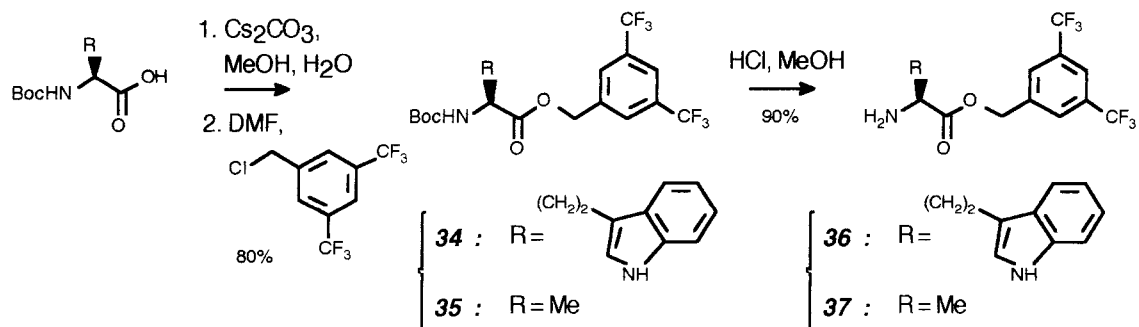
Notons, qu'en ce qui concerne la proline, l'utilisation de la forme naturelle permet d'accéder directement à la configuration souhaitée (S) pour le carbone asymétrique de **30**. Par ailleurs, la protection de sa fonction acide par un groupement acido-sensible permet d'éliminer du procédé des conditions basiques trop fortes qui peuvent s'avérer, dans certains cas, racémisantes.

A.3.2. Synthèse du tryptophanate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle **36** et de l'alaninate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle **37**

La préparation du tryptophanate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle **36** utilise la méthode décrite par McLeod et collaborateurs (1994). Elle consiste à alkyler le sel de césium du N-Boc-tryptophane. La déprotection du groupement acido-sensible est alors réalisée par l'acide chlorhydrique dans le méthanol. -schéma 9-

La synthèse de l'alaninate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle **37** se fait selon le même procédé -schéma 9-.

schéma 9 : estérification du N-Boc-tryptophane et de la N-Boc-Alanine



A.3.3. Synthèse du composé 1

Pour la condensation du synthon **30** et du tryptophanate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle **36**, chacun optiquement pur, un couplage peptidique utilisant cette fois, comme agent couplant, un benzotriazole, le PyBOP, est envisagé -schéma 6-

Une analyse de la pureté de **1** par HPLC sur gel de silice chirale a permis de montrer que, avec la méthode utilisée, seul un produit était visible ; ceci ne prouve pas la pureté optique du produit (il eut fallu, pour la démontrer sans ambiguïté, préparer les trois autres isomères et comparer leurs profils chromatographiques et leurs pouvoirs rotatoires). Toutefois, sachant que la voie de synthèse choisie n'induit pas, *a priori*, de racémisation et que, dans les conditions chromatographiques chirales étudiées, le produit se présente comme pur, il n'est pas injustifié d'admettre qu'il ne représente qu'un seul énantiomère.

A.3.4. Préparation des dipeptides 2 et 3

La préparation des dipeptides **2** et **3** est réalisée selon une méthode analogue à celle précédemment décrite -schéma 6 - : le couplage du synthon **30** au tryptophanate de méthyle donne **3** avec 90% de rendement et sa condensation sur l'alaninate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle **37** fournit **2** avec 75% de rendement.

B SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS NON PEPTIDIQUES ISSUS DE L'ANALYSE DES LEADS PEPTIDIQUES

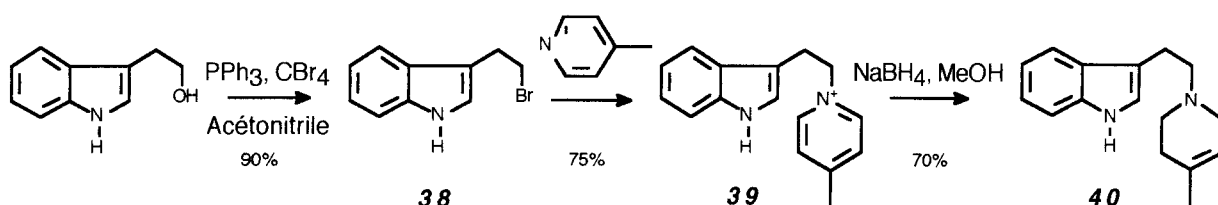
B.1. SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS POSSEDANT UN SQUELETTE INDOLIQUE

B.1.1. Préparation des dérivés du 3-{2-[1-(4-méthyl-1,2,5,6-tétrahydro)pyridinoéthyl]}indole **5** et **8**, et mise au point des conditions de substitution de l'atome d'azote indolique

La synthèse des dérivés benzylé ou benzoylé sur l'atome d'azote indolique de 3-{2-[1-(4-méthyl-1,2,5,6-tétrahydro)pyridinoéthyl]}indole (**5** et **8**) demande la préparation préalable de 3-{2-[1-(4-méthyl-1,2,5,6-tétrahydro)pyridinoéthyl]}indole **40** -schéma 10-

La substitution par la 4-méthylpyridine du dérivé bromé **38**, préparé à partir du tryptophol, permet d'accéder au sel de pyridinium **39**. La réduction de **39** par le borohydrure de sodium dans le méthanol fournit alors **40** avec 70% de rendement.

schéma 10 : préparation de **40**

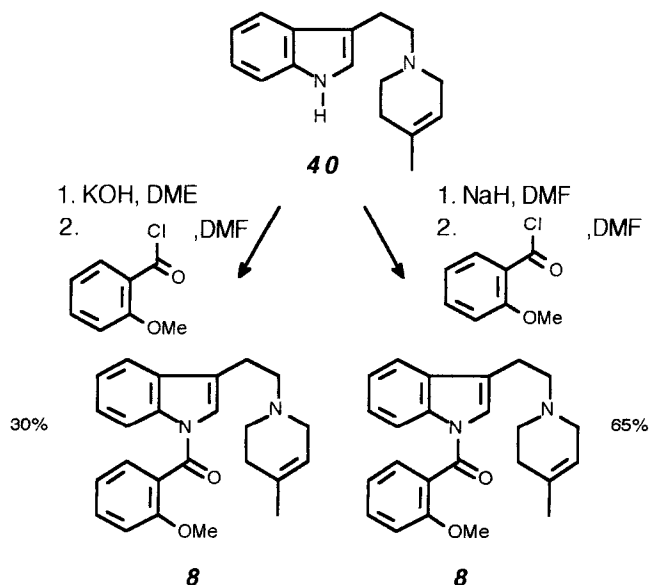


B.1.1.1. Acylation de l'atome d'azote indolique du composé **40**

Pour l'acylation de l'azote indolique de **40**, deux procédés ont été envisagés -schéma 11- :

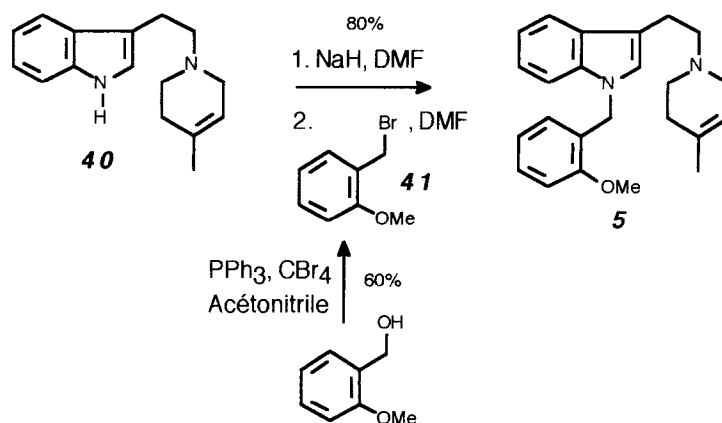
- une première méthode, douce, (Kikugawa et al, 1981) consiste à générer l'indolate par de la potasse dans le DME, celui-ci pouvant ensuite être acylé par le chlorure de 2-méthoxybenzoyle. Toutefois, le produit **8** n'a pu être isolé qu'avec un rendement de 30%.

- une méthode plus drastique a donc été adoptée; elle s'inspire de la synthèse de l'indométhacine (Juby et Hudyma, 1969) et utilise l'hydrure de sodium pour générer l'indolate. **8** est alors isolé avec 65% de rendement.

schéma 11 : acylation de **40**

B.1.1.2. Alkylation de l'atome d'azote indolique du composé **40**

L'azote indolique a pu être alkylé selon une méthode similaire, pour donner **5** avec 80% de rendement- schéma 12- : génération de l'indolate par NaH et alkylation par le bromure de 2-méthoxybenzyle **41** (préparé préalablement, par bromation de l'alcool correspondant par le tétrabromure de carbone en présence de triphénylphosphine).

schéma 12 : alkylation de **40**

C'est donc cette méthode qui procède selon la substitution nucléophile d'un dérivé halogéné par l'indolate généré *in situ* par l'hydrure de sodium, qui a été retenu pour les synthèses ultérieures

B.1.2. Synthèse du dérivé 4

La synthèse peut être prévue en deux étapes à partir de la tryptamine et du synthon N-[(méthylindol-3-yl)carbonyl]proline **30** dont la préparation est connue - schéma 13 - :

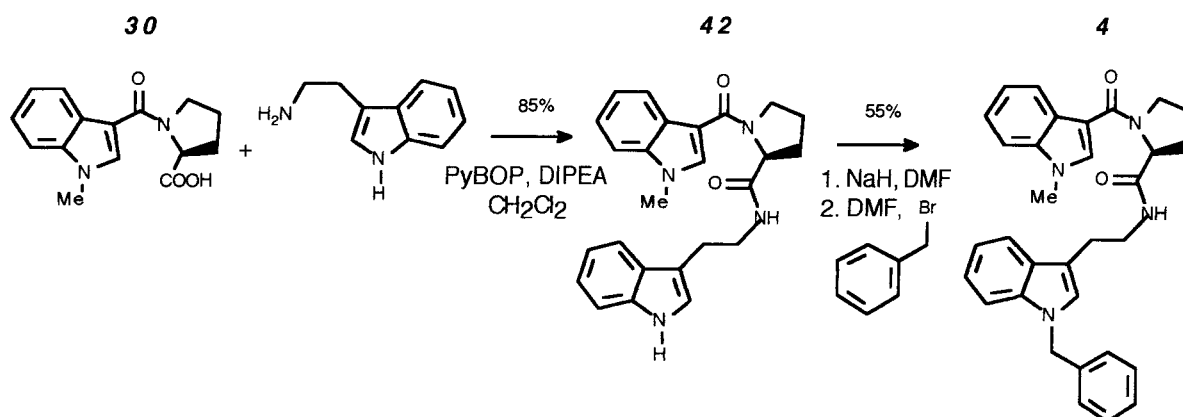
- acylation de l'atome d'azote extracyclique de la tryptamine par **30**
- benzylation de l'atome d'azote indolique selon la méthode d'alkylation mise au point précédemment.

La formation de la liaison amide est réalisée par couplage peptidique au PyBOP et **42** est obtenu avec 85% de rendement.

La benzylation de l'atome d'azote indolique se fait alors, comme précédemment par action du bromure de benzyle sur l'indolate, généré *in situ* par NaH, dans le DMF.

Notons que les conditions basiques mises en oeuvre peuvent induire la racémisation du centre chiral de la proline. Toutefois, la mesure du pouvoir rotatoire de **4** ($[\alpha]_{D_{25}^{\circ}} = -6,45^{\circ}$) montre que celle-ci n'est pas totale mais la pureté énantiomérique n'a pas été évaluée.

schéma 13 : préparation de **4**



B.1.3. Synthèse des dérivés possédant un squelette 1-alkyl-3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]indole ou 1-alkyl-3-[2-(2-méthoxybenzylamino)éthyl]indole

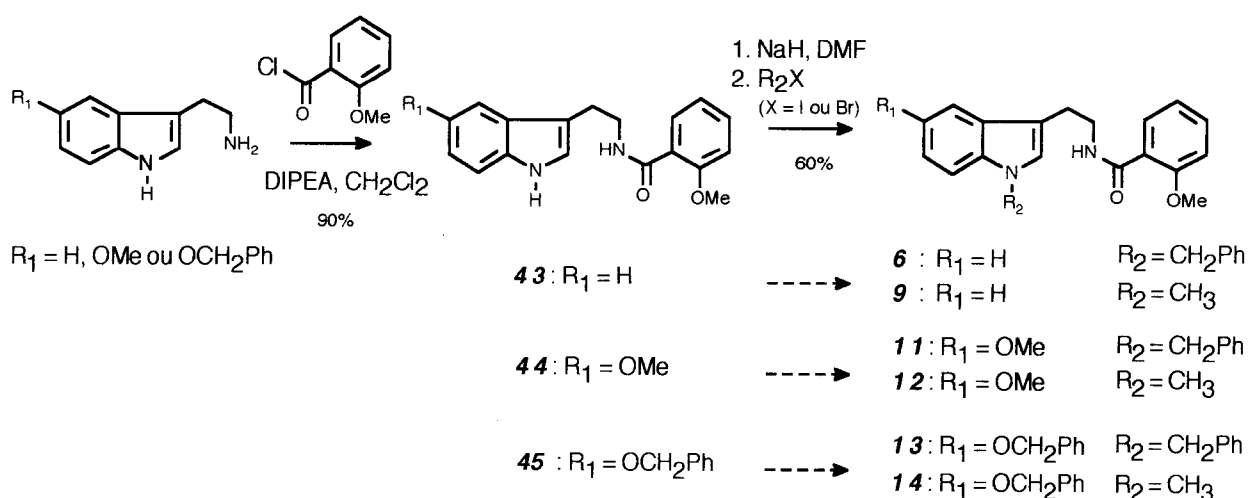
Pour la préparation de ces dérivés (composés **6**, **7** et de **9** à **16**), nous avons élaboré une synthèse permettant de considérer les produits possédant un squelette 1-alkyl-3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]indole) comme les intermédiaires réactionnels dans les synthèses de ceux possédant un squelette 1-alkyl-3-[2-(2-méthoxybenzylamino)éthyl]indole - schéma 14 -.

L'acylation de la tryptamine (correctement substituée en position 5) par le chlorure d'ortho-anisoyl conduit au dérivé **43** (respectivement **44** et **45**) avec des rendements variant entre 80 et 95%. L'alkylation de l'azote indolique est alors possible par traitement de l'anion indolate (généralisé *in situ*) par le bromure de benzyle ou l'iodure de méthyle. On a donc accès, en deux étapes aux dérivés **6** ou **9** (respectivement (**11** ou **12**) et (**13** ou **14**)).

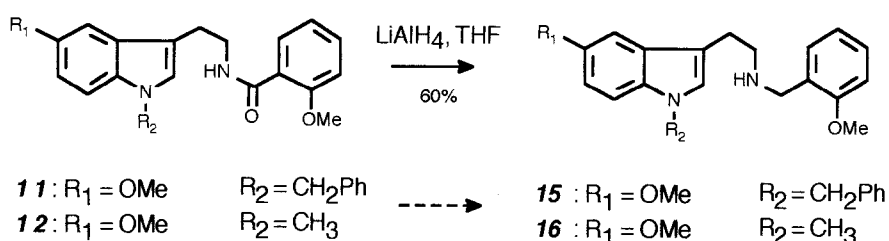
Notons que lors de la méthylation du dérivé **44**, nous avons pu également remarquer la formation du dérivé diméthylé **46** (sur l'azote indolique et sur l'azote de l'amide) avec des rendements pouvant aller jusqu'à 25% -schéma 15-. Pour ce composé, l'analyse de RMN ^1H réalisée à 300K a pu montrer la présence de deux conformères stables due à l'équilibre entre les formes Z et E de la liaison amide ; en effet, on note un dédoublement des signaux, notamment le signal correspondant au N-CH₃.

schéma 14 : préparation des dérivés possédant un squelette 1-alkyl-3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]indole ou 1-alkyl-3-[2-(2-méthoxybenzylamino)éthyl]indole

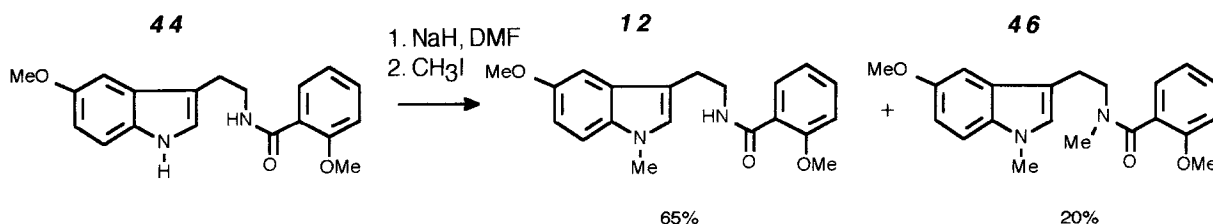
dérivés possédant un squelette 1-alkyl-3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]indole



dérivés possédant un squelette 1-alkyl-3-[2-(2-méthoxybenzylamino)éthyl]indole

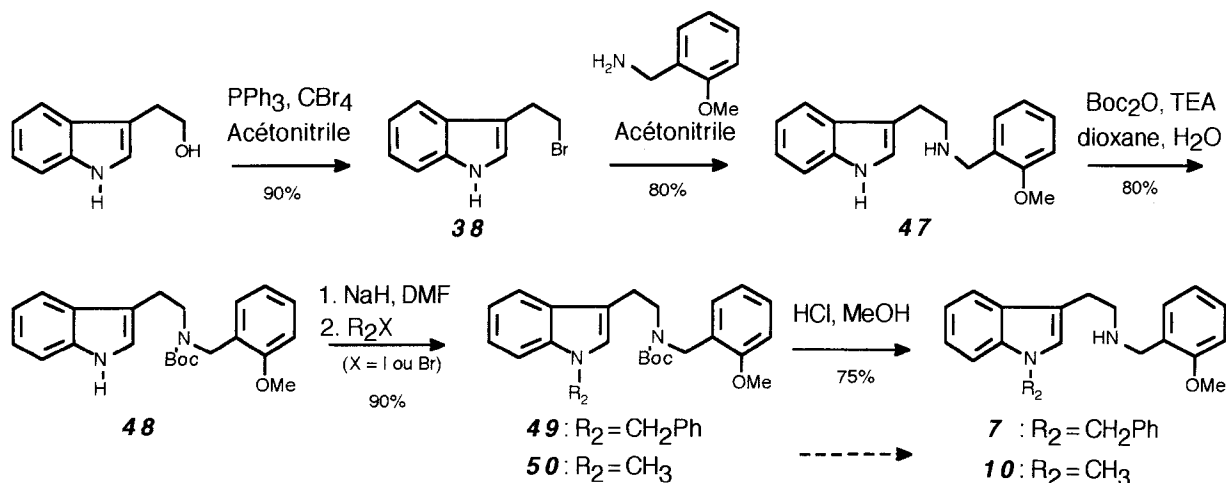


(N.B. les rendements sont indicatifs du fait des différents produits préparés selon le même protocole)

schéma 15 : méthylation de **49**

La réduction de la fonction amide de **11** et **12** par LiAlH₄ conduit aux dérivés **15** et **16** avec des rendements voisins de 60% -schéma 14-. La réduction de la fonction amide de **6** et **9** a été envisagée pour préparer **7** et **10**. Toutefois, dans ce cas où l'indole n'est pas substitué en position 5, la purification des produits s'avère très délicate et entraîne une chute notable du rendement (22% dans le cas de **10**).

La synthèse des deux dérivés **7** et **10** a donc été envisagée selon une autre voie -schéma 16 -.

schéma 16 : préparation des dérivés **7** et **10**

(N.B. les rendements sont indicatifs du fait des différents produits préparés selon le même protocole)

Après bromation du tryptophol par le tétrabromure de carbone en présence de triphénylphosphine, une substitution d'Hoffmann est réalisée avec comme agent nucléophile la 2-méthoxybenzylamine pour conduire au dérivé **47**. Il eut été possible de réaliser la substitution nucléophile du bromure de 2-méthoxybenzyle **41** par la tryptamine; toutefois ceci implique la synthèse préalable du dérivé bromé excessivement lacrymogène. Il a donc été préféré la préparation du 3-(2-bromoéthyl)indole **38**.

La substitution de l'azote indolique peut alors être réalisée par génération de l'anion indolate et action d'un dérivé halogéné ; il est nécessaire de protéger au préalable l'amine (ceci est réalisé par formation d'un carbamate **48**). Après alkylation de l'indole, l'amine est déprotégée en milieu acide pour fournir les dérivés **7** et **10** désirés.

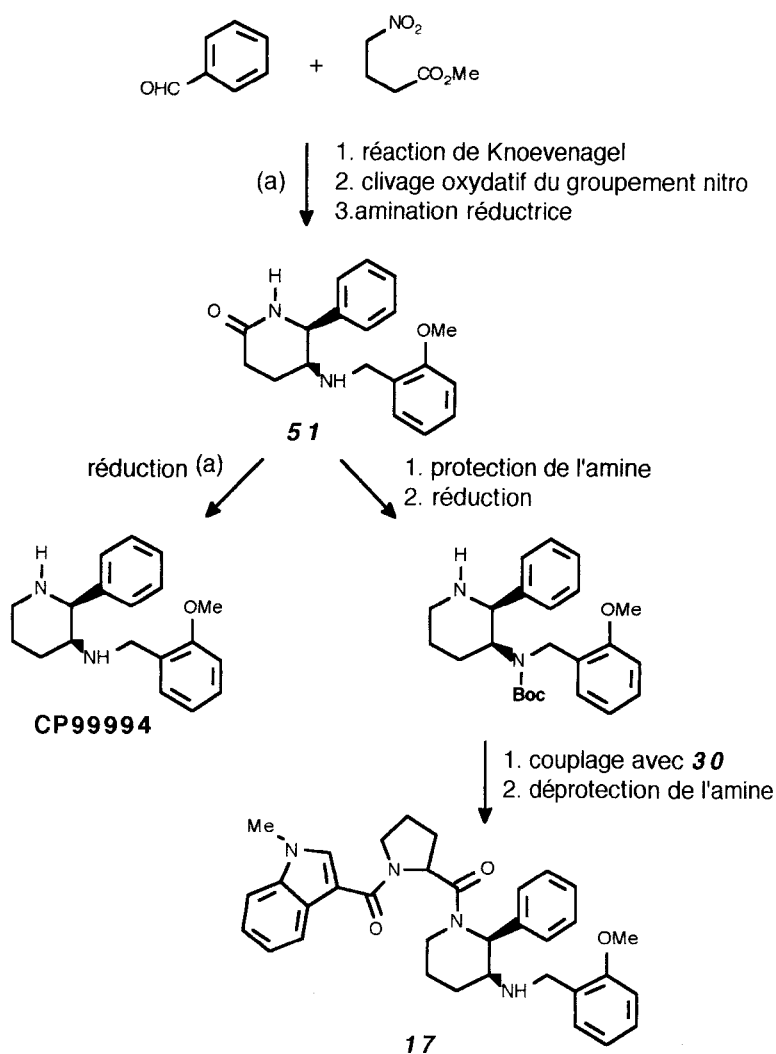
Cette stratégie, certes plus longue, permet la mise en oeuvre de réactions plus "propres" et a donc été préférée pour la synthèse de **7** et **10**.

B.2. SYNTHÈSE D'UNE MOLECULE HYBRIDE FK888 / CP99994, LE COMPOSE **17**

B.2.1. Stratégie de synthèse envisagée

Pour la synthèse du composé **17**, le couplage du CP99994 (dont la préparation du racémique est décrite (Desai et al., 1993 b)) avec la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline **30** est envisagé. Il est nécessaire, dans cette stratégie, de protéger sélectivement l'amine extracyclique ; ceci peut être réalisé au cours de la synthèse du CP99994 -schéma 17-.

schéma 17 : stratégie envisagée pour la synthèse de **17**



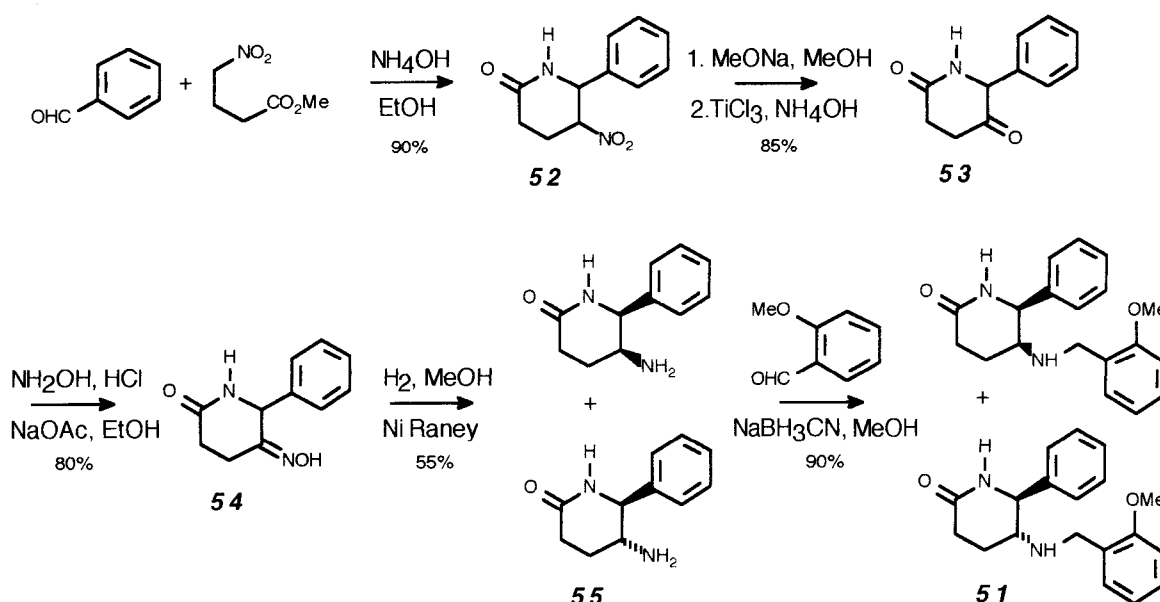
(a) : Desai et al., 1993 b

B.2.2. Synthèse du dérivé **51**, intermédiaire dans la synthèse du CP99994 et de l'hybride **17**

B.2.2.1. Préparation du mélange des diastéréoisomères *cis* et *trans* de **51**

La synthèse réalisée -schéma 18- procède selon la méthode décrite pour la préparation du CP99994 (Desai et al., 1993 b) ou de son analogue tritié (Rosen et al., 1993).

schéma 18 : préparation du dérivé **51**



Elle commence par une réaction de Knoevenagel entre le benzaldéhyde et le 4-nitrobutanoate de méthyle en présence d'acétate d'ammonium, suivie d'une cyclisation intramoléculaire ce qui fournit **52** avec 90% de rendement.

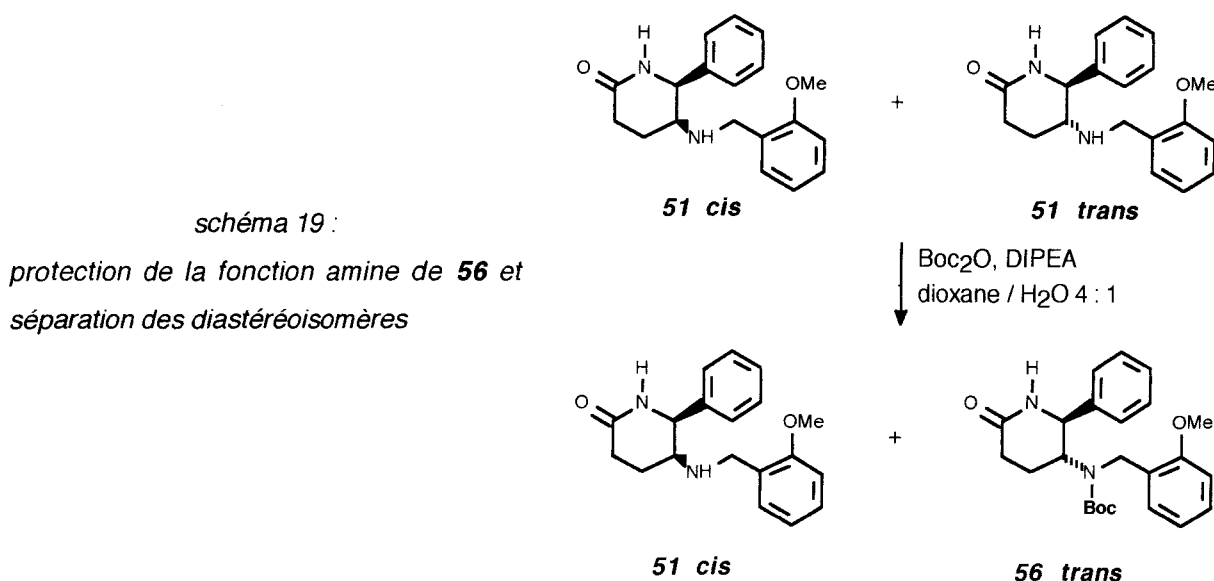
La conversion du groupement nitro en carbonyle peut être réalisée comme décrit, via une oxydation par l'ozone en présence de tert-butoxyde de potassium à -78°C . Toutefois, il a été préféré pour ce clivage oxydatif du nitronate, l'utilisation de TiCl_3 selon une méthode décrite par McMurry (McMurry et Melton, 1973). Elle permet d'obtenir la cétone **53** avec 85% de rendement.

La réduction de l'oxime (formée sur la cétone **53** par action de l'hydroxylamine) est réalisée par hydrogénation catalytique sur nickel de Raney. Elle permet d'obtenir un mélange *cis* / *trans* d'amine **55** dans des proportions indéterminées. Notons que la publication fait état d'un mélange 75 : 25 mais ceci n'a pas été directement vérifié dans notre cas ; en effet, nous avons conduit l'amination réductrice sur le couple de diastéréoisomères par action de l'ortho-méthoxybenzaldéhyde dans le méthanol en présence de cyanoborohydrure de sodium. Une purification de **51** par chromatographie sur gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 / MeOH 98 : 2) permet d'obtenir l'isomère minoritaire pur avec 3% de rendement. L'analyse de

son spectre de RMN révèle qu'il s'agit du stéréoisomère *trans* ($J_{H5-H6} = 7,5$ Hz). Un deuxième lot correspondant au stéréoisomère majoritaire légèrement souillé par la présence du composé *trans* a été isolé avec environ 90% de rendement brut ; nous n'avons pas cherché à le purifier plus finement.

B.2.2.2. Protection de la fonction amine et séparation des diastéréoisomères de **51**

Nous avons réalisé la protection de l'amine par le groupement tert-butoxycarbonyle (Boc) acido-sensible sur les diastéréoisomères *cis* / *trans* de **51**, en supposant que les produits carbamatés seraient plus aisés à séparer. Nous avons alors été amenés à constater que la mise en place du groupement Boc par le dicarbonate de di-tert-butyle dans un mélange dioxane / eau 4 : 1 en présence de DIPEA, ne se faisait que sur l'amine du dérivé **51 trans** (minoritaire) ; le composé **51 cis** ne subit pas la protection et garde sa fonction amine libre. Sa séparation du dérivé *trans* carbamaté est donc largement facilitée. -schéma 19- Le dérivé *trans* protégé sur la fonction amine n'a pas été caractérisé précisément puisque sa stéréochimie ne correspondait pas à celle attendue. Toutefois, les quantités de produit obtenues nous permettent d'évaluer les proportions du mélange *cis* / *trans* de **51** à 75 : 25, ce qui vérifie, *a posteriori*, celles données par Desai (1993 b) pour le mélange *cis* / *trans* de **55**.



B.2.2.3. Bilan

L'amination réductrice du mélange des diastéréoisomères de **55** suivie de la mise en place du groupement Boc permet donc, du fait de la protection sélective du dérivé **51 trans**, le facile isolement du composé **51 cis** avec 65% de rendement -schéma 20-. Il a été caractérisé par RMN et présente un couplage J_{H5-H6} de 3,7 Hz. Il se pourrait que l'explication de cette sélectivité soit dans l'encombrement stérique de la fonction amine du dérivé **51 cis**, ce qui laisse espérer la possibilité d'une acylation spécifique de l'amine intracyclique du dérivé *cis* réduit ((±) CP99994).

B.2.3. Synthèses du (\pm)CP99994 et du composé **17**

B.2.3.1. Synthèse du (\pm) CP99994

La réduction par le borane ($\text{BH}_3\text{-SMe}_2$) dans le THF du dérivé **51 cis**, permet d'accéder directement au CP99994 sous forme racémique avec 65% de rendement -schéma 20-. Une analyse des spectres de RMN du proton à une et deux dimensions (COSY-DQF et ROESY) permet de confirmer la structure de la molécule et en particulier sa stéréochimie cis. Par ailleurs, il est possible, d'après le spectre ROESY d'avancer la position équatoriale du groupement phényle qui est suggérée par Desai et collaborateurs (1992)

B.2.3.2. Synthèse du composé **17**

Conscients du fait qu'il était impossible de protéger l'amine extracyclique du dérivé **51 cis** par un groupement Boc encombré, nous avons cherché à acyler spécifiquement l'amine intracyclique du CP99994. Un couplage peptidique avec le synthon **30** par la méthode EDCI / HOBT a été réalisé -schéma 20-. Il permet d'accéder au dérivé **17**.

Un problème de stéréochimie doit alors être soulevé. Le fait d'opter pour un couplage utilisant un ester activé optiquement pur peut déboucher sur une amidification stéréosélective ne se faisant que sur un seul énantiomère du mélange racémique de CP99994 et nous fait courir le risque d'une acylation stéréosélective de l'énantiomère (2R,3R) de CP99994 (forme qui ne présente aucune affinité pour les récepteurs NK1).

La mesure du pouvoir rotatoire de **17** ne permet pas de savoir si l'on est en présence d'un produit optiquement pur ((S)Pro-(2S,3S)pipéridine ou (S)Pro-(2R,3R)pipéridine) ou d'un mélange de deux diastéréoisomères ((S)Pro-(2S,3S)pipéridine et (S)Pro-(2R,3R)pipéridine).

La mise en oeuvre d'un couplage

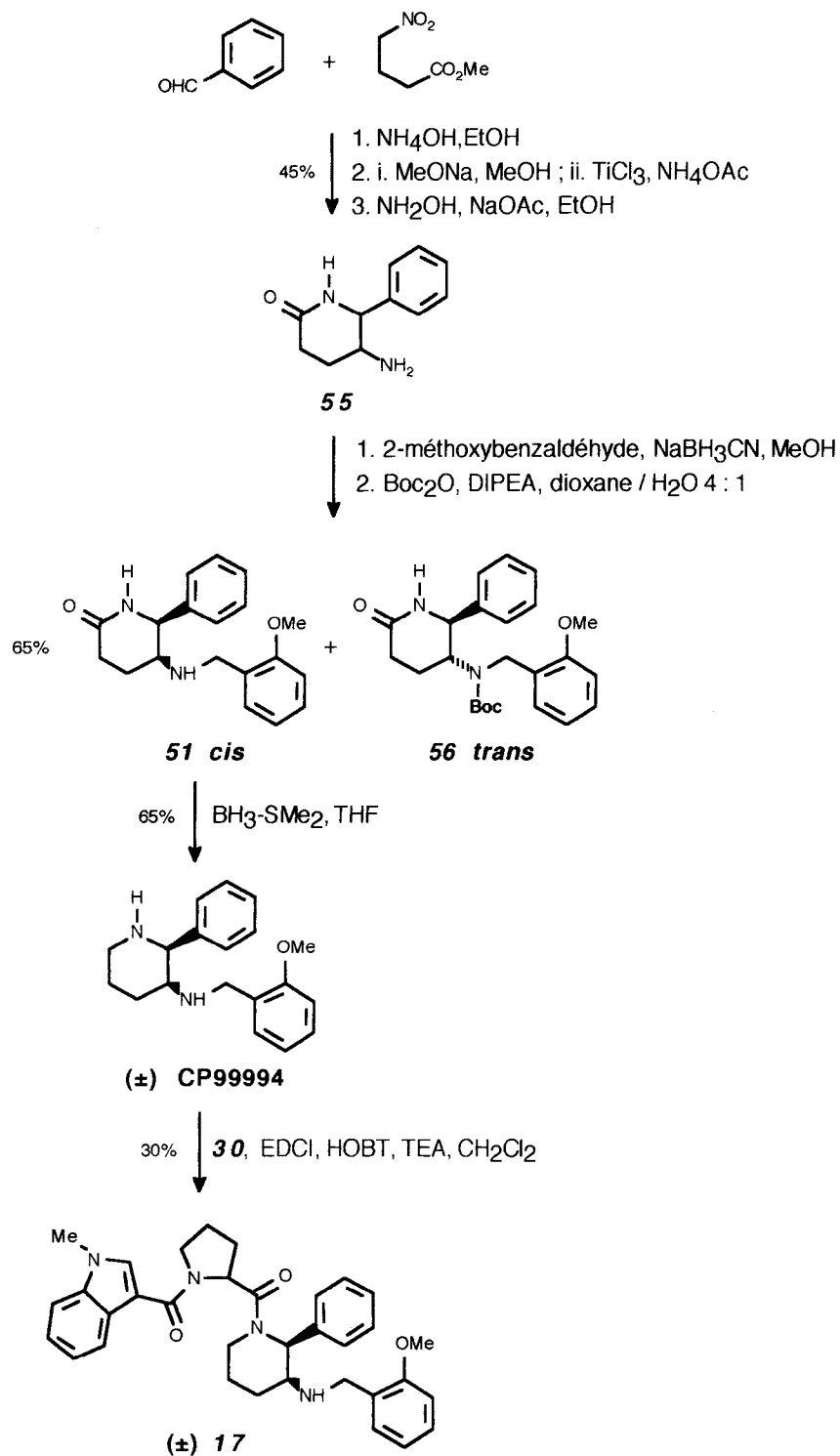
- soit avec la forme R de **30** qui fournirait respectivement le produit **17** pur ((R)Pro-(2R,3R)pipéridine ou (R)Pro-(2S,3S)pipéridine) ou le mélange ((R)Pro-(2R,3R)pipéridine et (R)Pro-(2S,3S)pipéridine)

- soit avec (\pm) **30**

ne permettrait pas d'aller plus loin dans les conclusions et n'a donc pas été réalisée.

Seule une synthèse stéréospécifique (préparation de (2S,3S)-CP99994 et couplage avec la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl](S)-proline **30** donnerait une réponse sans ambiguïté. Mais cette méthode n'a pas été développée vu l'intérêt moindre que présentaient ces composés pour notre recherche de squelettes originaux.

schéma 20 : synthèses du (±)CP99994 et du composé (±)17



B.3. SYNTHÈSE DE DERIVES POSSEDANT UN SQUELETTE 2-OXO-3-BENZYL-1,2,3,4-TETRAHYDROQUINOXALINE

-complété dans l'annexe III-

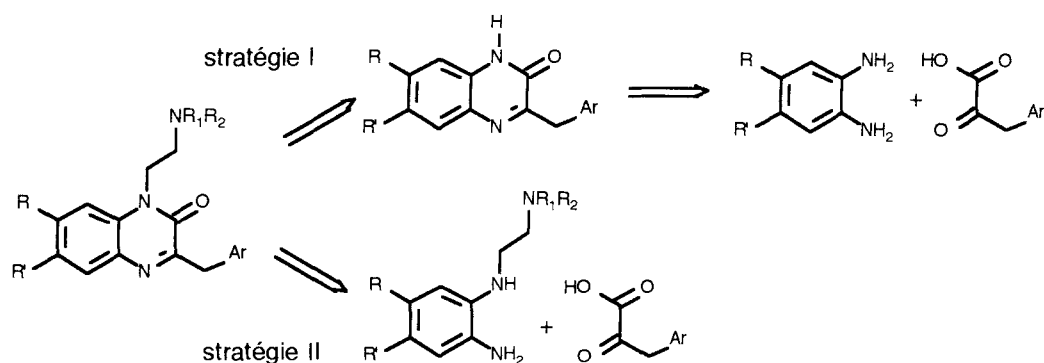
B.3.1. Stratégie de synthèse

La méthode de synthèse envisagée est inspirée de la préparation de la carovérine (Zellner et al., US 3,028,384, 1962), une N-aminoéthyl-dihydroquinoxalone. Les procédés revendiqués dans le brevet peuvent se classer en deux catégories principales selon l'amine de départ utilisée :

- une première stratégie consiste à prendre comme produit de départ l'orthophénylènediamine (ou un précurseur) et à n'alkyler l'atome d'azote qu'après cyclisation -schéma 21-

- la deuxième méthode utilise l'orthophénylènediamine déjà correctement N-alkylée pour cycliser en dernière étape -schéma 21-.

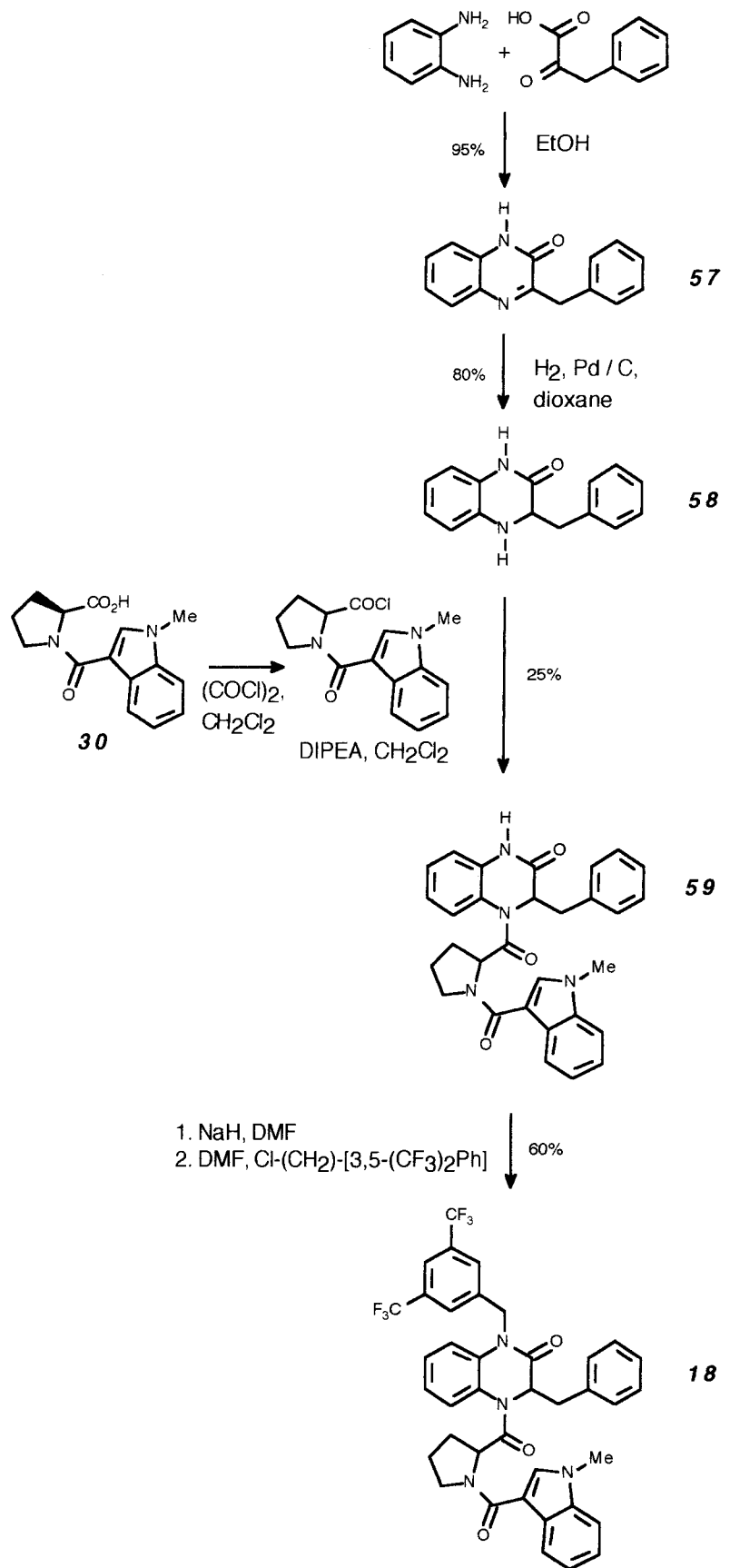
schéma 21 : voies rétrosynthétiques pour la préparation de 1-aminoéthyl-2-oxo-1,2-dihydroquinoxalines



La variabilité des substituants des atomes d'azote des produits que nous pouvions avoir à préparer, nous a conduit à choisir la première voie c'est-à-dire celle fournissant d'abord une dihydroquinoxalone non substituée -schéma 22-. Puis, des essais infructueux d'alkylation de la position 1 de **57** nous ont poussé à d'abord réduire ce dernier composé. Enfin, après acylation de la fonction amine de **58** (qui conduit au dérivé **59**), l'amide a pu être alkylé pour donner **18**.

Une stratégie similaire a été éprouvée pour la préparation d'une autre structure élaborée autour du même squelette mais devant rester confidentielle ; elle est reportée dans la partie annexe -annexe III-.

schéma 22 :
synthèse du composé **18**



B.3.2. Préparation de la 2-oxo-3-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **58**

-schéma 22-

La 2-oxo-3-benzyl-1,2,-dihydroquinoxaline **57** est préparée, avec un rendement de 95% par chauffage de l'orthophénylènediamine et de l'acide phénylpyruvique dans l'éthanol. Sa réduction en **58** peut alors être réalisée, soit par utilisation des hydrures (NaBH_4 dans le dioxane) avec un rendement pouvant aller jusqu'à 70%, soit par hydrogénation catalytique à pression normale avec un rendement allant jusqu'à 80%. Notons toutefois que, dans un cas comme dans l'autre, la réaction est difficile à conduire totalement. Le produit de départ **57** et le produit réduit **58** dont les comportements chromatographiques sont très voisins sont souvent isolés simultanément. Les conditions opératoires mises en oeuvre lors des étapes ultérieures permettent néanmoins d'utiliser **58** sans purification poussée.

B.3.3. Acylation de la 2-oxo-3-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **58**

L'acylation de **58** par un dérivé du synthon N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline **30** permet d'accéder au produit **59**. Elle requiert le couplage de **58**, racémique, avec **30** que l'on possède sous forme optiquement pure. Sachant que l'étape suivante dans la préparation du composé **18** se fait selon des conditions qui peuvent être racémisantes, nous n'avons pas cherché à conserver la stéréochimie de **30** et nous avons préparé son chlorure d'acide pour acyler **58**. Le dérivé **59** a pu ainsi être préparé mais le rendement reste faible (25%). -schéma 22-

La mesure du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = 0^\circ$) de **59** permet de vérifier qu'il y a bien eu racémisation du centre asymétrique de la proline à cause de l'activation de la fonction acide de **30** par un fort groupement attracteur -schéma 23-. Toutefois cette analyse n'est pas suffisante pour révéler si l'on est en présence d'un seul ou des deux couples d'énantiomères ((R)Pro-(S)benzylquinoxaline / (S)Pro-(R)benzylquinoxaline et (R)Pro-(R)benzylquinoxaline / (S)Pro-(S)benzylquinoxaline) selon qu'il y ait couplage stéréosélectif ou pas.

schéma 23 : effet d'un couplage stéréosélectif ou non stéréosélectif entre **30** (Pro) (racémisé ou non) et **58** (BQ) sur le pouvoir rotatoire de **59** (Pro-BQ)

composé	couplage avec 30 racémisé		couplage avec 30 non racémisé	
	couplage stéréosélectif	couplage non stéréosélectif	couplage stéréosélectif	couplage non stéréosélectif
30 + 58	(R)Pro+(S)Pro + (R)BQ+(S)BQ	(R)Pro+(S)Pro + (R)BQ+(S)BQ	(S)Pro + (R)BQ+(S)BQ	(S)Pro + (R)BQ+(S)BQ
↓	↓	↓	↓	↓
59	(R)Pro-(R)BQ+(S)Pro-(S)BQ <u>ou</u> (R)Pro-(S)BQ+(S)Pro-(R)BQ	(R)Pro-(R)BQ+(S)Pro-(S)BQ <u>et</u> (R)Pro-(S)BQ+(S)Pro-(R)BQ	(S)Pro-(S)BQ <u>ou</u> (S)Pro-(R)BQ	(S)Pro-(S)BQ <u>et</u> (S)Pro-(R)BQ
pouvoir rotatoire [α]	= 0°	= 0°	≠ 0°	≠ 0°

B.3.4. Benzyltion de la 2-oxo-3-benzyl-4-acyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **59**

La benzyltion du dérivé **59** par le chlorure de 3,5-bistrifluorométhylbenzyle est réalisée par alkylation de l'amidate de sodium généré *in situ* par action de l'hydrure de sodium dans le DMF. Elle permet d'obtenir le dérivé souhaité (**18**) avec 60% de rendement.

B.4. SYNTHESE DE 1,2,3,4-TETRAHYDROQUINOXALINES

-complété dans l'annexe IV-

B.4.1. Stratégie de synthèse envisagée

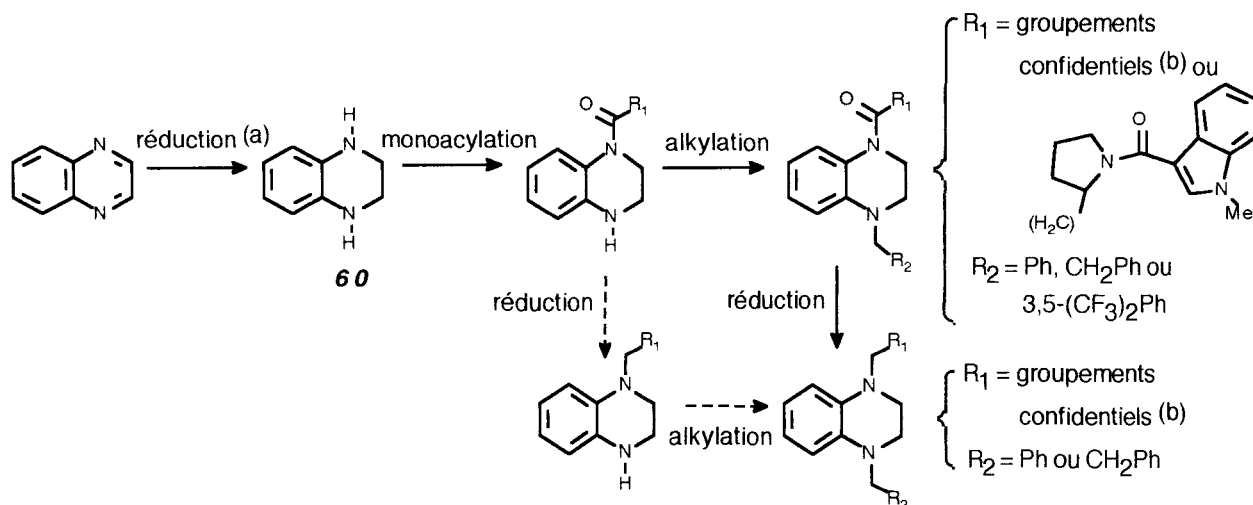
Deux types de composés ont été préparés :

- des N-acyl-N'-alkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines
- des N,N'-dialkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines

Pensant que la monoalkylation de la tétrahydroquinoxaline, diamine symétrique pouvait s'avérer délicate, nous avons d'abord élaboré un schéma de synthèse s'inspirant des considérations de Cavagnol et Wiselogle (1947) -schéma 24 -.

Dans cette stratégie, la 1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **60** (préparée à partir de la quinoxaline commerciale par hydrogénation sur catalyseur d'Adams) doit d'abord être acylée. Compte-tenu de l'effet attracteur du groupement, on peut penser que la nucléophilie du second atome d'azote sera diminuée ce qui favorisera la monoacylation aux dépens de la diacylation. Le produit monoacylé pourra alors être alkylé puis éventuellement réduit ; une alternative pour la préparation des dérivés dialkylés consisterait à d'abord réduire le composé monoacylé pour substituer le second atome d'azote ensuite.

schéma 24 : stratégie générale envisagée pour la préparation des dérivés de la tétrahydroquinoxaline



(a) : Cavagnol et Wiselogle (1947) ; (b) : les substituants devant rester confidentiels, ils sont simplement repris dans la partie annexe IV

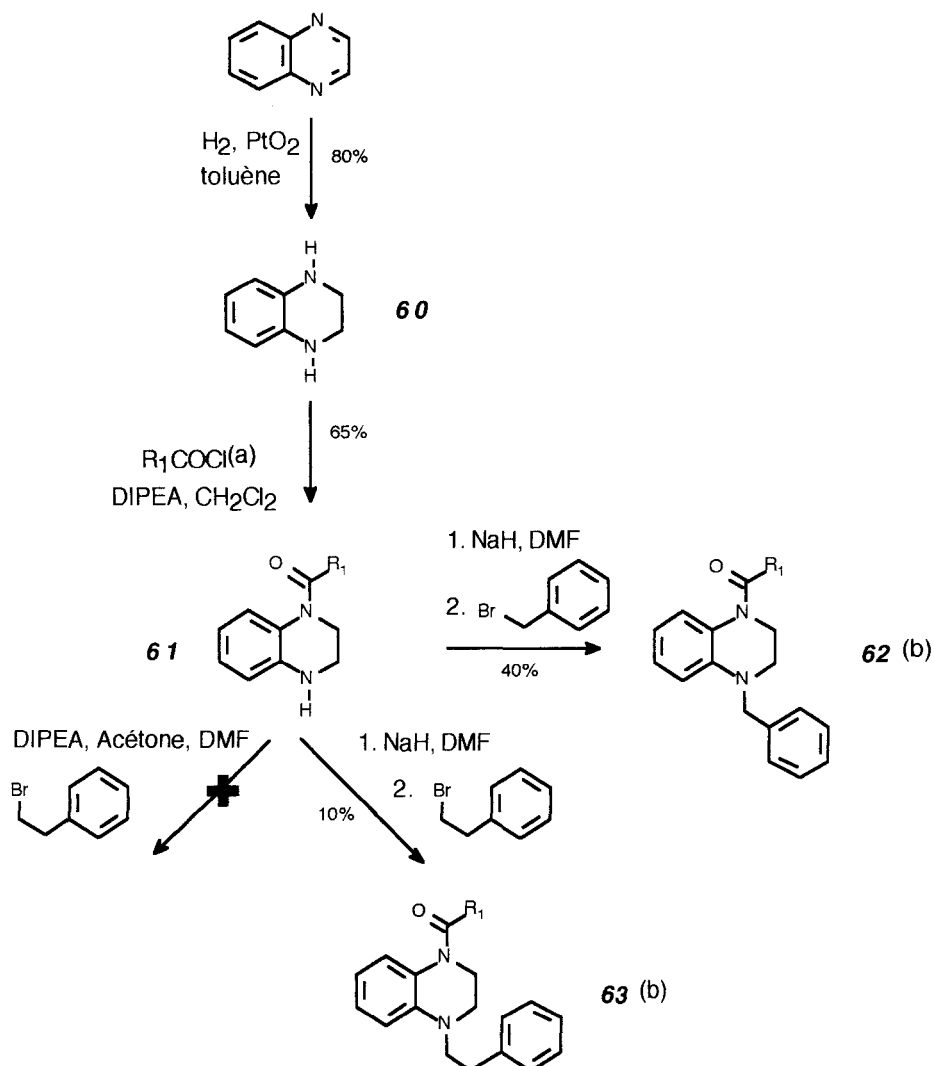
B.4.2. Préparation des N-acyl-N'-alkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines

La méthode de synthèse a d'abord été mise au point sur des dérivés ne possédant pas la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]propyle. Toutefois, ces structures devant rester confidentielles, la stratégie est décrite de façon générale et le détail concernant les substituants est reporté dans la partie annexe IV.

Le procédé a ensuite été éprouvé pour la préparation des dérivés **19**, **20** et **21**.

B.4.2.1. Alkylation d'une tétrahydroquinoxaline monoacylée : mise en évidence de difficultés opératoires lors de l'alkylation par un dérivé pouvant subir une déhydrohalogénéation

schéma 25 : préparation de N-acyl-N'-alkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines selon une stratégie consistant à i. acyler, ii. alkyler la tétrahydroquinoxaline



(a) : R_1 = groupements confidentiels détaillés en annexe ; (b) : composés appartenant aux structures confidentielles **22**, **23**, **24** ou **25**

Dans la stratégie prévue, une 1-acyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **61** est d'abord préparée à partir de **60** avec des rendements de l'ordre de 65% -schéma 25-. Notons qu'il convient de prendre quelques précautions afin de réduire au maximum la diacylation malgré-tout visible : ajout goutte à goutte du dérivé chloré, à froid.

L'étape suivante consiste à substituer le second atome d'azote. Pour l'alkylation par un groupe phénéthyle, un procédé classique de substitution d'Hoffmann (bromure de phénéthyle, DIPEA, acétone, DMF) ne donne pas de résultats. Afin d'augmenter la nucléophilie de l'atome d'azote, nous avons formé *in situ* l'anion correspondant par action de l'hydrure de sodium. Toutefois, ces conditions réactionnelles fortement basiques peuvent favoriser une réaction d'élimination sur le bromure de phénéthyle et ne permettent d'obtenir le produit attendu **63** qu'avec 10% de rendement. Une autre stratégie a donc dû être élaborée.

Néanmoins, si l'agent électrophile, par exemple le bromure de benzyle, ne peut donner lieu à une déhydrohalogénéation, la méthode (i. acylation ; ii. alkylation) peut être éprouvée : elle permet d'obtenir **62** à partir de **61** avec un rendement voisin de 40% -schéma 25-.

B.4.2.2. Nouvelle stratégie pour la préparation de 1-acyl-4-alkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines

a. préparation de 1-alkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines

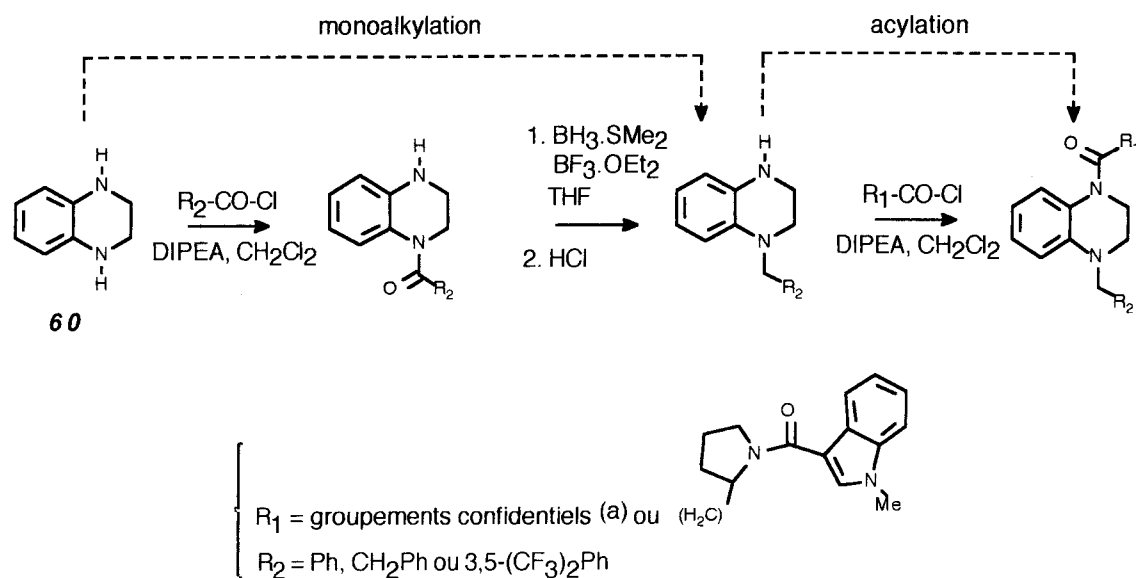
L'alkylation d'une 1-acyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline, même si elle donne accès aux produits attendus, ne permet d'obtenir que de faibles rendements. Une nouvelle stratégie a donc été élaborée -schéma 26- : elle commence par l'alkylation d'un atome d'azote de la 1,2,3,4- tétrahydroquinoxaline pour fournir des 1-alkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines ; le groupement acyle n'est introduit qu'en dernière étape.

La monoalkylation de la tétrahydroquinoxaline **60** est possible avec des rendements élevés en procédant en deux étapes -schéma 27- :

- i. acylation d'un atome d'azote
- ii. réduction de la fonction amide formée.

Cette réduction fait appel à une méthode décrite pour la réduction d'amides secondaires et tertiaires; elle est réalisée par le borane-sulfure de diméthyle en présence d'éthérate de trifluorure de bore (Brown et al, 1981). Elle fournit les dérivés **67**, **68** et **69** à partir de **64**, **65** et **66** respectivement avec des rendements variant entre 60 et 85%. Les produits monoalkylés peuvent alors être acylés.

schéma 26 : Nouvelle stratégie pour la préparation de 1-acyl-4-alkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines



(a) : détaillés en annexe IV

b. Préparation de la 1-acyl-4-alkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 63

L'acylation, dans des conditions classiques, de **69** permet de préparer **63** avec des rendements voisins de 30% -schéma 27- ; les détails sont reportés en annexe IV.

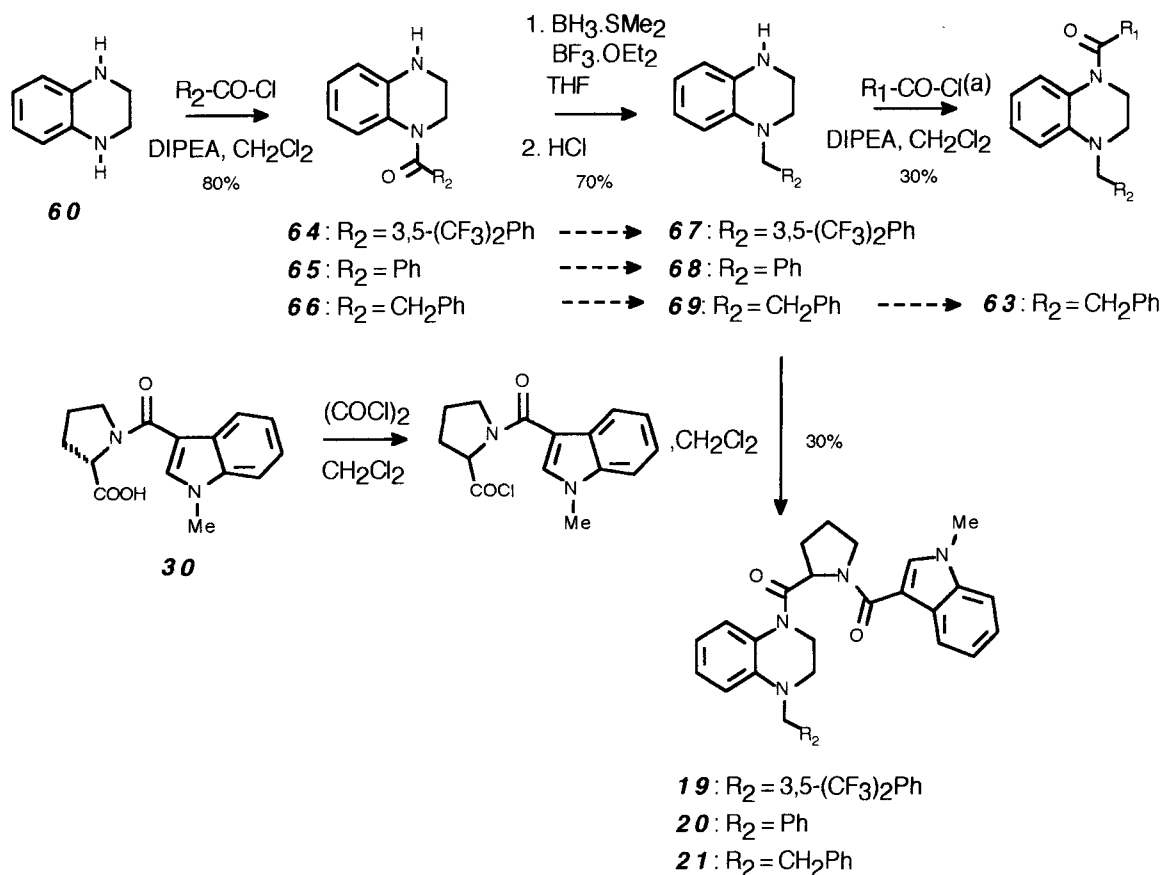
c. Préparation de la 1-acyl-4-alkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline possédant la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]prolyle (19, 20 et 21)

Trois 1-acyl-4-alkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines possédant la chaîne N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]prolyle ont été préparées -schéma 27-.

La préparation de **21** requiert le couplage du synthon **30**, optiquement actif, avec la tétrahydroquinoxaline **69**. Nous avons d'abord essayé un couplage peptidique classique (EDCI, HOBT) non racémisant. Mais la méthode s'avère impossible à utiliser ; le produit de départ est récupéré en intégralité. Nous avons donc acylé **69** par le chlorure d'acide de **30** pour obtenir **21** mais avec un rendement encore faible (25%).

Par la mesure du pouvoir rotatoire de **21** ($[\alpha]_D^{25^\circ C} = 0^\circ$), nous avons pu vérifier une nouvelle fois, que le fait d'activer l'acide **30** par un fort groupement attracteur induit la racémisation du centre chiral. Notons que la séparation des énantiomères a pu être réalisée grâce à l'utilisation d'une technique de HPLC sur gel de silice chiral.

Nous avons préparé de la même manière les dérivés **19** et **20** par acylation de **67** et de **68** respectivement. Pour ces deux composés la séparation des énantiomères n'a pas été réalisée.

schéma 27 : préparation des 1-acyl-4-alkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines **19**, **20**, **21** et **63**

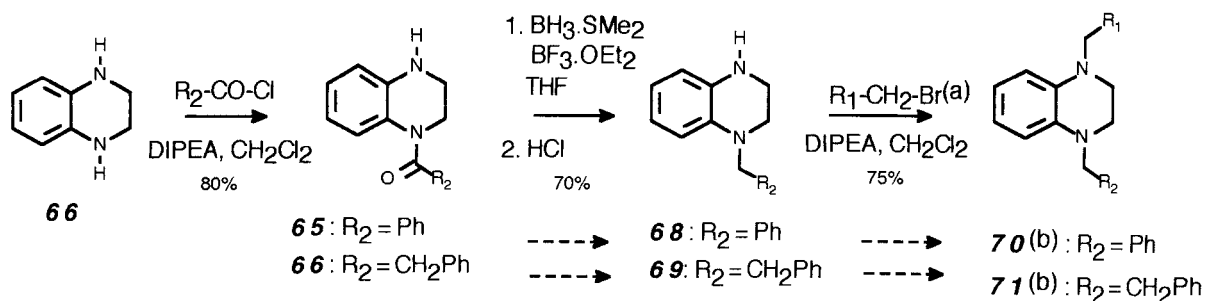
N.B. les rendements sont indicatifs du fait des différents produits préparés selon le même protocole ;
 (a) : détails reportés en annexe IV

B.4.3. Préparation de 1,4-dialkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines

Pour la préparation de 1,4-dialkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines, une stratégie similaire à la précédente a été éprouvée -schéma 28-. Elle demande :

- la monoalkylation du premier atome d'azote qui se fait en deux étapes (i. acylation, ii. réduction)
- l'alkylation du second atome d'azote de la tétrahydroquinoxaline monoalkylée.

schéma 28 : Préparation de 1,4-dialkyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxalines



N.B. les rendements sont indicatifs du fait des différents produits préparés selon le même protocole ;
 (a) : détails reportés en annexe IV; (b) : composés appartenant aux structures confidentielles **22**, **23**, **24** ou **25**

Notons que cette alkylation qui était difficile sur les produits monoacylés est réalisée dans des conditions classiques de substitution d'Hoffmann (BrCH_2R_1 , DIPEA, CH_2Cl_2). La nucléophilie de l'atome d'azote n'est donc pas diminuée, ce qui confirme, *a posteriori*, qu'il eut été difficile de monoalkyler directement la 1,2,3,4- tétrahydroquinoxaline.

B.5. SYNTHÈSE DE DERIVES POSSEDANT UN SQUELETTE PIPÉRAZINE -reporté en intégralité en annexe V-

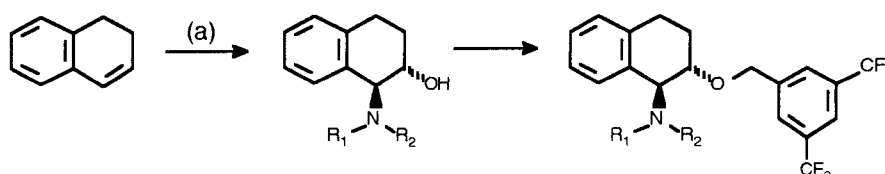
Tous les composés possédant un squelette pipérazine que nous avons préparés sont soumis à une clause de confidentialité. La description de leur synthèse est donc reportée en intégralité dans la partie annexe V.

B.6. SYNTHÈSE DE DERIVES A SQUELETTE 1-AMINO-2-[3,5-BIS-(TRIFLUOROMETHYL)BENZYLOXY]-1,2,3,4-TÉTRAHYDRONAPHTALÈNE

B.6.1. Stratégie de synthèse

La préparation de 1-amino-2-[3,5-bis(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène est fondée sur la synthèse de *trans*-1-amino-1,2,3,4-tétrahydronaphtalèn-2-ol (Sugihara et al., 1978) à partir du 1,2-dihydronaphtalène commercial. L'éthérisation de la fonction alcool par un groupement 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle est réalisée en dernier lieu. -schéma 29-

schéma 29 : stratégie générale pour la préparation de 1-amino-2-[3,5-bis(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène



(a) : Sugihara et al., 1978

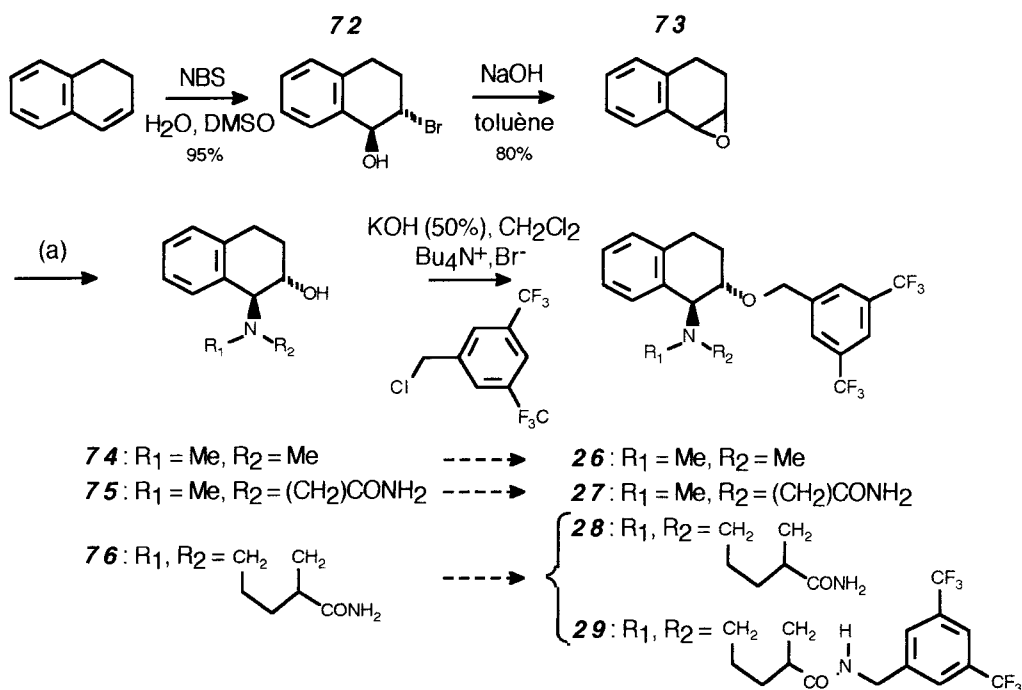
B.6.2. Préparation de *trans*-1-amino-1,2,3,4-tétrahydronaphtalèn-2-ol

Sugihara et ses collaborateurs (1978) ont reporté la préparation régiosélective de 1-amino-1,2,3,4-tétrahydronaphtalèn-2-ol à partir de 1,2-époxy-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène ; ils ont par ailleurs montré la stéréochimie relative *trans* des substituants en positions 1 et 2 par analyse de spectres de RMN et par la possibilité d'accéder à des 1,2-aziridine-1,2,3,4-tétrahydronaphtalènes à partir de 1-amino-1,2,3,4-tétrahydronaphtalèn-2-ol.

Nous avons donc éprouvé cette méthode pour la préparation des dérivés **74**, **75** et **76** -schéma 30-

Le *trans*-2-bromo-1,2,3,4-naphtalèn-1-ol **72** est préparé par action du N-bromosuccinimide sur le 1,2-tétrahydronaphtalène dans le DMSO contenant une faible quantité d'eau. Une déhydrohalogénéation par l'hydroxyde de sodium dans le toluène permet alors d'obtenir le 1,2-époxy-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène **73**. Ces deux étapes procèdent selon un rendement global de 80%.

schéma 30 : synthèse des 1-amino-2-[3,5-bis(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalènes **26**, **27**, **28** et **29**



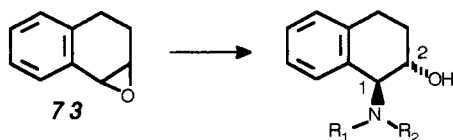
(a) : conditions opératoires reportées dans le tableau 26

L'ouverture de l'époxyde est réalisée par action d'une amine secondaire (diméthylamine, sarcosinamide ou prolinamide) dans le méthanol -tableau 26-.

- La réaction de **73** avec la diméthylamine (en solution à 40% dans l'eau) se fait "rapidement" (6 heures) et permet d'obtenir **74** avec de bons rendements -tableau 26-. L'analyse du spectre de RMN du chlorhydrate de **74** (en solution dans le DMSO-d₆ additionné de D₂O) montre un doublet (J = 8Hz) à 4,55 ppm correspondant au proton benzylique H₁ et un multiplet à 4,35 ppm correspondant au proton H₂. Les déplacements chimiques corroborent l'ouverture régiosélective en position 1 de l'époxyde par l'amine ; par ailleurs, la constante de couplage mesurée établit la stéréochimie relative trans des groupements amino et hydroxy.

- La réaction de **73** avec la sarcosinamide (respectivement la prolinamide) demande des temps réactionnels beaucoup plus longs et procède avec des rendements plus faibles -tableau 26-. L'analyse des spectres de RMN (déplacement chimique et figure de couplage) confirme là encore la régiosélectivité de l'attaque ainsi que la stéréochimie relative des substituants du naphthalène.

tableau 26: conditions opératoires mises en oeuvre pour l'ouverture de l'époxyde **73** par une amine et déplacements chimiques caractéristiques des produits **74**, **75** et **76** formés



composés préparés	conditions opératoires	temps de réaction	rendement	$\delta(H_1)$ (ppm)	$\delta(H_2)$ (ppm)
74 R ₁ = Me R ₂ = Me	NHMe ₂ MeOH, H ₂ O	6 h	80%	4,55 (a) d (J = 8 Hz)	4,35 (a) m
75 R ₁ = Me, R ₂ = CH ₂ CONH ₂	NHMe-(CH ₂)-CONH ₂ ·HCl DIPEA, MeOH	50 h	55%	3,65 (b) d (J = 8 Hz)	3,8 (b) m
76 R ₁ , R ₂ = 	 MeOH, 50°C	40 h	42%	3,75 (b) d (J = 7,35 Hz)	3,9 (b) m

(a) : spectre de RMN ¹H (300 MHz) du chlorhydrate enregistré dans DMSO-d₆ +D₂O ; (b) : spectre de RMN ¹H (300 MHz) enregistré dans le DMSO-d₆

B.6.3. Benzylation des composés **74**, **75** et **76**

Pour la benzylation du composé **74**, nous avons dans un premier temps mis en oeuvre la méthode de Williamson (action du chlorure de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle sur l'alcoolate de **74** formé *in situ* par l'hydroxyde de potassium dans le DMF). Toutefois, ces conditions réactionnelles ne permettent pas la réaction souhaitée : le produit de départ est récupéré en totalité.

Nous avons donc réalisé l'alkylation de **74** par le chlorure de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle en milieu biphasique (solution aqueuse à 50% d'hydroxyde de potassium, dichlorométhane) en utilisant un catalyseur de transfert de phase (bromure de tétrabutylammonium). Cette méthode permet d'obtenir **26** avec 45% de rendement -schéma 30- .

La benzylation de **75** (respectivement **76**) a été effectuée selon le même procédé et a permis d'obtenir **27** (respectivement **28**) avec 65% (respectivement 25%) de rendement. Notons que lors de l'alkylation de **76** par transfert de phase, la formation du dérivé **29**, dibenzylé (sur la fonction alcool et sur la fonction amide) est évaluée à 15% -schéma 30-.

Par ailleurs, l'analyse par HPLC de la pureté du chlorhydrate de **28** (qui possède trois centres asymétriques dont deux (les carbones C1 et C2 du cycle tétrahydronaphtalène) ont une stéréochimie relative fixe (trans), imposée par la voie de synthèse utilisée) a révélé la présence de deux diastéréoisomères (diast. A / diast. B) dans les proportions 15 : 85 -tableau 27- ; ils ont pu être séparés par recristallisation dans l'acétonitrile. Il est à noter que le dérivé majoritaire (diast. B) est resté en solution ; le composé minoritaire (diast. A) a précipité en totalité, mais souillé par 10% du diastéréoisomère B.

tableau 27 : *temps de rétention des diastéréoisomères de 28*

conditions d'HPLC : colonne Novapak C8, élution isocratique sol. A / sol. B 1 : 9, débit : 1ml / min

composé 28	t_R (min)
diast A	13,5
diast B	14,5

CHAPITRE IV :

PHARMACOLOGIE

Les travaux pharmacologiques réalisés sur les différents produits que nous avons préparés ont été effectués à l'Institut de Chimie Pharmaceutique de Lille et à UCB Secteur Pharmaceutique.

Les propriétés pharmacologiques des nouvelles molécules antagonistes potentiels de la SP peuvent être évaluées selon deux niveaux successifs :

- évaluation des propriétés *in vitro* . Deux séries de tests peuvent alors être réalisés :
 - mesure de l'affinité pour le récepteur NK1 (binding)
 - mesure de l'activité antagoniste sur organes isolés ; une expérience consiste à mesurer l'inhibition des contractions d'un organe isolé suscitée par la SP.
- évaluation des propriétés *in vivo* (développées plus spécifiquement dans le cadre de la thérapeutique de l'asthme). Deux tests sont alors possibles :
 - le KONZETT qui consiste à prévenir le bronchospasme et / ou la létalité induits par la SP injectée par voie i.v chez le cobaye ou délivrée en aérosol
 - la prévention de l'augmentation des taux de SP induite par l'installation d'une inflammation chronique chez le rat (elle-même produite par l'injection de particules de céphadex au niveau des poumons).

L'évaluation du potentiel pharmacologique des produits que nous avons préparés n'a été réalisée qu'*in vitro*, par des tests de binding. Ils ont été mis au point par N. Mestdagh pour les premiers et par J.F. Goossens pour les seconds, en collaboration avec l'unité de binding du Drug Discovery de la firme UCB Secteur Pharmaceutique.

□ L'affinité des molécules pour les récepteurs NK1 peut être mesurée dans de telles expériences puisque des ligands radioactifs sont commerciaux. La substance P est disponible marquée radioactivement soit à l'iode 125 soit au tritium. Notre préférence s'est orientée vers l'utilisation de la [4,5-³H-Leu¹⁰]substance P disponible auprès de la firme CRB (Aharony et al., 1991).

□ Les récepteurs NK1 peuvent être obtenus à partir de diverses sources : des lignées de cellules humaines telles IM-9 (Payan et al., 1984 ; Payan et al., 1986) et U373 MG (Heuillet et al., 1993) ou différents tissus animaux, comme les poumons de cobaye (Fujii et al., 1992) par exemple.

Des différences inter-espèces ont été démontrées en ce qui concerne la liaison d'antagonistes et la littérature fait état, nous l'avons vu, de récepteurs NK1 du type "rat / souris" ou encore du type "cobaye / humain". Dans ces conditions, le choix s'est porté sur l'utilisation de cellules humaines IM-9 pour la mise au point d'un premier test de binding.

Le récepteur NK1 humain peut également être exprimé dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) transfectées par le gène humain codant pour la protéine. Une autre expérience utilisant ce type de cellules a été élaborée pour évaluer l'affinité des produits

CONCLUSION

□ Au vu des rôles de la SP dans de nombreux mécanismes physiologiques et physiopathologiques, la découverte d'antagonistes puissants de ses récepteurs NK1 apparaît comme une opportunité pour, non seulement une meilleure connaissance des implications du neuropeptide dans l'organisme, mais surtout pour la découverte de nouvelles classes de médicaments.

Notre travail s'inscrivait dans ce cadre très général de la mise en évidence d'antagonistes de la SP à potentialité antiasthmatique et avait pour objectif l'élaboration de N.C.E., ligands des récepteurs NK1.

□ Nous avons structuré notre recherche autour d'une stratégie fondée sur une meilleure connaissance des mécanismes de reconnaissance moléculaire des ligands du récepteur. Les données bibliographiques de biologie moléculaire nous ont conduit à fonder nos hypothèses de travail sur des antagonistes connus peptidiques (FK888) ou non peptidiques (CP96345, CP99994, L709-210, L733-060, L732-138 et LY303-870) plutôt que sur la SP elle-même.

De leur étude, nous avons pu mettre en évidence la possibilité d'existence de deux pharmacophores différents pour les inhibiteurs de la liaison de la SP. Les deux se développent autour d'un noyau aromatique et d'un groupement benzylique porté par un hétéroatome. Ce dernier permet de faire la discrimination entre les deux types de pharmacophores :

- groupement benzylique monosubstitué en ortho par un méthoxy, voire non substitué pour le pharmacophore de type I

- groupement benzylique disubstitué en méta par des trifluorométhyles pour le pharmacophore de type II.

Pour chaque classe, nous avons d'abord mis en évidence un lead peptidique que nous avons pu modifier pour mettre en évidence des N.C.E. ligands de la protéine NK1 :

- trois squelettes présentant une liaison modeste pour le récepteur de la SP s'articulent autour des pharmacogroupements de type I ; il s'agit

- de la 1-benzyl-3-([2-(méthoxybenzyl)amino]éthyl)indole (**7**) qui présente un pKi de 6,0
- d'une 1-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline (**23**), pKi = 5,9
- d'une pipérazine (**77**), pKi = 6,5.

Ces deux dernières molécules présentent un caractère confidentiel et ne sont dévoilées qu'en annexe.

- une structure affine pour les récepteurs NK1 s'inscrit dans le pharmacophore de type II ; il s'agit

- de la 1-(N-diméthylamino)-2-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydro-naphtalène (**26**), pKi = 7,4.

□ Ces molécules doivent constituer le point de départ pour de nouvelles investigations qui peuvent permettre d'augmenter l'affinité, de mettre en évidence l'activité et de compléter les connaissances sur les pharmacophores. Par ailleurs, sous réserves d'éventuelles modulations leur concédant une grande originalité, elles pourraient prétendre à un développement thérapeutique.

PARTIE EXPERIMENTALE

A. APPAREILLAGES ET TECHNIQUES ANALYTIQUES

□ Différentes caractéristiques physico-chimiques (F, IR, RMN, SM) complémentaires ont été analysées pour les composés préparés. Pour les intermédiaires de synthèse, seules des données déterminantes sont reportées.

- Les points de fusion (F) ont été repérés à l'aide d'un appareil Büchi SMP20. Ils sont exprimés en °C.
- Les spectres IR ont été réalisés sur un spectrographe Perkin-Elmer 297. Pour leur enregistrement, les produits solides ont été dispersés dans du bromure de potassium et les liquides déposés sous forme de film sur une pastille de KBr. Les signaux caractéristiques sont repérés par leur nombre d'onde (en cm^{-1}).

Pour les produits ne présentant pas d'absorption distinctive, il n'est pas fait référence au spectre.

- Les spectres de RMN ^1H (80 MHz et 300 MHz) ont été enregistrés dans le laboratoire d'application de RMN, Service Commun de Physicochimie de l'Université de Lille II, sur des appareils à transformées de Fourier Brücker WP80SY et Brücker AC300P.

Les spectres de RMN ^1H (250 MHz) ont été réalisés par le Service d'Analyses Structurales d'UCB Secteur Pharmaceutique, sur un appareil Brücker AM250.

Sauf spécification contraire, les spectres sont enregistrés à température ambiante. Chaque signal est repéré par son déplacement chimique (δ en ppm), son intensité (nombre de H), sa multiplicité et éventuellement sa constante de couplage (J, exprimée en Hertz). Dans le cas de 'multiplets larges', celle-ci n'est pas mesurable.

- Les spectres de masse ont été réalisés par le Service d'Analyses Structurales d'UCB Secteur Pharmaceutique :
 - les spectres de type impact électronique (EI) ont été enregistrés sur un spectromètre quadripolaire Funnigan TSQ700 (couplé à un système de contrôle DEC)
 - les spectres de type FAB ont été enregistrés sur le même appareil en mode "FAB GUN".

Les signaux principaux sont repérés par leur rapport m/e et les fragments auxquels ils correspondent sont identifiés.

- Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur un appareil Perkin-Elmer 241 muni d'une lampe au sodium (589 nm) ; la cellule mesure 10 cm de long et possède un volume de 20 ml.

□ La pureté des produits devant subir des tests pharmacologiques a été vérifiée par HPLC analytique, puis par les analyses élémentaires.

- Les analyses par HPLC ont été réalisées selon trois types de conditions :
 - conditions I : appareil Waters Delta Prep 4000 équipé d'une colonne 'phase inverse' à compression radiale (Novapak C8 4 μ m 100 x 8 mm). Les produits sont détectés à l'aide d'un détecteur UV à trois longueurs d'ondes ($\lambda = 230$ nm ; $\lambda = 254$ nm ; $\lambda = 280$ nm)
 - conditions II (réalisées à UCB) : appareil Hewlett-Packard 1090 Liquid chromatograph équipé d'une colonne 'phase inverse' (Licrospher 60RP-select B C8 5 μ m 250 x 4,6mm). Les produits sont détectés par balayage UV de 210 à 350 nm.
 - conditions III : appareil Kontron 325 System équipé d'une colonne 'phase inverse' (Licrospher RP8 5 μ m 250 x 4,6mm). Les produits sont détectés par balayage UV de 200 à 400 nm.

Les analyses par HPLC sur gel de silice chiral ont été réalisées par M. E. Cavoy à UCB, Secteur Pharmaceutique sur un appareil Hewlett-Packard 1050 équipé d'une colonne de type Chiralpak AD 250 x 4,6mm (sauf spécification contraire) thermostatée à $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Les produits sont détectés à l'aide d'un détecteur à barrettes de diodes.

Dans tous les cas, les éluants sont spécifiés. Les solutions A ou B sont quelquefois utilisées ; elles correspondent aux mélanges suivants :

- solution A : H₂O / MeOH / PicB8 (5mM) 80 : 15 : 5
- solution B : H₂O / MeOH / PicB8 (5mM) 10 : 85 : 5.

L'éluion peut se faire selon un mode isocratique ou suivant un gradient d'éluion (Grad50) :

- t = 0 mn sol. A / sol. B 85 : 15
- t = 10 mn sol. A / sol. B 15 : 85
- t = 20 mn sol. A / sol. B 15 : 85

- Les analyses élémentaires ont été réalisées par le Service Central d'Analyse -Département Analyse élémentaire- du CNRS (F. 69390 Vernaison). Une marge d'erreur de $\pm 0,4\%$ est tolérée sur les pourcentages trouvés.

□ Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de gel de silice 60 F₂₅₄ d'épaisseur 0,2 mm (référence : 5735 Merck), révélées par UV (254 nm et 366 nm) et iode.

Les chromatographies sur colonne de gel de silice ont été réalisées sous de faibles pressions (entre 1 et 3 bars) sur gel de silice 60 Merck de granulométrie 0,040-0,063 mm, référence 9385.5000 Merck.

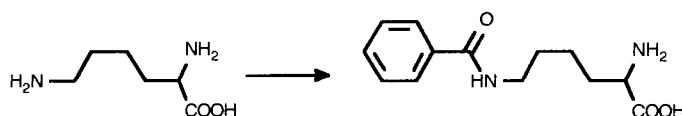
B. PROTOCOLES CHIMIQUES

Nous détaillons dans cette partie les différents protocoles expérimentaux élaborés pour la synthèse des différents produits en les classant suivant leur ordre d'apparition dans le chapitre III.

B.1. SYNTHÈSE DES TRIPEPTIDES $N\epsilon$ -Bz- $N\alpha$ -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl ET DES DIPEPTIDES $N\epsilon$ -Bz- $N\alpha$ -Z-Lys-Ala-OBzl ET $N\epsilon$ -Bz- $N\alpha$ -Z-Lys-Sar-OBzl

Les différentes synthèses sont conduites à partir d'acides aminés pris optiquement purs.

Synthèse de la $N\epsilon$ -benzoyl-Lysine ($N\epsilon$ -Bz-Lys)



A une solution de lysine (sous forme de chlorhydrate) (5 g ; 27,4 mmol) dans l'eau est ajouté $\text{CuCO}_3\text{-Cu(OH)}_2$ (7 g ; 31,6 mmol) par petites fractions. Le mélange est porté à 50°C et agité pendant 30 mn, puis refroidi. Après filtration de l'excès $\text{CuCO}_3\text{-Cu(OH)}_2$, la solution est portée à 0-5°C. Le chlorure de benzoyle (3,2 ml ; 27,5 mmol) et 13,8 ml de solution 2N de soude sont ajoutés. Après vérification du pH qui doit être compris entre 9 et 10, le mélange réactionnel est laissé sous agitation vigoureuse à température ambiante pendant 16 heures.

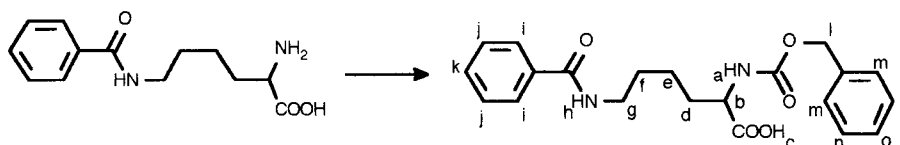
Le précipité formé est filtré, lavé à l'éthanol et mis en suspension dans l'eau. 680 ml d'une solution à 15 g / l d'EDTA sont ajoutés et la suspension est chauffée jusqu'à dissolution du sel. La solution est filtrée à chaud puis refroidie. La $N\epsilon$ -benzoyl-Lysine précipite sous forme d'une poudre blanche. Elle est isolée par filtration (rendement : 41%).

R_f : 0,8 (AcOH / H_2O / BuOH / AcOEt 1 : 1 : 1 : 1)

E : 260-263°C

$\overline{\text{IR}}$ (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:
 3200-3500 (OH)
 3250-3350 (NH)
 1650 (CO)

Synthèse de la $N\epsilon$ -benzoyl- $N\alpha$ -benzyloxycarbonyl-Lysine ($N\epsilon$ -Bz- $N\alpha$ -Z-Lys)



A une solution (maintenue entre 0 et 5°C et agitée vigoureusement) de $N\epsilon$ -Bz-Lys (3 g ; 12 mmol) dans 10 ml de soude 2N est ajouté le chloroformiate de benzyle (2,05 ml ; 14,3 mmol).

Après 16 heures, la solution est reprise dans 30 ml d'eau, lavée à l'éther (2 x 20 ml), acidifiée jusqu'à pH = 2-3 par une solution d'acide chlorhydrique concentrée et extraite par CH₂Cl₂ (3 x 60 ml). La phase organique est séchée sur MgSO₄ et évaporée pour donner N ϵ -Bz-N α -Z-Lys avec 95% de rendement.

Rf : 0,7 (CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1)

E : 60-62°C

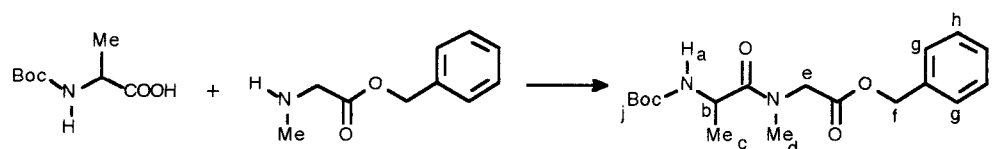
IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

3200-3400	(OH, NH)
1720	(CO acide)
1680	(CO carbamate)
1630	(CO amide)

RMN (80 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) :

1,45	(m, 6H, Hd+He+Hf)
3,35	(m, 2H, Hg)
4,3	(m, 1H, Hb)
5,0	(s, 2H, Hl)
5,85	(dl, 1H, Ha)
6,9	(tl, 1H, Hh)
7,4	(m, 8H, Hi+Hj+Hm+Hn)
7,85	(dl, 2H, Hk+Ho)
8,95	(s, 1H, Hc)

Synthèse du N-tert-butoxycarbonyl-Alanine-Sarcosinate de benzyle (N-Boc-Ala-Sar-OBzl)



A une solution (maintenue à 0°C) de Boc-Ala (3 g ; 15,9 mmol) dans 30 ml CH₂Cl₂ anhydre sont ajoutés le HOBT (3,2 g ; 23,7 mmol), la TEA (3,3 ml ; 23,7 mmol) et l'EDCI (4,56 g ; 23,7 mmol). Après une heure sont rajoutés 5,6 g de sarcosinate de benzyle (sous forme de paratosylate) (15,9 mmol) et 2,2 ml de TEA (15,8 mmol) dissous dans 30 ml de CH₂Cl₂. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 16 heures.

Il est alors lavé par HCl 1N (2 x 30 ml), par l'eau (1 x 30 ml), par une solution aqueuse de NaHCO₃ à 10% (2 x 30 ml) et de nouveau par l'eau (1 x 30 ml). Après séchage sur MgSO₄ et évaporation du solvant, le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : hexane / AcOEt 7 : 3) pour donner N-Boc-Ala-Sar-OBzl avec 92% de rendement.

Rf : 0,35 (hexane / AcOEt 7 : 3)

IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

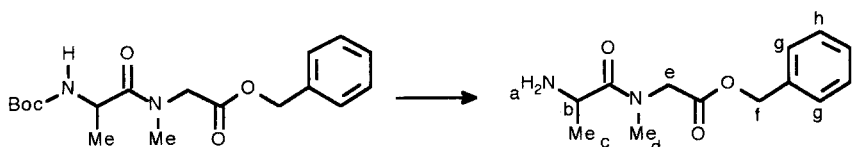
3200-3600	(NH)
1740	(CO ester)
1690	(CO carbamate)
1640	(CO amide)

RMN (300 MHz, DMSO-d6) : δ (ppm) :

deux conformations sont visibles (conf 1 / conf 2 75 : 25)

1,05	(d, J = 7,05 Hz, 3H conf 2, Hc)	4,5	(m, 1H, Hb)
1,1	(d, J = 6,8 Hz, 3H conf 1, Hc)	4,55	(d -système AB-, J = 18,3 Hz, 1H conf 2, He')
1,,35	(s, 9H, Hj)	5,1	(s, 2H conf 1, Hf)
2,8	(s, 3H conf 2, Hd)	5,15	(s, 2H conf 2, Hf)
3,1	(s, 3H conf 1, Hd)	6,95	(d, J = 7,7 Hz, 1H conf 1, Ha)
3,95	(d -système AB-, J = 17,2 Hz, 1H conf 1, He)	7,05	(d, J = 7,5 Hz, 1H conf 2, Ha)
4,25	(d -système AB-, J = 18,0 Hz, 1H conf 2, He)	7,4	(m, 5H, Hg+Hh+Hi)
4,3	(d -système AB-, J = 17,2 Hz, 1H conf 1, He')		

Synthèse de l'Alanine-Sarcosinate de benzyle (Ala-Sar-OBzl) (chlorhydrate)



Une solution de N-Boc-Ala-Sar-OBzl (2 g ; 2,85 mmol) dans le dioxane (20 ml) est refroidie à 0°C puis saturée en acide chlorhydrique.

Après 30 minutes, le solvant est éliminé ; le brut est repris plusieurs fois dans le dioxane. Ala-Sar-OBzl sous forme de chlorhydrate précipite alors. Il est filtré, lavé à l'hexane puis l'éther diéthylique et recristallisé dans l'acétonitrile (rendement 77%)

Rf : 0,7 (AcOH / H₂O / BuOH / AcOEt 1 : 1 : 1 : 1)

E : 168-171°C

IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

3300-3500	(NH)
1730	(CO ester)
1640	(CO amide)

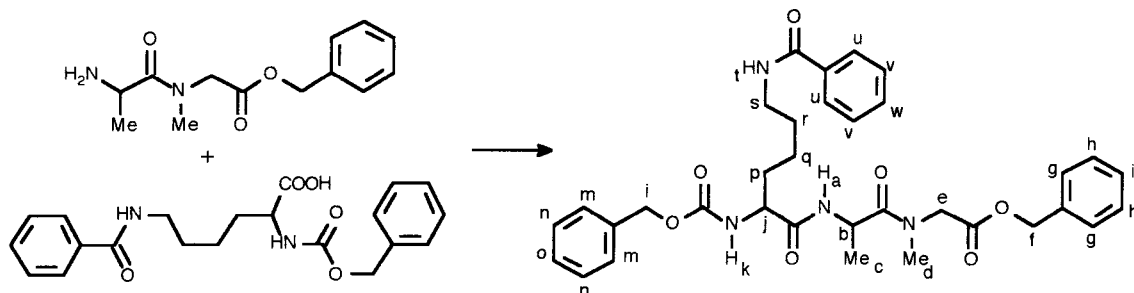
RMN (300 MHz, DMSO-d6) : δ (ppm) :

deux conformations sont visibles

(conf 1 / conf 2 75 : 25)

1,2	(d, J = 6,95 Hz, 3H conf 2, Hc)
1,5	(d, J = 6,8 Hz, 3H conf 1, Hc)
2,9	(s, 3H conf 2, Hd)
3,1	(s, 3H conf 1, Hd)
4,1	(d -système AB-, J = 17,3 Hz, 1H conf 1, He)
4,3	(d -système AB-, J = 16,7 Hz, 1H conf 1, He')
4,35	(d -système AB-, J = 17,3 Hz, 1H conf 2, He)
4,45	(m, 1H, Hb)
4,5	(d -système AB-, J = 17,5 Hz, 1H conf 2, He')
5,15	(s, 2H, Hf)
7,4	(m, 5H, Hg+Hh+Hi)
8,2	(s, 3H, NH ₃ ⁺)

Synthèse des isomères (R,R), (S,R) et (R,S) du N ϵ -benzoyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine-Alanine-Sarcosinate de benzyle (N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl)



A une solution (maintenue à 0°C) de N ϵ -Bz-N α -Z-Lys (1,5 g ; 3,9 mmol) dans 20 ml CH₂Cl₂ anhydre sont ajoutés le HOBT (0,8 g ; 5,8 mmol), la TEA (0,8 ml ; 5,8 mmol) et l'EDCI (1,12 g ; 5,8 mmol). Après une heure est ajoutée une solution de 1,12 g de Ala-Sar-OBzl (chlorhydrate) (3,9 mmol) et 0,5 ml de TEA (3,9 mmol) dans 20 ml de CH₂Cl₂. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 16 heures.

Il est alors lavé par HCl 1N (2 x 20 ml), par l'eau (1 x 20 ml), par une solution aqueuse de NaHCO₃ à 10% (2 x 20 ml) et de nouveau par l'eau (1 x 20 ml). Après séchage sur MgSO₄ et évaporation du solvant, le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : CH₂Cl₂ / AcOEt 5 : 5) pour donner N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl sous forme d'huile. Le tripeptide est alors précipité ((R,R) dans l'éther diéthylique ; (S,R) et (R,S) dans l'hexane) puis lavé à l'éther (rendement # 45%).

Caractéristiques communes aux trois isomères :

R_f : 0,75 (CH₂Cl₂ / EtOH 9 : 1)

SM (FAB) :

617 MH⁺

IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

3200-3500 (NH)
1730 (CO ester)
1700 (CO carbamate)
1625-1640 (CO amides)

Temps de rétention :

HPLC sur gel de silice C8 -conditions I- ;
éluant : grad 50 ; débit 1 ml / min
t_R = 17,1 min
pureté : 100%

RMN (300 MHz, DMSO-d6) : δ (ppm) :

deux conformations sont visibles (conf 1 / conf 2 75 : 25)

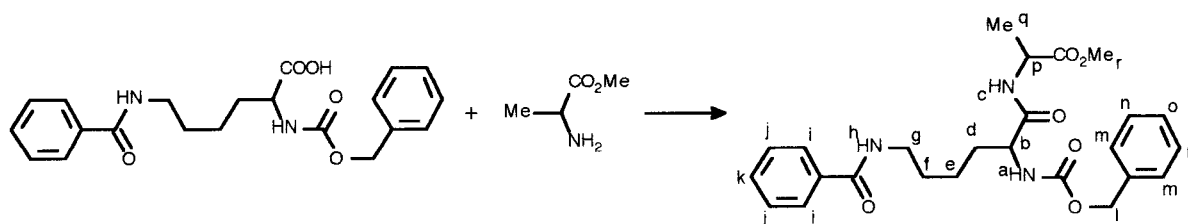
1,05	(d, J = 6,7 Hz, 3H conf 2, Hc)	4,6	(d -système AB-, J = 18,0 Hz, 1H conf 2, He')
1,1	(d, J = 6,75 Hz, 3H conf 1, Hc)		
1,3	(m, 2H, Hq)	4,75	(m, 1H, Hb)
1,55	(m, 4H, Hp+Hr)	4,95	(s, 2H conf 2, Hi)
2,8	(s, 3H conf 2, Hd)	5,0	(s, 2H conf 1, Hi)
3,05	(s, 3H conf 1, Hd)	5,1	(s, 2H conf 1, Hf)
3,2	(m, 2H, Hs)	5,15	(s, 2H conf 2, Hf)
4,0	(d -système AB-, J = 17,2 Hz, 1H conf 1, He)	7,5	(m, 13H, Hg+Hh+Hi+Hm+Hn+Ho+Hu+Hv+Hw)
4,0	(m, 1H, Hj)	7,8	(d, J = 7,3 Hz, 2H, Hu)
4,25	(d -système AB-, J = 18,0 Hz, 1H conf 2, He)	8,1	(d, J = 7,5 Hz, 1H, Hk)
4,3	(d -système AB-, J = 17,2 Hz, 1H conf 1, He')	8,2	(d, J = 7,8 Hz, 1H, Ha)
		8,4	(t, J = 5,3 Hz, 1H, Ht)

Caractéristiques différenciant les trois isomères :

isomère	F	pouvoir rotatoire spécifique [α] _D ^{25°C} (c = 1, EtOH)	Temps de rétention HPLC sur gel de silice chiral (a) t _R (min)
(R,R)	85-88°C	31,3°	11,0
(S,R)	75-78°C	13,4°	10,6
(R,S)	69-72°C	-14,5°	19,0

(a) : éluant : EtOH abs. ; débit 1 ml / min

Synthèse du N ϵ -benzoyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine-Alaninate de méthyle (N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-OMe)



A une solution (maintenue à 0°C) de N ϵ -Bz-N α -Z-Lys (3 g ; 7,8 mmol) dans 20 ml CH₂Cl₂ anhydre sont ajoutés le HOBT (1,58 g ; 11,7 mmol), la TEA (1,65 ml ; 11,8 mmol) et l'EDCI (2,25 g ; 11,7 mmol). Après une heure sont ajoutés 1,09 g d'alaninate de méthyle (sous forme de chlorhydrate) (7,8 mmol) et 1,1 ml de TEA (7,9 mmol) dissous dans 10 ml de CH₂Cl₂. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 16 heures.

Il est alors lavé par HCl 1N (2 x 20 ml), par l'eau (1 x 20 ml), par une solution aqueuse de NaHCO₃ à 10% (2 x 20 ml) et de nouveau par l'eau (1 x 20 ml). Après séchage sur MgSO₄ et évaporation du solvant, N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-OMe est obtenu sous forme de poudre avec 89% de rendement.

Rf : 0,75 (CH₂Cl₂ / MeOH 7 : 3)

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:

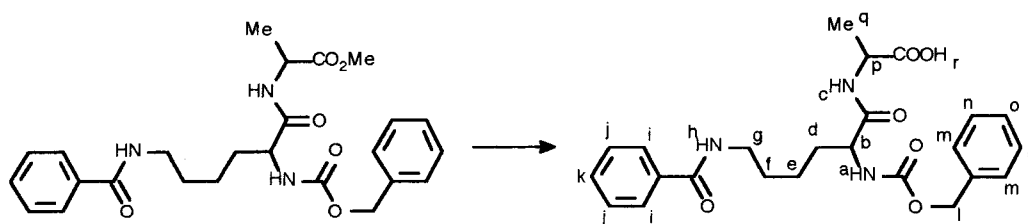
3200-3400	(NH)
1740	(CO ester)
1680	(CO carbamate)
1640	(CO amide)

E = 167-169°C

RMN (300 MHz, CDCl₃) : $\delta(\text{ppm})$:

1,35	(d, J = 6,4 Hz, 3H, Hq)
1,45	(m, 2H, He)
1,65	(m, 2H, Hd)
1,85	(m, 2H, Hf)
3,45	(m, 2H, Hg)
3,7	(s, 3H, Hr)
4,2	(m, 1H, Hp)
4,55	(m, 1H, Hb)
5,3	(s, 2H, Hl)
5,65	(dl, 1H, Ha)
6,55	(tl, 1H, Hh)
6,8	(dl, 1H, Hc)
7,3	(m, 8H, Hi+Hj+Hm+Hn)
7,75	(dl, 2H, Hk+Ho)

Synthèse de la N ϵ -benzoyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine-Alanine (N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala)



A une solution de N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-OMe (2 g ; 4,26 mmol) dans 30 ml d'éthanol sont ajoutés 3 ml d'une solution 2N de soude. Le mélange réactionnel est chauffé à 40°C pendant une heure puis dilué dans 20 ml d'eau.

Après évaporation de l'éthanol, la phase aqueuse est lavée par l'acétate d'éthyle (2 x 15 ml), acidifiée jusqu'à pH = 6.

Un solide blanc précipite. Il est isolé par filtration, lavé à l'eau et séché. N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala est obtenu avec 88% de rendement.

Rf : 0,4 (CH₂Cl₂ / EtOH 5 : 5)

E = 189-192°C

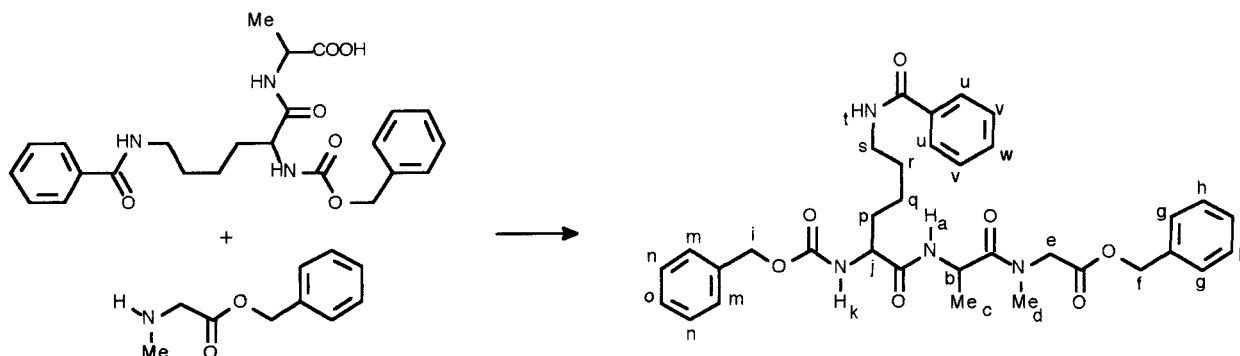
IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:

3200-3500	(OH, NH)
1730	(CO acide)
1670	(CO carbamate)
1630	(CO amide)

RMN (300 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) : $\delta(\text{ppm})$:

1,3	(d, J = 7,2 Hz, 3H, Hq)
1,3 à 1,75	(m, 6H, Hd+He+Hf)
3,2	(m, 2H, Hg)
4,0	(m, 1H, Hp)
4,2	(m, 1H, Hb)
5,0	(s, 2H, Hl)
7,5	(m, 9H, Ha+Hi+Hj+Hm+Hn)
7,9	(d, J = 8,25 Hz, 2H, Hk+Ho)
8,2	(d, J = 7,1 Hz, 1H, Hc)
8,5	(t, J = 5,45 Hz, 1H, Hh)

Synthèse de l'isomère (S,S) du N ϵ -benzoyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine-Alanine-Sarcosinate de benzyle (N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl)



A une solution (maintenue à 0°C) de N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala (1,5 g ; 3,3 mmol) dans 20 ml CH₂Cl₂ anhydre sont ajoutés le HOBT (0,67 g ; 5 mmol), la TEA (0,7 ml ; 5 mmol) et l'EDCI (0,95 g ; 5 mmol). Après une heure est ajoutée une solution de 1,16 g de Sar-OBzl (sous forme de de paratosylate) (3,3 mmol) et 0,5 ml de TEA (3,3 mmol) dans 20 ml de CH₂Cl₂. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 16 heures.

Il est alors lavé par HCl 1N (2 x 20 ml), par l'eau (1 x 20 ml), par une solution aqueuse de NaHCO₃ à 10% (2 x 20 ml) et de nouveau par l'eau (1 x 20 ml). Après séchage sur MgSO₄ et évaporation du solvant, le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : AcOEt) pour donner N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-Sar-OBzl. Le tripeptide est alors recristallisé dans un mélange éther / AcOEt (rendement 72%). Il se présente sous forme d'un mélange de diastéréoisomères ((S,S) / (S,R) 76 : 24) qui sont séparés par HPLC préparative sur gel de silice chirale :

- colonne Chiralpak AD -diamètre = 10 cm, longueur = 50 cm-
- éluant : éthanol absolu
- débit 300 ml / min

Caractéristiques de l' isomère (S,S) :

Rf : 0,75 (CH₂Cl₂ / EtOH 9 : 1)

SM (FAB) :

617 MH⁺

E = 85-86°C

IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

3200-3500 (NH)
1730 (CO ester)
1700 (CO carbamate)
1625-1640 (CO amides)

Temps de rétention :

HPLC sur gel de silice C8 -conditions I-

éluant : Grad 50 ; débit 1 ml / min

t_R = 17,1 min

pureté : 100%

HPLC sur gel de silice chirale ;

éluant : EtOH abs ; débit 1 ml / min

t_R = 15,0 min

pouvoir rotatoire spécifique

[α]_D^{25°C} (c = 1, EtOH) = -31,3°

RMN (300 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) :

deux conformations sont visibles (conf 1 / conf 2 8 : 2)

1,25	(d, $J = 6,85$ Hz, 3H conf 2, Hc)	4,4	(d -système AB-, $J = 17,25$ Hz, 1H conf 2, He')
1,3	(d, $J = 6,85$ Hz, 3H conf 1, Hc)	4,9	(m, 1H, Hb)
1,35 à 1,95	(m, 6H, Hp+Hq+Hr)	5,05	(s, 2H, Hi)
2,95	(s, 3H conf 2, Hd)	5,15	(s, 2H conf 1, Hf)
3,1	(s, 3H conf 1, Hd)	5,2	(m, 2H conf 2, Hf)
3,4	(m, 2H, Hs)	5,45	(m, 1H, Hk)
3,9	(d -système AB-, $J = 17,3$ Hz, 1H conf 1, He)	6,4	(m, 1H, Ht)
4,0	(d -système AB-, $J = 17,25$ Hz, 1H conf 2, He)	6,8	(sl, 1H, Ha)
4,2	(m, 1H, Hj)	7,35	(m, 13H, Hg+Hh+Hi+Hm+Hn+Ho+Hv+Hw)
4,3	(d -système AB-, $J = 17,25$ Hz, 1H conf 1, He')	7,75	(d, $J = 6,85$ Hz, 2H, Hu)

Synthèse de la N_ϵ -tert-butoxycarbonyl- N_α -benzyloxycarbonyl-Lysine (N_ϵ -Boc- N_α -Z-Lys)



A une solution de N_α -Z-Lys (1 g ; 3,6 mmol) dans 20 ml d'un mélange DMF / H_2O 4 : 1 sont ajoutés 0,6 ml de TEA (7,2 mmol) puis 0,8 g de dicarbonate de di-tert-butyle (5,4 mmol).

Après 24 heures, le solvant est évaporé ; le brut est mis en suspension dans l'eau et extrait par l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée et évaporée pour donner N_ϵ -Boc- N_α -Z-Lys avec 91% de rendement.

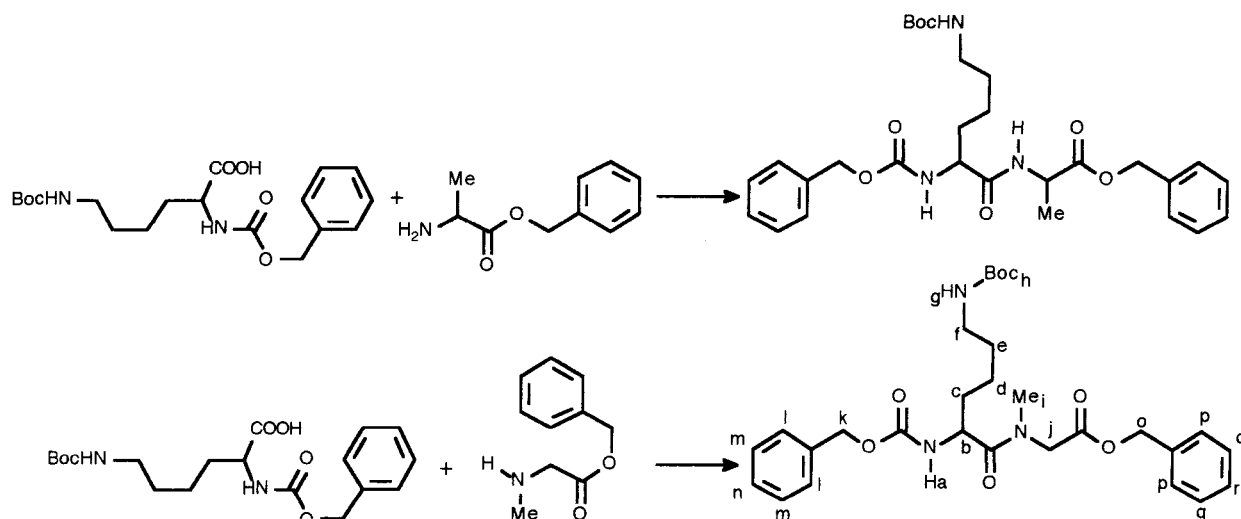
Rf : 0,5 (CH_2Cl_2 / MeOH 9 : 1)

E = 71-72°C

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:

3200-3400 (NH, OH)
1675 (CO)

Synthèse du N ϵ -tert-butoxycarbonyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine-Alaninate de benzyle (N ϵ -Boc-N α -Z-Lys-Ala-OBzl) et du N ϵ -tert-butoxycarbonyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine-Sarcosinate de benzyle (N ϵ -Boc-N α -Z-Lys-Sar-OBzl)



A une solution (maintenue à 0°C) de N ϵ -Boc-N α -Z-Lys (1 g ; 2,6 mmol) dans 20 ml CH₂Cl₂ anhydre sont ajoutés le HOBT (0,5 g ; 3,6 mmol), la TEA (0,5 ml ; 3,6 mmol) et l'EDCI (0,7 g ; 3,6 mmol). Après une heure est ajoutée une solution de 0,56 g de Ala-OBzl (chlorhydrate) (2,6 mmol) et 0,4 ml de TEA (2,6 mmol) dans 10 ml de CH₂Cl₂ [resp. une solution de 0,9 g de Sar-OBzl (sous forme de para-tosylate) (2,6 mmol) et 0,4 ml de TEA (2,6 mmol) dans 10 ml de CH₂Cl₂]. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 24 heures.

Il est alors lavé par HCl 1N (2 x 20 ml), par l'eau (1 x 20 ml), par une solution aqueuse de NaHCO₃ à 10% (2 x 20 ml) et de nouveau par l'eau (1 x 20 ml). Après séchage sur MgSO₄ et évaporation du solvant, les produits sont obtenus bruts avec 81% (resp. 85%) de rendement.

Caractéristiques de N ϵ -Boc-N α -Z-Lys-Sar-OBzl:

Rf: 0,7 (CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1)

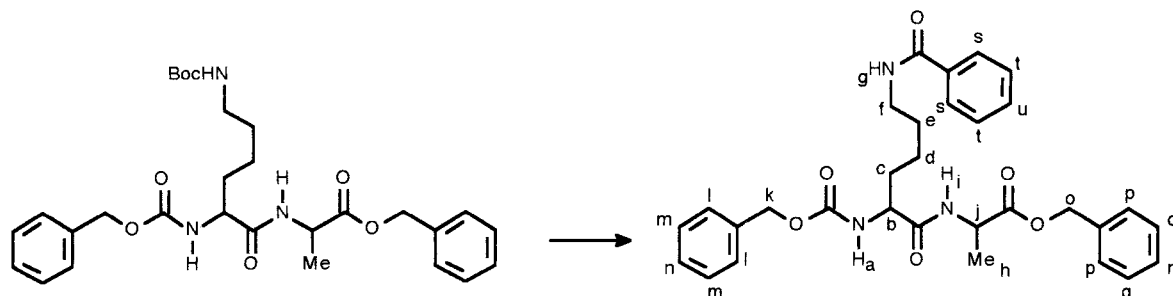
Caractéristiques de N ϵ -Boc-N α -Z-Lys-Ala-OBzl:

Rf: 0,9 (CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1)

RMN (80 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) :

1,4	(m, 15H, Hc+Hd+He+Hh)
2,8	(s, 3H, Hi)
3,2	(m, 2H, Hf)
5,0	(s, 2H, Hk)
5,1	(s, 2H, Ho)
7,4	(m, 10H, Hl+Hm+Hn+Hp+Hq+Hr)

Synthèse des quatre stéréoisomères du N ϵ -benzoyl-N α -benzyloxycarbonyl-Lysine-Alaninate de benzyle (N ϵ -Bz-N α -Z-Lys-Ala-OBzl)



A une solution maintenue à 0°C de N ϵ -Boc-N α -Z-Lys-Ala-OBzl (2 g ; 3,7 mmol) dans le dichlorométhane est additionné l'acide trifluoroacétique (4,2 g ; 37 mmol). Après 5 heures, le solvant est évaporé et le brut repris dans le dichlorométhane. La solution est portée à 0°C et le chlorure de benzoyle (520 mg ; 3,7 mmol) est ajouté au mélange réactionnel.

Après 24 heures, la phase organique est lavée par une solution aqueuse de NaHCO₃ à 10% (2 x 20 ml), par l'eau (1 x 20 ml), par HCl 1N (2 x 20 ml) et de nouveau par l'eau (1 x 20 ml), séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le dipeptide obtenu est recristallisé dans l'isopropanol (rendement # 50%)

Caractéristiques communes aux quatre isomères :

R_f : 0,3 (hexane / AcOEt 3 : 7)

SM (FAB) :

546 M⁺

Temps de rétention :

HPLC sur gel de silice C8 -conditions II- ;

éluant : grad 50 ; débit 1 ml / min

t_R = 10,9 min

pureté : 100%

IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

3250 (NH)

1610-1710 (CO)

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) :

1,3 (d, J = 6,1 Hz, 3H, Hh)

1,3 à 1,65 (m, 6H, Hc+Hd+He)

3,2 (dd, J = 12,5 Hz, J' = 6,6 Hz, 2H, Hf)

4,05 (m, 1H, Hb)

4,3 (m, 1H, Hj)

5,0 (s, 2H, Hk)

5,1 (s, 2H, Ho)

7,25 à 7,55 (m, 14H, Ha+Hl+Hm+Hn+Hp+Hq+Hr+Ht+Hu)

7,8 (dd, J = 6,8 Hz, J' = 1,6 Hz, 2H, Hs)

8,35 (d, J = 7,2 Hz, 1H, Hi)

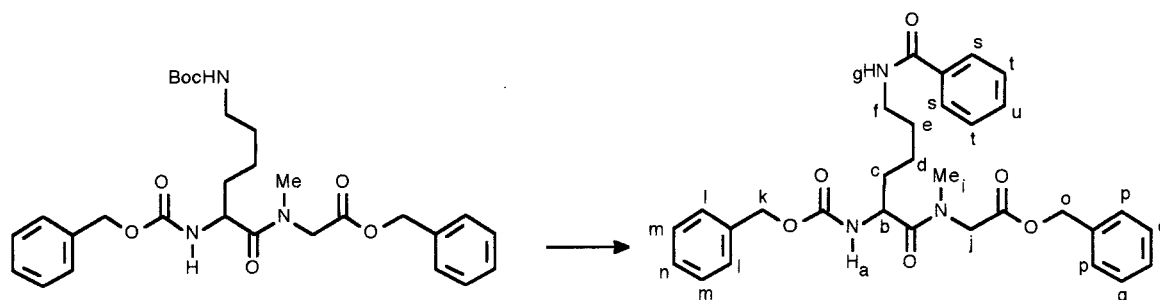
8,45 (t, J = 5,5 Hz, 1H, Hg)

Caractéristiques différenciant les quatre isomères :

isomère	α	pouvoir rotatoire spécifique [α] _D ^{25°C} (c = 1, EtOH)	Temps de rétention HPLC sur gel de silice chirale (a) t _R (min)
(R,R)	167,3-165,4°C	25,85°	4,7
(S,S)	165,8-166,0°C	-27,1°	7,35
(S,R)	157,0-157,1°C	7,6°	7,15
(R,S)	157,9-158,0°C	8,0°	5,7

(a) : éluant : EtOH / MeOH 2 : 8 ; débit 1 ml / min

Synthèse des deux stéréoisomères du N_ε-benzoyl-N_α-benzyloxycarbonyl-Lysine-Sarcosinate de benzyle (N_ε-Bz-N_α-Z-Lys-Sar-OBzl)



A une solution maintenue à 0°C de N_ε-Boc-N_α-Z-Lys-Sar-OBzl (2 g ; 3,7 mmol) dans le dichlorométhane est additionné l'acide trifluoroacétique (4,2 g ; 37 mmol). Après 5 heures, le solvant est évaporé et le brut repris dans le dichlorométhane. La solution est portée à 0°C et le chlorure de benzoyle (520 mg ; 3,7 mmol) est ajouté au mélange réactionnel.

Après 24 heures, la phase organique est lavée par une solution aqueuse de NaHCO₃ à 10% (2 x 20 ml), par l'eau (1 x 20 ml), par HCl 1N (2 x 20 ml) et de nouveau par l'eau (1 x 20 ml), séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le résidu est filtré sur gel de silice (éluant : hexane / AcOEt 25 : 75) pour donner le dipeptide sous forme d'huile avec environ 50% de rendement.

Caractéristiques communes aux deux énantiomères :

R_f : 0,35 (hexane / AcOEt 25 : 75)

SM (FAB) :

546 MH⁺

IR (pastille de KBr) : ν(cm⁻¹) :

3250 (NH)
1610-1710 (CO)

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) : δ(ppm) :

deux conformations sont visibles

(conf 1 / conf 2 75 : 25)

1,3 à 1,65	(m, 6H, Hc+Hd+He)
2,8	(s, 3H conf 2, Hi)
3,1	(s, 3H conf 1, Hi)
3,2	(m, 2H, Hf)
4,0	(d -système AB-, J = 17,2 Hz, 1H conf 1, Hj)
4,3	(d -système AB-, J = 17,3 Hz, 1H conf 1, Hj' +1H conf 2, Hj)
4,45	(m, 1H, Hb)
4,6	(d -système AB-, J = 17,2 Hz, 1H conf 2, Hj')
5,0	(s, 2H, Hk)
5,1	(s, 2H conf 1, Ho)
5,15	(s, 2H conf 2, Ho)
7,25 à 7,65	(m, 14H, Ha+Hl+Hm+Hn+Hp+Hq+Hr+Ht+Hu)
7,8	(dd, J = 7,0 Hz, J' = 1,2 Hz, 2H, Hs)
8,45	(tl, 1H, Hg)

Caractéristiques différenciant les deux énantiomères :

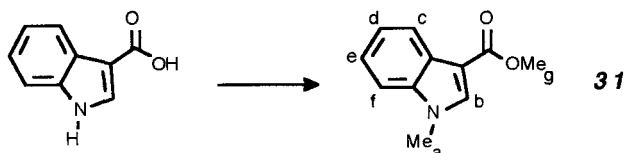
pouvoir rotatoire spécifique

énantiomère R : [α]_D^{25°C} (c = 1, MeOH) = 15,75°

énantiomère S : [α]_D^{25°C} (c = 1, MeOH) = -15,2°

B.2. SYNTHÈSE DU N-{1-[(1-METHYLINDOL-3-YL)CARBONYL](S)-PROLYL}(S)-TRYPTOPHANATE DE 3,5-BIS(TRIFLUOROMETHYL)BENZYLE **1** ET DES DIPEPTIDES APPARENTES **2** ET **3**

Synthèse du 1-méthylindol-3-yl carboxylate de méthyle **31**



A une solution maintenue à 0°C et sous atmosphère inerte, d'acide 3-indolecarboxylique (9,2 g ; 57 mmol) dans le DMF sont ajoutés, par petites portions, l'hydrure de sodium (4,11 g ; 171 mmol) puis, goutte à goutte, une solution d'iode de méthyle (24,4 g ; 171 mmol) dans le DMF.

Après 4 heures, un insoluble est écarté et le filtrat évaporé à sec et repris dans AcOEt. Un nouveau précipité est écarté et le filtrat est lavé par une solution saturée en NaHCO₃ et par l'eau, puis séché sur MgSO₄. **31** est alors obtenu quantitativement par évaporation du solvant.

R_f : 0,5 (hexane / AcOEt 5 : 5)

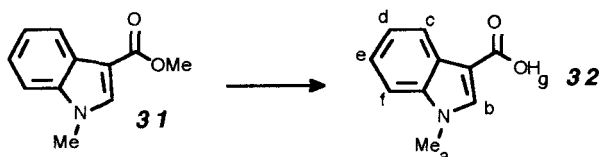
RMN (80 MHz, DMSO-d₆) : δ(ppm) :

R (pastille de KBr) : ν(cm⁻¹) :

3000-3100 (CH aromatiques)
2800-3000 (CH aliphatiques)
1680 (CO)

3,8 (s, 3H, Ha)
3,85 (s, 3H, Hg)
7,2 à 7,4 (m, 2H, Hd + He)
7,5 à 7,6 (m, 1H, Hb)
7,9 à 8,2 (m, 2H, Hc + Hf)

Synthèse de l'acide 1-méthyl-3-indole carboxylique **32**



A une solution maintenue à 0°C de 1-méthylindol-3-yl carboxylate de méthyle **31** (1g ; 5,2 mmol) dans le minimum de méthanol est ajoutée une solution de NaOH (991 mg ; 24,8 mmol) dans le minimum d'eau. Le mélange réactionnel est alors porté à reflux pendant 4 heures.

Après neutralisation du milieu par une solution de HCl 1N, le méthanol est évaporé et le mélange repris par l'eau, acidifié par une solution de HCl 1N jusqu'à pH = 1-2. **32** précipite alors dans cette phase aqueuse (rendement : 94%); la phase acide est extraite par CH₂Cl₂ et fournit encore **32** avec 2% de rendement.

R_f : 0,3 (hexane / AcOEt 5 : 5)

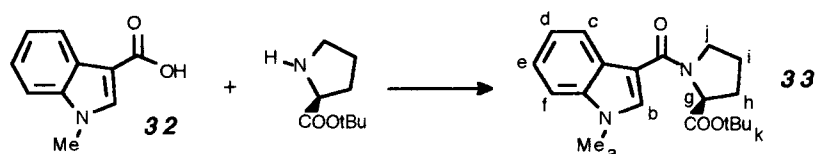
RMN (80 MHz; DMSO-d₆) : δ(ppm) :

IR (pastille de KBr) : ν(cm⁻¹) :

3000-3200 (CH aromatiques)
2800-2980 (CH aliphatiques + OH)
1630 (CO)

3,8 (s, 3H, Ha)
7,1 à 7,4 (m, 2H, Hd + He)
7,4 à 7,6 (m, 1H, Hb)
7,9 à 8,2 (m, 2H, Hc + Hf)
12 (s, 1H, Hg)

Synthèse du N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl](S)-prolinate de tert-butyle **33**



A une solution maintenue à 0°C d'acide 1-méthyl-3-indole carboxylique **32** (6,07 g ; 34,7 mmol) et de HOBT dans le dichlorométhane anhydre sont ajoutés la TEA (5,25 g ; 52 mmol) et l'EDCI (chlorhydrate) (9,97 g ; 52 mmol). Après trois heures d'agitation, est ajoutée une solution de prolinate de tert-butyle (sous forme de sel de dibenzènesulfimide) (16,26 g ; 34,7 mmol) et de TEA (3,5 g ; 34,7 mmol) dans le dichlorométhane.

Après 30 minutes, le mélange réactionnel est lavé par une solution de HCl 1N (2 fois), par une solution saturée en NaHCO₃ et par l'eau. Après séchage sur MgSO₄ et évaporation à sec, le résidu est lavé par l'éther diéthylique pour fournir **33** avec 90% de rendement.

R_f : 0,75 (CH₂Cl₂ / MeOH 95 : 5)

IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

3000-3120	(CH aromatiques)
2800-2980	(CH aliphatiques)
1720	(CO)

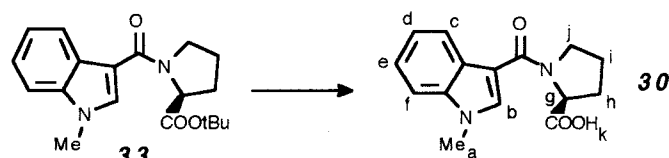
RMN (80 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) :

1,45	(s, 9H, Hk)
2	(m, 4H, Hh+Hi)
3,8	(sl, 5H, Ha+Hj)
4,6	(dd, J= 5,3 Hz, J'= 4Hz, 1H, Hg)
7,1 à 8,2	(m, 5H, Hb+Hc+Hd+He+Hf)

SM (EI) :

328	M ⁺
255	M-M(OtBu)
227	M-M(COotBu)
158	M (1-Me-3-CO-Ind)

Synthèse de la N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl](S)-proline **30**



A une solution maintenue à 0°C de N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl](S)-prolinate de tert-butyle **33** (2,13 g ; 6,5 mmol) dans le dichlorométhane est ajouté goutte à goutte l'acide trifluoroacétique (7,4 g ; 65 mmol). On laisse le mélange réactionnel revenir à température ambiante.

Après 12 heures d'agitation, le mélange réactionnel est évaporé à sec et repris plusieurs fois dans CH₂Cl₂. Le composé **30** précipite alors dans l'éther diéthylique avec un rendement de 95%.

R_f : 0,25 (CH₂Cl₂ / MeOH, 9 : 1)

E : 210-211°C

IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

2800-3100	(OH)
1720	(CO amide)
1700	(CO acide)

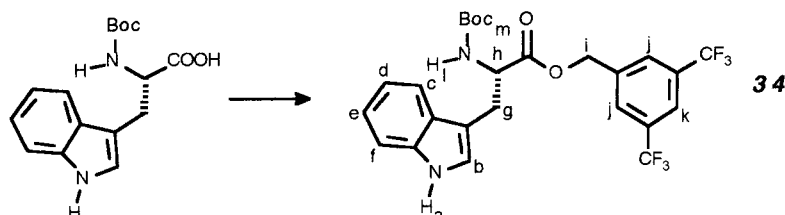
SM (FAB) :

273	(MH ⁺)
158	(M (1-Me-3-CO-Indole))

RMN (80 MHz; DMSO-d₆) : δ (ppm) :

2	(m, 4H, Hh+Hi)	7,0 à 7,4	(m, 2H, Hd + He)
3,85	(sl, 5H, Ha +Hj)	7,5	(m, 1H, Hb)
4,5	(m, 1H, Hg)	7,9 à 8,25	(m, 2H, Hc + Hf)

Synthèse du N-tert-butoxycarbonyltryptophanate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle **34**



A une solution de N-tert-butoxycarbonyltryptophane (3,8 g ; 12,5 mmol) dans un mélange MeOH / H₂O 10 : 1 (55 ml) est ajouté le carbonate de césium (2,02 g ; 6,2 mmol). Aussitôt, le solvant est évaporé et le brut repris trois fois dans 50 ml de DMF et évaporé. Il est dissous de nouveau dans le DMF (50 ml) et le chlorure de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle (3,3 g ; 12,6 mmol) en solution dans 5 ml de DMF est alors ajouté. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 16 heures.

Un insoluble est écarté. Après évaporation du DMF, le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé deux fois à l'eau et séché (MgSO₄). L'ester **34** précipite alors dans l'éther diisopropylique (rendement 75%)

Rf : 0,7 (hexane / AcOEt 6 : 4)

SM (FAB) :

531 MH^+

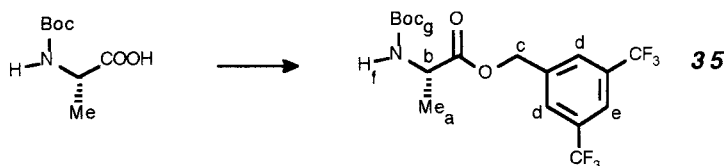
IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

3350	(NH indole)
3300	(NH carbamate)
1730	(CO ester)
1680	(CO carbamate)

RMN (300 MHz, CDCl₃) : δ (ppm) :

1,4	(s, 9H, Hm)
3,3	(m, 2H, Hg)
4,65	(ddl, 1H, Hh)
5,0	(d -système AB-, J = 12,9 Hz, 1H, Hi)
5,1	(d -système AB-, J = 12,9 Hz, 1H, Hi')
7,0	(d, J = 1,8 Hz, 1H, Hb)
7,1	(td, J = 8,0 Hz, J' = 1,0 Hz, 1H, Hd)
7,15	(td, J = 7,5 Hz, J' = 1,0 Hz, 1H, He)
7,25	(m, Hl)
7,3	(d, J = 8,0 Hz, 1H, Hc)
7,5	(d, J = 7,6 Hz, 1H, Hf)
7,55	(s, 2H, Hj)
7,8	(s, 1H, Hk)
8,05	(sl, 1H, Ha)

Synthèse du N-tert-butoxycarbonylalaninate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle **35**



A une solution de N-tert-butoxycarbonylalanine (5,7 g ; 29 mmol) dans un mélange MeOH / H₂O 10 : 1 (55 ml) est ajouté le carbonate de césium (4,75 g ; 14,5 mmol). Aussitôt, le solvant est évaporé et le brut repris trois fois dans

50 ml de DMF et évaporé. Il est dissous de nouveau dans le DMF (50 ml) et le chlorure de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle (8,4 g ; 32 mmol) en solution dans 5 ml de DMF est alors rajouté. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 16 heures.

Un insoluble est écarté. Après évaporation du DMF, le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé par l'eau, par une solution saturée en NaHCO_3 , par l'eau et séché (MgSO_4). L'ester **35** est obtenu après évaporation du solvant avec 92% de rendement.

Rf : 0,3 (hexane / AcOEt 9 : 1)

RMN (80 MHz, DMSO- d_6) : δ (ppm) :

SM (EI) :

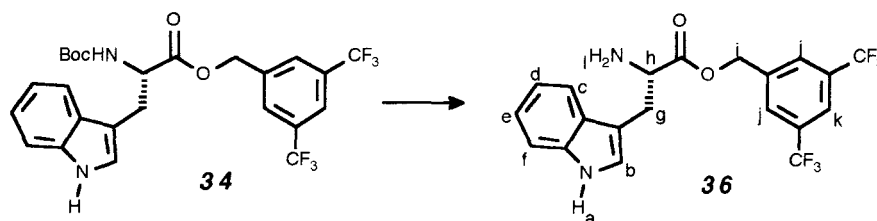
416	MH^+
342	M-M(OtBu)
314	M-M(Boc)
227	M($3,5(\text{CF}_3)_2\text{-Ph-CH}_2^+$)

1,2	(s, 3H, Ha)
1,3	(s, 9H, Hg)
4,1	(m, 1H, Hb)
5,3	(s, 2H, Hc)
7,4	(dl, 1H, Hf)
8,1	(sl, 3H, Hd+He)

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:

3300	(NH)
1715	(CO ester)
1660	(CO carbamate)

Synthèse du tryptophanate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle **36** (chlorhydrate)



A une solution de N-tert-butoxycarbonyltryptophanate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle (3,7 g ; 7 mmol) dans le THF anhydre (60 ml) sont ajoutés 30 ml de MeOH saturé en HCl. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 16 heures puis le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans l'éther diisopropylique et **36** précipite. Il est isolé par filtration (rendement : 90%).

Rf : 0,65 (CH_2Cl_2 / MeOH 9 : 1)

RMN (300 MHz, DMSO- d_6 + D_2O) : δ (ppm) :

SM (EI) :

430	M^+
227	M($3,5(\text{CF}_3)_2\text{-Ph-CH}_2^+$)
130	M(Ind- CH_2^+)

3,3	(dd, $J = 6,3$ Hz, $J' = 3,0$ Hz, 2H, Hg)
4,4	(t, $J = 6,5$ Hz, 1H, Hh)
5,2	(d -système AB-, $J = 13,1$ Hz, 1H, Hi)
5,35	(d -système AB-, $J = 13,1$ Hz, 1H, Hi')
6,95	(t, $J = 7,3$ Hz, 1H, Hd)
7,05	(t, $J = 7,2$ Hz, 1H, He)
7,2	(s, 1H, Hb)
7,3	(d, $J = 8,05$ Hz, 1H, Hc)
7,45	(d, $J = 7,85$ Hz, 1H, Hf)
7,95	(s, 2H, Hj)
8,1	(s, 1H, Hk)
11,05	(sl, 1H, Ha)

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:

3200-3400	(NH)
1715	(CO ester)

Synthèse de l'alaninate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle **37** (chlorhydrate)



A une solution de N-tert-butoxycarbonylalaninate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle (11,05 g ; 26,6 mmol) dans le THF anhydre (60 ml) sont ajoutés 30 ml de MeOH saturé en HCl. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 16 heures puis le solvant est évaporé. Le résidu est repris dans l'éther diisopropylique et **37** précipite. Il est isolé par filtration (rendement : 80%).

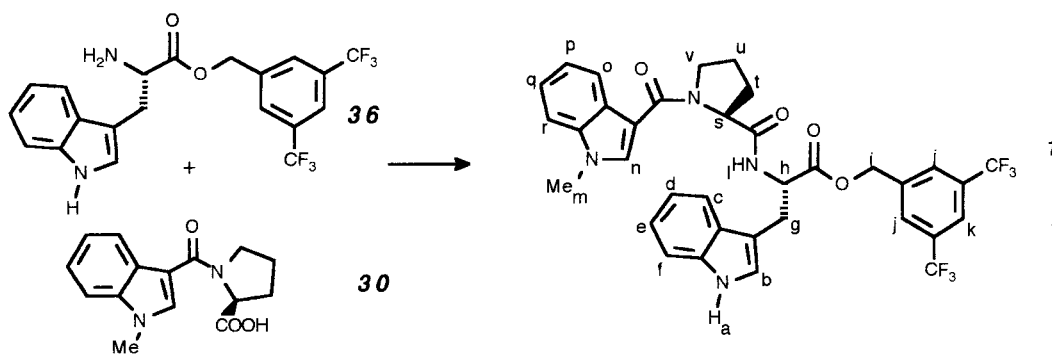
Rf : 0,5 (CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1)

IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :
1730 (CO ester)

RMN (80 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) :

1,4	(s, 3H, Ha)
4,2	(m, 1H, Hb)
5,45	(s, 2H, Hc)
7,4	(dl, 1H, Hf)
8,1	(sl, 1H, He)
8,2	(sl, 2H, Hd)
8,7	(sl, 3H, NH ₃ ⁺)

Synthèse du {N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl](S)-prolyl}(S)-tryptophanate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle **1**



A une solution de tryptophanate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle **36** (2,32 g ; 5 mmol) dans le dichlorométhane sont ajoutés le PyBOP (2,86 g ; 5,5 mmol), la DIPEA (2,2 ml ; 12,5 mmol) puis le dérivé **30** (1,36 g ; 5 mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 72 heures.

Il est lavé par HCl 1N, par l'eau, par une solution saturée en NaHCO₃ et par l'eau, séché (MgSO₄). Le résidu est purifié sur gel de silice (éluant CH₂Cl₂ / AcOEt 8 : 2) puis, **1** précipite dans un mélange MeOH / H₂O. Il est lavé à l'éther diisopropylique. (rendement : 80%).

Rf : 0,2 (CH₂Cl₂ / AcOEt 8 : 2)

SM (FAB) :

685	MH ⁺
255	M[(1-Me)Ind-CO-(N(CH ₂) ₃ CH)-CO ⁺]
227	M(3,5(CF ₃) ₂ -Ph-CH ₂ ⁺)

Temps de rétention :

HPLC sur gel de silice chirale ;
 éluant hexane : EtOH 5 : 5 ; débit 1 ml / min
 t_R = 5,2 min
 pureté : 99%

IR (pastille de KBr) : ν(cm⁻¹) :

3100-3400	(NH)
1715	(CO ester)
1650	(CO amide)

Analyse élémentaire :

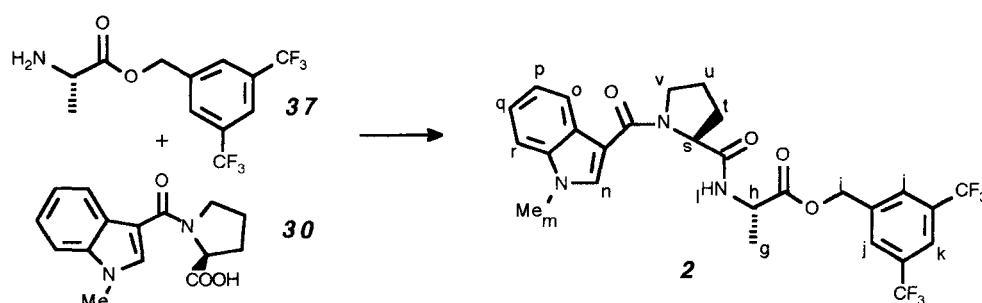
	% calculé	% trouvé
C	61,40	61,09
H	4,42	4,70
N	8,18	7,80

E = 125,5-128°C

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) : δ(ppm) :

1,8	(m, 3H, Ht / Hu)
2,05	(m, 1H, Ht)
3,2	(t, J = 6,3 Hz, 2H, Hg)
3,8	(m, 5H, Hm+Hv)
4,6	(m, 2H, Hh+Hs)
5,15	(d -système AB-, J = 13,2 Hz, 1H, Hi)
5,25	(d -système AB-, J = 13,1 Hz, 1H, Hi')
6,95	(t, J = 7,4 Hz, 1H, Hd)
7,05	(t, J = 7,5 Hz, 1H, He)
7,1	(t, J = 8,0 Hz, 1H, Hp)
7,2	(t, J = 7,2 Hz, 1H, Hq)
7,25	(sl, 1H, Hb)
7,3	(d, J = 8,0 Hz, 1H, Ho)
7,45	(d, J = 7,9 Hz, 1H, Hc)
7,5	(d, J = 7,6 Hz, 1H, Hf)
7,9	(m, 1H, Hl)
7,95	(s, 1H, Hk)
8,0	(m, 1H, Hr)
8,05	(s, 2H, Hj)
8,5	(m, 1H, Hn)
10,9	(s, 1H, Ha)

Synthèse du {N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl](S)-prolyl}(S)-alaninate de 3,5-bis-(trifluoro méthyl)benzyle **2**



N.B. La numérotation omet 'a, b, c, d, e et f' pour permettre la comparaison avec celle du composé **1**

A une solution d'alaninate de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle **37** (1,55 g ; 4,4 mmol) dans le dichlorométhane sont ajoutés le PyBOP (2,52 g ; 4,85 mmol), la DIPEA (1,9 ml ; 11 mmol) puis le dérivé **30** (1,2 g ; 4,4 mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 72 heures.

Il est lavé par HCl 1N, par l'eau, par une solution saturée en NaHCO₃ et par l'eau, séché (MgSO₄). Le résidu est purifié sur gel de silice (éluant : AcOEt) puis, **2** précipite dans l'hexane. Il est recristallisé dans l'éther diéthylique. (rendement : 75%).

Rf : 0,2 (AcOEt)

SM (EI) :

569	M ⁺
227	M(3,5(CF ₃) ₂ -Ph-CH ₂ ⁺)
158	M[(1-Me)Ind-CO ⁺]

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:

3100-3300	(NH)
1745	(CO ester)
1660	(CO amide)
1670	(CO amide)

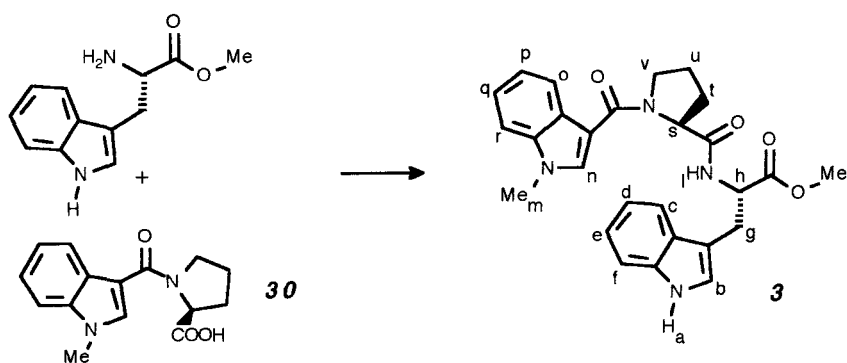
Analyse élémentaire (2. H₂O) :

	% calculé	% trouvé
C	55,19	55,09
H	4,63	4,35
N	7,15	7,04

F = 92-94°C

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) : $\delta(\text{ppm})$:

1,35	(d, J = 6,6 Hz, 3H, Hg)
1,8	(m, 3H, Ht / Hu)
2,05	(m, 1H, Ht)
3,7	(m, 2H, Hv)
3,8	(s, 3H, Hm)
4,3	(m, 1H, Hh)
4,55	(m, 1H, Hs)
5,3	(s, 2H, Hi)
7,1	(td, J = 8,0 Hz, J' = 1,0 Hz, 1H, Hp)
7,2	(td, J = 7,1 Hz, J' = 1,2 Hz, 1H, Hq)
7,45	(d, J = 8,0 Hz, 1H, Ho)
7,9	(m, 1H, Hl)
8,05	(m, 1H, Hr)
8,1	(s, 3H, Hj+Hk)
8,45	(m, 1H, Hn)

Synthèse du {N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl](S)-prolyl}(S)-tryptophanate de méthyle **3**N.B. La numérotation omet 'j' et 'k' pour permettre la comparaison avec celle du composé **1**

A une solution de tryptophanate de méthyle (chlorhydrate) (1,9 g ; 7,55 mmol) dans le dichlorométhane sont ajoutés le PyBOP (4,3 g ; 8,25 mmol), la DIPEA (3,3 ml ; 18,75 mmol) puis le dérivé **30** (2 g ; 7,5 mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 72 heures.

Il est lavé par HCl 1N, par l'eau, par une solution saturée en NaHCO₃ et par l'eau, séché (MgSO₄). Le résidu est purifié sur gel de silice (éluant : AcOEt), repris dans H₂O, extrait à CH₂Cl₂ et séché (MgSO₄). Après évaporation du solvant, **3** est lavé à l'éther diisopropylique puis à l'hexane (rendement : 93%).

Rf: 0,25 (AcOEt)

SM (EI):

472 M⁺
 255 M[((1-Me)Ind-CO-(N(CH₂)₃CH)-CO-NH₂)H⁺]
 255 M[(1-Me)Ind-CO-(N(CH₂)₃CH)-CO⁺]
 158 M[(1-Me)Ind-CO⁺]

IR (pastille de KBr): ν (cm⁻¹):

3200-3400 (NH)
 1735 (CO ester)
 1650-1680 (CO amide)

Analyse élémentaire (3.3/2H₂O):

	% calculé	% trouvé
C	64,91	64,76
H	6,25	5,83
N	11,21	11,21

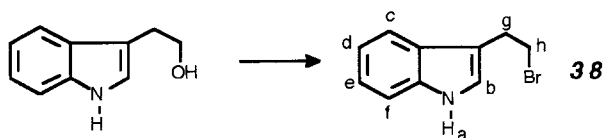
RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm):

1,8	(m, 3H, Ht / Hu)
2,05	(m, 1H, Ht)
3,15	(m, 2H, Hg)
3,5	(s, 3H, Hi)
3,75	(m, 2H, Hv)
3,8	(m, 3H, Hm)
4,6	(m, 2H, Hh+Hs)
6,95	(td, J = 7,85 Hz, J' = 1,0 Hz, 1H, Hd)
7,05	(td, J = 7,8 Hz, J' = 0,8 Hz, 1H, He)
7,1	(td, J = 8,0 Hz, J' = 0,9 Hz, 1H, Hp)
7,2	(m, 2H, Hb+Hq)
7,3	(d, J = 8,0 Hz, 1H, Ho)
7,45	(d, J = 8,0 Hz, 1H, Hc)
7,5	(d, J = 7,6 Hz, 1H, Hf)
7,8	(m, 1H, Hl)
8,05	(d, J = 8,1 Hz, 1H, Hr)
8,35	(m, 1H, Hn)
10,9	(s, 1H, Ha)

E= 111-112°C

B.3. SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS POSSEDANT UN SQUELETTE INDOLIQUE

Synthèse du 3-(2-bromoéthyl)indole **38**



A une solution de tryptophol (5 g ; 0,03 mol) dans l'acétonitrile est ajouté le tétrabromure de carbone (13,7 g ; 0,04 mol). Le mélange est porté à 0°C. La triphénylphosphine (9,9 g ; 0,037 mol) est ajoutée par petites portions, en une heure environ. On laisse le mélange réactionnel revenir à température ambiante.

30 minutes après la fin de l'ajout, le solvant est évaporé et le résidu repris dans l'acétate d'éthyle. Après lavages à l'eau et à l'eau saturée en NaCl, et séchage sur MgSO₄, le solvant est évaporé et le brut chromatographié (gel de silice ; hexane / AcOEt, 9 : 1). Le produit est obtenu avec un rendement de 90%.

Rf : 0,2 (hexane / AcOEt 7 : 3)

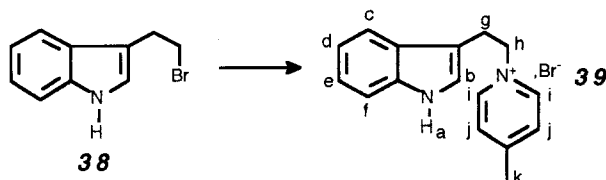
E : 94-97°C

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:
3360 (NH)

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) : $\delta(\text{ppm})$:

3,25	(t, J= 7,4 Hz, 2H, Hg)
3,75	(t, J= 7,4 Hz, 2H, Hh)
7,0	(m, 1H, Hd)
7,1	(m, 1H, He)
7,25	(s, 1H, Hb)
7,4	(d, J= 8 Hz, 1H, Hc)
7,6	(d, J= 7,7 Hz, 1H, Hf)
11,0	(s, 1H, Ha)

Synthèse du bromure de 3-{2-[1-(4-méthyl)pyridinio]éthyl}indole **39**



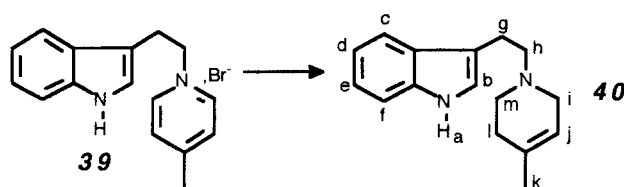
Une solution de dérivé bromé **38** (3,5 g ; 15,6 mmol) dans la 4-méthylpyridine (15 ml) est agitée à 80°C sous atmosphère inerte.

Après 2 heures, le mélange réactionnel est pris en masse. Il est lavé trois fois par l'éther éthylique. Le sel de pyridinium **39** est obtenu sous forme d'une poudre beige avec 75% de rendement.

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) : $\delta(\text{ppm})$:

2,6	(s, 3H, Hk)
3,3	(t, J= 6,85 Hz, 2H, Hg)
4,8	(t, J= 6,85 Hz, 2H, Hh)
6,9 à 7,2	(m, 3H, Hb+Hd+He)
7,4	(d, J= 8 Hz, 1H, Hc)
7,6	(d, J= 7,75 Hz, 1H, Hf)
7,9	(d, J= 6 Hz, 2H, Hj)
8,8	(d, J= 6,2 Hz, 2H, Hi)
11,0	(s, 1H, Ha)

Synthèse du 3-{2-[1-(4-méthyl)-1,2,5,6-tétrahydropyridino]éthyl}indole **40**



A une solution (maintenue à 0°C et sous atmosphère inerte) de sel de pyridinium **39** (3,63 g ; 11,45 mmol) dans le méthanol (125 ml) est ajouté le borohydrure de sodium (866 mg ; 22,9 mmol) par petites portions ; après deux heures, 779 mg (20,6 mmol) sont ajoutés.

L'agitation est maintenue pendant 18 heures puis le solvant est évaporé sous vide. Le brut est repris dans le dichlorométhane. Un insoluble est écarté et la phase organique est lavée à l'eau puis séchée sur MgSO₄. Le produit **40** attendu est obtenu, avec un rendement de 78%, par précipitation fractionnée dans le méthanol.

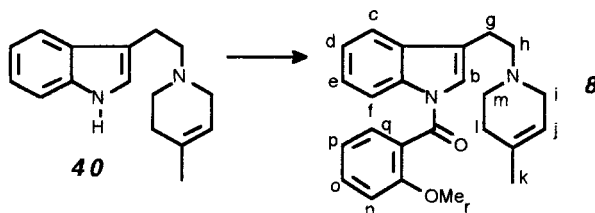
Rf : 0,5 (CH₂Cl₂ / MeOH, 9 : 1)

E : 135-135,5°C

RMN (200 MHz, CDCl₃) : δ(ppm) :

1,75	(d, J= 1,3 Hz, 3H, Hk)	3,1	(m, 2H, Hi)
2,2	(m, 2H, Hl)	5,4	(sl, 1H, Hj)
2,75	(t, J= 5,8 Hz, 2H, Hg)	7,0	(d, J= 2,35 Hz, 1H, Hb)
2,8	(m, 2H, Hm)	7,1 à 7,65	(m, 4H, Hc, Hd, He, Hf)
3,05	(m, 2H, Hh)	8,3	(s, Ha)

Synthèse du 1-(2-méthoxybenzoyl)-3-{2-[1-(4-méthyl)-1,2,5,6-tétrahydropyridino]éthyl}indole **8** (chlorhydrate)



A une solution (maintenue à 0°C) d'hydru de sodium (120 mg ; 5 mmol) dans le DMF est ajouté le dérivé indolique **40** (1 g ; 4,06 mmol) par petites portions. Après 3 heures d'agitation, le chlorure de 2-méthoxybenzoyle (851 mg ; 5 mmol) dissous dans du DMF est ajouté goutte à goutte.

Après 24 heures, le solvant est évaporé ; le brut est repris dans du dichlorométhane et après élimination d'un insoluble, il est lavé par l'eau et par une solution de bicarbonate de sodium à 4%, puis séché sur MgSO₄. Le brut est chromatographié sur gel de silice (éluant : CH₂Cl₂ / EtOH 99 : 1).

Le résidu est repris dans l'éthanol saturé en HCl. Le produit salifié est précipité dans le toluène et cristallisé dans l'acétate d'éthyle (rendement 65%).

Rf : 0,5 (CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1)

SM (EI) :

374	M+
135	M(p-(OMe)Ph(CO) ⁺)
110	

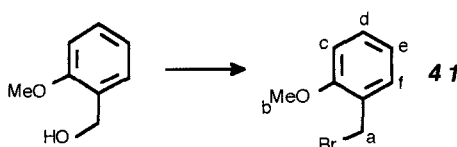
E : 175-176°C

Analyse élémentaire : (8.HCl)

	% calculé	% trouvé
C	70,15	70,03
H	6,62	6,81
N	6,81	6,76

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) : δ(ppm) :

1,7	(s, 3H, Hk)
2,5	(sl, 2H, Hl)
3 à 3,5	(m, 8H, Hg + Hh + Hi + Hj)
3,75	(s, 3H, Hr)
5,4	(sl, 1H, Hj)
7 à 7,2	(m, 2H, Hd + He)
7,3	(d, J= 8,4 Hz, 1H, Hc)
7,35 à 7,5	(m, 2H, Hb + Hp)
7,5	(d, J= 6,3 Hz, 1H, Hn)
7,6	(m, 1H, Ho)
7,8	(d, J= 6,4 Hz, 1H, Hf)
8,25	(sl, 1H, Hq)
10,5	(s, NH ⁺)

Synthèse du bromure de 2-méthoxybenzyle **41**

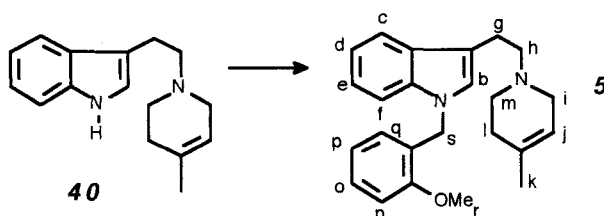
A une solution, maintenue à 0°C, d'alcool 2-méthoxybenzylique (1,34 ml ; 10 mmol) dans l'acétonitrile (80 ml), sont ajoutés le tétrabromure de carbone (4,3 g ; 13 mmol), et, par petites portions, en une heure environ, la triphénylphosphine (3,14 g ; 12 mmol). On laisse le mélange réactionnel revenir à température ambiante.

Après 24 heures, le mélange réactionnel est évaporé à sec, repris dans CH₂Cl₂, lavé par de l'eau saturée en NaCl et séché sur MgSO₄. Après évaporation à sec, le brut est repris dans un mélange CH₂Cl₂ / hexane : il reste un insoluble qui est écarté. Le filtrat est chromatographié (éluant : hexane / AcOEt 98 : 2). Le produit **41** est alors obtenu avec 60% de rendement.

Rf : 0,4 (hexane / AcOEt 98 : 2)

RMN (80 MHz, CDCl₃) : δ(ppm) :

3,85	(s, 3H, Hb)
4,6	(dl, 2H, Ha)
6,7 à 7,5	(m, 5H, Hc + Hd + He + Hf)

Synthèse du 1-(2-méthoxybenzyl)-3-{2-[1-(4-méthyl)-1,2,5,6-tétrahydropyridino]éthyl}indole **5** (chlorhydrate)

A une solution (maintenue à 10°C) de dérivé indolique **40** (1 g ; 4,06 mmol) dans le DMF est ajouté l'hydrure de sodium (146 mg ; 6,08 mmol). Après 3 heures d'agitation, le dérivé bromé **41** (856 mg ; 4,25 mmol) dissous dans du DMF est ajouté goutte à goutte.

Après 24 heures, le solvant est évaporé; le brut est repris dans du dichlorométhane et après élimination d'un insoluble, il est lavé par l'eau et séché sur MgSO₄. Le solvant est évaporé et le résidu repris dans l'éther éthylique.

Après ajout d'éther de pétrole saturé en HCl, le produit salifié précipite (rendement 80%). Il est recristallisé deux fois dans l'acétonitrile.

R_f : 0,5 (CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1)

SM (EI) :

360 M⁺

E₁ : 185-187°C

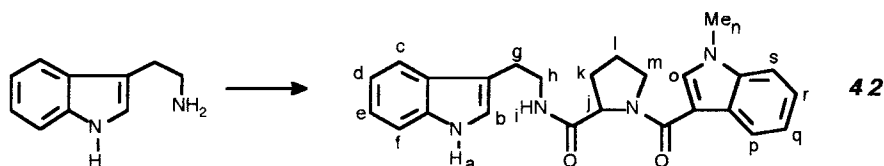
Analyse élémentaire : (5. HCl. 0,5 H₂O)

	% calculé	% trouvé
C	71,31	71,32
H	7,28	7,54
N	6,93	6,80

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) : δ(ppm) :

1,7	(s, 3H, Hk)
2,5	(sl, 2H, Hm)
3 à 4	(m, 11 H, Hg+Hh+Hr+Hi+Hm)
5,3	(sl, 2H, Hs)
5,4	(sl, 1H, Hj)
6,7 à 6,9	(m, 2H, (Hn + Hp))
7 à 7,2	(m, 3H, Hd + He + Ho)
7,2	(m, 1H, Hq)
7,3	(s, 1H, Hb)
7,4	(d, J= 8 Hz, 1H, Hc)
7,7	(d, J= 7,6 Hz, 1H, Hf)
10,75	(s, NH ⁺)

Synthèse du 3-((2-[N-(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]propyl)aminoéthyl)indole **42**



A une solution de tryptamine (1,46 g ; 9 mmol) dans le dichlorométhane sont ajoutés la DIPEA (2,4 ml ; 13,5 mmol), le PyBOP (5,2 g ; 10 mmol) puis l'acide **30** (2,5 g ; 9 mmol). Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation pendant 24 heures.

Il est ensuite lavé deux fois par HCl 1N, par l'eau, deux fois par une solution saturée de NaHCO₃ et de nouveau par l'eau puis séché par MgSO₄. Après évaporation du solvant, le brut est purifié sur gel de silice (éluant : AcOEt) pour donner **42** avec 85% de rendement.

R_f : 0,15 (AcOEt)

IR (pastille de KBr) : ν(cm⁻¹) :

1635 (CO)

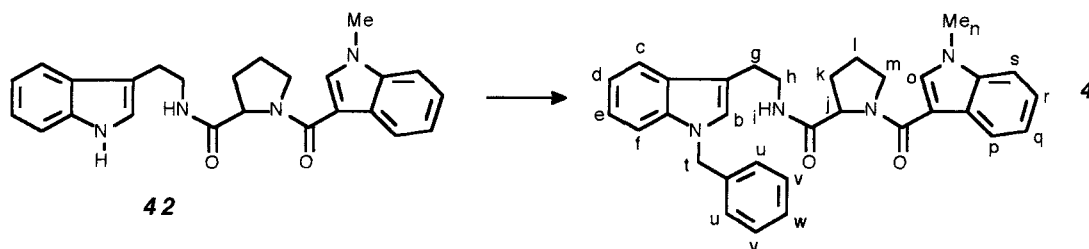
SM (EI) :

414	M ⁺
272	M[(((1-Me)Ind-CO-(N(CH ₂) ₃ CH)-CO-NH ₂)H ⁺)]
255	M[(1-Me)Ind-CO-(N(CH ₂) ₃ CH)-CO ⁺]
227	M[(1-Me)Ind-CO-(N(CH ₂) ₃ CH) ⁺]
158	M[(1-Me)Ind-CO ⁺]

RMN (300 MHz, DMSO-d6) : δ (ppm) :

1,85	(m, 3H, Hk / Hl)	6,9 à 7,25	(m, 5H, Hb+Hd+He+ Hq+Hr)
2,1	(m, 1H, Hk)	7,3	(d, J= 8 Hz, 1H, Hc)
2,8	(m, 2H, Hg)	7,45	(d, J= 8,1 Hz, 1H, Hp)
3,3	(m, 2H, Hh)	7,5	(d, J= 7,8 Hz, 1H, Hf)
3,8	(m, 2H, Hm)	7,9	(m, 1H, Hi)
3,85	(s, 3H, Hn)	8	(m, 1H, Ho)
4,5	(dd, J= 10,6 Hz, J'= 4,2 Hz, 1H, Hj)	8,1	(d, J= 7,85 Hz, 1H, Hs)
		10,8	(s, Ha)

Synthèse du 1-benzyl-3-({2-[N-(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]prolyl}aminoéthyl)indole **4**



A une solution (maintenue à 0°C) de dérivé indolique **42** (1,05 g ; 2,5 mmol) dans le DMF est ajouté l'hydrure de sodium (66 mg ; 2,75 mmol). Après une heure d'agitation, le bromure de benzyle (0,3 ml ; 2,5 mmol) est ajouté goutte à goutte.

Après 12 heures, le mélange réactionnel est versé doucement dans 500 ml d'eau glacée. **4** précipite. Il est isolé par filtration et lavé avec un mélange hexane / éther 3 : 1 (rendement 53%). Il est recristallisé dans l'acétate d'éthyle.

Rf : 0,45 (AcOEt -cuve saturée en NH₃-)

IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :
1655 (CO)

SM (EI) :

504	M ⁺
233	M[({1-Bzl}IndCH-CH ₂) ⁺]
158	M[(1-Me)Ind-CO ⁺]

E : 153,5-155°C

pouvoir rotatoire spécifique :

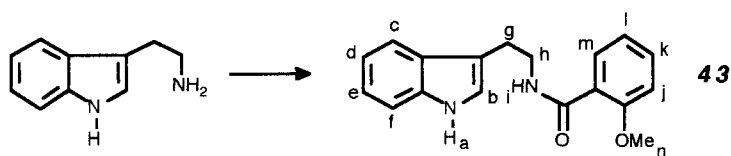
$$[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} (c = 1, \text{MeOH}) = -6,45^\circ$$

Analyse élémentaire : (**4**. 2/3 H₂O)

	% calculé	% trouvé
C	74,39	74,43
H	6,50	6,35
N	10,84	10,61

RMN (300 MHz, DMSO-d6) : δ (ppm) :

1,85	(m, 3H, Hk / Hl)
2,1	(m, 1H, Hk)
2,85	(m, 2H, Hg)
3,35	(m, 2H, Hh)
3,8	(m, 2H, Hm)
3,85	(s, 3H, Hn)
4,55	(m, 1H, Hj)
5,25	(s, 2H, Ht)
6,95 à 7,15	(m, 5H, Hb+Hd+He+ Hq+Hr)
7,2 à 7,35	(m, 5H, Hu+Hv+Hw)
7,4	(d, J= 8 Hz, 1H, Hc)
7,5	(d, J= 8,1 Hz, 1H, Hp)
7,6	(d, J= 7,5 Hz, 1H, Hf)
7,95	(m, 1H, Hi)
8,05	(m, 1H, Ho)
8,15	(d, J= 7,8 Hz, 1H, Hs)

Synthèse du 3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]indole **43**

A une solution, maintenue à 0°C, de tryptamine (3 g ; 18,72 mmol) dans le dichlorométhane sont ajoutés la DIPEA (3,3 ml ; 18,72 mmol) et, goutte à goutte, le chlorure de 2-méthoxybenzoyle (3,3 ml ; 18,72 mmol).

30 minutes après la fin de l'ajout, le précipité formé dans le milieu réactionnel est filtré, puis lavé par le dichlorométhane (2 x 20 ml) pour donner **43** sous forme d'une poudre blanche. Le filtrat est évaporé à sec, repris par une solution aqueuse de HCl 1N (20 ml) dans laquelle il précipite. Ce solide est filtré puis lavé par AcOEt (2 x 20 ml) pour donner un deuxième jet de **43** (rendement : 82%).

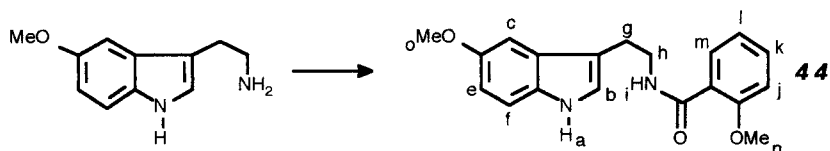
Rf : 0,8 (CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1)

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:

3320 (NH-CO)
3200 (NH indolique)
1620 (CO)

RMN(300 MHz, DMSO-d₆) : $\delta(\text{ppm})$:

3,0 (t, J= 7Hz, 2H, Hg)
3,6 (m, 2H, Hh)
3,7 (s, 3H, Hn)
6,9 à 7,1 (m, 3H, Hd+ He+ Hl)
7,2 (d, J=7,6Hz, 1H, Hj)
7,25 (s, 1H, Hb)
7,35 (d, J=8Hz, 1H, Hc)
7,45 (m, 1H, Hk)
7,6 (d, J=7,8Hz, 1H, Hf)
7,8 (d, J= 7,7Hz, 1H, Hm)
8,3 (m, 1H, Hi)
10,8 (s, 1H, Ha)

Synthèse du 3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]-5-méthoxyindole **44**

A une solution, maintenue à 0°C et à l'abri de la lumière, de chlorhydrate de 5-méthoxytryptamine (10 g ; 44,2 mmol) dans le dichlorométhane sont ajoutés la DIPEA (15,4 ml ; 88,5 mmol) et, goutte à goutte, le chlorure de 2-méthoxybenzoyle (6,6 ml ; 44,2 mmol).

2 heures après la fin de l'ajout, un insoluble restant dans le milieu réactionnel est écarté. Le filtrat est lavé par une solution acide de HCl 1N et par une solution de bicarbonate de sodium à 4%. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis évaporée à sec. La poudre obtenue est lavée par l'éther diéthylique pour donner **44** avec 97% de rendement.

Rf : 0,7 (CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1)

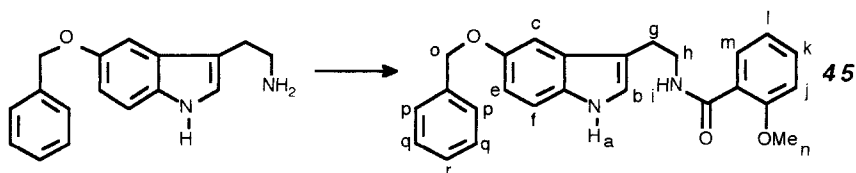
IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:

3350 (NH-CO)
3200 (NH indolique)
1625 (CO)

RMN (300 MHz, DMSO-d6) : δ (ppm) :

2,95	(t, J= 7,0Hz, 2H, Hg)	7,3	(d, J= 8,8 Hz, 1H, Hf)
3,6	(td, J= 6,8Hz, J' < J, 2H, Hh)	7,5	(td, J= 7,2 Hz, J' = 1,0 Hz, 1H, Hk)
3,7	(sl, 6H, Hn+Ho)	7,8	(dd, J= 6,7 Hz, J= 0,9 Hz, 1H, Hm)
6,75	(dd, J= 8,7 Hz, J'= 2,2 Hz, 1H, He)	8,3	(t, J= 5,3Hz, 1H, Hi)
7 à 7,15	(m, 3H, Hc+Hj+ Hl)	10,7	(s, 1H, Ha)
7,2	(d, J= 1,25 Hz, 1H, Hb)		

Synthèse du 3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]-5-benzyloxyindole **45**



A une solution, maintenue à 0°C et à l'abri de la lumière, de chlorhydrate de 5-benzyloxytryptamine (3 g ; 9,9 mmol) dans le dichlorométhane sont ajoutés la DIPEA (3,45 ml ; 19,81 mmol) et, goutte à goutte, le chlorure de 2-méthoxybenzoyl (2,2 ml ; 14,9 mmol).

30 minutes après la fin de l'ajout, un insoluble restant dans le milieu réactionnel est écarté. Le filtrat est lavé par une solution acide de HCl 1N et par une solution de bicarbonate de sodium à 10%. Un précipité de **45** se forme dans la phase organique; il est isolé (rendement : 85%). Le filtrat est séché sur MgSO₄ puis concentré. Un deuxième jet de **45** est obtenu avec 5% de rendement.

R_f : 0,8 (CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1)

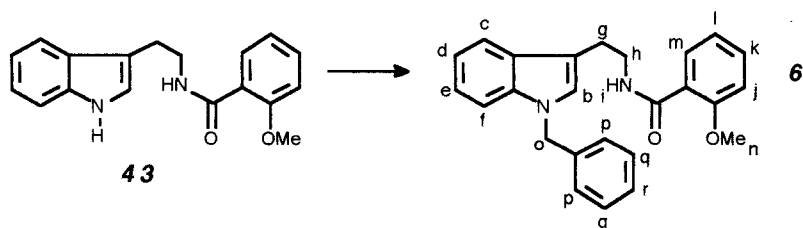
IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

3350	(NH-CO)
3240	(NH indolique)
1620	(CO)

RMN (80 MHz, DMSO-d6) : δ (ppm) :

2,9	(tl, 2H, Hg)
3,6	(m, 2H, Hh)
3,75	(s, 3H, Hn)
5,0	(s, 2H, Ho)
6,6 à 7,6	(m, 12H, Hb+Hc+He+Hf+Hj+Hk+Hl+Hp+Hq+Hr)
7,8	(ddl, 1H, Hm)
8,2	(m, 1H, Hi)
10,7	(s, 1H, Ha)

Synthèse du 1-benzyl-3-(2-(2-méthoxybenzamido)éthyl)indole **6**



A une solution, maintenue à 0°C et sous atmosphère inerte, de dérivé indolique **43** (1 g ; 3,4 mmol) dans le DMF est ajouté l'hydrure de sodium (122,5 mg ; 5,1 mmol) par petites portions. Après 2 heures d'agitation, le bromure de benzyle (581 mg ; 3,4 mmol) dissous dans du DMF est ajouté goutte à goutte.

Après 4 heures, le solvant est évaporé; le brut est repris dans AcOEt. La phase organique est lavée par une solution aqueuse de HCl 1N (2 x 30 ml), par l'eau (2 x 30 ml), puis séchée sur MgSO₄ et portée à sec. Le brut est chromatographié sur gel de silice (éluant : hexane / AcOEt 7 : 3) pour donner **6** qui est ensuite recristallisé dans l'éther diéthylique (rendement : 60%).

R_f : 0,45 (hexane / AcOEt 5 : 5)

E: 84-86°C

SM(EI) :

384 M⁺
151 M[H₂N-CO-(2-OCH₃)Ph]

Analyse élémentaire :

	% calculé	% trouvé
C	78,10	78,19
H	6,29	6,47
N	7,28	7,19

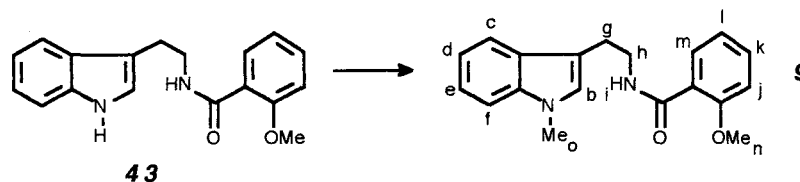
IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

3360 (NHCO)
1620 (CO)

RMN (250 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) :

3,0 (t, J= 7,0Hz, 2H, Hg)
3,6 (m, 2H, Hh)
3,7 (s, 3H, Hn)
5,4 (s, 2H, Ho)
7 à 7,3 (m, 9H, Hj+Hd+ He+Hl+Hp+Hq+Hr)
7,3 à 7,5 (m, 3H, Hb+Hc+Hk)
7,6 (d, J=7,8Hz, 1H, Hf)
7,8 (d, J= 7,7Hz, 1H, Hm)
8,3 (m, 1H, Hi)

Synthèse du 1-méthyl-3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]indole **9**



A une solution, maintenue à 0°C et sous atmosphère inerte, de dérivé indolique **43** (1 g ; 3,4 mmol) dans le DMF est ajouté l'hydruide de sodium (122,5 mg ; 5,1 mmol) par petites portions. Après 2 heures d'agitation, l'iode de méthyle (0,32 ml ; 5,1 mmol) dissous dans du DMF est ajouté goutte à goutte.

Après 2 heures, le solvant est évaporé; le brut est repris dans AcOEt. La phase organique est lavée par une solution aqueuse de HCl 1N (2 x 30 ml), par l'eau (2 x 30 ml), puis séchée sur MgSO₄ et portée à sec. La poudre obtenue est lavée par l'éther diéthylique pour donner **9** avec 60% de rendement.

R_f : 0,4 (Hexane / AcOEt 5 : 5)

E: 110-112°C

SM(EI) :

308 M⁺
157 M-M[H₂N-CO-(2-OCH₃)Ph]
144

Analyse élémentaire :

	% calculé	% trouvé
C	74,0	74,03
H	6,53	6,74
N	9,08	9,07

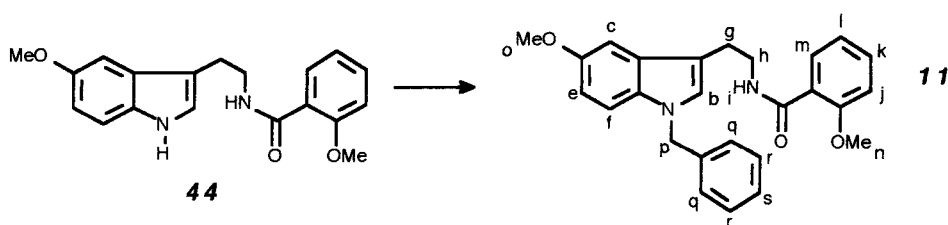
IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

3330 (NHCO)
1630 (CO)

RMN (250 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) :

2,95 (t, J= 7,25Hz, 2H, Hg)
3,6 (td, J= 7Hz, J'< J, 2H, Hh)
3,75 (s, 6H, Hn+Ho)
7 à 7,3 (m, 5H, H aromatiques)
7,35 à 7,5 (m, 2H, H aromatiques)
7,6 (d, J=7,8Hz, 1H, Hf)
7,8 (dd, J= 7,7Hz, J= 1,5Hz, 1H, Hm)
8,15 (m, 1H, Hi)

Synthèse du 1-benzyl-3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]-5-méthoxyindole **11**



A une solution, maintenue à 0°C et sous atmosphère inerte, de dérivé indolique **44** (1 g ; 3,1 mmol) dans le DMF est ajouté l'hydrure de sodium (111 mg ; 4,63 mmol) par petites portions. Après 2 heures d'agitation, le bromure de benzyle (528 mg ; 3,1 mmol) dissous dans du DMF est ajouté goutte à goutte.

Après 20 heures, le solvant est évaporé; le brut est repris dans AcOEt. La phase organique est lavée par une solution aqueuse de HCl 1N, par l'eau, puis séchée sur MgSO₄ et portée à sec.

Le brut, huileux, précipite dans un mélange AcOEt / éther diéthylique pour donner **11**. Il est recristallisé dans l'éther diisopropylique (rendement : 60%).

Rf : 0,4 (hexane / AcOEt 5 : 5)

F : 89-92°C

SM(EI) :

414	M ⁺
263	M-M[H ₂ N-CO-(2-OCH ₃)Ph]
91	M(cation tropylium)

Analyse élémentaire :

	% calculé	% trouvé
C	75,34	75,22
H	6,32	6,51
N	6,75	6,96

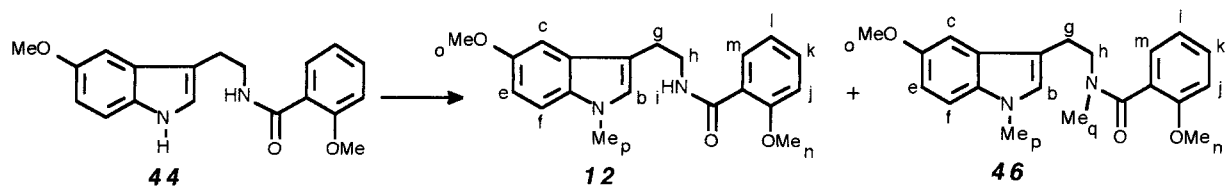
IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

3360	(NHCO)
1630	(CO)

RMN (250 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) :

2,95	(t, J= 7,0 Hz, 2H, Hg)
3,6	(td, J= 7,0 Hz, J' < J, 2H, Hh)
3,65-3,7	(2s, 3H+3H, Hn+Ho)
5,3	(s, 2H, Hp)
6,7	(dl, J= 8,8 Hz, 1H, He)
7 à 7,5	(m, 11H, Hb+Hc+Hf+Hj+Hk+Hl+Hq +Hr+Hs)
7,8	(d, J= 7,7 Hz, 1H, Hm)
8,15	(m, 1H, Hi)

Synthèse du 1-méthyl-3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]-5-méthoxyindole **12** et du 1-méthyl-3-[2-[N-méthyl(2-méthoxybenzamido)éthyl]-5-méthoxyindole **46**



A une solution, maintenue à 0°C et sous atmosphère inerte, de dérivé indolique **44** (1,8 g ; 5,55 mmol) dans le DMF est ajouté l'hydrure de sodium (267 mg ; 11,1 mmol) par petites portions. Après 2 heures d'agitation, l'iodure de méthyle (1,2 g ; 8,3 mmol) dissous dans du DMF est ajouté goutte à goutte.

Après 5 heures, le solvant est évaporé; le brut est repris dans AcOEt. La phase organique est lavée par une solution aqueuse de HCl 1N, par l'eau saturée en NaCl, puis séchée sur MgSO₄ et portée à sec. Le brut est chromatographié sur gel de silice (éluant : hexane / AcOEt 6 : 4) et fournit **12** et **46**.

12 est obtenu, après lavage par l'éther éthylique, avec 65% de rendement.

Rf: 0,35 (Hexane / AcOEt, 5 : 5)

F: 112-115°C

SM(EI) :

338 M⁺
187 M-M[H₂N-CO-(2-OCH₃)Ph]

Analyse élémentaire :

	% calculé	% trouvé
C	70,98	71,04
H	6,55	6,80
N	8,27	8,17

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:

3340 (NHCO)
1630 (CO)

RMN(250 MHz, DMSO-d₆) : $\delta(\text{ppm})$:

2,9 (t, J= 7,1 Hz, 2H, Hg)
3,6 (td, J= 7,0 Hz, J' < J, 2H, Hh)
3,7 (s, 3H, Hp)
3,75 (2s, 3H+3H, Hn+Ho)
6,8 (dd, J= 8,8 Hz, J'= 2,4 Hz, 1H, He)
7 à 7,15 (m, 4H, Hb + Hc + Hj+ Hl)
7,27 (d, J= 8,8 Hz, 1H, Hf)
7,45 (td, J= 8,6 Hz, J'= 1,75 Hz, 1H, Hk)
7,8 (dd, J= 7,6 Hz, J'= 1,7 Hz, 1H, Hm)
8,15 (m, 1H, Hi)

46 est obtenu, après recristallisation dans un mélange hexane / toluène, avec 20% de rendement.

Rf: 0,2 (hexane / AcOEt 5 : 5)

F: 112-115°C

SM(EI) :

352 M⁺
187 M-M[H(CH₃)N-CO-(2-OCH₃)Ph]
135 M[⁺CO-(2-OCH₃)Ph]

Analyse élémentaire :

	% calculé	% trouvé
C	71,56	71,08
H	6,86	7,15
N	7,94	7,87

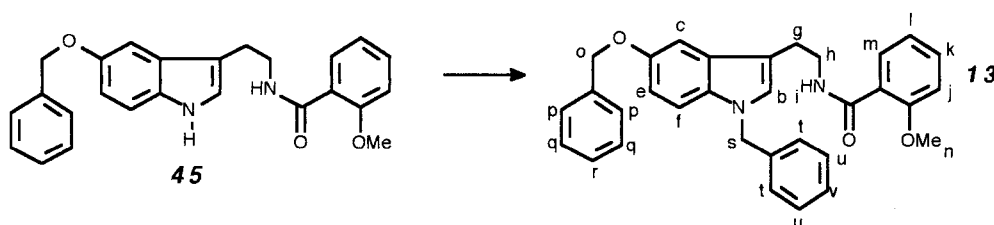
IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:

1615 (CO)

RMN(300 MHz, DMSO-d₆) : $\delta(\text{ppm})$:

2 conformations sont visibles (conf1 / conf2, 6:4)
2,73 (s, 3H, conf2, Hq)
2,9 (m, 2H, conf1, Hg)
2,9 (t, J= 7,6Hz, 2H, conf2, Hg)
3,05 (s, 3H, conf1, Hq)
3,25 (m, 2H, conf1, Hh)
3,65 (sl, 3H, Ho + 2H, conf2, Hh)
3,7 (s, 3H, conf2, Hp)
3,75 (s, 3H, conf1, Hp)
3,8 (2s, 3H, conf1 + 3H, conf2, Hn)
6,5 à 7,4 (m, 8H, Hb+Hc+He+Hf+Hj+Hk+Hl+Hm)

Synthèse du 1-benzyl-3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]-5-benzyloxyindole **13**



A une solution, maintenue à 0°C et sous atmosphère inerte, de dérivé indolique **45** (2 g ; 5 mmol) dans le DMF est ajouté l'hydrure de sodium (180 mg ; 7,5 mmol) par petites portions. Après 2 heures d'agitation, le bromure de benzyle (855 mg ; 5 mmol) dissous dans du DMF est ajouté goutte à goutte.

Après 2 heures, le solvant est évaporé; le brut est repris dans AcOEt. La phase organique est lavée par une solution aqueuse de HCl 1N, par l'eau, puis séchée sur MgSO₄ et portée à sec. Le brut est chromatographié sur gel de silice (éluant : hexane / AcOEt 65 : 35) pour donner **13**.

13 est recristallisé dans l'éther diisopropylique (rendement : 30%).

R_f : 0,2 (hexane / AcOEt 7 : 3)

F : 102-104°C

SM(EI) :

490	M ⁺
339	M-M[H ₂ N-CO-(2-OCH ₃)Ph]
135	M[⁺ CO-(2-OCH ₃)Ph]
91	M(cation tropylium)

Analyse élémentaire :

	% calculé	% trouvé
C	78,34	78,20
H	6,16	6,41
N	5,7	5,88

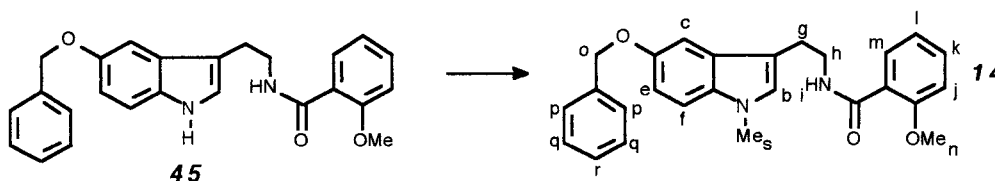
IR (pastille de KBr) : ν(cm⁻¹) :

3380	(NHCO)
1630	(CO)

RMN(250 MHz, DMSO-d₆) : δ(ppm) :

2,95	(t, J= 7,0 Hz, 2H, Hg)
3,6	(td, 2H, Hh)
3,7	(s, 3H, Hn)
5,0	(s, 2H, Hs)
5,3	(s, 2H, Ho)
6,8	(dd, J= 8,8 Hz, J'= 2,4 Hz, 1H, He)
7,0 à 7,5	(m, 16H, Hb+Hc+Hf+Hj+Hk+Hl+Hp+Hq+Hr+Ht+Hu+Hv)
7,8	(dd, J= 7,7 Hz, J'= 1,9 Hz, 1H, Hm)
8,15	(m, 1H, Hi)

Synthèse du 1-méthyl-3-[2-(2-méthoxybenzamido)éthyl]-5-benzyloxyindole **14**



A une solution, maintenue à 0°C et sous atmosphère inerte, de dérivé indolique **45** (900 mg ; 2,25 mmol) dans le DMF est ajouté l'hydruide de sodium (81 mg, 3,38 mmol) par petites portions. Après 2 heures d'agitation, l'iodure de méthyle (320 mg ; 2,25 mmol) dissous dans du DMF est ajouté goutte à goutte.

Après 2 heures, le solvant est évaporé; le brut est repris dans AcOEt. La phase organique est lavée par une solution aqueuse de HCl 1N (3 x 30 ml), par l'eau (3 x 30 ml), puis séchée sur MgSO₄ et portée à sec pour donner **14**.

14 est recristallisé dans le méthanol (rendement : 60%).

R_f : 0,2 (hexane / AcOEt 7 : 3)

F : 130-132°C

SM(EI) :

414	M ⁺
263	M-M[H ₂ N-CO-(2-OCH ₃)Ph]

IR (pastille de KBr) : ν(cm⁻¹) :

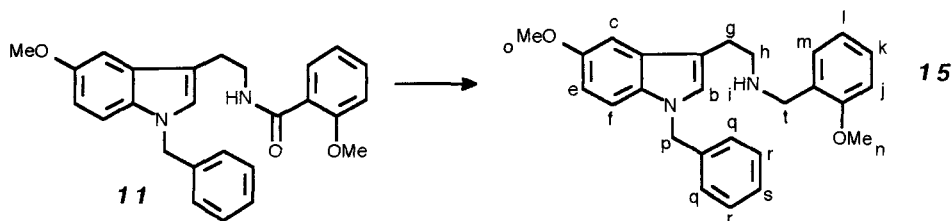
3350	(NHCO)
1630	(CO)

RMN(250 MHz, DMSO-d₆) : δ(ppm) :

2,9	(t, J= 7,25 Hz, 2H, Hg)
3,6	(m, 2H, Hh)
3,7	(s, 3H, Hs)
3,75	(s, 3H, Hn)
5,0	(s, 2H, Ho)
6,85	(dd, 1H, He)
7,0 à 7,5	(m, 11H, Hb+Hc+Hf+Hj+Hk+Hl+Hp+Hq+Hr)
7,8	(dd, 1H, Hm)
8,15	(m, 1H, Hi)

Analyse élémentaire :

	% calculé	% trouvé
C	75,34	75,14
H	6,32	6,48
N	6,75	6,96

Synthèse du 1-benzyl-3-(2-(2-méthoxybenzylamino)éthyl)-5-méthoxyindole **15 (chlorhydrate)**

A une solution, maintenue sous atmosphère inerte, de dérivé indolique **11** (1,5 g ; 3,6 mmol) dans le THF anhydre est ajouté LiAlH_4 (550 mg ; 14,5 mmol) par petites portions. Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 26 heures. On ajoute alors, goutte à goutte, de l'eau au mélange refroidi jusqu'à arrêt du dégagement gazeux ; le précipité formé est filtré, lavé trois fois par le THF. Les filtrats sont rassemblés, évaporés à sec, repris dans AcOEt et lavés par une solution de HCl 1N.

La phase organique contenant **15** sous forme de chlorhydrate est séchée sur MgSO_4 , portée à sec et reprise dans un mélange éther diéthylique / AcOEt dans lequel **15** précipite (rendement : 60%).

15 (sous forme de chlorhydrate) est recristallisé dans AcOEt puis dans l'acétonitrile.

Rf : 0,5 (CH_2Cl_2 / MeOH 9 : 1)

E : 172-174°C

SM(EI) :

400	M^+
251	$\text{M}-\text{M}[\text{CH}-\text{HN}-\text{CH}_2-(2-\text{OCH}_3)\text{Ph}]$
150	$\text{M}[\text{CH}_2=\text{NH}^+-(2-\text{OCH}_3)\text{Ph}]$
121	$\text{M}[\text{CH}_2-(2-\text{OCH}_3)\text{Ph}]$
91	$\text{M}(\text{cation tropylium})$

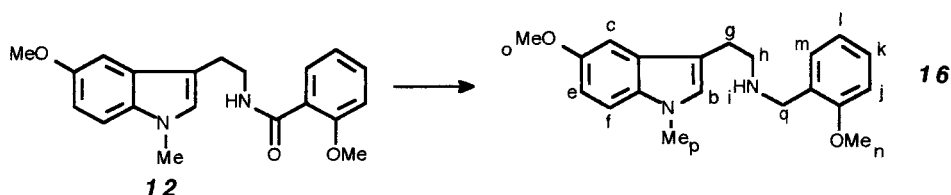
RMN(250 MHz, DMSO- d_6) : δ (ppm) :

3,1	(sl, 4H, Hg+Hh)
3,75-3,8	(2s, 3H+3H, Hn+Ho)
4,2	(s, 2H, Ht)
5,3	(s, 2H, Hp)
6,76	(dd, $J=8,8\text{ Hz}$, $J'=2,4\text{ Hz}$, 1H, He)
7,0 à 7,5	(m, 12H, Hb+Hc+Hf+Hj+Hk+Hl+Hm+Hq+Hr+Hs)
9,2	(m, NH_2^+)

Analyse élémentaire :

	% calculé	% trouvé
C	71,46	71,69
H	6,68	6,90
N	6,41	6,71
Cl	8,11	8,49

Synthèse du 1-méthyl-3-(2-(2-méthoxybenzylamino)éthyl)-5-méthoxyindole **16** (maléate)



A une solution, maintenue sous atmosphère inerte, de dérivé indolique **12** (2,4 g ; 7,1 mmol) dans le THF anhydre est ajouté LiAlH_4 (1,08 g ; 28,4 mmol) par petites portions. Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 20 heures. On ajoute alors, goutte à goutte, de l'eau au mélange refroidi jusqu'à arrêt du dégagement gazeux ; le précipité formé est filtré, lavé trois fois par le THF. Les filtrats sont rassemblés, évaporés à sec et repris par une solution de HCl 1N. Cette phase aqueuse est lavée par AcOEt, alcalinisée par du carbonate de potassium et extraite à AcOEt. La phase d'extraction est séchée sur MgSO_4 et portée à sec. Le brut est repris dans le dioxane, dans lequel on ajoute une solution de dioxane saturée en acide maléique. **16** sous forme de maléate précipite. Il est filtré et recristallisé dans l'éthanol absolu (rendement : 60%).

Rf : 0,45 (CH_2Cl_2 / MeOH, 9 : 1)

F : 199-202°C

SM(EI) :

324	M^+
339	$\text{M}-\text{M}[\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(2-\text{OCH}_3)\text{Ph}]$
121	$\text{M}^+[\text{CH}_2-(2-\text{OCH}_3)\text{Ph}]$

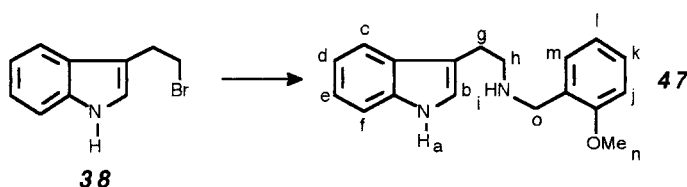
Analyse élémentaire :

	% calculé	% trouvé
C	65,44	65,32
H	6,40	6,46
N	6,36	6,55

RMN (250 MHz, DMSO- d_6) : δ (ppm) :

3,0	(m, 2H, Hg)
3,2	(m, 2H, Hh)
3,3	(m, COOH-maléate-)
3,7	(s, 3H, Hp)
3,75-3,8	(2s, 3H+3H, Hn+Ho)
4,2	(s, 2H, Hq)
6,0	(s, 2H, -CH=CH-maléate-)
6,8	(dd, $J=8,8$ Hz, $J'=2,3$ Hz, 1H, He)
7,0 à 7,2	(m, 4H, H aromatiques)
7,3	(d, $J=8,8$ Hz, 1H, Hf)
7,4 à 7,5	(m, 2H, H aromatiques)
8,6	(m, NH_2^+)

Synthèse du 3-(2-(2-méthoxybenzylamino)éthyl)indole **47** (bromhydrate)



A une solution, maintenue sous atmosphère inerte, de 2-méthoxybenzylamine (6,12 g, 44,6 mmol) dans l'acétonitrile est ajoutée le dérivé indolique **38** (2 g, 8,92 mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 40 heures.

Après évaporation à sec du solvant, le brut est chromatographié sur gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 / MeOH 9 : 1) puis précipité dans AcOEt (rendement 80%).

Rf : 0,3 (CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1)

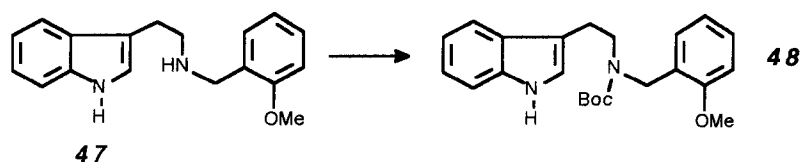
IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :
 3280 (NH indolique)
 2300-2900 (NH₂⁺)

SM(EI) :
 280 M⁺
 150 M[CH₂=NH⁺-(2-OCH₃)Ph]
 121 M⁺[CH₂-(2-OCH₃)Ph]

RMN(300 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) :

3,0	(sl, 4H, Hg+Hh)
3,8	(s, 3H, Hn)
4,0	(s, 2H, Ho)
6,9 à 7,1	(m, 4H, H aromatiques)
7,15	(s, 1H, Hb)
7,15 à 7,3	(m, 3H, H aromatiques)
7,5	(d, J= 7,8Hz, 1H, Hf)
10,9	(m, 1H, Ha)

Synthèse du 3-(2-(N-tert-butoxycarbonyl-N-(2-méthoxybenzyl)amino)éthyl)indole **48**



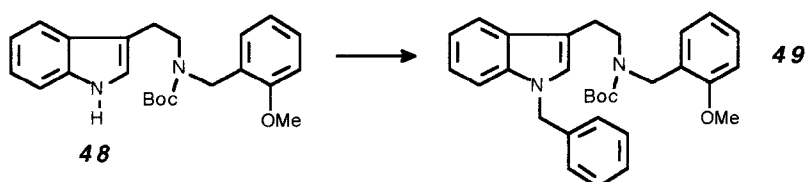
A une solution de dérivé indolique **47** (1,9 g ; 5,26 mmol) dans un mélange dioxane / eau (4 : 1) sont ajoutés la TEA (1,37 g ; 13,57 mmol) puis le dicarbonate de di-tert butyle (1,15 g ; 5,26 mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 24 heures.

Après évaporation du solvant, le brut est repris dans AcOEt, lavé par l'eau puis par une solution de soude 2N. La phase organique est séchée sur MgSO₄, évaporée à sec et lavée par l'éther diéthylique pour donner **48** avec 80% de rendement.

Rf : 0,8 (hexane / AcOEt 5 : 5)

IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :
 3280 (NH)
 1660 (CO)

Synthèse du 1-benzyl-3-(2-(N-tert-butoxycarbonyl-N-(2-méthoxybenzyl)amino)éthyl)indole **49**

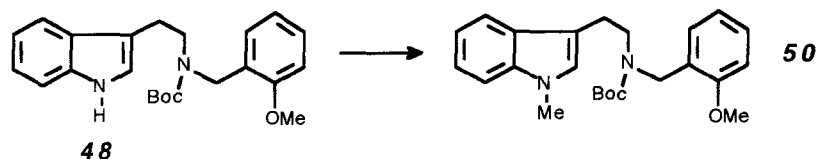


A une solution, maintenue à 0°C, de dérivé indolique **48** (1,6 g ; 4,22 mmol) dans le DMF est ajouté l'hydruure de sodium (152 mg ; 6,34 mmol) par petites portions. Après 2 heures d'agitation, le bromure de benzyle (723 mg ; 4,22 mmol) dissous dans du DMF est ajouté goutte à goutte.

Après 24 heures, le solvant est évaporé; le brut est repris dans AcOEt. La phase organique est lavée par une solution aqueuse de HCl 1N, par l'eau, puis séchée sur MgSO₄ et portée à sec pour donner **49** avec 85% de rendement.

Rf : 0,55 (hexane / AcOEt 3 : 7)

IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :
 1680 (CO)

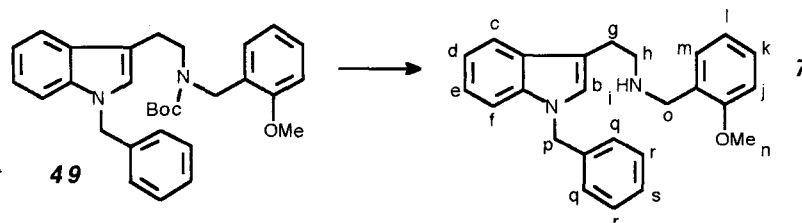
Synthèse du 1-méthyl-3-(2-(N-tert-butoxycarbonyl-N-(2-méthoxybenzyl)amino)éthyl)indole **50**

A une solution, maintenue à 0°C, de dérivé indolique **48** (1,1 g ; 2,8 mmol) dans le DMF est ajouté l'hydrure de sodium (136 mg ; 5,65 mmol) par petites portions. Après 2 heures d'agitation, l'iodure de méthyle (400 mg, 2,8 mmol) dissous dans du DMF est ajouté goutte à goutte.

Après 2 heures, le solvant est évaporé; le brut est repris dans AcOEt. La phase organique est lavée par une solution aqueuse de HCl 1N, par l'eau, puis séchée sur MgSO₄ et portée à sec pour donner **50** avec 90% de rendement.

R_f : 0,2 (hexane / AcOEt 9 : 1)

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:
1680 (CO)

Synthèse du 1-benzyl-3-(2-(2-méthoxybenzyl)amino)éthyl)indole **7** (chlorhydrate)

A une solution de dérivé indolique **49** (1,61 g ; 3,43 mmol) dans le méthanol est ajoutée une solution de méthanol saturé en HCl.

Après 3 heures d'agitation, le solvant est évaporé. Le brut précipite dans AcOEt; le précipité est recristallisé dans l'acétonitrile pour donner **7** avec 55% de rendement.

R_f : 0,6 (CH₂Cl₂ / MeOH, 9 : 1)

E₁ : 189-191°C

SM(EI) :

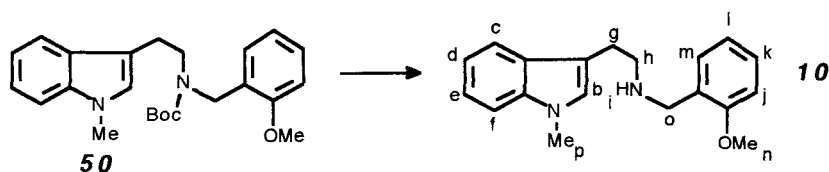
370	M ⁺
150	M(CH ₂ =NH ⁺ -(2-OCH ₃)Ph]
121	(M(⁺ CH ₂ -(2-OCH ₃)Ph]
91	(M(cation tropylium)

Analyse élémentaire :

	% calculé	% trouvé
C	73,78	73,58
H	6,68	6,99
N	6,88	6,83
Cl	8,71	8,63

RMN(300 MHz, DMSO-d₆) : $\delta(\text{ppm})$:

3,15	(sl, 4H, Hg+Hh)
3,8	(s, 3H, Hn)
4,15	(s, 2H, Ho)
5,35	(s, 2H, Hp)
6,95 à 7,6	(m, 14H, Hb+Hc+Hd+He+Hf+Hj+Hk+Hl+Hm+Hq+Hr+Hs)
9,25	(m, NH ₂ ⁺)

Synthèse du 1-méthyl-3-(2-(2-méthoxybenzyl)amino)éthyl)indole **10** (chlorhydrate)

A une solution de dérivé indolique **50** (1,1 g ; 2,79 mmol) dans le méthanol est ajoutée une solution de méthanol saturé en HCl.

Après 2 heures d'agitation, le solvant est évaporé. Le brut précipite dans l'éther diéthylique; le précipité est passé sur gel de silice (éluant : CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1) puis recristallisé dans l'acétonitrile pour donner **10** avec 90% de rendement.

Rf : 0,3 (CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1)

F : 178-181°C

SM(EI) :

294	M ⁺
150	M[CH ₂ =NH ⁺ -(2-OCH ₃)Ph]
121	M[⁺ CH ₂ -(2-OCH ₃)Ph]

Analyse élémentaire :

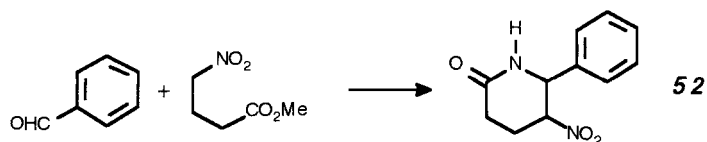
	% calculé	% trouvé
C	68,97	69,16
H	7,00	7,38
N	8,46	8,08

RMN(250 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) : δ(ppm) :

3,1	(sl, 4H, Hg+Hh)
3,75	(s, 3H, Hp)
3,8	(s, 3H, Hn)
4,1	(s, 2H, Ho)
6,95 à 7,6	(m, 9H, Hb+Hc+Hd+He+Hf+Hj+Hk+Hl+Hm)

B.4. SYNTHÈSE D'UNE MOLECULE HYBRIDE FK888 / CP99994, LE COMPOSE 17

Synthèse de la 5-nitro-6-phénylpipéridin-2-one 52



A une solution (placée sous atmosphère inerte) de benzaldéhyde (7,93 g ; 75 mmol) dans l'éthanol sont ajoutés le 4-nitrobutyrate de méthyle (10 g ; 0,7 mmol) et l'acétate d'ammonium (10,48 g ; 136 mmol). Le mélange est porté à reflux pendant 3 heures puis refroidi dans un bain de glace.

52 précipite. Il est isolé par filtration, lavé par l'éthanol puis par l'éther. (rendement 90%)

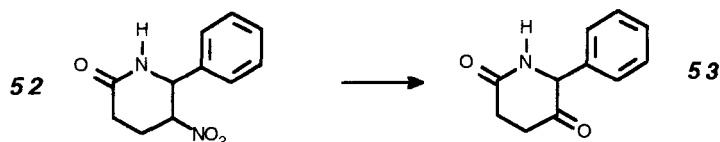
Rf : 0,4 (CH₂Cl₂/ AcOEt 5 : 5)

E : 175-178°C

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:

1630	(CO)
1530	(NO ₂)
1360	(NO ₂)

Synthèse de la 5-oxo-6-phénylpipéridin-2-one 53



Le méthanolate de sodium est préparé à partir de 750 mg (32,6 mmol) de sodium. Le dérivé nitré **52** (3,5 g ; 15,9 mmol) est ajouté (solution A). Dans un bicol maintenu sous atmosphère inerte, sont solubilisés 12,3 g (79,5 mmol) de TiCl₃ dans de l'eau préalablement dégazée (solution B).

Dans un autre bicol maintenu sous atmosphère inerte et dans un bain de glace, sont solubilisés 18,4 g (238 mmol) d'acétate d'ammonium dans de l'eau préalablement dégazée. La solution B et la solution A sont alors successivement ajoutées. Le mélange réactionnel est agité une heure à 0°C et une heure supplémentaire à température ambiante. Puis 13,5 ml d'HCl concentré sont additionnés goutte à goutte.

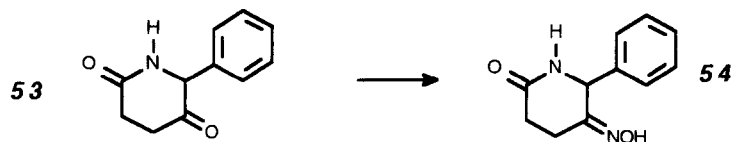
Après évaporation du méthanol, la phase aqueuse est extraite trois fois par l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée par une solution aqueuse de chlorure de sodium, séchée sur MgSO₄ et portée à sec. Le résidu est repris par l'éther diéthylique. Un précipité de **53** (rendement 85%) est alors isolé.

Rf : 0,25 (CH₂Cl₂/ AcOEt 5 : 5)

E : 168-170°C

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:

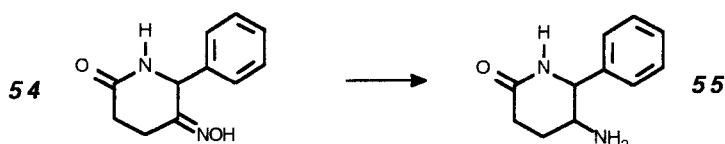
1700	(CO cétone)
1640	(CO amide)

Synthèse de la 5-oximino-6-phénylpipéridin-2-one **54**

A une solution de cétone **53** (6 g ; 31,7 mmol) dans l'éthanol (75 ml) sont ajoutés l'hydroxylamine sous forme de chlorhydrate (6,6 g ; 95,2 mmol) puis l'acétate de sodium (13 g ; 158,7 mmol) dissous dans 25 ml d'eau. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation pendant 72 heures. **54** se forme et précipite dans le milieu ; il est isolé par filtration et lavé par l'éther. Il est recristallisé dans l'éthanol (rendement 81%).

Rf : 0,3 (CH₂Cl₂/ AcOEt 5 : 5)

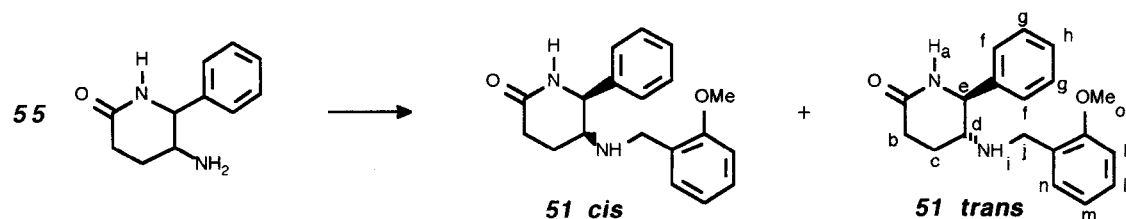
IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:
 3100-3500 (NH, OH)
 1630 (CO amide)

Synthèse de la 5-amino-6-phénylpipéridin-2-one **55**

A une solution d'oxime **54** (3,2 g ; 17,7 mmol) dans le méthanol est ajoutée une quantité catalytique de nickel de Raney. Le mélange réactionnel est maintenu sous une atmosphère normale d'hydrogène pendant 5 heures.

Après filtration du nickel, le solvant est évaporé et le résidu repris dans le dichlorométhane. Un précipité est écarté et **55** est obtenu sous forme d'huile après évaporation du CH₂Cl₂ (rendement 54 %)

Rf : 0,3 (CH₂Cl₂/ MeOH 9 : 1)

Synthèse de la 5-[(2-méthoxybenzyl)-amino]-6-phénylpipéridin-2-one **51** (sous forme de mélange de diastéréoisomères : **51 cis** / **51 trans**) et de **51 trans**

Le pH d'une solution d'amine **55** (1,82 g ; 9,6 mmol) dans le méthanol (80 ml) est ajusté à 5 par ajout goutte à goutte de méthanol saturé en HCl. Cette solution dans laquelle est ajouté du tamis moléculaire (3Å), est placée dans un tricol muni d'une garde à soude, sous atmosphère inerte. Le cyanoborohydrure de sodium (0,6 g ; 9,6 mmol) est additionné par petites fractions et le pH réajusté à 5. Après ajout du 2-méthoxybenzaldéhyde (1,57 g ; 11,5 mmol), le

mélange réactionnel est maintenu sous agitation pendant 12 heures à température ambiante puis évaporé à sec et repris dans le dichlorométhane. Il est lavé par une solution à 10% de NaHCO_3 puis par HCl 1N (trois fois). La phase acide est alcalinisée par K_2CO_3 , extraite par CH_2Cl_2 et séchée sur MgSO_4 . Après évaporation à sec, le brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 / MeOH 98 : 2). Le produit **51 trans** est alors obtenu pur avec 3% de rendement. Le mélange des diastéréoisomères **51 trans** / **51 cis** est également isolé avec 90% de rendement.

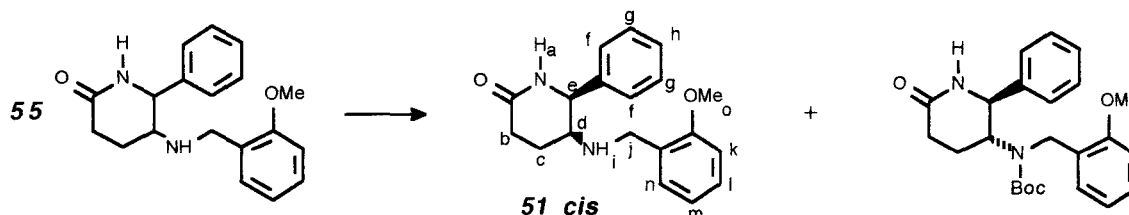
Caractéristiques du dérivé **51 trans**

Rf : 0,5 (CH_2Cl_2 / MeOH 9 : 1)

RMN (300 MHz, CDCl_3) : δ (ppm) :

1,8	(m, 1H, Hc)	3,85	(d-système AB-, J = 13,5 Hz, 1H, Hj)
2,15	(m, 1H, Hc')		
2,45	(dt -système AB-, J = 17,8 Hz, J' = 5,4 Hz, 1H, Hb)	4,4	(d, J = 7,5 Hz, 1H, He)
		6,15	(s, 1H, Ha)
2,6	(m, 1H, Hb')	6,75	(d, J = 8,2 Hz, 1H, Hk)
2,75	(m, 1H, Hd)	6,85	(t, J = 7,4 Hz, 1H, Hm)
3,5	(s, 3H, Ho)	7,1	(d, J = 7,1 Hz, 1H, Hn)
3,65	(d -système AB-, J = 13,0 Hz, 1H, Hj)	7,2 à 7,5	(m, 7H, Hf+Hg+Hh+Hi+Hl)

Synthèse de la 5-[(2-méthoxybenzyl)-amino]-6-phénylpipéridin-2-one **51 cis**



Le mélange de diastéréoisomères **51 trans** / **51 cis** (2,7 g ; 8,7 mmol) est préparé selon le protocole décrit précédemment. Il est dissous dans 50 ml d'un mélange dioxane / eau 4 : 1 dans lequel est ajouté la DIPEA (2,3 ml ; 13 mmol) puis le dicarbonate de di-tert-butyle (2,85 g ; 13 mmol). Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation pendant 24 heures.

Le solvant est évaporé. Le brut est repris dans CH_2Cl_2 , lavé par une solution saturée de NaHCO_3 puis par HCl . La phase acide est alcalinisée par K_2CO_3 , extraite par CH_2Cl_2 et séchée sur MgSO_4 . Après évaporation du solvant, le résidu précipite dans l'éther isopropylique et fournit **51 cis** avec un rendement de 75%.

Caractéristiques du dérivé **51 cis**

Rf : 0,4 (CH_2Cl_2 / MeOH 9 : 1)

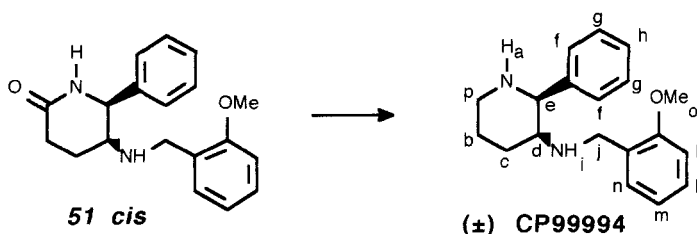
E : 125-127°C

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:
1650 (CO amide)

RMN (300 MHz, CDCl₃) : δ(ppm) :

1,85	(m, 1H, Hc)	3,8	(d-système AB-, J = 13,7 Hz, 1H, Hj)
2,05	(m, 1H, Hc')	4,75	(d, J = 7,5 Hz, 1H, He)
2,4	(dt -système AB-, J = 17,6 Hz, J' = 5,3 Hz, 1H, Hb)	5,95	(s, 1H, Ha)
2,7	(ddd -système AB-, J = 16,7 Hz, J' = 10,1 Hz, J'' = 6,6 Hz, 1H, Hb')	6,75	(d, J = 8,2 Hz, 1H, Hk)
3,0	(m, 1H, Hd)	6,85	(t, J = 7,4 Hz, 1H, Hm)
3,5	(s, 3H, Ho)	7,1	(d, J = 7,2 Hz, 1H, Hn)
3,55	(d -système AB-, J = 13,3 Hz, 1H, Hj)	7,2	(t, J = 8,0 Hz, 1H, Hl)
		7,2 à 7,4	(m, 7H, Hf+Hg+Hh+Hi)

Synthèse de la 2-phényl-3-[(2-méthoxybenzyl)-amino]pipéridine (±) CP99994 (dichlorhydrate)



A une solution maintenue sous atmosphère inerte de **51 cis** (1,675 g ; 5,2 mmol) dans le THF anhydre sont ajoutés 13,9 ml d'une solution 2N de BH₃.SMe₂ dans le THF. Le mélange réactionnel est porté à 60°C et maintenu sous agitation pendant 16 heures.

Après ajout de 4 ml de MeOH, l'agitation est poursuivie deux heures supplémentaires à température ambiante. Puis, le solvant est évaporé et le résidu repris dans le méthanol. 1,5 g (10,8 mmol) de K₂CO₃ sont additionnés au mélange et la solution est de nouveau chauffée à reflux.

Après 2,5 heures, le solvant est évaporé, le brut repris dans le dichlorométhane, lavé par une solution saturée de NaHCO₃ puis par HCl 1N. La phase acide est alcalinisée par K₂CO₃, extraite par CH₂Cl₂ et séchée sur MgSO₄.

Après évaporation du solvant, le résidu est repris dans l'éther diéthylique et (±) **CP99994** précipite sous forme de dichlorhydrate après l'ajout d'une solution éthérée d'HCl. Il est recristallisé dans l'éthanol. (rendement 65%)

Rf : 0,15 (CH₂Cl₂ / MeOH 95 : 5)

Analyse élémentaire : (CP99994.2HCl.1/5EtOH.)

F : 262-264°C

SM (EI) :

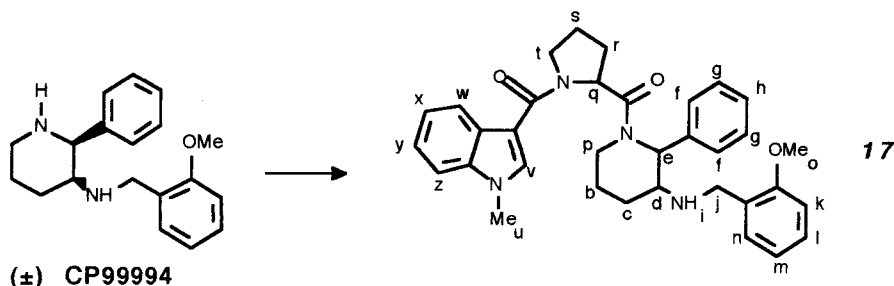
296	M ⁺
177	M[HN(CH ₂) ₃ CHPhCHNH ₃ ⁺]
121	M[2-(OMe)Ph-CH ₂ ⁺]

	% calculé	% trouvé
C	60,12	60,13
H	7,33	7,44
N	7,23	7,32

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) : δ(ppm) :

1,8	(dl, 1H, Hc)	4,95	(m, 1H, He)
2,15	(m, 1H, Hb)	6,95	(m, 2H, Hk+Hm)
2,25	(m, 1H, Hc')	7,25	(d, J = 7,4 Hz, 1H, Hn)
2,35	(dl, 1H, Hb')	7,35	(t, J = 7,6 Hz, 1H, Hl)
3,2	(m, 1H, Hp)	7,5	(m, 3H, Hg+Hh)
3,45	(m, 1H, Hj)	7,7	(d, J = 7,35 Hz, 2H, Hf)
3,5	(m, 1H, Hp')	9,0	(m, 1H, NH ₂ i ⁺)
3,7	(s, 3H, Ho)	9,4	(m, 1H, NH ₂ i ⁺)
3,85	(dl, 1H, Hj)	10,1	(m, 1H, NH ₂ a ⁺)
4,0	(m, 1H, Hd)	10,7	(m, 1H, NH ₂ a ⁺)

Synthèse de la 1-(2-[N-(1-méthyl-indol-3-yl)carbonyl]proyl)-2-phényl-3-[(2-méthoxybenzyl)amino]pipéridine **17**



A une solution d'acide **30** (790 mg ; 2,9 mmol) dans le dichlorométhane est ajouté le HOBT (585 mg ; 4,35 mmol), la TEA (0,8 ml ; 5,8 mmol) et l'EDCI (830 mg ; 4,35 mmol). Après 5 heures, l'amine **CP99994** (958 mg ; 2,9 mmol) et 0,8 ml de TEA sont ajoutés.

Après 48 heures, le mélange réactionnel est lavé par une solution saturée de NaHCO₃ puis par l'eau, par HCl 1N et de nouveau par l'eau. La phase acide est alcalinisée par K₂CO₃, extraite par CH₂Cl₂. Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, le résidu est repris dans une solution étherée d'acide chlorhydrique. **17** (sous forme de chlorhydrate) précipite et est isolé avec 31 % de rendement.

Rf : 0,5 (CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1 -cuve saturée en NH₃-)

E : 250-252°C

SM (EI) :

550	M ⁺
255	M[(1-Me)Ind-CO-(N(CH ₂) ₃ CH)-CO ⁺]
158	M[(1-Me)Ind-CO ⁺]

Analyse élémentaire : (**17**. HCl. 1/2 H₂O)

	% calculé	% trouvé
C	68,40	68,66
H	6,76	6,75
N	9,39	9,24

pouvoir rotatoire spécifique :

$$[\alpha]_{\text{D}}^{25^{\circ}\text{C}} = -10,40^{\circ} \text{ (c = 1 dans MeOH)}$$

IR (pastille de KBr) : ν(cm⁻¹) :

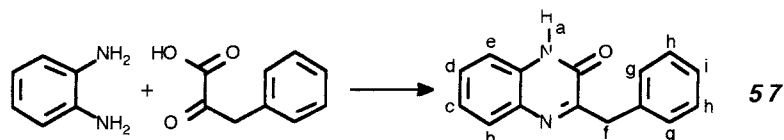
3300-3500	(NH)
1640	(CO)

RMN (300 MHz, DMSO-d6) : δ (ppm) :

1,6	(ml, 1H, Hc)	6,2	(m, 1H, He)
1,9	(m, 4H, Hs / Hr+ Hb)	6,9 à 7,8	(m, 12H, Hg+Hh+Hk+Hl+Hm+Hn+Hv+ Hw+Hx+Hy+Hz)
2,25	(m, 3H, Hr'+Hc'+Hb')	7,95	(dl, 2H, Hf)
3,2	(m, 2H, Hp)	8,7	(m, 1H, NH ₂ i ⁺)
3,55 à 4,1	(m, 4H, Hj+Ht)	9,2	(m, 1H, NH ₂ i' ⁺)
3,6	(s, 3H, Ho)		
3,85	(s, 3H, Hu)		
4,15	(m, 2H, Hd+Hq)		

B.5. SYNTHÈSE DE DERIVES POSSEDANT UN SQUELETTE 2-OXO-3-BENZYL-1,2,3,4-TETRAHYDROQUINOXALINE -complété dans l'annexe VI-

Synthèse de la 2-oxo-3-benzyl-1,2-dihydroquinoxaline 57



A une solution d'acide phénylpyruvique (26,3 g ; 150 mmoles) dans l'éthanol (200 ml) est ajoutée par petites portions l'orthophénylènediamine (10,8 g ; 100 mmoles). Le mélange est porté à reflux pendant trente minutes puis le solvant est évaporé et le résidu est encore chauffé à 100°C pendant une heure.

Le mélange réactionnel est alors repris dans l'eau et le produit brut est isolé sous forme d'un précipité orange. Il est lavé par une solution aqueuse bouillante saturée en NaHCO₃ puis par l'éther diisopropylique. Le produit **57** est alors obtenu sous forme d'une poudre jaune pâle avec un rendement de 95%. Il peut être recristallisé dans l'isopropanol.

R_f: 0.7 (AcOEt)

E: 198,4-198,7°C

SM (EI):

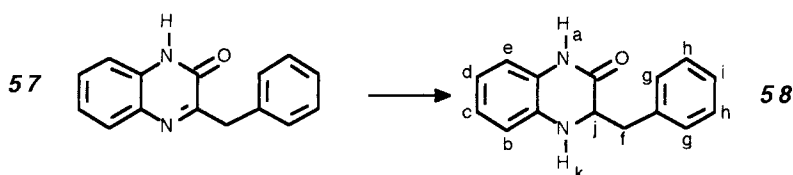
236	M ⁺
219	M-M(OH)
207	M-M(CHO)
91	M(cation tropylium)

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:
1640 (CO)

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) : $\delta(\text{ppm})$:

4,10	(s, 2H, H _f)
7,25	(m, 7H, H aromatiques)
7,45	(m, 1H, H aromatique)
7,70	(d, J= 8,05 Hz, 1H, H aromatique)
12,4	(m, 1H, H _a)

Synthèse de la 2-oxo-3-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 58



Une solution de **57** (5,01 g ; 21,2 mmoles) dans le dioxane (100ml) et dans laquelle a été ajoutée une quantité catalytique de charbon palladié à 10% est agitée vigoureusement pendant 48 heures sous une atmosphère normale d'hydrogène.

Après filtration du catalyseur, le solvant est évaporé et le produit **58** est isolé avec 80% de rendement par précipitation fractionnée dans l'éther diisopropylique.

R_f : 0.45 (hexane / AcOEt 6 : 4)

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:

3360	(NH)
3320	(NH)
2800-3200	(CH)
1660	(CO)

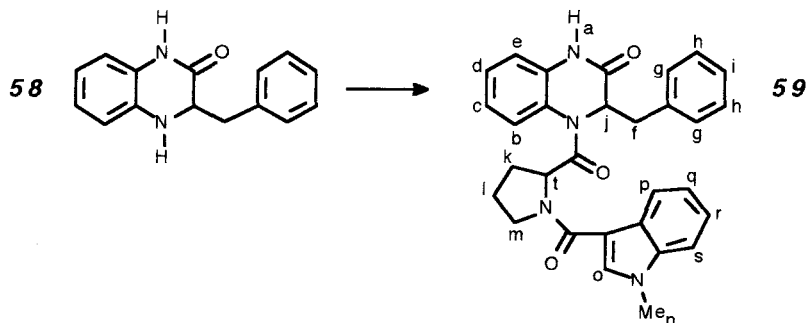
RMN (300 MHz, CDCl₃) : $\delta(\text{ppm})$:

2,85	(dd, J= 13,5Hz, J'= 11Hz, 1H, H _f)
3,25	(dd, J= 13,5Hz, J'= 3Hz, 1H, H _{f'})
4,05	(dd, J= 11,05Hz, J'= 3,05Hz, 1H, H _j)
6,6	(d, J= 7,75Hz, 1H, H _b)
6,8 à 7,5	(m, 9H, H _c +H _d +H _e +H _g +H _h +H _i)
8,6	(s, 1H, H _a)

SM (EI) :

238	M ⁺
147	M-M(CH ₂ Ph)
91	M(cation tropylium)

Synthèse de la 2-oxo-3-benzyl-4-[[N-(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]prolyl]-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **58**



Formation du chlorure d'acide de **30**

A une solution maintenue à 0°C de [N-(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline **30** (3,5 g ; 13 mmol) dans le dichlorométhane anhydre est ajouté goutte à goutte le chlorure d'oxalyle (1,8 g ; 15 mmol). On laisse le mélange réactionnel revenir à température ambiante. Après une heure, il est évaporé à sec.

Acylation de **58**

Le chlorure d'acide de **30**, brut, est repris dans du dichlorométhane anhydre et ajouté goutte à goutte à une solution de **58** (2,14g ; 9 mmol) et de DIPEA (1,7g ; 13 mmol) dans le dichlorométhane.

Après 5 heures, un insoluble est écarté puis le mélange réactionnel est lavé par HCl 1N, par l'eau, par une solution saturée de NaHCO₃ et, de nouveau, par l'eau puis séché sur MgSO₄. Après évaporation à sec, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant CH₂Cl₂ / AcOEt 15 : 85) pour donner **59** qui est recristallisé dans l'isopropanol (rendement : 25%).

R_f : 0,4 (AcOEt)

E : 233,8-234,3°C

SM (FAB) :

493	MH ⁺
255	M((N-Me)Ind-CO-(N(CH ₂) ₃ CH)-CO ⁺)
158	M((N-Me)Ind-CO ⁺)

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:

1675	(CO intracyclique)
1625	(CO)

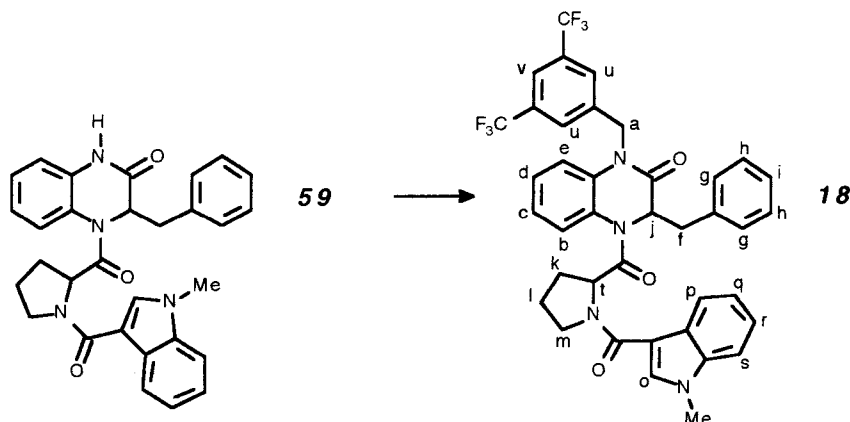
Analyse élémentaire :

	% calculé	% obtenu
C	73,15	73,05
H	5,73	5,84
N	11,37	11,33

RMN (300 MHz, DMSO-d6) : δ (ppm) :

1,5 à 2,3	(m, 4H, Hk+Hl)	5,4	(m, 1H, Ht)
2,45	(m, 1H, Hf)	7,0 à 7,4	(m, 11H, H aromatiques)
2,9	(m, 1H, Hf')	7,45	(d, J= 7,7 Hz, 1H, Hp)
3,75	(m, 2H, Hm)	7,9	(m, 2H, H aromatiques)
3,8	(s, 3H, Hn)	10,85	(s, 1H, Ha)
4,8	(m, 1H, Hj)		

Synthèse de la 1-[3,5-bis(trifluorométhyl)benzyl]-2-oxo-3-benzyl-4-[[N-(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proyl]-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **18**



A une solution maintenue à 0°C de **59** (600 mg ; 1,22 mmoles) dans du DMF anhydre (50 ml) est ajouté par petites portions l'hydrure de sodium (44 mg ; 1,83 mmoles). Le mélange est laissé sous agitation pendant 2 heures. Le chlorure de 3,5-bis(trifluorométhyl)benzyle (384 mg ; 1,46 mmoles) est alors ajouté goutte à goutte.

Après 16 heures, le DMF est évaporé et le résidu repris dans du dichlorométhane. Après lavages par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃, par l'eau, par une solution aqueuse d'HCl 1N et de nouveau par l'eau, la phase organique est séchée sur MgSO₄ puis évaporée à sec. La poudre est lavée par l'éther diisopropylique bouillant pour donner **18** avec 60% de rendement. **18** est alors recristallisé dans le toluène puis dans l'acétate d'éthyle.

Rf : 0,55 (CH₂Cl₂ / AcOEt 5:5)

E : 227,5-227,7°C

IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

1665	(CO intracyclique)
1650	(CO)

SM (FAB) :

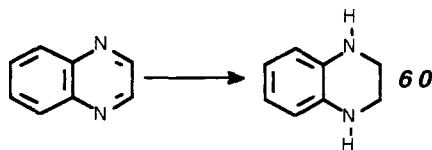
719	MH ⁺
255	M((N-Me)Ind-CO-(N(CH ₂) ₃ CH)-CO ⁺)
158	M((N-Me)Ind-CO ⁺)

RMN (300 MHz, DMSO-d6) : δ (ppm) :

1,6 à 2,35	(m, 4H, Hk+Hl)
2,55	(m, 1H, Hf)
2,95	(ddl, 1H, Hf')
3,75	(m, 2H, Hm)
3,8	(s, 3H, Hn)
4,7	(m, 1H, Hj)
5,5	(s, 2H, Ha)
5,6	(m, 1H, Ht)
7,0 à 7,45	(m, 11H, H aromatiques)
7,45	(d, J= 8,1 Hz, 1H, Hp)
7,9	(m, 2H, H aromatiques)
8,0	(m, 3H, Hu+Hv)

Analyse élémentaire :

	% calculé	% obtenu
C	65,18	65,12
H	4,49	4,63
N	7,79	7,81

B.6. SYNTHÈSE DE 1,2,3,4-TÉTRAHYDROQUINOXALINES**-complété dans l'annexe VII-****Synthèse de la 1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 60**

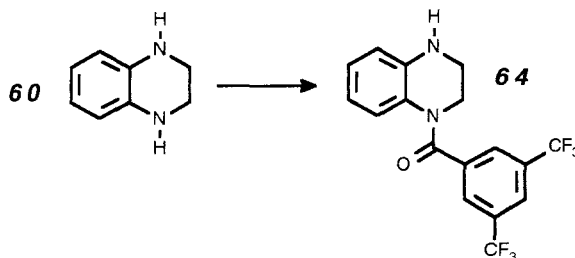
Une solution de quinoxaline (20 g ; 150 mmol) dans du toluène (200 ml), passé préalablement sur nickel de Raney, et contenant une quantité catalytique (15 mg) de PtO₂ est agitée pendant 24 heures sous une atmosphère de 20 bars d'hydrogène.

Le catalyseur est écarté par filtration et le toluène évaporé jusqu'à formation des premiers cristaux. **60** est isolé par précipitation fractionnée (rendement : 80%).

R_f : 0,25 (hexane / AcOEt, 5 : 5)

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:
3220 (NH)

F : 96-97°C

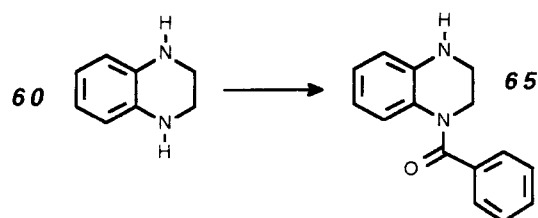
Synthèse de la 1-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzoyl]-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline 64

A une solution maintenue à 0°C de 1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **60** (5,5 g ; 41 mmol) et de DIPEA (5,83 g ; 45 mmol) dans le dichlorométhane (100 ml) est ajoutée goutte à goutte une solution de chlorure de 3,5-bis-(trifluorométhyl)benzoyl (5 g ; 37 mmol) dans le dichlorométhane.

Dès la fin de l'addition, le mélange réactionnel est lavé par HCl 1N et séché sur MgSO₄. Après évaporation à sec, **65** est obtenu pur avec 95% de rendement.

R_f : 0,7 (hexane / AcOEt 6 : 4)

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:
3320 (NH)
1620 (CO)

Synthèse de la 1-benzoyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **65**

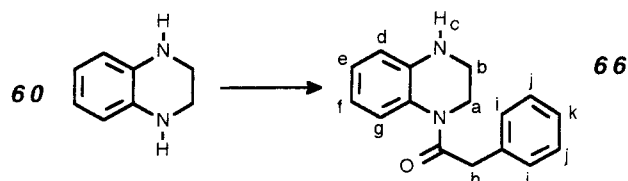
A une solution maintenue à 0°C de 1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **60** (1 g ; 7,45 mmol) et de DIPEA (1,06 g ; 8,2 mmol) dans le dichlorométhane (100 ml) est ajoutée goutte à goutte une solution de chlorure de benzoyle (943 mg ; 6,71 mmol) dans le dichlorométhane.

Dès la fin de l'addition, le mélange réactionnel est lavé par HCl 1N et séché sur MgSO_4 . Après évaporation à sec, **65** est obtenu pur, sous forme de poudre, avec 82% de rendement.

Rf: 0,2 (hexane / AcOEt 75 : 25)

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:

3310	(NH)
1620	(CO)

Synthèse de la 1-phénacétyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **66**

A une solution maintenue à 0°C de 1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **60** (3 g ; 22,2 mmol) et de DIPEA (2,87 g ; 22,2 mmol) dans le dichlorométhane (50 ml) est ajoutée goutte à goutte une solution de chlorure de phénylacétyle (3,43 g ; 22,2 mmol) dans le dichlorométhane (10 ml). Après 10 et 16 heures sont rajoutés 700 mg (4,5 mmol) de dérivé chloré. 4 heures après le dernier ajout, le mélange réactionnel est lavé par HCl 1N (3 fois) et par l'eau. Les phases aqueuses sont réextraites par CH_2Cl_2 ; les phases organiques sont combinées et séchées sur MgSO_4 . Après évaporation à sec, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : hexane / AcOEt 8 : 2) pour donner **66** avec 77% de rendement.

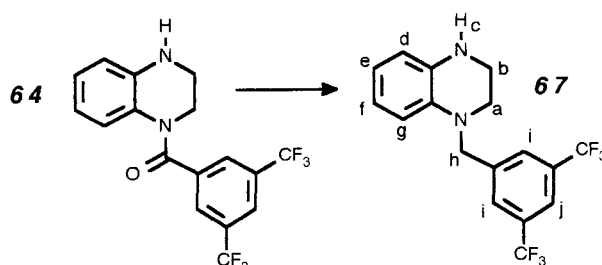
Rf: 0,55 (hexane / AcOEt 5 : 5)

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:

3340	(NH)
1650	(CO)

RMN (80 MHz, DMSO- d_6) : $\delta(\text{ppm})$:

3,25	(m, 2H, Hb)
3,65	(m, 2H, Ha)
3,9	(s, 2H, Hh)
6,1	(m, Hc)
6,4 à 7,7	(m, 9H, Hd+He+Hf+Hg+Hi+Hj+Hk)

Synthèse de la 1-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyl]-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **67**

A une solution (maintenue sous atmosphère inerte et placée dans un bicol muni d'une colonne de Vigreux), de 1-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzoyl]-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **64** (6,6 g ; 17,65 mmol) dans le THF anhydre est ajouté goutte à goutte l'éthérate de trifluorure de bore (5 ml ; 37,05 mmol). La solution est chauffée à reflux pendant 10 minutes, puis est ajouté goutte à goutte le complexe borane-sulfure de diméthyle en solution (2N) dans le THF (20 ml; 20 mmol). On porte de nouveau la solution à reflux pendant 90 minutes, en distillant l'éther diéthylique et le sulfure de diméthyle libérés lors de la réaction.

Après évaporation à sec, le brut est repris dans une solution de HCl 1N (40 ml) et porté à reflux pendant une heure. La solution est alors refroidie à 0°C et 40 ml d'une solution de soude 2N sont ajoutés. Cette phase aqueuse est saturée par K₂CO₃. Un précipité est écarté et le filtrat est extrait trois fois par l'éther diéthylique, séché sur MgSO₄ et évaporé. Le résidu est cristallisé dans l'hexane et fournit **67** avec 60% de rendement. Le filtrat de cristallisation est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : hexane / AcOEt 9 : 1) et recristallisé dans l'hexane pour donner **67** avec 10% de rendement.

R_f : 0.3 (hexane / AcOEt 9 : 1)

E : 137-138°C

SM (EI) :

360	M ⁺
227	M[3,5-(CF ₃) ₂ -Ph-CH ₂ ⁺]
133	M-M[3,5-(CF ₃) ₂ -Ph-CH ₂ ⁺]

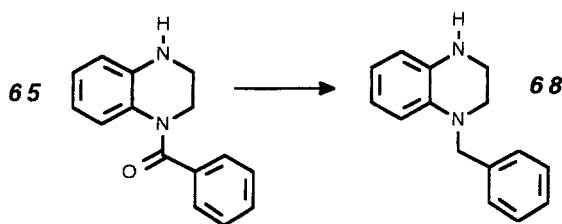
IR (pastille de KBr) : ν(cm⁻¹) :

3200	(NH)
------	------

RMN (300 MHz, CDCl₃) : δ(ppm):

deux conformères sont visibles (conf1 / conf2) dans les proportions 75 : 25

3,55	(m, 4H, Ha+Hb)
4,15	(m, Hc)
4,55	(s, 2H conf1, Hh)
4,65	(s, 2H conf2, Hh)
6,5	(d, J = 8,0 Hz, 1H conf1, Hd)
6,6	(d, J = 8,3 Hz, 1H conf2, Hd)
6,7	(t, J = 7,5 Hz, 1H, Hf)
6,75	(t, J = 8,3 Hz, 1H conf2, He)
6,9	(t, J = 7,8 Hz, 1H conf1, He)
7,0	(d, J = 7,1 Hz, 1H conf1, Hg)
7,1	(d, J = 7,7 Hz, 1H conf2, Hg)
7,7	(s, 2H conf2, Hi)
7,75	(s, 2H conf1, Hi)
7,8	(s, 1H, Hj)

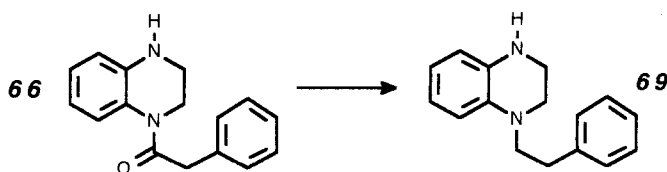
Synthèse de la 1-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **68**

A une suspension (maintenue sous atmosphère inerte et placée dans un bicol muni d'une colonne de Vigreux), de 1-benzoyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **65** (3 g ; 12,6 mmol) dans le THF anhydre est ajouté goutte à goutte l'éthérate de trifluorure de bore (3,75 g ; 26,5 mmol). Il y a alors solubilisation du produit de départ. La solution est chauffée à reflux pendant 10 minutes, puis est ajouté goutte à goutte le complexe borane-sulfure de diméthyle en solution (2N) dans le THF (6,95 ml ; 13,9 mmol). On porte de nouveau la solution à reflux pendant une heure, en distillant l'éther diéthylique et le sulfure de diméthyle libérés lors de la réaction.

Après évaporation à sec, le brut est repris dans une solution de HCl 1N (26,5 ml) et porté à reflux pendant une heure. La solution est alors refroidie à 0°C et 19,6 ml d'une solution de soude 2N sont ajoutés. Cette phase aqueuse est saturée par K₂CO₃ et extraite trois fois par l'éther diéthylique. La phase organique est séchée sur MgSO₄. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : hexane / AcOEt 9 : 1) pour donner **68** avec 81% de rendement.

Rf : 0.5 (hexane / AcOEt 7 : 3)

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:
3360 (NH)

Synthèse de la 1-phénéthyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **69**

A une solution (maintenue sous atmosphère inerte et placée dans un bicol muni d'une colonne de Vigreux), de 1-phénacétyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **66** (3,9 g ; 15,5 mmol) dans le THF anhydre (5 ml) est ajouté goutte à goutte l'éthérate de trifluorure de bore (4,63 g ; 32,6 mmol). La solution est chauffée à reflux pendant 10 minutes, puis est rajouté goutte à goutte le complexe borane-sulfure de diméthyle en solution (2N) dans le THF (8,5 ml ; 17 mmol). On porte de nouveau la solution à reflux pendant 2 heures, en distillant l'éther diéthylique et le sulfure de diméthyle libérés lors de la réaction.

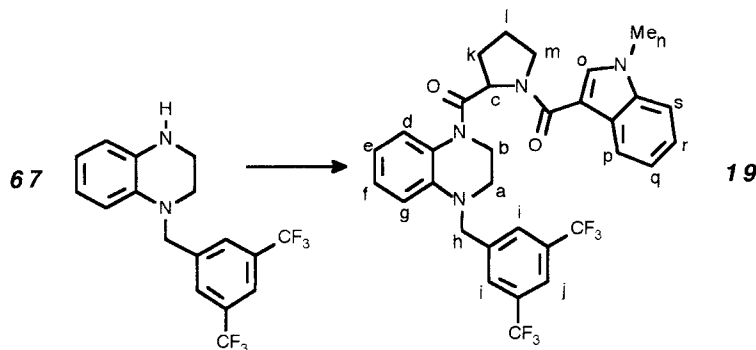
Après évaporation à sec, le brut est repris dans une solution de HCl 1N (32,6 ml) et porté à reflux pendant une heure. La solution est alors refroidie jusqu'à 0°C et 24 ml d'une solution de soude 2N sont ajoutés. Cette phase aqueuse est saturée par K₂CO₃ et extraite trois fois par le dichlorométhane. La phase organique est séchée sur MgSO₄. Le

résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : hexane / AcOEt 76 : 24) pour donner **69** avec 60% de rendement.

Rf : 0.5 (hexane / AcOEt, 75 : 25)

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:
3350 (NH)

Synthèse de la 1-[[N-(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]prolyl]-4-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyl]-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **19**



Formation du chlorure d'acide de **30**

A une solution maintenue à 0°C de N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline **30** (2,1 g ; 7,8 mmol) dans le dichlorométhane anhydre est ajouté goutte à goutte le chlorure d'oxalyle (1,5 g ; 11,7 mmol). On laisse le mélange réactionnel revenir à température ambiante. Après une heure, il est évaporé à sec.

Acylation de **67**

Le chlorure d'acide de **30**, brut, est repris dans du dichlorométhane anhydre et ajouté à une solution de 1-phénéthyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **67** (3,4 g ; 15 mmol) et de DIPEA (2 ml ; 11,1 mmol) dans le dichlorométhane.

Après 4 heures, le mélange réactionnel est lavé par HCl 1N, par l'eau, par une solution saturée de NaHCO₃ et, de nouveau, par l'eau puis séché sur MgSO₄. Après évaporation à sec, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant hexane / AcOEt 3 : 7) pour donner **19** qui est recristallisé dans l'éthanol (rendement : 50%).

Rf : 0.4 (hexane / AcOEt 3 : 7)

E : 159-161°C

SM (FAB) :

615 MH⁺
255 M[(N-Me)Ind-CO-(N(CH₂)₃CH)-CO⁺]

IR (pastille de KBr) : $\nu(\text{cm}^{-1})$:
1640 (CO)

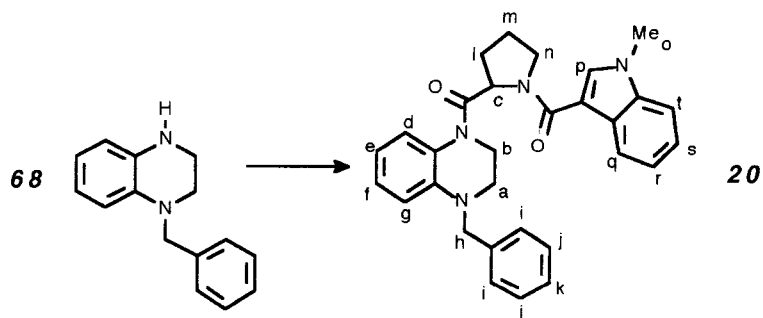
Analyse élémentaire :

	% calculé	% trouvé
C	62,54	62,35
H	4,59	4,53
N	9,12	8,89

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) : $\delta(\text{ppm})$:

1,95	(m, 2H, Hk / Hl)
2,15	(m, 2H, Hk / Hl)
3,45 à 4,05	(m, 9H, Ha+ Hb+Hm+Hn)
4,55	(m, 1H, Hh)
4,8	(m, 1H, Hh')
5,3	(m, 1H, Hc)
6,55	(d, J= 7,85 Hz, 1H, Hg)
6,75	(t, 1H, He)
7,05	(t, J= 7,9 Hz, 1H, Hf)
7,25	(m, 4H, Hd+Hp+HqHr)
7,4	(m, 2H, Hi)
7,7	(m, 1H, Hj)
7,8	(m, 1H, Ho)
8,1	(m, 1H, Hs)

Synthèse de la 1-[[N-(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]prolyl]-4-benzyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **20**



Formation du chlorure d'acide de **30**

A une solution maintenue à 0°C de N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline **30** (3,4 g ; 12,5 mmol) dans le dichlorométhane anhydre est ajouté goutte à goutte le chlorure d'oxalyle (2,4 g ; 18,7 mmol). On laisse le mélange réactionnel revenir à température ambiante. Après une heure, il est évaporé à sec.

Acylation de **68**

Le chlorure d'acide de **30**, brut, est repris dans du dichlorométhane anhydre et ajouté à une solution de 1-phényléthyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **68** (2 g ; 8,9 mmol) et de DIPEA (3,1 ml ; 17,8 mmol) dans le dichlorométhane.

Après 2 heures, le mélange réactionnel est lavé par HCl 1N, par l'eau, par une solution saturée de NaHCO₃ et, de nouveau, par l'eau puis séché sur MgSO₄. Après évaporation à sec, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant CH₂Cl₂ / AcOEt 5 : 5) pour donner **20** qui est recristallisé dans l'éthanol absolu (rendement : 22%).

RF : 0.3 (CH₂Cl₂ / AcOEt 5 : 5)

E : 222-224°C

SM (FAB) :

479	MH ⁺
255	M[(N-Me)Ind-CO-(N(CH ₂) ₃ CH)-CO ⁺]

IR (pastille de KBr) : ν(cm⁻¹) :

1635	(CO)
------	------

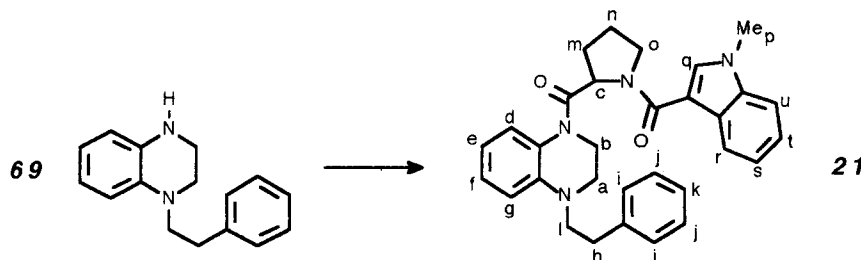
Analyse élémentaire :

	% calculé	% trouvé
C	75,29	74,67
H	6,32	6,29
N	11,71	11,56

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) : δ(ppm) :

1,9	(m, 2H, Hl / Hm)
2,1	(m, 2H, Hl / Hm)
3,45	(m, 1H, Hb)
3,65	(m, 2H, Hn)
3,85	(sl, 5H, Hd+Ho)
4,05	(m, 1H, Hb')
4,7	(m, 2H, Hh)
5,0	(m, 1H, Hc)
6,6	(m, 2H, He+Hg)
6,95	(m, 1H, Hd)
7,1	(t, J= 7,3 Hz, 1H, Hf)
7,2	(m, 2H, Hr+ Hs)
7,35	(m, 5H, Hi+Hj+Hk)
7,5	(d, J= 8,1 Hz, 1H, Hq)
7,95	(m, 1H, Hp)
8,15	(m, 1H, Ht)

Synthèse de la 1-[[N-(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]propyl]-4-(2-(phényl)éthyl)-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **21**



Formation du chlorure d'acide de **30**

A une solution maintenue à 0°C de N-[(1-méthylindol-3-yl)carbonyl]proline **30** (5,72 g ; 21 mmol) dans le dichlorométhane anhydre est ajouté goutte à goutte le chlorure d'oxalyle (4 g ; 31,5 mmol). On laisse le mélange réactionnel revenir à température ambiante. Après une heure, il est évaporé à sec.

Acylation de **69**

Le chlorure d'acide de **30**, brut, est repris dans du dichlorométhane anhydre et ajouté à une solution de 1-phénéthyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline **69** (3,4 g ; 15 mmol) dans le dichlorométhane.

Après 10 heures, le mélange réactionnel est lavé par HCl 1N, par l'eau, par une solution saturée de NaHCO₃ et, de nouveau, par l'eau puis séché sur MgSO₄. Après évaporation à sec, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant CH₂Cl₂ / AcOEt 5 : 5) pour donner **21** qui est recristallisé dans AcOEt (rendement : 25%).

Rf : 0.5 (CH₂Cl₂ / AcOEt 5 : 5)

E : 145-146°C

SM (EI) :

492	M ⁺
401	M-M(CH ₂ Ph)
255	M[(N-Me)Ind-CO-(N(CH ₂) ₃ CH)-CO ⁺]
158	M[(N-Me)Ind-CO ⁺]

IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

1635	(CO)
------	------

Analyse élémentaire :

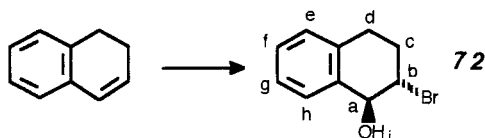
	% calculé	% trouvé
C	75,58	75,05
H	6,55	6,69
N	11,37	11,36

RMN (250 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm) :

1,8 à 2,1	(m, 4H, Hm+Hn)
2,9	(m, 2H, Hh)
3,4	(m, 2H, Hb)
3,6	(m, 2H, Hl)
3,7 à 3,9	(m, 7H, Hp+Ha+Ho)
5,15	(m, 1H, Hc)
6,6	(tl, 1H, He)
6,85	(d, J= 7,9 Hz, 1H, Hg)
7,05	(tl, 2H, Hd+Hf)
7,15 à 7,3	(m, 7H, Hi+Hj+Hk+Ht+Hs)
7,45	(d, J= 8,1 Hz, 1H, Hr)
7,9	(m, 1H, Hq)
8,0	(m, 1H, Hu)

Pouvoir rotatoire spécifique:

$$[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = 0^\circ \text{ (c = 1, MeOH)}$$

B.7. SYNTHESE DE DERIVES POSSEDANT UN SQUELETTE PIPERAZINE*-reporté dans l'annexe VIII-***B.8. SYNTHESE DES DERIVES A SQUELETTE 1-AMINO-2-[3,5-BIS-(TRIFLUORO METHYL)BENZYLOXY]-1,2,3,4-TETRAHYDRONAPHTALENE****Synthèse du 2-bromo-1,2,3,4-tétrahydronaphtalén-1-ol 72**

A une solution de 1,2-dihydronaphtalène (4 g ; 30,8 mmol) dans un mélange DMSO / H₂O 20 : 1 (42 ml) est ajoutée le N-bromosuccinimide (11 g ; 61,8 mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant une heure puis versé dans 400 ml d'eau glacée.

Après 2 heures, le précipité de **72** qui s'est formé est isolé par filtration (rendement quantitatif). Il est recristallisé dans un mélange toluène / hexane.

Rf : 0,4 (hexane / AcOEt 8 : 2)

E : 111,5-112°C

SM (EI) :

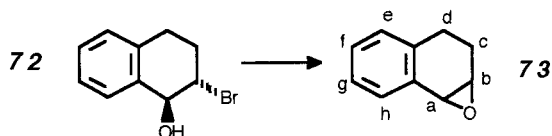
226-228	M ⁺
147	M-M[Br]
129	M-M[Br]-M[H ₂ O]
119	M-M[Br]-M[CO]

RMN (300 MHz, CDCl₃) : δ(ppm):

2,25	(m, 1H, Hc)
2,5	(m, 2H, Hc'+Hi)
2,9	(m, 2H, Hd)
4,3	(m, 1H, Hb)
4,85	(d, J = 6,95 Hz, 1H, Ha)
7,05	(m, 1H, Hg)
7,2	(m, He+Hh)
7,45	(m, 1H, Hf)

IR (pastille de KBr) : ν(cm⁻¹) :

3200 (OH)

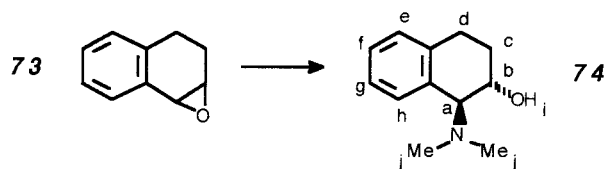
Synthèse du 1,2-époxy-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène 73

A une suspension de 2-bromo-1,2,3,4-tétrahydronaphtalén-1-ol **72** (3,3 g ; 14,4 mmol) dans le toluène (40 ml) sont ajoutées des pastilles de soude (3 g ; 75 mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 5 heures.

Après filtration de l'insoluble, le toluène est lavé par une solution saturée en NaHCO₃, séchée par K₂CO₃ puis évaporé pour donner **73** sous forme d'une huile jaune.

Rf : 0,65 (hexane / AcOEt 8 : 2)

Synthèse du 1-diméthylamino-1,2,3,4-tétrahydronaphtalèn-2-ol **74** (sous forme de chlorhydrate)



A une solution de 1,2-époxy-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène **73** (1,7 g ; 11,6 mmol) dans le méthanol (10 ml) est ajoutée la diméthylamine en solution à 40% dans l'eau (7,3 ml ; 58 mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 6 heures.

Après évaporation du solvant, le brut est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé à l'eau et séché sur $MgSO_4$. L'acétate d'éthyle est évaporé et le résidu dans une solution étherée saturée en HCl. Le précipité de **74** (sous forme de chlorhydrate) qui se forme est isolé par filtration (rendement : 81%)

Rf : 0,4 (CH_2Cl_2 / MeOH 98 : 2)

SM (EI) :

191 M^+
146 M-M[NHMe₂]

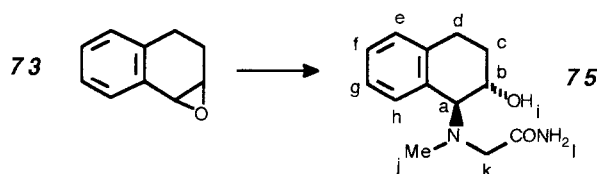
IR (pastille de KBr) : ν (cm^{-1}) :
3230 (OH)

RMN (300 MHz, DMSO- d_6 +D₂O) : δ (ppm):

1,55	(m, 1H, Hc)
2,1	(m, 1H, Hc')
2,55	(s, 3H, Hj)
2,75	(m, 2H, Hd)
2,85	(s, 3H, Hj)
4,35	(m, 1H, Hb)
4,55	(d, J = 8,0 Hz, 1H, Ha)
5,7*	(m, 1H, Hi)
7,25	(m, 3H, He+Hf+Hg)
7,7	(d, J = 7,2 Hz, 1H, Hh)
10,25	(m, 1H, NH ⁺)

* : visible sur le spectre enregistré dans le DMSO

Synthèse du 1-[(N-méthyl-N-carboxamidométhyl)amino]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalèn-2-ol **75**



A une solution de 1,2-époxy-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène **73** (585 mg ; 4 mmol) dans le méthanol (15 ml) est ajoutée une solution de sarcosinamide (chlorhydrate) (1 g ; 8 mmol) et de DIPEA (1,4 ml ; 8 mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 50 heures.

Après évaporation du solvant, le brut est repris dans l'acétate d'éthyle. Un insoluble est écarté et la phase organique est lavée à l'eau, séchée sur $MgSO_4$ puis purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : CH_2Cl_2 / MeOH 95 : 5) pour donner **75** avec 55% de rendement

Rf : 0,5 (CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1)

E : 52,5-53,5°C

SM (EI) :

235	MH ⁺
216	M-M[H ₂ O]
190	M-M[CONH ₂]
190	M-M[CONH ₂]-M[H ₂ O]
190	M-M[CH ₂ -CONH ₂]
190	M-M[CONH ₂]-M[H ₂ O]

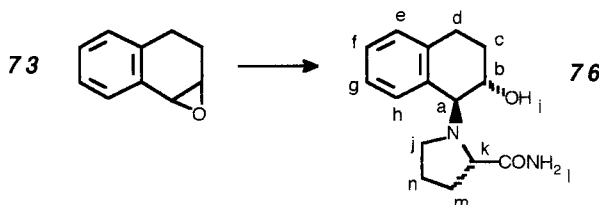
RMN (300 MHz, DMSO-d₆+D₂O) : δ(ppm):

1,65	(m, 1H, Hc)
1,9	(m, 1H, Hc')
2,25	(s, 3H, Hj)
2,7	(m, 2H, Hd)
3,1	(d -système AB-, J = 16,5 Hz, 1H, Hk)
3,2	(d -système AB-, J = 16,5 Hz, 1H, Hk')
3,65	(d, J = 8,0 Hz, 1H, Ha)
3,8	(td, J = 8,5 Hz, J' = 3,5 Hz, 1H, Hb)
5,15*	(d, J = 4,1 Hz, 1H, Hi)
7,0 à 7,2	(m, 4H, He+Hf+Hg+Hl)
7,55	(m, 2H, Hh+Hl')

IR (pastille de KBr) : ν(cm⁻¹) :

3100-3500	(OH, NH ₂)
1660	(CO)

* : visible sur le spectre enregistré dans le DMSO

Synthèse du 1-[2-(carboxamido)pyrrolidino]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalèn-2-ol **76**

A une solution de 1,2-époxy-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène **73** (1,3 g ; 8,8 mmol) dans le méthanol (10 ml) est ajoutée le prolinamide (2 g ; 17,5 mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 40 heures.

Après évaporation du solvant, le brut est repris dans le dichlorométhane, lavé à l'eau, séché sur MgSO₄ puis purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1) pour donner **76** avec 42% de rendement

Rf : 0,45 (CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1)

E : 167-168°C

SM (EI) :

261	MH ⁺
242	M-M[H ₂ O]
216	M-M[CONH ₂]
261	M[(CH ₂) ₃ CHNH ⁺]

RMN (300 MHz, DMSO-d₆+D₂O) : δ(ppm):

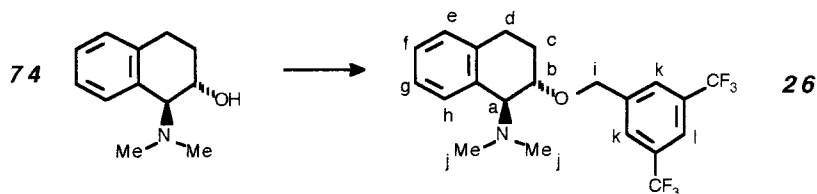
1,7	(m, 4H, Hc+Hm / Hn)
1,9	(m, 1H, Hc')
2,05	(m, 1H, Hm')
2,7	(m, 4H, Hd+Hj)
3,75	(m, 1H, Hk)
3,75	(d dans m, J = 8,2 Hz, 1H, Ha)
3,9	(td, J = 8,3 Hz, J' = 3,3 Hz, 1H, Hb)
4,85*	(d, J = 4,25 Hz, 1H, Hi)
6,95 à 7,2	(m, 5H, He+Hf+Hg+Hl)
7,55	(dd, J = 8,35 Hz, J' = 1,7 Hz, 1H, Hh)

IR (pastille de KBr) : ν(cm⁻¹) :

3230	(OH, NH ₂)
1650	(CO)

* : visible sur le spectre enregistré dans le DMSO

Synthèse du 1-diméthylamino-2-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydro naphthalène **26** (sous forme de chlorhydrate)



A une solution biphasique (solution aqueuse à 50% de potasse / dichlorométhane) (20 ml) de 1-diméthylamino-1,2,3,4-tétrahydronaphthalène-2-ol **74** (sous forme de chlorhydrate) (980 mg ; 4,3 mmol) sont ajoutés le chlorure de 3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyle (1,58 g ; 6 mmol) et le catalyseur de transfert de phase (bromure de tétrabutylammonium, 1,66 g ; 5,2 mmol). Après 2 heures sont rajoutés 451 mg (1,72 mmol) de dérivé chloré.

Après 24 heures, les deux phases sont séparées et la phase organique est lavée par une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 , par HCl 0,1N, par l'eau et séchée sur MgSO_4 . Après évaporation du solvant, le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle et **26** précipite. Le filtrat est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : hexane / AcOEt 85 : 15). (rendement : 45%)

26 est repris dans une solution étherée saturée en HCl et séché par évaporation du solvant. Le chlorhydrate formé est recristallisé dans l'eau.

Rf : 0,6 (hexane / AcOEt 5 : 5)

E : 187-187,5°C

SM (EI) :

417	M^+
398	$\text{M}-\text{M}[\text{F}]$
227	$\text{M}[3,5-(\text{CF}_3)_2\text{-Ph-CH}_2^+]$
133	$\text{M}-\text{M}[3,5-(\text{CF}_3)_2\text{-Ph-CH}_2^+]$
146	$\text{M}-\text{M}[3,5-(\text{CF}_3)_2\text{-Ph-CH}_2^+]-\text{M}[\text{NMe}_2]$

Analyse élémentaire (**26**. HCl . H_2O):

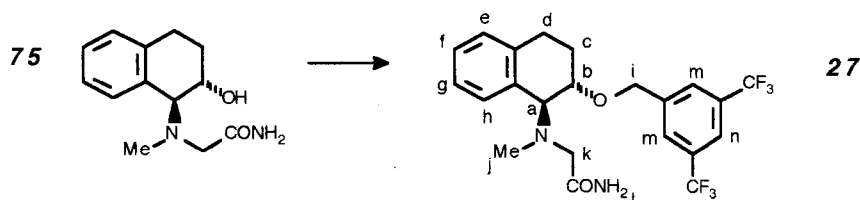
	% calculé	% trouvé
C	53,47	53,68
H	5,09	4,71
N	2,97	3,00

RMN (300 MHz, $\text{DMSO-d}_6+\text{D}_2\text{O}$) : δ (ppm):

1,75	(m, 1H, Hc)
2,35	(m, 1H, Hc')
2,6	(s, 3H, Hj)
2,75	(t, $J = 6,4$ Hz, 2H, Hd)
2,85	(s, 3H, Hj)
4,45	(m, 1H, Hb)
4,8	(d -système AB-, $J = 12,5$ Hz, 1H, Hi)
4,85	(m, 2H, Ha+Hl')
7,3	(m, 3H, He+Hf+Hg)
7,65	(d, $J = 7,0$ Hz, 1H, Hh)
8,05	(s, 3H, Hk+Hl)
10,1*	(m, 1H, NH^+)

* : visible sur le spectre enregistré dans le DMSO

Synthèse du 1-[(N-méthyl-N-carboxamidométhyl)amino]-2-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphthalène **27**



A une solution biphasique (solution aqueuse à 50% de potasse / dichlorométhane) (20 ml) de 1-[(N-méthyl-N-carboxamidométhyl)amino]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène-2-ol **75** (2,35 g ; 10 mmol) sont ajoutés le chlorure de 3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyle (3,15 g ; 12 mmol) et le catalyseur de transfert de phase (bromure de tétrabutylammonium, 3,9 g ; 12 mmol).

Après 30 heures, les deux phases sont séparées et la phase organique est lavée par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ et séchée sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : hexane / AcOEt 45 : 55) puis lavé par l'éther diéthylique pour donner **27** avec 67 % de rendement.

Rf : 0,7 (CH₂Cl₂ / MeOH 9 : 1)

E : 141,5-142°C

SM (EI) :

460	M ⁺
416	M-M[CONH ₂]
227	M[3,5-(CF ₃) ₂ -Ph-CH ₂ ⁺]

IR (pastille de KBr) : ν(cm⁻¹) :

3380	(NH ₂)
1640	(CO)

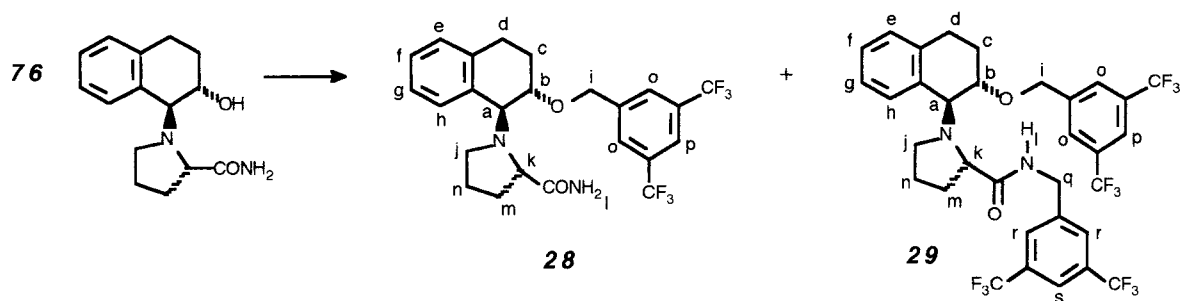
Analyse élémentaire :

	% calculé	% trouvé
C	57,39	57,32
H	4,82	4,81
N	6,08	6,07

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) : δ(ppm) :

1,75	(m, 1H, Hc)
2,15	(m, 1H, Hc')
2,25	(s, 3H, Hj)
2,75	(tl., 2H, Hd)
3,0	(d -système AB-, J = 16,0 Hz, 1H, Hk)
3,15	(d -système AB-, J = 16,0 Hz, 1H, Hk')
3,9	(m, 2H, Hb+Hc)
4,75	(d -système AB-, J = 12,9 Hz, 1H, Hi)
4,75	(d -système AB-, J = 12,9 Hz, 1H, Hi')
7,05 à 7,25	(m, 5H, He+Hf+Hg+Hi)
7,65	(dd, J = 8,6 Hz, J' = 2,0 Hz, 1H, Hh)
8,0	(s, 1H, Hn)
8,05	(s, 2H, Hm)

Synthèse du 1-[2-(carboxamido)pyrrolidino]-2-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène **28 (sous forme de chlorhydrate) et du 1-{2-[N-(3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyl)carboxamido]pyrrolidino}-2-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène **29** (sous forme de chlorhydrate)**



A une solution biphasique (solution aqueuse à 50% de potasse / dichlorométhane) (20 ml) de 1-[2-(carboxamido)pyrrolidino]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène-2-ol **75** (950 mg ; 3,65 mmol) sont ajoutés le chlorure de 3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyle (1,9 g ; 7,3 mmol) et le catalyseur de transfert de phase (bromure de tétrabutylammonium, 1,4 g ; 4,4 mmol).

Après 20 heures, les deux phases sont séparées et la phase organique est lavée par une solution aqueuse saturée en NaHCO₃ et séchée sur MgSO₄. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de

silice (éluant : hexane / AcOEt 3 : 7) et fournit **28** avec 25 % de rendement et **29** avec 15% de rendement. Les deux fractions sont reprises dans une solution étherée d'HCl pour donner **28** et **29** (sous forme de chlorhydrate).

28 (sous forme de chlorhydrate) est analysé par HPLC (conditions II ; éluant : solution A / solution B 1 : 9) et se présente sous forme de deux diastéréoisomères (diast A / diast B 15 : 85). Il est dissous dans le minimum d'acétonitrile chaud. Un mélange diast A / diast B (90 : 10) précipite à froid et est isolé par filtration. Le filtrat est évaporé et donne **28** sous la forme d'un diastéréoisomère pur (diast B).

29 (sous forme de chlorhydrate) est lavé par l'hexane.

Caractéristiques de 28 (sous forme de chlorhydrate) (diast A / diast B 0 : 100)

Rf : 0,25 (hexane / AcOEt 5 : 5)

E : 126-127°C

SM (EI) :

487	MH ⁺
467	M-M[F]
442	M-M[CONH ₂]
227	M[3,5-(CF ₃) ₂ -Ph-CH ₂ ⁺]

IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

1680 (CO)

Analyse élémentaire (**28**. HCl) :

	% calculé	% trouvé
C	55,13	55,22
H	4,81	5,09
N	5,35	4,95

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm):

1,7 à 2,0	(m, 4H, Hc+Hm / Hn)
2,35	(m, 2H, Hm' / Hn')
2,75	(m, 2H, Hd)
3,15	(m, 1H, Hj)
3,4	(m, 1H, Hj')
4,2	(m, 1H, Hk)
4,3	(m, 1H, Hb)
4,75	(d -système AB-, J = 12,75 Hz, 1H, Hi)
4,8	(m dans d, 1H, Ha)
4,85	(d -système AB-, J = 12,75 Hz, 1H, Hi')
7,15 à 7,3	(m, 3H, He+Hf+Hg)
7,5	(d, J = 7,9 Hz, 1H, Hh)
7,7	(m, 1H, Hl)
7,9	(s, 2H, Ho)
8,0	(s, 1H, Hp)
8,1	(m, 1H, Hl')
9,35	(m, 1H, NH ⁺)

Caractéristiques de 28 (sous forme de chlorhydrate) (diast A / diast B 90 : 10)

Rf : 0,25 (hexane / AcOEt 5 : 5)

E : 246-247°C

IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

1680 (CO)

Analyse élémentaire (**28**. HCl) :

	% calculé	% trouvé
C	55,13	55,07
H	4,81	4,8
N	5,35	5,21

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm):

1,65 à 1,95	(m, 3H, Hc+Hm / Hn)
2,0	(m, 1H, Hc')
2,35	(m, 2H, Hm' / Hn')
2,75	(m, 2H, Hd)
3,35	(m, 2H, Hj)
4,35	(m, 1H, Hk)
4,45	(m, 1H, Hb)
4,8	(d -système AB-, J = 12,6 Hz, 1H, Hi)
4,85	(m dans d, 1H, Ha)
4,9	(d -système AB-, J = 12,6 Hz, 1H, Hi')
7,2 à 7,4	(m, 3H, He+Hf+Hg)
7,5	(m, 1H, Hl)
7,6	(d, J = 6,9 Hz, 1H, Hh)
7,8	(m, 1H, Hl')
8,0	(s, 2H, Ho)
8,05	(s, 1H, Hp)
9,15	(m, 1H, NH ⁺)



*Caractéristiques de 29 (sous forme de chlorhydrate)*R_f : 0,7 (hexane / AcOEt 5 : 5)E : 84-85°CSM (EI) :

712	M ⁺
227	M[3,5-(CF ₃) ₂ -Ph-CH ₂ ⁺]

IR (pastille de KBr) : ν (cm⁻¹) :

3220	(NH)
1640	(CO)

Analyse élémentaire (29. HCl) :

	% calculé	% trouvé
C	52,92	52,98
H	3,90	3,92
N	3,74	3,59

RMN (300 MHz, DMSO-d₆) : δ (ppm):

1,6 à 2,0	(m, 4H, Hc+Hm / Hn)
2,25	(m, 1H, Hm')
2,45	(m, 1H, Hn')
2,8	(m, 2H, Hd)
3,15	(m, 1H, Hj)
3,4	(m, 1H, Hj')
4,2	(m, 1H, Hk)
4,4 à 4,6	(m, 3H, Hb+Hq)
4,7	(d -système AB-, J = 12,7 Hz, 1H, Hi)
4,85	(m dans d, 1H, Ha)
4,8	(d -système AB-, J = 12,7 Hz, 1H, Hi')
4,85	(m dans d, 1H, Ha)
7,1 à 7,3	(m, 3H, He+Hf+Hg)
7,5	(m, 1H, Hl)
8,0	(m, 7H, Hh+Ho+Hp+Hr+Hs)
9,6	(m, 1H, NH ⁺)

C. PROTOCOLES PHARMACOLOGIQUES

C.1. BINDING SUR RECEPTEURS NK1 EXPRIMES DANS DES CELLULES IM-9

Ce test a été mis au point par N. Mestdagh en collaboration avec l'unité de binding du Drug Discovery à UCB Secteur Pharmaceutique.

Choix du modèle :

Le choix s'est porté sur la lignée de cellules IM-9 (human B lymphoblastoïd) (ECACC...). Il s'agit de lymphocytes B provenant de la moëlle osseuse d'un patient atteint de myélome multiple. Ces cellules sont maintenues en culture dans un milieu RPMI contenant 10% de sérum de veau foetal, 2mM de glutamine, 100 unités / ml de pénicilline et 100 µg / ml de streptomycine. Ces cultures en suspension sont maintenues à 37°C sous une atmosphère humide de 95% d'air et 5% de CO₂.

Conditions d'incubation

Les tests sont effectués sur le culot de cellules centrifugées à 100g durant 5 minutes, cellules rincées par un milieu PBS et remises en suspension dans un milieu PBS-BSA (PBS-0,035%BSA).

Le tampon d'incubation se compose de PBS additionné de bacitracine, un inhibiteur de protéases. A ce milieu sont ajoutés l'équivalent d'environ $2 \cdot 10^6$ cellules IM-9 (le contenu en protéines est déterminé lors de chaque expérience), la SP marquée ([4,5-³H-Leu¹⁰]SP) comme ligand ainsi que tout compétiteur éventuel. Après avoir fait varier aussi bien le temps que la température d'incubation, les conditions qui ont été déterminées sont les suivantes : deux heures d'incubation à 4°C. La liaison non spécifique est déterminée en présence de SP froide (1 µM). Après filtration sur des filtres prétraités (polyéthylèneimine 0,1%), le comptage est effectué avec un compteur à scintillations.

Lors de chaque expérience, screening de molécules à une concentration donnée ou courbe de compétition d'une molécule déterminée, une référence interne est utilisée : la SP à une concentration de 1 mM (pourcentage d'inhibition).

Les différentes molécules UCB sont testées à une concentration finale en DMSO de 0,1% ou 1% maximum.

Divers composés de référence ont été étudiés afin de mieux caractériser le modèle :

- agoniste NK1 :	SP	pKi = 9,1
- antagonistes NK1 :	CP 96345	pKi = 9,3
	FK888	pKi = 8,8
- agoniste NK2 :	NKA	pKi = 6,8
- antagonistes NK1 :	SR 48968	pKi = 6,9
	L659874	pKi = 6,2

C.2. BINDING SUR RECEPTEURS NK1 EXPRIMES DANS DES CELLULES CHO

Ce test a été mis au point par J.F. Goossens en collaboration avec l'unité de binding du Drug Discovery à UCB Secteur Pharmaceutique.

Choix du modèle :

Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) sont transfectées par le gène humain codant pour le récepteur NK1. Elles sont cultivées dans un milieu de culture sous atmosphère humidifiée de CO₂ / air 5 : 95.

Préparation membranaire

Les cellules à confluence sont grattées à l'aide d'un 'ruber policeman'. La suspension cellulaire, placée dans un tampon Tris.HCl / MgCl₂, 50 mM : 2mM (pH = 7,4) est soumise à une lyse à l'aide d'un 'Potter'. Une centrifugation à 30000 g permet d'obtenir les membranes exprimant le récepteur NK1 recombinant. Le culot est placé dans un tampon permettant le stockage des membranes dans l'azote liquide (Tris / sucrase 20mM : 250 mM)

Expérience de compétition : conditions d'incubation

Les expériences de compétition sont réalisées dans un tampon Tris.HCl / MgCl₂, 50 mM : 2mM (pH = 7,4) contenant la bacitracine (160 µg / ml) pendant 60 minutes et à 25°C. La réaction est initiée par l'addition de la suspension membranaire (0,03 mg / essai) dans une préparation de 500 µl contenant le traceur ([4,5-³H-Leu¹⁰]SP) (50000 dpm / essai ; activité spécifique 200 Ci / mmol) et des concentrations croissantes de molécules à tester. La réaction est stoppée par filtration sous vide à l'aide de filtres en fibres de verre préincubés à température ambiante dans une solution aqueuse de polyéthylèneimine 0,1%. Les filtres sont rincés (4 x 2 ml Tris 50 mM) puis placés dans des fioles de comptage. La radioactivité de chaque filtre est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillations (radiations β⁻).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aharony D.**, Catanese A., Woodhouse D.
Binding of the novel ligand [4,5-³H-Leu¹⁰]substance P to high-affinity NK1 receptors on guinea pig lung membranes: modulation by GTP analogs and sulfhydryl agents
J. Pharmacol. Exp. Ther. (1991) 259, 148-155
- Appell K.C.**, Babb B.E., Goswami R., Hall P.L., Lawrence K.B., Logan M.E., Przyklek-Elling R., Tomczuk B.E., Venepalli B.R., Yanni J.M.
Imidazo(4,5-b)quinoxaline cyanines as neurokinin antagonists
J. Med. Chem (1991) 34, 1751-1753
- Armour D.R.**, Watson S.P., Pegg N.A., Heron N.M., Middlemiss D., Chan C., Cholerton T.J., Hubbard T., Vinader M.V., Davies H.G., Cocker J.D., Bays D.E., Ward P.
Spiro-piperidine non-peptide neurokinin-1 receptor antagonists
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1995) 5, 2671-2676
- Astolfi M.**, Goso C., Maggi M., Manzini S.
Binding profile of a novel potent and selective antagonist of NK1 tachykinin receptor MEN10930
Tachykinins' 95 (1995) Florence, October 16-18
- Barnes P.J.**
Neuropeptides in the lung : localization, function, and pathophysiological implications
J. Allerg. Clin. Immun. (1987) 79, 285-295
- Barnes P.J.**
New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma
J. Allerg. Clin. Immun. (1989) 6, 1013-1026
- Barrow C.J.**, Cai P., Snyder J.K., Sedlock D.M., Sun H.H., Cooper R.
WIN 64821, a new competitive antagonist to Substance P, isolated from an *Aspergillus* Species : structure determination and solution conformation
J. Org. Chem. (1993) 58, 6016-6021
- Barrow C.J.**, Doleman M.S., Bobko M.A., Cooper R.
Structure determination, pharmacological evaluation, and structure-activity studies of a new cyclic peptide Substance P antagonist containing the new amino acid 3-prenyl- β -hydroxytyrosine, isolated from *Aspergillus flavipes*
J. Med. Chem (1994) 37, 356-363
- Beattie D.T.**, Connor H.E., Hagan R.M.
Recent developments in tachykinin NK1 receptor antagonist prospects for the treatment of migraine headache
Can. J. Physiol. Pharmacol. (1995) 73, 871-877
- Beresford I.J.M.**, Brich P.J., Hagan R.M., Ireland S.J.
Investigation into species variants in tachykinin NK1 receptors by use of the non-peptide antagonist CP 96,345
Brit. J. Pharmacol (1991) 104, 292-293
- Boyd N.D.**, Kage R., Dumas J.J., Krause J.E., Leeman S.E.
The peptide binding site of the substance P (NK-1) receptor localized by a photoreactive analogue of substance P : presence of a disulfide bond
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93, 433-437
- Boyle S.**, Guard S., Higginbottom M., Horwell D.C., Howson W., McKnight A.T., Martin K., Pritchard M.C., O'Toole J., Raphy J., Rees D.C., Roberts E., Watling K.J., Woodruff G.N., Hughes J.
Rational design of high affinity Tachykinin NK1 receptor antagonists
Bioorg. Med. Chem. (1994) 2, 357-370
- Brown H.C.**, Narasimhan S., Choi Y.M.
Improved procedure for borane-dimethyl sulfide reduction of tertiary and secondary amides in the presence of boron trifluoride etherate
Synthesis (1981) 996-997
- Buck S.H.** Ed.
The tachykinin receptors
Humana Press Inc., Totowa, NJ. (1994)

- Burkholder T.P.**, Kudlacz E.M., Le T-B., Knippenberg R.W., Shatzer S.A., Maynard G.D., Webster M.E., Horgan S.W.
Identification and chemical synthesis of MDL 105,212, a non-peptide tachykinin antagonist with high affinity for NK-1 and NK-2 receptors
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1996) 6, 951-956
- Caliendo G.**, Greco G., Perissutti E., Santagada V., Silipo C., Vittoria A., Turbanti L., Renzetti R., Benedetti E., Pedone C., Santini E.
Synthesis and neurokinin antagonist activity of 2-benzylidene- and 2-benzyl-3-benzylamino quinuclidines
Farmaco (1993) 48, 1359-1378
- Caliendo G.**, Calignano A., Grieco P., Mancuso F., Perissutti E., Santini A., Santagada V.
Synthesis and biological activity of tripeptide FR113-680 analogues containing unconventional amino-acids
Biopolymers (1995 a) 36, 409-414
- Caliendo G.**, Greco G., Grieco P., Perissutti E., Santagada V., Calignano A., Mancuso F., Novellino E.
Synthesis and in vitro activities of highly potent and selective tripeptide antagonists of the neurokinin NK-1 receptor
Farmaco (1995 b) 50, 755-759
- Caliendo G.**, Greco G., Grieco P., Perissutti E., Santagada V., Calignano A., Mancuso F., Novellino E.
Modification of the potent peptide FK888 with unusual amino-acids : effects on activity on neurokinin receptors
Farmaco (1996) 51, 197-201
- Carruthers N.I., Kaminski J.J.**
Neurokinin receptor antagonists for the treatment of inflammation
Exp. Opin. Ther. Patents (1995) 6, 169-174
- Cascieri M.A.**, McLeod A.M., Underwood D., Shiao L-L., Ber E., Sadowski S., Yu H., Merchant K.J., Swain C.J., Strader C.D., Fong T.M.
Characterization of the interaction of N-acyl-L-tryptophan benzyl ester neurokinin antagonists with the human neurokinin-1 receptor
J. Biol. Chem. (1994) 269, 6587-6591
- Cascieri M.A.**, Shiao L.L., Mills S.G., MacCoss M., Swain C.J., Yu. H., Ber E., Sadowski S., Wu M.T., Strader C.D., Fong T.M.
Characterization of the interaction of diacylpiperazine antagonists with the human neurokinin-1 receptor: identification of a common binding site for structurally dissimilar antagonists
Mol. Pharmacol. (1995) 47, 660-665
- Cascieri M.A.**
Post conference workshop 'Drug-design & discovery techniques'
Molecular biological approaches to drug-design and G protein-coupled receptors
Meeting of medicinal Chemical Society (1996) Washington Vista, Washington DC., March 6.
- Cavagnol J.C., Wiselogle F.Y.**
1-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalines
J. Amer. Chem. Soc. (1947) 69, 795-799
- Chan C.**, Cocker J.D., Davies H.G., Gore A., Green R.H.
Indolizidine derivatives as potential substance P antagonists
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1996) 6, 161-164
- Chang M.M., Leeman S.E.**
Amino-Acid sequence of Substance P
Nature New Biol. (1971) 232, 86-87
- Cocker J.D., Davies H.G.**
Morphin based substance P antagonists
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1996) 6, 13-16
- Coge F., Regoli D.**
NK1 and NK2 Receptors are similar in Man and Rabbit
Neuropeptides (1994) 26, 385-390

Cordero F.M., Brandi A., Cristilli S., De Sarlo F., Viti G.

Syntheses of 3-phenyl substituted indolizidin-2-ones and a pyrrolizidin-2-one on the route to constrained potential NK1 receptor antagonists
Tetrahedron (1994) 50, 12713-12726

Desai M.C., Lefkowitz S.L., Thadeio P.F., Longo K.P., Snider R.M.

Discovery of a potent substance P antagonist : recognition of the key molecular determinant
J. Med. Chem (1992) 35, 4911-4913

Desai M.C., Lefkowitz S.L.

Conformationally restricted analogs of CP 99994 : synthesis of a spirocyclic amine
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1993 a) 3, 2083-2086

Desai M.C., Thadeio P.F., Lefkowitz S.L.

Synthesis of (±)-CP-99,994 : a highly potent substance P antagonist
Tetrahedron Lett. (1993 b) 34, 5831-5834

Desai M.C., Lefkowitz S.L., Bryce D.K., McLean S.

Articulating a pharmacophore driven synthetic strategy : discovery of a potent substance P antagonist
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1994 a) 4, 1865-1868

Desai M.C., Vincent L.A., Rizzi J.P.

Importance of parallel vectors and "hydrophobic collapse" of the aligned aromatic rings: discovery of a potent substance P antagonist
J. Med. Chem (1994 b) 37, 4263-4266

Desai M.C., Lefkowitz S.L.

Application of β -lactams in the synthesis of substance P antagonists : preparation of 2-azabicyclo-[3.3.1]nonane ring system
Tetrahedron Lett. (1994 c) 35, 4701-4704

Diez A., Voltaire A., Lopez I., Rubiralta M., Segarra V., Pages L., Palacios J.M.

Synthetic applications of 2-aryl-4-piperidones. X synthesis of 3-aminopiperidines, potential substance P antagonists
Tetrahedron (1995) 51, 5143-5156

Emonds-Alt X., Dautrempuich J-D., Heaulure M., Neliat G., Santucci V., Steinberg R., Vilain P., Bichon D., Soubrié P., Le Fur G., Brelière J-C.

In vitro and *in vivo* biological activity of SR140333, a novel potent non-peptide tachykinin NK1 receptor antagonist
Eur. J. Pharmacol. (1993) 250, 403-413

Fardin V., Foucault F., Bock M.D., Jolly A., Flamand O., Clerc F., Garret C.

Variations in affinities for the NK1 receptor : differences between the non-peptide substance P antagonist RP 67580 and CP-96,345 and the agonist septide
Regul. Peptides (1993) 46, 300-303

Folkers K., Hakanson R., Hang H., Xu J.C., Leander S.

Biological evaluation of SP antagonists
Brit. J. Pharmacol (1984) 83, 449-456

Folkers K., Feng D-M., Asano N., Hakanson R., Weisenfeld-Hallin Z., Leander S.

Spantide II, an effective tachykinin antagonist having high potency and negligible neurotoxicity
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87, 4833-4835

Fong T.M., Huang R-R.C., Strader C.D.

Localization of agonist and antagonist binding domains of the human neurokinin-1 receptor
J. Biol. Chem. (1992 a) 267, 25664-25667

Fong T.M., Yu H., Strader C.D.

Molecular basis for the species selectivity of the neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and RP67580
J. Biol. Chem. (1992 b) 267, 25668-25671

Fong T.M., Yu H., Huang R-R.C., Strader C.

The extracellular domain of the neurokinin-1 receptor is required for high-affinity binding of peptides
Biochemistry (1992 c) 31, 11806-11811

- Fong T.M.**, Cascieri M.A., Yu H., Bansal A., Swain C., Strader C.D.
Amino-aromatic interaction between histidine 197 of the neurokinin-1 receptor and CP 96345
Nature (1993) 362, 350-353
- Fong T.M.**, Yu H., Cascieri M.A., Underwood D., Swain C.J., Strader C.D.
The Role histidine 265 in antagonist binding to the neurokinin-1 receptor
J. Biol. Chem. (1994 a) 269, 2728-2732
- Fong T.M.**, Yu H., Cascieri M.A., Underwoods D., Swain C.J., Strader C.D.
Interaction of glutamine 165 in the fourth transmembrane segment of the human neurokinin-1 receptor with quinuclidine ring
J. Biol. Chem. (1994 b) 269, 14957-14961
- Frossard N., Advenier C.**
Tachykinin receptors and the airways
Life Sci. (1991) 49, 1941-1953
- Fujii T., Murai M., Morimoto H., Maeda Y., Yamaoka M., Hagiwara D., Miyake H., Ikare N., Matsuo M.**
Pharmacological profile of a high affinity dipeptide NK1 receptor antagonist, FK888
Brit. J. Pharmacol. (1992) 107, 785-789
- Gaddum J.H. , Schild H.O.**
Depressor substances in extracts of intestine
J. Physiol. (1934) 83,1-14
- Garret C.**, Carruette A., Fardin V., Moussaoui S., Peyronel J-F., Blanchard J-C., Laduron P.M.
Pharmacological properties of a potent and selective nonpeptide substance P antagonist
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 88, 10208-10212
- Garret C.**, Carruette A., Fardin V., Moussaoui S., Montier F., Peyronel J-F., Laduron P.M.
Antinociceptive properties and inhibition of neurogenic inflammation with potent SP antagonists belonging to perhydroisoindoles
Regul. Peptides (1993) 46, 24-30
- Gether U.**, Johansen T.E., Snider R.M., Lowe J.A.III, Emonds-Alt X., Yokota Y., Nakanishi S., Schwartz T.W.
Binding epitopes for peptide and nonpeptide ligands on the NK1 (substance P) receptor
Regul. Peptides (1993 a) 46, 49-58
- Gether U.**, Johansen T.E., Snider R.M., Lowe J.A.III, Nakanishi S., Schwartz T.W.
Different binding epitopes on the receptor for substance P and a non-peptide antagonist
Nature (1993 b) 362, 345-348
- Gether U.**, Johansen T.E., Schwartz T.W.
Chimeric NK1 (substance P) / NK3 (neurokinin B) receptors
J. Biol. Chem. (1993 c) 268, 7893-7898
- Gether U.**, Yokota Y., Emonds-Alt X., Brelière J-C., Lowe J.A.III, Snider R.M., Nakanishi S., Schwartz T.W.
Two nonpeptide tachykinin antagonists act through epitopes on corresponding segments of the NK1 and NK2 receptors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993 d) 90, 6194-6198
- Gether U.**, Emonds-Alt X., Brelière J-C., Fujii T., Hagiwara D., Pradier L., Garret C., Johansen T.E., Schwartz T.W.
Evidence for a common molecular mode of action for chemically distinct nonpeptide antagonists at the neurokinin-1 (substance P) receptor
Mol. Pharmacol. (1994 a) 45, 500-508
- Gether U.**, Nilsson L., Lowe J.A.III., Schwartz T.W.
Specific residues at the top of transmembrane segment V and VI of the neurokinin-1 receptor involved in binding of the nonpeptide antagonist CP 96,345
J. Biol. Chem. (1994 b) 269, 23959-23964
- Gether U.**, Lowe J.A.III., Schwartz T.W.
Tachykinin non-peptide antagonists : binding domain and molecular mode of action
Biochem. Soc. Trans. (1995) 23, 96-102

- Goldstein S.**, Neuwels M., Lassoie M-A., Houssin R., Caumont K., Differding E., Hénichart J-P.
De l'Analyse conformationnelle d'antagonistes peptidiques à la conception d'antagonistes pseudo-peptidiques et non-peptidiques
J. Pharm. Belg. (1995 a) 50, 213-222
- Goldstein S.**, Neuwels M., Moureau F., Berckmanns D., Lassoie M-A., Differding E., Houssin R., Hénichart J-P.
Bioactive conformations of peptides and mimetics as milestones in drug design : investigation of NK-1 receptor antagonists
Lett. Pept. Sci. (1995 b) 2, 125-134
- Greene T.W., Wuts P.G.M.**
Protective groups
John Wiley and Sons, Inc. (1991) p373
- Hagan R.M.**, Ireland S.J., Bailey F., McBride C., Jordan C.C., Ward P.
A Spirolactam conformationally-constrained analogue of physalaemin which is peptidase resistant, selective NK1 receptor agonist
Brit. J. Pharmacol (1991) 102, 168P
- Hagiwara D.**, Miyake H., Morimoto H., Murai M., Fujii T., Matsuo M.
Studies on neurokinin antagonists. 1. The design of novel tripeptides possessing the glutamyl-D-tryptophylphenylalanine sequence as substance P antagonists
J. Med. Chem (1992 a) 35, 2015-2025
- Hagiwara D.**, Miyake H., Morimoto H., Murai M., Fujii T., Matsuo M.
Studies on neurokinin antagonists. 2. Design and structure-activity relationships of novel tripeptide substance P antagonists, N^α-(N^α-(N^α-acetyl-L-threonyl)-N¹-formyl-D tryptophyl)-N-methyl-N-(phenyl-methyl)L-phenylalaninamide and its related compounds
J. Med. Chem (1992 b) 35, 3184-3191
- Hagiwara D.**, Miyake H., Murano K., Morimoto H., Murai M., Fujii T., Nakanishi I., Matsuo M.
Studies on neurokinin antagonists. 2. Design and structure-activity relationships of new branched tripeptides N^α-(substituted L-aspartyl, L-ornithyl, or L-lysyl)-N-methyl-N-(phenyl-methyl)L-phenylalaninamides as substance P antagonists
J. Med. Chem (1993 a) 36, 2266-2278
- Hagiwara D.**, Miyake H., Igari N., Murano K., Morimoto H., Murai M., Fujii T., Matsuo M.
Design of a novel dipeptide substance P antagonist FK888
Regul. Peptides (1993 b) 46, 332-334
- Hagiwara D.**, Miyake H., Igari N., Karino M., Maeda Y., Fujii T., Matsuo M.
Studies on neurokinin antagonists. 4. Synthesis and structure-activity relationships of novel dipeptide substance P antagonists : N²-((4R)-4-hydroxy-1-((1-methyl-1H-indol-3-yl)-L-prolyl)-N-methyl-N-(phenethyl)-3-(2-naphthyl)-L-alaninamide and its related compounds
J. Med. Chem. (1994) 37, 2090-2099
- Hale J.J.**, Mills S.G., McCoss M., Shah S.K., Qi H., Mathre D.J., Cascieri M.A., Sadowski S., Strader C.D., McIntyre D.E., Metzger J.M.
2(S)-[(3,5-bis(trifluoromethyl)benzyl)-oxy]-3(S)-phenyl-4-[(3-oxo-1,2,4-triazol-5-yl)methyl]morpholine (1) : a potent orally active, morpholine-based human neurokinin-1 receptor antagonist
J. Med. Chem. (1996) 39, 1760-1762
- Harrison T.**, Williams B.J., Swain C.J., Ball R.G.
Piperidine-ether Based h NK1 antagonists 1 : determination of the relative and absolute stereochemical requirements
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1994 a) 4, 2545-2550
- Harrison T.**, Williams B.J., Swain C.J.
Gem-disubstituted amino-ether based substance P antagonists
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1994 b) 4, 2733-2734
- Harrison T.**, Owens A.P., Williams B.J., Swain C.J., Baker R., Hutson P.H., Sadowski S., Cascieri M.A.,
Piperidine-ether based hNK1 antagonists 2 : investigation of the effect of N-substitution
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1995) 5, 209-212

- Hashimoto M.**, Hayashi K., Murai M., Fujii T., Nishikawa M., Kiyoto S., Okuhara M., Kohsaka M., Imanaka H. WS9326A, a novel tachykinin antagonist isolated from streptomyces violaceusniger N°9326. ii. biological and pharmacological properties of WS9326A and tetrahydro-WS9326A (FK224)
J. Antibiot. (1992) 45, 1064-1070
- Heuillet E.**, Ménager J., Fardin V., Flamand O., Bock M., Garret C., Crespo A., Fallourd A.M., Doble A. Characterization of a human NK1 tachykinin receptor in the astrocytoma cell line U 373 MG
J. Neurochem. (1993) 60, 868-876
- Hipskind P.A.**, Howbert J.J., Cho S., Cronin J.S., Fort S.L., Ginah F.O., Hansen G.J., Huff B.E., Lobb K.L., Martinelli M.J., Murray A.R., Nixon J.A., Staszak M.A., Copp J.D. Pratical and enantiospecific synthesis of LY303870, a novel NK-1 antagonist
J. Org. Chem. (1995) 60, 7033-7036
- Hipskind P.A.**, Howbert J.J., Bruns R.F., Cho S.S.Y., Crowell T.A., Foreman M.M., Gehlert D.R., Lyengar S., Johnson K.W., Krushinski J.H., Li D.L., Lobb K.L., Mason N.R., Muehl B.S., Nixon J.A., Phebus L.A., Regoli D., Simmons R.M., Threlkeld P.G., Waters D.C., Gitter B.D. 3-Aryl-1,2-diacetamidopropane derivatives as novel and potent NK-1 receptor antagonists
J. Med. Chem. (1996) 39, 736-748
- Hirshmann R.**, Nicolaou K.C., Pietranico S., Salvino J., Leahy E.M., Sprengeler P.A., Furst G., Smith III A.B., Strader C.D., Cascieri M.A., Candelore M.R., Donaldson C., Vale W., Maechler L. Nonpeptidal peptidomimetics with b-D- glucose scaffolding. A partial somatostatin agonist bearing a close structural relationship to a potent, selective substance P antagonist
J. Amer. Chem. Soc (1992) 114, 9217-9218
- Howard H.R.**, Shenk K.D., Coffmann K.C., Bryce D.K., Crawford R.T., McLean S.A. Synthesis of conformationally restricted substance P antagonists
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1995) 5, 111-114
- Howson W.**, Hodgson J., Richardson R., Welton L., Guard S., Watling K. An SAR study for the non-peptide substance P receptor (NK1) antagonist, CP96345
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1992) 2, 559-564
- Howson W.**
Rational design of tachykinin receptor antagonists
Drug News & Perspectives (1995) 8, 97-103
- Huang R-R.C.**, Yu H., Strader C.D., Fong T.M. Interaction of substance P with the second and seventh transmembrane domain of the neurokinin-1 receptor
Biochemistry (1994 a) 33, 3007-3013
- Huang R-R.C.**, Yu H., Strader C.D., Fong T.M. Localization of the ligand binding site of the neurokinin-1 receptor : interpretation of chimeric mutations and single-residue substitutions
Mol. Pharmacol. (1994 b) 45, 690-695
- Ichinose M.**, Nakajima N., Takahashi T., Yamauchi H., Inoue H., Takishima T. Protection against bradykinin-induced bronchoconstriction in asthmatic patients by neurokinin receptor antagonist
Lancet (1992) 340, 1248-1251
- Jensen C.J.**, Guard N.P., Schwartz T.W., Gether U. The species selectivity of chemically distinct tachykinin non-peptide antagonists is dependent on common divergent residues of the rat and human neurokinin-1 receptors
Mol. Pharmacol. (1993) 45, 294-299
- Joos G.F.**, Germonpre P.R., Kips J.C., Peleman R.A., Pauwels R.A. Sensory neuropeptides and the human lower airways : present state and future directions
Eur. Resp. J. (1994) 7, 1161-1171
- Juby P.F., Hudyma T.W.**
Preparation and antiinflammatory properties of some 1-substituted 3-(5-tetrazolylmethyl)indoles and homologs
J. Med. Chem (1969) 12, 396-401

- Kersey I.D.**, Fishwick C.W.G., Findlay J.B.C., Ward P.
Photoactivatable analogues of a substance P non-peptidic antagonist, for probing the antagonist binding site of the NK1 receptor
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1995) 5, 1271-1274
- Kikugawa Y.**
A simple synthesis of N-acyl and N-sulfonylindoles
Synthesis (1981) 460-461
- Kucharczyk N.**, Thuriéau C., Paladino J., Morris A.D., Bonnet J., Conet E., Krause J.E., Regoli D., Couture R., Fauchère J-L.
Tetrapeptide tachykinin antagonists : synthesis and modulation of the physicochemical and pharmacological properties of a new series of partially cyclic analogs
J. Med. Chem. (1993) 36, 1654-1661
- Ladduwahetty T.**, Keown L., Cascieri M.A., Sadowski S.
Morpholine-based substance P antagonists : assessment of the 3-point binding model
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1994) 4, 1917-1920
- Lawrence K.B.**, Venepalli B.R., Appell K.C., Goswami R., Logan M.E., Tomczuk B.E., Yanni J.M.
Synthesis and substance P antagonist activity of naphthimidazolium derivatives
J. Med. Chem. (1992) 35, 1273-1279
- Lembeck F.**, Donnerer J., Tsuchiya M., Nagahisa A.
The non-peptide tachykinin antagonist, CP-96,345, is a potent inhibitor of neurogenic inflammation
Brit. J. Pharmacol. (1992) 105, 527-530
- Lewis R.T.**, Macleod A.M., Merchant K.J., Kelleher F., Sanderson I., Herbert R.H., Cascieri M.A., Sadowski S., Ball R.G., Hoogsteen K.
Tryptophan-derived NK antagonists: conformationally constrained heterocyclic bioisosteres of the ester linkage
J. Med. Chem. (1995) 38, 923-933
- Li Y.M.**, Marnerakis M., Stimson E.R., Maggio J.E.
Mapping peptide-binding domains of the Substance P (NK1) receptor from P388D₁ cells with photolabile agonists
J. Biol. Chem. (1995) 270, 1213-1220
- Longmore J.**, Swain C.J., Hill R.G.
Neurokinin receptors
Drug News & Perspectives (1995) 5-23
- Lowe III. J.A.**, Drozda S.E., Snider R.M., Longo K.P., Bordner J.
Preparation and radiolabelling of CP 96,345, the first non-peptide substance P antagonist
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1991) 1, 129-132
- Lowe III. J.A.**, Drozda S.E., Snider R.M., Longo K.P., Zorn S.H., Morrone J., Jackson E.R., McLean S., Bryce D.K., Bordner J., Nagahisa A., Kanai Y., Suga O., Tsuchiya M.
The discovery of (2S,3S)-cis-2-(diphenylmethyl-N-((2-methoxyphenyl)methyl)-1-azabicyclo(2.2.2)-octan-3-amine as a novel, nonpeptide substance P antagonist
J. Med. Chem. (1992) 35, 2591-2600
- Lowe III. J.A.**, Drozda S.E., Snider R.M., Longo K.P., Zorn S.H., Jackson E.R., Morrone J., McLean S., Bryce D.K., Bordner J., Nagahisa A., Kanai Y., Suga O., Tsuchiya M.
Discovery of CP-96,345 and its characterization in disease models involving substance P
Regul. Peptides (1993 a) 46, 20-23
- Lowe III. J.A.**, Drozda S.E., Snider R.M., Longo K.P., Rizzi J.P.
Nuclear variations of quinuclidines substances P antagonists : 2-diphenylmethyl-1- azabicyclo(3.2.2)nonan-3-amines
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1993 b) 3, 921-924
- Lowe III. J.A.**, Ewing F.E., Snider R.M., Longo K.P., Constantine J.W., Lebel W.S., Woody H.A., Bordner J.
2-Aryl-1-azabicyclo(2.2.2)octanes as novel nonpeptide substance P antagonists
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1994 a) 4, 839-842
- Lowe III. J.A.**, Drozda S.E., McLean S., Crawford R.T., Bryce D.K., Bordner J.
N-alkyl quinuclidinium substance P antagonists
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1994 b) 4, 1153-1156

Lowe III. J.A., Drozda S.E., McLean S., Bryce D.K., Crawford R.T., Snider R.M., Longo K.P., Nagahisa A., Tsuchiya M.

Aza-tricyclic substance P antagonists
J. Med. Chem. (1994 c) 37, 2831-2840

Lowe III. J.A., McLean S.

Tachykinin antagonists
Current Pharmaceutical Design (1995) 1, 269-278

Lowe III. J.A.

Tachykinin antagonists in the treatment of asthma
Emerging drugs (1996) Ashley publications Ltd., Chap 1., 1-18

Maggi C.A., Patacchini R., Rovero P., Giachetti A.

Tachykinin receptor and tachykinin receptor antagonists
J. Autonom. Pharmacol (1993) 13, 23-93

Maggi C.A.

The mammalian tachykinin receptors
Gen. Pharmacol. (1995) 26, 911-944

Maggi C.A., Giachetti A., Dey R.D., Said S.I

Neuropeptides as regulators of airway function : vasoactive intestinal peptide and the tachykinins
Phys. Rev. (1995) 75, 277-322

McLean S., Snider R.M., Desai M.C., Rosen T., Bryce D.K., Longo K.P., Schmidt A.W., Heym J.

CP-99,994, a non-peptide antagonist of the tachykinin NK1 receptor
Regul. Peptides (1993) 46, 329-331

McLeod A.M., Merchant K.J., Cascieri M.A., Sadowski S., Ber E., Swain C.J., Baker R.

N-Acyl-L-tryptophan benzyl esters : potent substance P receptor antagonists
J. Med. Chem (1993) 36, 2044-2045

McLeod A.M., Merchant K.J., Brookfield F., Kelleher F., Stevenson G., Owens A.P., Swain C.J., Cascieri M.A., Sadowski S., Ber E., Strader C.D., McIntyre D.E., Metzger J.M., Ball R.G., Baker R.

Identification of L-tryptophan derivatives with potent and selective antagonist activity at the NK1 receptor
J. Med. Chem. (1994) 37, 1269-1274

McLeod A.M., Cascieri M.A., Merchant K.J., Sadowski S., Hardwicke S., Lewis R.T., MacIntyre D.E., Metzger J.M., Fong T.M., Shephard S., Tattersall F.D., Hargreaves R., Baker R.

Synthesis and biological evaluation of NK-1 antagonists derived from L-tryptophan
J. Med. Chem (1995) 38, 934-941

McMurry J.E., Melton J.

A new method for the conversion of nitro groups into carbonyls
J. Org. Chem. (1973) 38, 4367-4373

Mills S.G., Wu M.T., McCoss M., Budhu R.J., Dorn C.P., Cascieri M.A., Sadowski S., Strader C.D., Greenlee W.J.

1,4-Diacylpiperazine-2-(S)-((N-aminoalkyl)carboxamides) as novel potent substance P receptor antagonists
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1993) 3, 2707-2712

Mills S.G., McCoss M., Underwood D., Shah S.K., Finke P.E., Miller D.J., Budhu R.J., Cascieri M.A., Sadowski S., Strader C.D.

1,2,3-trisubstituted cyclohexyl substance P antagonists : significance of the ring nitrogen in piperidine-based NK-1 receptor antagonists
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1995) 5, 1345-1350

Nakanishi S., Nakajima Y., Yokota Y.

Signal transduction and ligand-binding domains of the tachykinin receptors
Regul. Peptides (1993) 46, 37-42

Natsugari H., Ikeura Y., Kiyota Y., Ishichi Y., Ishimaru T., Saga O., Shirafuji H., Tanaka T., Kamo I., Doi T., Otsuka M.

Novel, potent, and orally active substance P antagonists: synthesis and antagonist activity of N-benzylcarboxamide derivatives of pyrido(3,4-b)pyridine
J. Med. Chem. (1995) 38, 3106-3120

- Oleynek J.J.**, Sedlock D.M., Barrow C.J., Appell K.C., Casiano F., Haycock D., Ward S.J., Kaplita P., Gillum A.M. WIN64821, a novel neurokinin antagonist produced by an aspergillus sp. II. Biological activity
J. Antibiot. (1994) 47, 399-410
- Oury-Donat F.**, Lefevre I.A., Thurneyssen O., Gauthier T., Bordey A., Feltz P., Emonds-Alt X., Le Fur G., Soubrié P. SR140333, a novel selective and potent non-peptide antagonist of the NK1 tachykinin receptor : characterization on the U373 MG cell line
J. Neurochem. (1994) 62, 1399-1407
- Owens A.P.**, Harrison W.T., Swain C.J., Baker R., Sadowski S., Cascieri M.A. Phenyl-glycinol based NK-1 receptor antagonists - Toward the minimum pharmacophore
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1995) 5, 2761-2766
- Papadopoulos A.**, Lewall B., Steckhan E., Ginzel K-D., Knoch F., Nieger M. Anodic oxidation of N-acyl and N-alkoxycarbonyl dipeptide esters as a key step for the formation of chiral heterocyclic synthetic building blocks
Tetrahedron (1991) 47, 563- 572
- Payan D.**, Bewster D., Goetzi. Stereospecific receptors for Substance P on cultured human IM-9 lymphoblasts
J. Immunol. (1984) 133, 3260-3265
- Payan D.**, McGillis J., Organist M. Binding Characteristics and Affinity Labeling of Protein Constituents of the human IM-9 Lymphoblast Receptor for Substance P
J. Biol. Chem. (1986) 261, 14321-14329
- Piedimonte G.** Tachykinin peptides, receptors, and peptidases in airway disease
Exp. Lung Res. (1995) 21, 809-834
- Pradier L.**, Habert-Ortoli E., Emile L., Le Guern J., Locquet I., Bock M-D., Clot J., Mercken L., Fardin V., Garret C., Mayaux J-F. Molecular Determinants of the species selectivity of neurokinin type 1 receptor antagonists
Mol. pharmacol. (1994) 47, 314-321
- Regoli D.**, Boudon A., Fauchère J-L. Receptors and antagonists for substance P and related peptides
Pharmacol. rev. (1994 a) 46, 551-599
- Regoli D.**, Nguyen Q.T., Jukic D. Neurokinin receptor subtypes characterized by biological assays
Life Sci. (1994 b) 54, 2035-2047
- Robineau P.**, Lonchamp M., Kucharczyk N., Krause J.E., Regoli D., Fauchère J-L., Prost J-F., Canet E. In vitro and in vivo pharmacology of S16474, a novel dual tachykinin NK-1 and NK-2 receptor antagonist
Eur. J. Pharmacol. (1995) 294, 677-684
- Rosen T.**, Seeger T.F., McLean S., Desai M.C., Guarino K.J., Bryce D., Pratt K., Heym J., Chalabi P.M., Windels J.H., Roth R.W. Synthesis, *in vitro* binding profile and autoradiographic analysis of [3H]-cis-3-[(2-methoxybenzyl)amino]-2-phenyl piperidine, a highly potent and selective nonpeptide Substance P receptor antagonist radioligand
J. Med. Chem. (1993) 36, 3197-3201
- Rosenkilde M.M.**, Cahir M., Gether U., Hjorth S.A., Schwartz T.W. Mutations along transmembrane segment II of the NK-1 receptor affect substance P competition with non-peptide antagonists but not substance P binding
J. Biol. Chem. (1994) 269, 28160-28164
- Sachais B.S.**, Snider R.M., Lowe III.J.A., Krause J.E. Molecular basis for the species selectivity of the substance P antagonist CP-96,345
J. Biol. Chem. (1993) 268, 2319-2323
- Schilling W.**, Bittiger H., Brugger F., Criscione L., Hauser K., Ofner S., Olpe H-R., Vassout A., Veenstra S. Chap 15 : Approaches towards the design and synthesis of nonpeptidic substance P antagonists
Perspectives in Medicinal Chemistry, Testa B., Kyburz E., Fuhrer W., Giger R., Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel (1993) 209-220

- Schwartz T.W.**, Gether U., Schambye H.T., Hjorth S.A.
Molecular mechanism of action of non-peptide ligands for peptide receptors
Current Pharmaceutical Design (1995) 7, 325-342
- Seward E.M.**, Swain C.J., Merchant K.J., Owen S.N., Sabin V., Cascieri M.A., Sadowski S., Strader C., Baker R.
Quinuclidines-based NK1 antagonists I : 3-benzyloxy-1-azabicyclo(2.2.2)octanes
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1993) 3, 1361-1366
- Sisto A.**, Bonelli F., Centini F., Fincham C.I., Potier E., Monteagudo E., Lombardi P., Arcamona F., Goso C., Manzini S., Giolitti A., Maggi C.A., Venanzi M., Pispisa B.
Synthesis and biological evaluation of novel NK1 tachykinin receptor antagonists : the use of cycloalkylaminoacids as a template
Biopolymers (1995) 36, 511-524
- Snider R.M.**, Constantine J.W., Lowe III J.A., Longo K.P., Lebel W.S., Woody H.A., Drozda S.E., Desai M.C., Vinick F.J., Spencer R.W., Hess H-J.
A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK1) receptor
Science (1991 a) 251, 435-437
- Snider R.M.**, Longo K.P., Drozda S.E., Lowe III J.A., Leeman S.E.
Effect of CP 96,345, a non-peptide substance P receptor antagonist on salivation in rats
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991 b) 88, 10042-10044
- Snider R.M.**, Longo K.P., Zorn S.H., Morrone J., Jackson E.R., Nagahisa R., Kanai Y., Suga O., Nakagaki M., Drozda S.E., Lowe III J.A.
Differential SAR of quinuclidine SP antagonists between rats and human-type receptors
Regul. Peptides (1993) 46, 290-292
- Stevenson G.I.**, MacLeod A.M., Huscroft I., Cascieri M.A., Sadowski S., Baker R.
4,4-disubstituted piperidines: a new class of NK-1 antagonist
J. Med. Chem. (1995) 38, 1264-1266
- Sugihara H.**, Ukawa K., Miyake A., Itoh K., Yasushi S.
Syntheses of 1,2-N-alkylimino-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene derivatives and preparation of ring closed analog of salbutamol as a new β -adrenoceptor agent
Chem. Pharm. Bull. (1978) 26, 394-403
- Swain C.J.**, Seward E.M., Sabin V., Owen S., Baker R., Cascieri M.A., Sadowski S., Strader C., Ball R.G.
Quinuclidine based NK1 antagonists 2 : determination of the absolute stereochemical requirements
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1993) 3, 1703-1706
- Swain C.J.**, Cascieri M.A., Owens A., Soari W., Sadowski S., Strader C., Teall M., Van Niel M.B., Williams B.J.
Acyclic NK1 Antagonists : replacements for the benzhydryl group
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1994) 4, 2161-2164
- Swain C.J.**, Seward E.M., Cascieri M.A., Fong T.M., Herbert R., MacIntyre D.E., Merchant K.J., Owen S.N., Owens A.P., Sabin V., Teall M., VanNiel M.B., Williams B.J., Sadowski S., Strader C., Ball R.G., Baker R.
Identification of a series of 3-(benzyloxy)-1-azabicyclo(2,2,2)octane human NK-1 antagonists
J. Med. Chem. (1995 a) 38, 4793-4805
- Swain C.J.**, Fong T.M., Haworth K., Owen S.N., Seward E.M., Strader C.D.
Quinuclidine-based NK1 antagonists, the role of the benzhydryl
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1995 b) 5, 1261-1264
- Swain C.J.**
Neurokinin receptor antagonists
Exp. Opin. Ther. Patents (1996) 6, 367-378
- Tabart M.**, Peyronel J.F.
Synthesis of RPR100893, prototype of a new series of potent and selective non-peptide NK1 antagonists: the triarylperhydroisoindolols
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1994) 4, 673-676
- Tregear G.W.**, Niall H.D., Potts J.T., Leeman S.E., Chang M.M.
Synthesis of substance P
Nature New Biol. (1971) 232, 87-89

Venepalli B.R., Aimone L.D., Appell K.C., Bell M.R., Dority J.A., Goswami R., Hall P.L., Kumar V., Lawrence K.B., Logan M.E., Scensny P.M., Seelye J.A., Tomczuk B.E., Yanni J.M.
Synthesis and substance P binding activity of androstano(3,2-b)pyrimido(1,2-a)benzimidazoles
J. Med. Chem (1992) 35, 374-378

Von Euler U.S., Gaddum J.H.
An unidentified depressor substance in certain tissue extracts
J. Physiol (1931) 72, 74-87

Ward P., Ewan G.B., Jordan C.C., Ireland S.J., Hagan R.M., Brown J.R.
Potent and highly selective neurokinin antagonists
J. Med. Chem (1990) 33, 1848-1851

Ward P., Armour D.R., Bays D.E., Evans B., Giblin G.M.P., Heron N., Hubbard T., Liang K., Middlemiss D., Mordaunt J., Naylor A., Pegg N.A., Vinader M.V., Watson S.P., Bountra C., Evans D.C.
Discovery of an orally bioavailable NK-1 receptor antagonist, (2S,3S)-(2-methoxy-5-tetrazol-1-ylbenzyl)(2-phenylpiperidin-3-yl)amine (GR203040), with potent antiemetic activity
J. Med. Chem (1995) 38, 4985-4992

Watling K.J., Guard S., Boyle S.J., McKnight A.T., Woodruff G.N.
Species variants of tachykinin receptor types
Biochem. Soc. Trans. (1994) 22, 118-122

Williams B.J., Curtis N.R., McKnight A.T., Maguire J.J., Young S.C., Veber D.F., Baker R.
Cyclic peptides as selective tachykinin antagonists
J. Med. Chem. (1993) 36, 2-10

Williams B.J., Teall M., McKenna J., Harrison T., Swain C.J., Cascieri M.A., Sadowski S., Strader C., Baker R.
Acyclic NK1 antagonists : 2-benzhydryl-2-aminoethyl ethers
Bioorg. Med. Chem. Lett. (1994) 4, 1903-1908

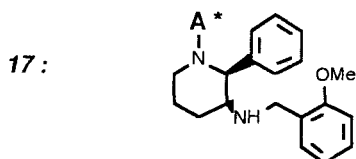
Zoffmann S., Gether U., Schwartz T.W.
Conserved His^{VI-17} of the NK-1 receptor is involved in binding of non-peptide antagonists but not substance P
FEBS Lett. (1993) 336, 506-510



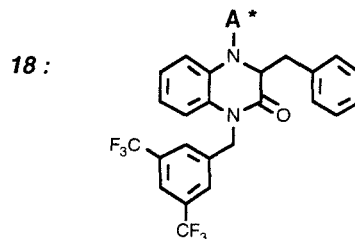
RECAPITULATIF

STRUCTURES NON PEPTIDIQUES

Dérivé hybride FK888 / CP99994

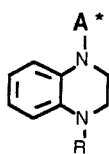


Dérivés à squelette 2-oxo-3-benzyl- 1,2,3,4-tétrahydroquinoxaline



78 : confidentiel

Dérivés à squelette 1,2,3,4- tétrahydroquinoxaline



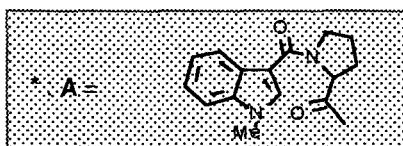
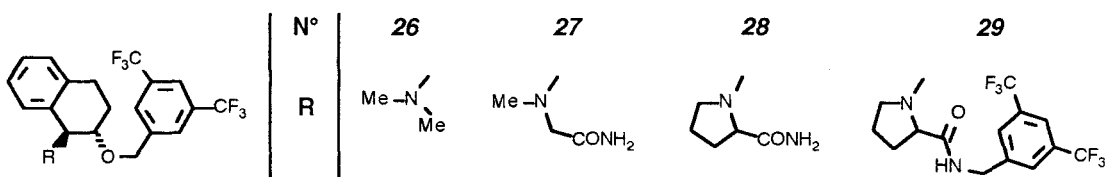
Autres 1,2,3,4-
tétrahydroquinoxalines

N°	R		
19	CH ₂ [3,5-(CF ₃) ₂ Ph]	22 :	confidentiel
20	CH ₂ Ph	23 :	confidentiel
21	(CH ₂) ₂ Ph	24 :	confidentiel
		25 :	confidentiel

Dérivés à squelette pipérazine

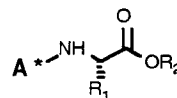
77 : confidentiel
79 : confidentiel
80 : confidentiel
81 : confidentiel
82 : confidentiel

Dérivés à squelette 1-amino-2-[3,5-bis-(trifluorométhyl)benzyloxy]-1,2,3,4-tétrahydronaphtalène



RECAPITULATIF

STRUCTURES PEPTIDIQUES



Tripeptides : NeBz-N α Z-Lys-Ala-Sar-OBzl

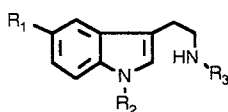
Dipeptides : NeBz-N α Z-Lys-Ala-OBzl

Dipeptides : NeBz-N α Z-Lys-Sar-OBzl

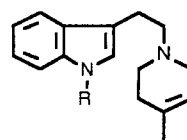
N°	R ₁	R ₂
1	CH ₂ Ind	CH ₂ [3,5-(CF ₃) ₂ Ph]
2	Me	CH ₂ [3,5-(CF ₃) ₂ Ph]
3	CH ₂ Ind	Me

STRUCTURES NON PEPTIDIQUES

Dérivés à squelette indolique



N°	R ₁	R ₂	R ₃
4	H	CH ₂ Ph	A*
6	H	CH ₂ Ph	CO[2-(OMe)Ph]
7	H	CH ₂ Ph	CH ₂ [2-(OMe)Ph]
9	H	Me	CO[2-(OMe)Ph]
10	H	Me	CH ₂ [2-(OMe)Ph]
11	OMe	CH ₂ Ph	CO[2-(OMe)Ph]
12	OMe	Me	CO[2-(OMe)Ph]
13	OCH ₂ Ph	CH ₂ Ph	CO[2-(OMe)Ph]
14	OCH ₂ Ph	Me	CO[2-(OMe)Ph]
15	OMe	CH ₂ Ph	CH ₂ [2-(OMe)Ph]
16	OMe	Me	CH ₂ [2-(OMe)Ph]



N°	R
5	CH ₂ [2-(OMe)Ph]
8	CO[2-(OMe)Ph]

* A =

