

## TESI DOCTORAL

Títol	<b>Disseny, síntesi i avaluació biològica de nous inhibidors potencials de CXCR4</b>
Realitzada per	Albert Gibert Bosch
en el Centre	IQS School of Engineering
i en el Departament	Química Orgànica i Farmacèutica
Dirigida per	Dr. José I. Borrell Bilbao i Dr. Jordi Teixidó i Closa









A la meva família  
Al Roger, el Pol i en Robert  
A la Marta



“Primer has d’aprendre a utilitzar un rem,  
només llavors, podràs portar el timó.”

-Lucio Cornelio Sila

“If we never did anything we shouldn’t do.  
We’d never feel good about doing the things we should.”

- Frank Underwood,  
President of the United States of America.

*(House of Cards)*



## Agraïments

Donar les gràcies de forma ràpida i simple és molt senzill, agrair profundament a la gent que t'envolta és un fet difícil de transmetre, en tan sols unes línies impossible, però prometo dedicar-m'hi a fons. I es que tinc molt a agrair, poca gent ho sap, però el primer dia a la universitat vaig decidir deixar la carrera, potser es tractava de la típica crisi existencial passatgera que tota persona viu almenys un cop a la vida, però aquella era la meva crisi existencial, i si no fos per un bon grup de les persones que menciono posteriorment, no hauria arribat fins on he arribat. Així que tinc molt a dir per estar a l'alçada...

Primerament m'agradaria agrair a l'Iñaki i al Jordi la seva impagable ajuda, per haver-me codirigit aquests anys, per haver-me estès la mà i fer-me un lloc al departament de síntesi. No direm que han estat uns anys fàcils, perquè cada cop que salvàvem un entrebanc semblaven sorgir-ne cinc més i cada cop els hem sabut salvar, fins i tot quan semblaven més complicats. Però tot i les dificultats tampoc podem negar que ho hem gaudit i fins i tot hem somrigut.

Als equips que m'han realitzat els assajos i anàlisis sense els quals aquest treball estaria incomplet; al Servei de RMN i al Dr. Batllori, al Dr. Jesús Planesas per estar sempre disponible, al Laboratori de Retrovirologia de la Fundació IrsiCaixa, a la Júlia per la seva paciència amb els meus *timings*, al Dr. Lliberia per la utilització de la cromatografia líquida UPLC i a la Divisió d'Hematologia i Oncologia d'IDIBAPS i al Dr. Roué per les proves realitzades i l'ajuda rebuda.

Als que m'heu ajudat amb la feina d'aquest treball; en especial al Roger, m'has hagut d'aguantar d'alumne quan ja no era necessari, deu ser el karma... Al Lluís, el Raül i el David, el millor padawan ninja que m'he creuat, per haver-me ajudat en els moments en els que estàveu en el laboratori.

A l'Eli, per aparèixer en el moment oportú, no tenir un no per resposta i ajudar-me tant en un moment tant necessari. T'has guanyat el meu profund agraïment.

Als meus companys de departament, els meus amics de departament; tant els que hem coincidit en alguna etapa com els que heu estat allà des d'un inici fins al final; mai oblidaré la por que em fèieu tots plegats, ni les primeres paraules de la Montse, però Rai, Maia, Gemma, Marta, Gonzalo, Maria... heu de reconèixer que potser el que us fa por ara sóc jo. Hem enterrat desenes de cops a la Meredith, hem discutit degut a l'ambient de crispació per la temperatura, hem jugat, hem defensat presidents, hem pujat fins al cim més alt de Tarragona, hem escapat de zombies i sí, també hem treballat, però sobretot hem menjat... reconeixeu que hem menjat per sobre de les nostres possibilitats, i hem rigut, perquè hem rigut molt. I a l'aparell de Karl-Fisher per els nostres tres mesos un amb l'altre.

També voldria agrair a gent que, encara que estigués a un altre departament, ha compartit bons moments amb mi i ha fet més lleuger el dia a dia; entre molts voldria destacar a la Gemma, l'Anna, l'Adaya o el Quico.

Al Xavi i a la Clàudia, perquè, tot i ser unes incorporacions força recents al meu entorn, heu ocupat un lloc tant important que no m'imagino fer aquesta pàgina sense ser-hi vosaltres.

A l'Alba, per anar-me seguint pels laboratoris des del primer dia, perquè entre pelufes i kebabs, entre cançons i balls, t'has convertit poc a poc en la meva fufal.

A l'Alícia *frau*, per fer-me riure sempre, tot i estar separats per més de 1000 Km i molts, moltíssims francesos. A la Júlia, la Marta i l'Edu, per posar la primera pedra en l'organització més maligna que s'ha vist mai, amb nocturnitat i traïdoria.

A l'Annie, tant lluny però tant a prop, a l'Héctor i a l'Àlex. Junts vam aconseguir la taula més xunga del menjador... Tot i que en el tema organitzatiu fora d'IQS hauríem de plantejar-nos de millorar bastant, molt.

Alguns m'anomenen l'etern auxiliar, reien cada cop que deia "és l'últim any que en faig", ara vist amb perspectiva reien amb raó. Però si una cosa he d'agrair a tants anys de col·laborador de càtedra és a la gent que m'he endut. Podria dir molts noms, però en qualsevol llista acabarien sortint els mateixos: El Claudi, el duc més impacient, la Laura, amb el seu mobiliari peculiar, la Marta, per cada somriure i cada llàgrima, el David, per ensenyar-me el costat més lluminós del costat fosc de la química, el Godoy, perquè ens uneixen més coses que no pas ens separen, el Felix, per aquells caps de setmana inacabables però que s'acabaven fent curts, el Toni, el gironí més gironí amb qui vam convergir en un tema força important, l'Albert i en Hyde, dos persones que ben bé en podrien ser una de sola, l'Anna, l'adinerada que millor sap controlar, i el Pol, l'últim membre d'una comunitat força especial i sens dubte la més particular de les que he format part. També seria just, doncs, agrair a tres taronges que ens van portar de cap durant 6h d'una llarga tarda d'estiu.

A la Carme i a l'Artur, perquè junts hem aconseguït fites que eren inimaginables.

A l'Anna, per haver seguit el meu avenç des dels primers mesos a l'autònoma i comprovar que en acabar la carrera els llaços tenen perquè trencar-se, i a la Maria, perquè m'has ensenyat a no donar-me per vençut i només amb un somriure, el teu somriure, fas millor qualsevol situació.

Als meus amics de Rellinars que, literalment, m'han suportat tants anys d'històries sense cap sentit faltades de tota diversió des del seu punt de vista, però que sempre estan al meu costat cada cop que he creuat el cartell del poble. Maria i Iñaki, Anna i Dani, Mireia i Sergi, però sobretot al Tons i a la Rosa, la meva lectora més devota, m'heu acompanyat en grans moments i m'heu fet costat en aquells que no eren tant grans, encara que fos menjant un tall de pizza prop meu un diumenge qualsevol al vespre.

A la meva família, que sempre han cregut amb mi, fins i tot quan ni jo mateix hi creia, els meus pares que m'han animat i escoltat sempre que ho he necessitat, al Josep i l'Anna, als meus tiets i cosins i la meva àvia, que s'han interessat per cada pas que anava fent. La família no s'escull, diuen, però no em puc imaginar una tria millor.

Per acabar, hi ha persones que et marquen una etapa, que cada cop que recordes un d'aquells moments no pots imaginar-lo sense elles al costat. No em voldria estar de destacar-ne quatre que han definit els meus anys en aquest treball:

Als inicis a IQS, al Roger; perquè tot i estar a l'altre punta del món (literalment), mai has deixat ni deixaràs d'estar prop meu. M'has convertit en part de la teva família sense demanar-ho i amb fets i paraules m'has demostrat any rere any que la distància no ho canviarà.

Enmig de la tesi, quan tot penjava d'un fil, al Pol; moltes coses han canviat, jo he passat de ser el mestre a ser el que aprèn, tu has passat de ser un nom que no recordava a un que no oblidaré. Has estat al meu costat en els moments més difícils i no m'has fallat, i en aquests moments és quan més es valora un gran amic, dels millors. Hem fet grans coses però els millors moments, sens dubte amb els que em quedo, són aquells quotidians, quasi avorrits, que poden no significar res o poden significar-ho tot. *Major Pleasure*. I atent al que ens queda per fer...

L'etapa final, potser quan segurament em sentia més perdut, a en Robert; intentar col·locar en una mateixa frase conceptes tant dispars com Cero, #ahiravuidemà, Pitu o pollet despentinat no té cap tipus de sentit, així que em limitaré a donar-te les gràcies per fer-me riure quan no en tenia motiu, per ser el meu fufal, l'àguila negra i mallerenga. Sempre seràs aquell xaval en xandall amb el que pensava que no tindria res en comú, el mateix que ara no em puc imaginar al meu costat

I no puc deixar de mencionar a la Marta, que m'ha acompanyat des del primer dia del meu recorregut químic fins a l'últim, l'etapa que et correspon és tant gran que no té sentit intentar posar dates. Desenes de cops he escrit el mateix i escriuria el mateix mil vegades més, ja que tot i passar els anys la situació és sempre la mateixa i la conclusió a la que arribo no canvia: sense tenir-te al meu costat no hauria arribat fins aquí, no hauria fet el que he fet i no seria tal com sóc. Gràcies i mil cops gràcies.

A la iaia Maria Rosa, que em vas veure començar aquest projecte però no has pogut veure'n el final. Sé que hi voldries estar i saps que ho donaria tot perquè fos així.

Tanco una etapa que penso que no hauria estat igual de no ser per la gent d'aquesta extensa llista, però en començo una de nova que sé segur que no podré fer sense vosaltres.





## Sumari

El receptor de quimiocina CXCR4 ha resultat ser una diana terapèutica de principal importància des del descobriment de la seva funció en l'etapa d'unió del virus del VIH amb la cèl·lula hoste en el seu cicle de replicació i el seu paper en una gran varietat de processos tumorals en la seva expansió en l'organisme mitjançant metàstasi. Des del descobriment, l'any 1990, del biciclam AMD3100 (Plerixafor,  $EC_{50} = 0.002 \mu M$ ), la primera molècula petita inhibidora de CXCR4, s'han dedicat grans esforços en trobar-ne anàlegs més potents, selectius i menys tòxics.

El Grup d'Enginyeria Molecular (GEM) d'IQS ha treballat prèviament amb anàlegs d'AMD3100 dissenyant i sintetitzant diverses quimioteques de tetraamines potencialment inhibidores de CXCR4. D'elles n'han sorgit diversos compostos amb resultats anti-VIH prometedors. En el present treball s'ha optat per realitzar diverses modificacions en aquests caps de sèrie del grup amb l'objectiu d'ampliar l'espai químic al seu voltant i millorar aquests resultats.

En primer lloc, es dissenyen i es sintetitzen dues noves famílies que contenen dos espaiadors diferents als utilitzats fins al moment. Un primer espaiador fenílic, com el que conté l'AMD3100 però no simètric, amb una cadena d'una sola baula i una de dues baules metilèniques entre l'anell fenílic i el primer nitrogen de banda i banda de l'anell. El segon és un espaiador simètric amb un anell naftalènic central.

En segon lloc, s'amplia la diversitat molecular en dissenyar noves tetraamines amb l'espaiador *p*-fenilbismetilènic que implementen nous substituents en busca d'una millora en la capacitat d'inhibició de CXCR4. En aquesta cerca, es dissenya una nova ruta sintètica que permet incloure la funcionalitat èster en l'anell heterocíclic dels extrems de la tetraamina, no accessible amb les metodologies usades fins al moment.

Finalment, es realitzen assaigs d'inhibició del receptor CXCR4, proliferació cel·lular i anti-VIH així com estudis computacionals per estudiar el mode d'acció d'alguns d'aquests compostos front el receptor CXCR4 i com actuen en diverses malalties amb les que està relacionat, tals com la infecció del VIH, el càncer de pàncrees o la leucèmia.



## Sumario

El receptor de quimosina CXCR4 ha resultado ser una diana terapéutica de principal importancia desde el descubrimiento de su función en la etapa de unión del virus del VIH con la célula huésped durante el ciclo de replicación y su papel en una gran variedad de procesos tumorales en su expansión en el organismo a través de la metástasis. Desde el descubrimiento, el año 1990, del biciclo AMD3100 (Plerixafor,  $EC_{50} = 0.002 \mu\text{M}$ ), la primera molécula pequeña inhibidora de CXCR4, se han dedicado grandes esfuerzos en hallar análogos más potentes, selectivos y menos tóxicos.

El *Grup d'Enginyeria Molecular (GEM)* de IQS ha trabajado previamente con análogos de AMD3100 diseñando y sintetizando diversas quimiotecas de tetraaminas potencialmente inhibidoras de CXCR4. De ellas han surgido diversos compuestos con resultados anti-VIH prometedores. En el presente trabajo se ha optado por realizar diversas modificaciones en estos cabezas de serie del grupo con el objetivo de ampliar el espacio químico a su alrededor y mejorar estos resultados.

En primer lugar, se diseñan y se sintetizan dos nuevas familias que contienen dos espaciadores diferentes a los utilizados hasta el momento. Un primer espaciador fenílico, como el que contiene AMD3100 pero no simétrico, con una cadena de un solo eslabón y una de dos eslabones metilénicos entre el anillo fenílico y el primer nitrógeno a cada lado del anillo. El segundo es un espaciador simétrico con un anillo naftalénico central.

En segundo lugar, se amplía la diversidad molecular en diseñar nuevas tetraaminas con el espaciador *p*-fenilbismetilénico que implementan nuevos sustituyentes en busca de una mejora en la capacidad de inhibición de CXCR4. En esta búsqueda, se diseña una nueva ruta sintética que permita incluir la funcionalidad éster en el anillo heterocíclico de los extremos de la tetraamina, no accesible con las metodologías usadas hasta el momento.

Finalmente, se realizan ensayos de inhibición del receptor CXCR4, proliferación celular y anti VIH a la vez que estudios computacionales para estudiar el modo de acción de alguno de estos compuestos frente el receptor CXCR4 y cómo actúan en diversas enfermedades con las que está relacionado, tales como la infección del VIH, el cáncer de páncreas o la leucemia.



## Summary

The chemokine receptor CXCR4, has proved to be a therapeutic target of major importance since the discovery of its role in the binding and fusion steps of the HIV virus with the host cell during the replication cycle and its role in a variety of tumor processes in its expansion in the organism through the metastasis. Since the discovery, in 1990, of the bicyclic system AMD3100 (Plerixafor,  $EC_{50} = 0.002 \mu\text{M}$ ), the first small molecule inhibitor of CXCR4, great efforts have been devoted to find analogues more potent, selective and less toxic.

The *Grup d'Enginyeria Molecular (GEM)* of IQS has previously worked with AMD3100 analogues designing and synthesizing various libraries of tetramines as potential CXCR4 inhibitors. Among them various compounds with promising anti-HIV results have emerged. In the present work, we carried out various modifications of these structures with the objective of expanding the chemical space around them and improve these results.

First, we designed and synthesized two new families of compounds containing different cores to those previously. The first core presents a central phenyl ring, the same included in AMD3100 but not symmetrical, with a methylene and two methylene carbons between the phenyl ring and the first nitrogen of the substituents on each side. The second is a symmetrical core with a central naphthalene ring.

Secondly, the molecular diversity was increased by designing new tetramines with a *p*-xylene core implementing new substituents to improve the inhibition CXCR4. In this search, a new synthetic route was designed, which allowed to introduce the ester in the heterocyclic ring present in the ends of the tetramine, functionality not accessible with the methodologies used so far.

Finally, inhibition assays of the CXCR4 receptor, cell proliferation assays and anti HIV tests were carried out together with computational studies to cast light on the mode of action of these compounds against the CXCR4 receptor and how they act in various related diseases such as HIV infection, pancreatic cancer or leukemia.



# ÍNDEX

	Pàg.
Acrònims	1
<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>5</b>
1.1 Les citocines i les quimiocines	7
1.2 El receptor de quimiocina CXCR4	9
1.2.1 Estructura del receptor CXCR4 i el lligand CXCL12	9
1.2.2 Unió de CXCR4 amb CXCL12	12
1.2.3 El receptor CXCR4 i la SIDA	15
1.2.3.1 La SIDA i el VIH	15
1.2.3.2 Cicle de replicació del VIH	17
1.2.4 El receptor de quimiocina CCR5	20
1.2.4.1 Tropisme del VIH	20
1.2.4.2 Variabilitat genètica del VIH	21
1.2.5 CXCR4 i el càncer	22
1.2.5.1 El càncer en la societat	22
1.2.5.2 Metàstasi	24
1.2.5.3 El paper del receptor CXCR4	25
1.2.6 Tipus d'inhibició	27
1.3 Estat actual	28
1.3.1 Inhibidors de CXCR4	28
1.3.2 Compostos ciclàmics	31
1.3.3 Monociclams	33
1.4 El Grup d'Enginyeria Molecular (GEM) i els inhibidors de CXCR4	33
1.5 Objectius	42
Bibliografia	43
<b>2. SÍNTESI DE TETRAAMINES AMB NOUS ESPAIADORS</b>	<b>55</b>
2.0 Antecedents a IQS	57
2.1 Nou espaiador no simètric	58
2.1.1 Anteriorment al GEM	58
2.1.2 Disseny de la nova quimioteca	59
2.1.3 Síntesi de <i>p</i> -(2-hidroxietil)benzaldehyd	62
2.1.4 Nova ruta sintètica	63

2.1.4.1 Síntesi del <i>p</i> -(bromometil)benzaldehyd	64
2.1.4.2 Protecció del grup aldehyd	67
2.1.4.3 Bromació de la molècula 28	68
2.1.5 Utilització d'un grup imina com a grup protector	69
2.1.5.1 Formació de la imina	70
2.1.6 Nou producte de partida i nova ruta sintètica	72
2.1.6.1 Síntesi del clorur d'àcid 36	76
2.1.6.2 Síntesi de les amides 38{x}	79
2.1.6.3 Síntesi dels compostos 37{x,y} amina-amida	82
2.1.6.4 Reducció de les molècules 37{x,y}	84
2.2 Espaiador naftalènic	89
2.2.1 Obtenció del clorur d'àcid 49	90
2.2.2 Obtenció de les diamides 50{x}	91
2.2.3 Reducció de les diamides 50{x}	94
2.3 Anàlisi dels resultats d'activitat anti-VIH	97
Bibliografia	107
<b>3. SÍNTESI DE NOUS COMPOSTOS A PARTIR DEL CAP DE SÈRIE 3{3}</b>	<b>111</b>
3.0 Antecedents al grup	113
3.1 Modificacions en la tetraamina 3{3}	114
3.1.1 Tetrasubstitució de l'espaiador	114
3.1.1.1 Obtenció dels compostos intermedis 67 i 68	118
3.1.2 Combinacions dels nous substituents amb l'amina 2{3}	123
3.1.2.1 Síntesi de l'intermedi monosubstituït 5{3}	125
3.1.2.2 Substitució de l'intermedi 5{3}	126
3.1.3 Anàlisi d'activitat anti-VIH	128
3.1.4 Nou compost naftalènic 73 amb substituents d'anell de piridina	130
3.1.4.1 Formació de l'intermedi amida 75	131
3.1.4.2 Obtenció del compost naftalènic 73	132
3.1.4.3 Anàlisi de l'activitat anti-VIH del compost naftalènic 73	133
3.2 Nous heterocicles per a la síntesi de tetraamines	134
3.2.1 Construcció de la quimioteca	135
3.2.2 Reducció de la quimioteca	136
3.2.3 <i>Docking</i>	139
3.2.4 Síntesi de les tetraamines 80{x,y}	140
3.2.4.1 Síntesi de les amines 2{17} i 2{18}	141
3.2.4.2 Formació de les tetraamines simètriques 80{17,17} i 80{18,18}	144
3.2.5 Síntesi de la tetraamina no simètrica 80{18,17}	147
3.2.6 Anàlisi d'activitat anti-VIH dels compostos 80{x,y}	148
3.3 Cerca d'un nou cap de sèrie	150



3.3.1 Treball computacional	150
3.3.2 Síntesi de l'amina primària 2{20}	153
3.3.2.1 Formació de l'èster 91{6}	154
3.3.2.2 Obtenció de l'amina 2{20}	155
3.3.2.3 Formació de la imina 89{20,20}	155
3.3.2.4 Nous èsters de partida	156
3.3.3 Purificació per <i>scavengers</i>	159
3.3.3.1 Selecció del <i>scavenger</i> i optimització de la reacció	159
3.3.3.2 Aplicació de la purificació per <i>scavengers</i> optimitzada	163
3.3.4 Autociclació de l'amina 2{20}	164
3.3.4.1 Plantejament de la nova ruta sintètica	165
3.3.4.2 Formació del bicicle 96	166
3.3.5 Nova ruta sintètica per obtenir la tetraamina 3{19}	168
3.3.5.1 Obtenció de l'espaiador 103	170
3.3.5.2 Obtenció de la imina 89{21,21}	172
3.3.5.3 Reducció de la imina 89{21,21}	174
3.3.5.4 Obtenció de la tetraamina 3{19}	177
3.4 Obtenció de noves molècules 3{x}	181
3.4.1 Comprovació de la viabilitat de la ruta sintètica	181
3.4.2 Síntesi de les noves molècules 3{x} usant la nova ruta sintètica	183
3.4.2.1 Síntesi de la tetraamina 3{20}	186
3.5 Assaig biològic i anàlisi de resultats	186
3.5.1 Assaig antiviral	186
3.5.2 Assaig front a la leucèmia	189
3.5.2.1 Assaig de proliferació cel·lular	190
3.5.2.2 Assaig de citotoxicitat	191
3.5.2.3 Assaig de quantificació d'apoptosi	192
3.5.2.4 Assaig de migració cel·lular	194
3.5.3 Assaig front a càncer de pulmó	195
3.5.4 Assaig front a càncer de pàncrees	196
3.5.5 Assaig front a CXCR4	198
3.5.6 Predicció del mode d'acció del compost 3{21}	207
3.5.6.1 Estudi computacional d'unió al receptor CXCR4	207
3.5.6.2 Estudi dels processos metabòlics derivats de CXCR4	211
3.5.6.3 Estudi del lloc d'unió del compost 3{21} amb CXCR4	212
3.5.6.4 Al·lostèria de 3{21} respecte a CXCR4	214
3.6 Síntesi dels estereoisòmers de 3{21}	216
3.6.1 Síntesi dels estereoisòmers (R,R) i (S,S) de la tetraamina 3{21}	217
3.6.2 Síntesi de la forma <i>meso</i> (R,S)-3{21}	219
Bibliografia	223

<b>4. EXPERIMENTAL</b>	<b>229</b>
<b>5. CONCLUSIONS</b>	<b>317</b>
<b>6. ANNEX</b>	<b>323</b>

## Acrònims

ACN	acetonitril
as	asimètrica
BDS	dimetilmercaptà borà
Boc	tert-butoxicarbonil
C	quimiocines del tipus C
CAF	fibroblasts associats a carcinoma
CC <sub>50</sub>	concentració citotòxica
CC	quimiocines del tipus CC
CCF	cromatografia de capa fina
CCR	receptor de quimiocines de tipus CC
COSY	espectroscòpia de correlació de ressonància magnètica nuclear
<sup>13</sup> C-RMN/NMR	ressonància magnètica nuclear de carboni
CX3C	quimiocines del tipus CX3C
CXC	quimiocines del tipus CXC
CXCR	receptor de quimiocines de tipus CXC
Cys	cisteïna
δ	vibració de deformació
d	doblet
d-CHCl <sub>3</sub> /CdCl <sub>3</sub>	cloroform deuterat
Da	dalton
DLBLC	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i>
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DNA	àcid desoxiribonucleic
EC <sub>50</sub>	concentració efectiva
EI	Impacte electrònic
ESI-TOF	ionització per electrosprai-temps de vol
Et	etil
eV	electronvolt
γ	vibració de l'esquelet
γ-PCC	clorocromat de γ-picolina

G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
Gp	glicoproteïna
GPCR	receptor unit a proteïna G
GRK	quimiocines unides a proteïna G
HAART	<i>high active antiretroviral therapy</i>
<sup>1</sup> H-RMN/NMR	ressonancia magnètica nuclear de protó
Hz	hertz
IR	espectroscòpia d'infraroig
ITIAN	inhibidor de transcriptasa inversa anàleg a nucleòsid
ITINAN	inhibidor de transcriptasa inversa no anàleg a nucleòsid
IP	inhibidor de proteasa
IS	índex de selectivitat/índex terapèutic
<i>J</i>	constant d'acoblament
M	molar
[M] <sup>+</sup>	ió molecular
<i>M</i>	<i>major</i>
m	multiplet
m/z	relació massa càrrega
MDC	<i>macrophage-derived chemokine</i>
Me	metil
MS	espectroscòpia de masses de baixa resolució
MTT	bromur de 3-(4,4-dimetiltiazole-2-il)-2,5-difeniltetrazole
mw	calefacció per microones
N	<i>non-outlier, non-major</i>
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
O	<i>outlier</i>
<i>o</i>	Substituent en orto
<i>p</i>	Substituent en para
pàg.	pàgina
Ph	fenil
ppm	part per milió

q	quadruplet
quint	quintuplet
RNA	àcid ribonucleic
S	Singlet
SCLC	small cell lung cancer
SDF	Servei de Disseny de Fàrmacs
SDF-1	factor derivat de cèl·lules estromals
SIDA	síndrome de la immunodeficiència adquirida
sim	simètrica
<i>t</i>	tensió
t	triplet
$T_{amb}$	temperatura ambient
TMCS	trimetilclorosilà
THF	tetrahidrofuran
UV	llum ultravioleta
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
vDNA	àcid desoxiribonucleic víric
VIH	virus de la immunodeficiència humana
wt	<i>wild type</i>



# 1- INTRODUCCIÓ





## 1.1- Les citocines i les quimiocines

Les citocines són una família de proteïnes de baix pes molecular amb funció reguladora. La resposta normal que generen enfront a estímuls diversos sol ser la inflamació, aquesta inflamació comporta un augment del flux sanguini local i un augment del nombre de cèl·lules del sistema immunitari presents en el punt d'infecció. També tenen la capacitat de generar nous capil·lars sanguinis (angiogènesi), producció de col·lagen i proliferació de precursors hematopoètics (medul·la òssia).<sup>[1]</sup>

Les quimiocines són un tipus de citocines, de mida petita (8-14 kDa), caracteritzades per la presència de residus de cisteïna (Cys) terminals propers que, segons la seva situació, les classifica en dos grans grups: CC i CXC segons si aquests residus es troben adjacents o no.<sup>[2]</sup> Es troben en tots els vertebrats, així com en alguns virus i bacteris.

Les quimiocines resulten ser els lligands naturals de les proteïnes transmembrana anomenats receptors de quimiocina. El cos humà posseeix 50 quimiocines i 20 receptors de quimiocina. Aquestes últimes es classifiquen en quatre categories diferents, de la mateixa forma que les quimiocines, com s'ha explicat anteriorment, basant-se en la distància entre els dos primers residus de cisteïna i la localització cromosòmica dels seus respectius gens:<sup>[2,3]</sup>

-CC ( $\beta$ -quimiocines): contenen dues cisteïnes adjacents prop de l'extrem N-terminal.

-CXC ( $\alpha$ -quimiocines): les dues cisteïnes de N-terminal es troben separades per un aminoàcid, aquest queda representat per la X.

-C: tan sols presenten dues cisteïnes en tota la seva estructura.

-CX3C: presenten 3 aminoàcids entremig de les dues cisteïnes del seu extrem N-terminal.

Essent les dues primeres (CC i CXC) les majoritàries, i les famílies C i CX3C les que trobem de forma minoritària. <sup>[4,5]</sup> Segons si es tracta de quimiocines o receptors de quimiocina, es completa la nomenclatura amb una L (quimiocines) o una R (receptors de quimiocina).

També es poden classificar segons la seva funcionalitat, dividint-se així dos grans grups<sup>[4,5]</sup>:

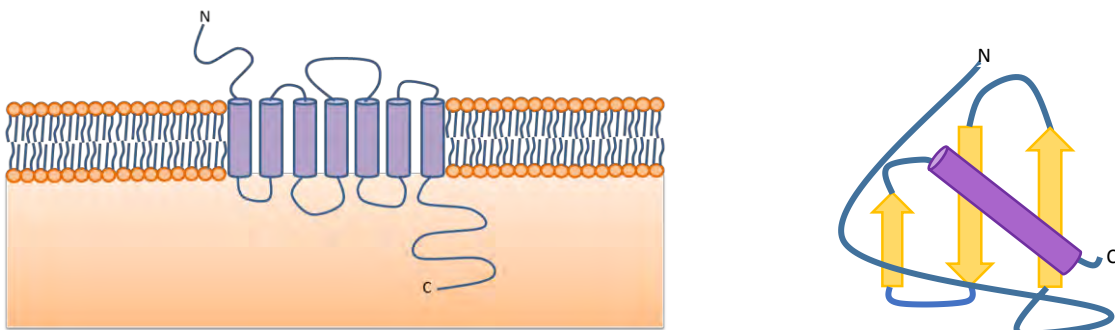
-Quimiocines homeostàtiques: participen en l'activació i migració de les poblacions leucocitàries per organitzar l'arquitectura dels òrgans limfoides.

-Quimiocines inflamatòries: participen en processos inflamatoris induïdes per un procés pro-inflamatori.

Tot i tenir un rol important en la protecció de l'individu contra l'atac de patògens perillosos i en la cicatrització de ferides com s'ha indicat, el seu alliberament excessiu o inapropiat pot comportar danys en el teixit i ser l'origen d'algunes malalties com l'esclerosi múltiple, l'artritis reumatoide o ser el causant del rebuig d'òrgans trasplantats.<sup>[6]</sup>

La principal característica dels receptors de quimiocina és la quimiotaxi, l'habilitat d'induir la migració dirigida de cèl·lules cap a un gradient de citocina quimiotàctica provocat per cèl·lules danyades o infectades.<sup>[5,6]</sup> Aquesta habilitat d'activar leucòcits es troba també en altres tipus de cèl·lules, incloent-ne les endotelials o les cèl·lules tumorals, fet que pot propiciar-ne la mobilitat i alhora la proliferació i l'angiogènesi de nous tumors.<sup>[6]</sup>

Els receptors de quimiocina pertanyen al grup dels Receptors Units a Proteïnes G o GPCR (*G Protein-coupled Receptor*) i la major part tenen una estructura terciària similar<sup>[3]</sup>: 7 dominis alfa hèlix transmembrana amb 6 *loops* que els uneixen, 3 extracel·lulars i 3 intracel·lulars, a més d'un extrem N-terminal flexible extracel·lular i l'extrem C-terminal a l'interior de les cèl·lules (Figura 1.1). Aquesta unió de l'extrem C-terminal a una proteïna G és la que permetrà la transmissió del senyal dins la cèl·lula un cop s'hi ha unit el lligand natural promovent les diverses cascades de transducció de senyal que n'activaran les diferents funcions: mobilitat cel·lular, angiogènesi, desgranulació cel·lular, etc...<sup>[3]</sup>



**Figura 1.1.** Estructura d'una quimiocina receptora, amb els 7 dominis hèlix  $\alpha$  transmembrana, els 6 *loops* (3 extracel·lulars i 3 intracel·lulars) i els extrems N-terminal i C-terminal (esquerra) i una quimiocina amb les tres làmines fulla  $\beta$  en groc, l'hèlix  $\alpha$  en violeta i els *loops* que l'estabilitzen i conformen l'estructura (dreta).

Les quimiocines, en canvi, estan formades per tres làmines de fulla  $\beta$  antiparal·leles unides a l'extrem N-terminal amb una hèlix  $\alpha$  en l'extrem C-terminal (Figura 1.1). L'estructura de les quimiocines s'estabilitza gràcies a la presència de 1-3 ponts disulfur.<sup>[8]</sup> L'extrem N-terminal és el que confereix major flexibilitat a la proteïna, i és per això que aquest és el punt d'unió amb la zona més inaccessible del receptor de quimiocina corresponent.

Quan un receptor de quimiocina entra en contacte amb un dels seus lligands naturals, aquest últim actua com a agonista d'aquest receptor, unint-se a ell pel lloc d'unió i provocant una resposta en la cèl·lula. Un antagonista d'aquest receptor el que provocarà és una ocupació

d'aquest de la mateixa forma que el seu lligand però no provocant cap resposta en la cèl·lula i impedit que el lligand s'hi pugui unir.

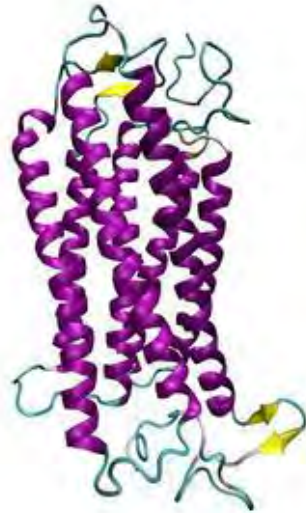
## 1.2- El receptor de quimiocina CXCR4

El receptor CXCR4, o quimiocina CXC receptora de tipus 4, és conegut també com a fusina o clúster de diferenciació 184. Es pot trobar en qualsevol cèl·lula que precisa de mobilitat cel·lular, per exemple, en condicions fisiològiques normals, el trobem tant en el sistema immune com en el sistema hematopoètic, en fases de desenvolupament de l'organisme es pot trobar també en cèl·lules mare que els hi permetin arribar al destí indicat o en el cas de malalties com el càncer on es pot trobar en cèl·lules de metàstasi que provoquen la formació de nous tumors en diferents teixits de l'organisme. És activat específicament per la quimiocina lligand 12 (CXCL12) anomenada també Factor Derivat de l'Estroma 1 (SDF-1), una quimiocina peptídica de 8 kDa formada per tan sols 67 aminoàcids localitzada majoritàriament en les cèl·lules de l'estroma de la medul·la òssia. S'ha vist que, a part del receptor CXCR4, la SDF-1 també serveix de lligand pel receptor CXCR7.<sup>[3]</sup>

La interacció de les quimiocines amb els seus receptors es caracteritza per una considerable promiscuïtat ja que la major part dels receptors coneguts interaccionen amb diversos agonistes i la major part dels agonistes interaccionen amb més d'un receptor<sup>[9]</sup> fent de les quimiocines (agonistes) una diana poc recomanable. En contrast, diversos antagonistes i amb gran selectivitat s'han desenvolupat contra receptors de quimiocina com a diana.<sup>[9]</sup>

### 1.2.1- Estructura del receptor CXCR4 i el lligand CXCL12

A l'octubre del 2010 es va publicar l'estructura del receptor CXCR4.<sup>[10]</sup> Es classifica dins els receptors GPCR en la família de la Rodopsina, dins d'aquesta es troba en el grup de les quimiocines. Com tots els receptors de quimiocina, el receptor CXCR4 està format per 7 dominis transmembrana, en aquest cas en forma de  $\alpha$ -hèlix. La seva estructura de 352 aminoàcids es completa amb l'extrem N-terminal extracel·lular i C-terminal intracel·lular que col·labora amb la transducció de senyal, a més de 3 *loops* extra-cel·lulars i 3 *loops* intra-cel·lulars<sup>[10,11]</sup> (Figura 1.2).

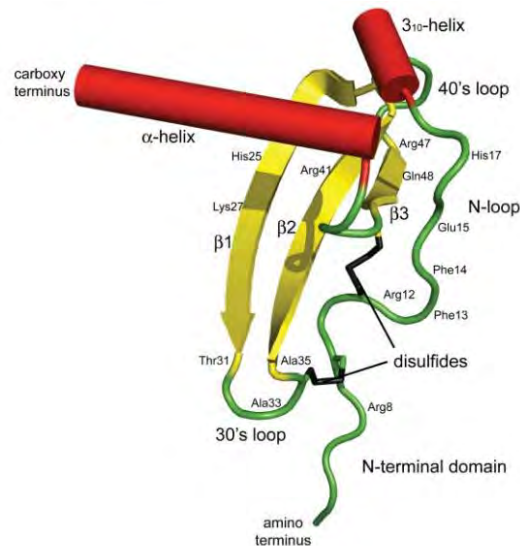


**Figura 1.2.** Estructura del receptor CXCR4.<sup>[12]</sup>

CXCR4 és l'únic receptor de quimiocines funcional en les cèl·lules progenitores hematopoètiques i la seva unió amb CXCL12 és vital en el mecanisme de migració de cèl·lules, essencial tant en la vida embrionària com en l'adult<sup>[13]</sup>, per aquest motiu es troba altament conservat entre espècies.

El receptor CXCR4 es pot trobar a l'organisme tant en forma de monòmer com formant homo<sup>[14]</sup> o hetero-dímers amb CCR2, CCR5 o CXCR7, per exemple.<sup>[15]</sup> En el moment en què formen hetero-dímers els mecanismes metabòlics que se'n desencadenen canvien respecte la forma monomèrica. Aquesta capacitat per formar hetero-dímers pot explicar que entre ells comparteixin bona part dels seus inhibidors així com el fet que el lligand CXCL12 sigui el lligand natural tant del receptor CXCR4 com del CXCR7.

La quimiocina CXCL12 va ser inicialment identificada com a factor de creixement cel·lular.<sup>[16]</sup> Tal com s'ha indicat, aquesta quimiocina homeostàtica és secretada majoritàriament en la medulla òssia en individus adults, però també es troba en altres teixits i òrgans com el fetge, els pulmons o els teixits limfàtics.<sup>[17,18]</sup> En la Figura 1.3 es mostra l'estructura de CXCL12 on es perceben les tres fulles  $\beta$  (groc) i les dues hèlix  $\alpha$  (vermell) amb l'extrem C-terminal, els dos ponts disulfur que estableixen l'estructura (negre) i l'extrem N-terminal típics de les quimiocines CXC però té poca homologia amb altres quimiocines de la família. El fet que el gen que la codifiqui es trobi en el cromosoma 10 mentre que els de la resta de quimiocines CXC es troben el cromosoma 4 pot ser-ne el motiu.<sup>[21]</sup> A més, és la quimiocina CXC amb un major grau de conservació interespecífica.



**Figura 1.3.** Estructura de la quimiocina CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ).<sup>[17]</sup>

Es coneixen 6 isoformes de la quimiocina CXCL12<sup>[19,20]</sup> designades com a CXCL12 $\alpha$ , CXCL12 $\beta$ , CXCL12 $\gamma$ , CXCL12 $\delta$ , CXCL12 $\epsilon$  i CXCL12 $\phi$ , essent la primera d'elles la de major predominança i la més estudiada. Difereixen entre elles per la seva extensió de l'extrem C-terminal.<sup>[19]</sup> L'existència de més d'una isoforma segueix no sent clara tot i codificar per diferent nombre d'aminoàcids, ja que la major part d'ells els comparteixen, per exemple CXCL12 $\beta$  tot i codificar per 93 aminoàcids, els 89 primers són els mateixos que corresponen a CXCL12 $\alpha$ .<sup>[20]</sup>

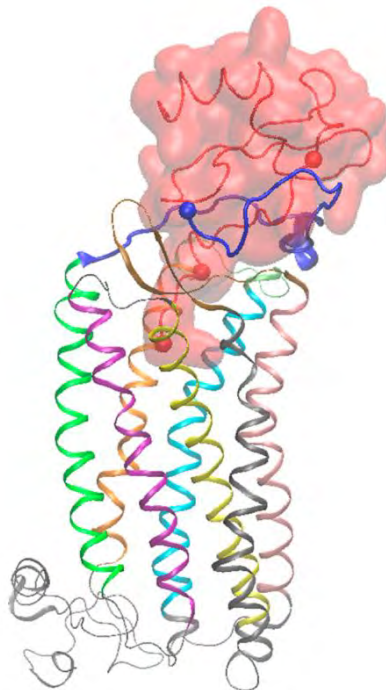
A pH àcids la quimiocina CXCL12 $\alpha$  es troba en forma de monòmer, però s'ha comprovat que a pH entre 7 i 8,5 tendeix a formar dímers, per tant, a pH fisiològic es troba en equilibri entre les dues formes.<sup>[22]</sup> Quan es troba en forma de dímer és capaç d'activar el receptor CXCR4, però no provoca migració cel·lular, per a això cal la forma monomèrica. Calen les dues formes, però, per activar les cèl·lules *in vivo*.<sup>[23]</sup> Les seves principals funcions són la regulació de la quimiotaxi de leucòcits, la diferenciació dels limfòcits T i la angiogènesi o neovascularització.<sup>[24-26]</sup> La seva funcionalitat i els mecanismes que es desencadenen, però, difereixen entre les diferents isoformes.<sup>[27]</sup>

Lligands com el SDF-1 o MDC (*macrophage-derived chemokine*) estan en constant producció en les cèl·lules i òrgans especialitzats (com la medul·la òssia, el fetge o el cervell, per exemple) però, a més, es sobreexpressa quan té lloc una infecció o un atac extern de l'organisme, la major part de la resta de quimiocines es produeixen tan sols en cèl·lules activades en moment puntuals, però, a diferència de CXCL12, no disposen d'un lloc de producció constant; a més, les cèl·lules usualment produeixen alhora diverses quimiocines en resposta a un mateix estímul.<sup>[9]</sup>

### 1.2.2- Unió de CXCR4 amb CXCL12

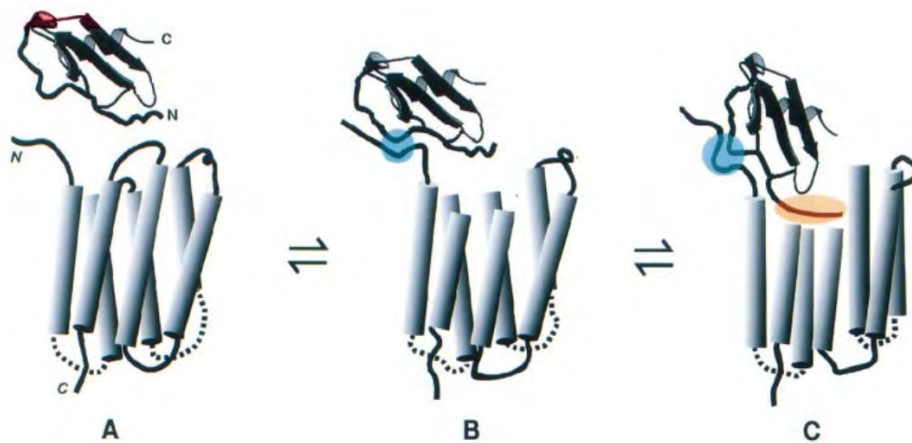
La quimiocina CXCL12 (SDF-1) i el receptor de quimiocina CXCR4 tenen una de les poques unions monògames que es poden trobar d'aquest tipus. Es considera així perquè, com s'ha dit, el receptor CXCR4 tan sols s'uneix a aquest lligand per activar-se; no és així amb el cas de CXCL12, que, com s'ha vist, és capaç d'unir-se a més d'un receptor.<sup>[28]</sup>

La unió de CXCR4 i CXCL12 (Figura 1.4) es dona inicialment entre els residus centrals (24-50) de CXCL12 amb l'extrem N-terminal del receptor. Seguidament, i tal com s'ha comentat anteriorment, l'extrem N-terminal de CXCL12 (residus 1-15) s'uneixen a l'interior del domini transmembrana de CXCR4 en el punt més intern del lloc d'unió.<sup>[29,30]</sup>



**Figura 1.4.** Unió entre la quimiocina CXCL12 (vermell) i el receptor de quimiocina CXCR4. Es mostra l'extrem N-terminal de CXCR4 en blau fosc i es destaquen els residus 1, 5 i 15 de CXCL12 en esferes vermelles (ordre ascendent essent el residu 15 el que es troba a la part més externa del receptor CXCR4).<sup>[29]</sup>

L'extrem N-terminal de CXCR4 conté 3 residus tirosina sulfatats, cadascun d'aquests residus ocupa un únic lloc específic en la quimiocina i s'uneixen amb alta afinitat. Aquesta unió és la inicial i la que permet la unió més interna que actua com a senyal d'activació del receptor (Figura 1.5).<sup>[31,32]</sup> Encara no se'n coneix la configuració específica, però.



**Figura 1.5.** Unió de la quimiocina CXCL12 amb el receptor CXCR4. La unió entre l'extrem N-terminal de CXCR4 i la part central de CXCL12 es troba ressaltada en blau, mentre que la interacció entre l'extrem N-terminal de CXCL12 i la part interna del receptor en taronja. Es pot percebre com es precisa de la primera unió perquè es doni la següent.<sup>[32]</sup>

Les funcionalitats d'aquesta unió són essencialment la quimiotaxi (migració direccional de cèl·lules a localitzacions específiques), l'hematopoesi (ja que és capaç de fer entrar les noves cèl·lules formades al torrent sanguini un cop han madurat en la medulla òssia), així com el manteniment i retenció de les cèl·lules mares hematopoètiques (cèl·lules B precursors) en diferents nodes limfàtics i vasculars de cara al seu desenvolupament i creixement.<sup>[18,28,33]</sup>

Després de la unió, el receptor CXCR4 s'estabilitza en una conformació que activa la proteïna G heterotrímica. Els *loops* intracel·lulars són els responsables d'aquesta interacció amb la proteïna G heterotrímica,<sup>[34]</sup> i aquesta es dissocia en dues subunitats, iniciant diferents vies de senyalització.<sup>[35]</sup> La subunitat  $G\alpha$  queda unida al receptor mentre que la subunitat  $\beta\gamma$  s'associa a la membrana cel·lular activant la resta de la cascada de senyalització.<sup>[35]</sup>

Mitjançant la inducció de diferents cascades de transducció de senyal, els receptors de quimiocina poden iniciar diferents vies metabòliques dirigides a remodelar el citoesquelet d'actina (responsable de la motilitat cel·lular i els canvis de forma de la cèl·lula)<sup>[36]</sup> i d'aquesta manera les diferents funcions biològiques associades tal com es veu en la Figura 1.6.

L'extrem C terminal del receptor és el responsable d'optimitzar l'especificitat, la selectivitat i la duració del senyal, a més de minimitzar la comunicació no desitjada entre rutes de senyalització.<sup>[37,38]</sup> Aquest extrem C-terminal, a més, és fosforilat per les quinases receptores de proteïnes G (GRK)<sup>[39]</sup> fet que permet captar la  $\beta$ -arrestina que, conjuntament amb la Clatrina, permet l'endocitosi controlada.<sup>[40]</sup> Tal com es comentarà més endavant, els pacients amb la síndrome de WHIM presenten un trencament d'aquest extrem C-terminal que impedeix el normal funcionament de la proteïna GRK3 fet que en provoca la senyalització constant.<sup>[41,42]</sup>



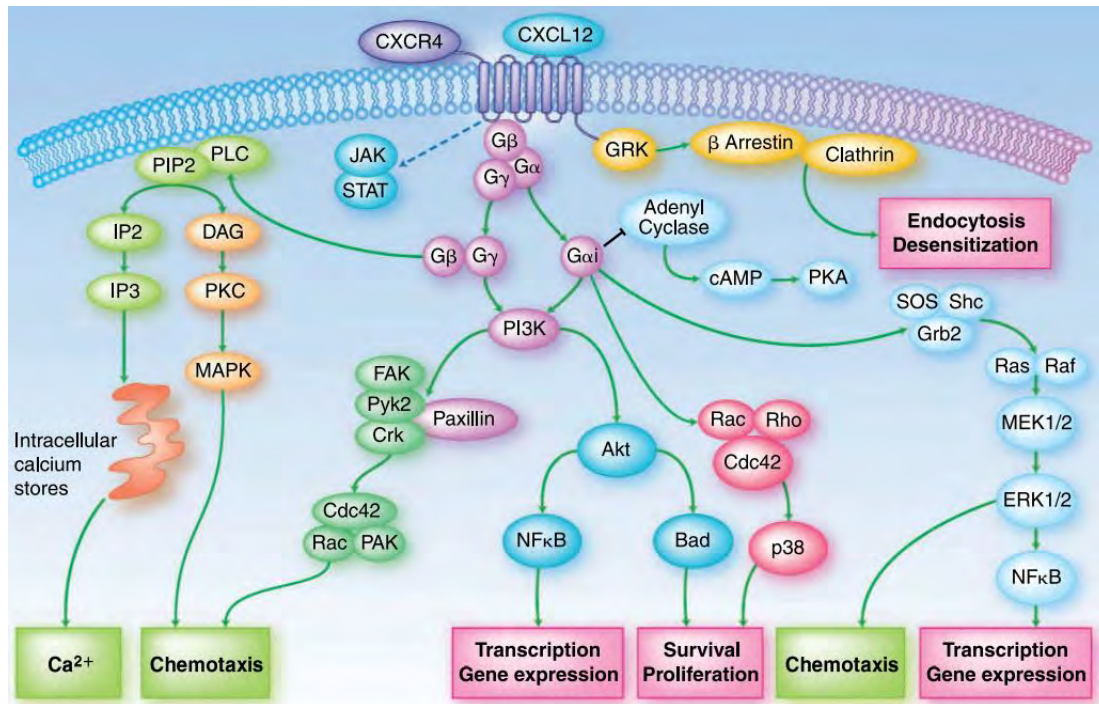


Figura 1.6. Camí de la transducció de senyal derivada de la unió de CXCL12 amb CXCR4.<sup>[38]</sup>

La unió CXCR4/CXCL12 està especialment implicada en la infecció per VIH<sup>[44]</sup>, ja que el virus utilitza el receptor CXCR4 per entrar dins la cèl·lula hoste, i en càncer. Es troba associada a més de 23 tipus de càncer on promou metàstasi, angiogènesi i el creixement i supervivència del tumor.<sup>[38]</sup>

Disfuncions en aquest receptor són la causa d'altres malalties com l'artritis reumatoide o la Síndrome de WHIM que no es tractaran en el present treball, però que demostren la importància i varietat de CXCR4 com a diana terapèutica.

### Artritis reumatoide

L'artritis reumatoide és una malaltia inflamatòria crònica que afecta a l'1% de la població i que afecta diverses articulacions, la infiltració massiva de leucòcits en les articulacions inflamades, la proliferació de cèl·lules sinovial i la destrucció progressiva de cartílags i ossos en les articulacions afectades.<sup>[44,45]</sup>

Sembla que l'origen de la malaltia roman en una anomalia en el receptor CD4<sup>[45]</sup> de les cèl·lules, però s'ha comprovat que en els pacients afectats per aquesta malaltia es troba sobreexpressat en alts nivells el receptor CXCR4 i, en conseqüència, la quimiocina CXCL12.<sup>[46]</sup> El conjunt CXCR4/CXCL12 resulta doncs una diana terapèutica factible com a teràpia per la malaltia.<sup>[47]</sup>

### Síndrome de WHIM

La síndrome de WHIM és provocada per una mutació genètica heretada en els gens que codifiquen pel receptor CXCR4 que n'impedeixen la regulació negativa. Els leucòcits dels



pacients segueixen senyalitzant CXCL12, però no hi ha interacció amb el receptor i queden retinguts en la medul·la òssia, ja que no es dona lloc cap tipus de migració cap al torrent sanguini.<sup>[48]</sup>

Aquesta síndrome es caracteritza per hipogammaglobulinèmia (una deficiència del sistema immune), neutropènia associada a la retenció de neutròfils retingudes en la medul·la òssia, limfopènia de cèl·lules B i T així com infeccions bacterianes constants entre elles la del virus del Papiloma.<sup>[48,49]</sup>

S'està utilitzant AMD3100 (Figura 1.22 de l'Apartat 1.3.2) per tractar pacients amb WHIM, ja que el fàrmac actua com a antagonista del receptor CXCR4 i permet bloquejar la sobresenyalització de CXCL12.<sup>[50]</sup>

### **1.2.3- El receptor CXCR4 i la SIDA**

L'any 1996 es va descobrir la funció del receptor CXCR4 en el cicle de replicació del virus del VIH (Virus de la Immunodeficiència Humana).<sup>[43]</sup> El descobriment que molècules endògenes de CXCL12 tenien la capacitat d'inhibir l'entrada del virus del VIH va convertir el receptor CXCR4 en una diana potencial contra la SIDA (Síndrome de la Immunodeficiència Adquirida).<sup>[51,52]</sup>

#### **1.2.3.1- La SIDA i el VIH**

Aproximadament hi ha 37 milions de persones convivint amb el virus del VIH arreu del món actualment.<sup>[53,54]</sup>

Durant el 2014 es creu que hi van haver 2 milions de noves infeccions. Encara que sembli una xifra desorbitada, durant la última dècada les noves infeccions han disminuït un 33%. Tot i això, quasi 1.2 milions de persones van morir en el 2014 a causa de la SIDA i es calcula que per cada persona amb SIDA que comença el tractament anti-VIH, dues noves persones se'n contagien.<sup>[53,54]</sup> Per tant s'està molt lluny d'aconseguir eradicar o vèncer aquesta malaltia, que ja ha estat designada com la gran epidèmia de l'època actual.

Les regions més afectades per la SIDA es troben focalitzades a l'Àfrica i algunes de les zones menys desenvolupades de la resta del món. En aquests moments la prevenció i la informació a la població són els millors mètodes per evitar el contagi, amb això, els països més desenvolupats del planeta han vist com els casos de noves infeccions disminuïen o es mantenien estables. Des del seu descobriment, però, s'ha tractat la malaltia a nivell mundial, ja que es poden trobar casos en qualsevol regió del món i en individus de qualsevol ètnia o perfil social.

Quan el virus del VIH entra en l'organisme, comença la infecció d'aquest cap a tot tipus de cèl·lules que presentin els receptors CD4 en la seva membrana; mostrant predilecció pels limfòcits T. Aquesta infecció es pot dividir en dues grans etapes diferenciades:

- La infecció primària o fase primerenca, que es dona durant les primeres setmanes de la infecció, on el virus s'estableix a l'organisme. Es replica de forma massiva i s'estableix als nodes limfàtics on nous virions s'alliberen al torrent sanguini per acabar distribuint-se per tot l'organisme. Finalment l'organisme genera anticossos contra el VIH. S'arriba a un estat de latència on el pacient no té cap mena de dolència ni símptoma, el virus es replica de forma massiva i el nombre de limfòcits T comença a decreixer. Quan aquest arriba a menys de 200 unitats/ml es considera que l'estat de latència ha acabat.<sup>[55]</sup>
- La fase tardana, la segona gran etapa, que és quan el pacient realment desenvolupa la malaltia, el nombre de limfòcits T cau en picat i comencen a aparèixer els símptomes derivats de la SIDA. Arribats a aquest punt, el sistema immunitari del pacient es troba tant debilitat que tota una sèrie de malalties oportunistes fan acte de presència.

Com a virus, el VIH és una entitat infecciosa microscòpica tan sols formada per un genoma i un conjunt de proteïnes, que posseeix membrana cel·lular, fet que tan sols es dona en alguns tipus de virus.

Pertany a la família dels *retroviridae lentivirinae*, o retrovirus del tipus lentivirus, família de virus responsables d'una gran varietat de les malalties neurològiques i immunològiques. Es caracteritzen per la seva lenta incubació abans de manifestar la malaltia, per tant poden estar dins l'organisme de forma latent sense manifestar la malaltia durant llargs períodes de temps.<sup>[56]</sup>

Tal com ja s'ha dit, el VIH té capacitat per infectar qualsevol cèl·lula que presenti els receptors CD4 en la seva membrana, però té tendència a infectar els limfòcits T4, també coneguts com "cèl·lula T col·laboradora", un tipus de glòbul blanc que té la funció d'advertir al sistema immunitari si hi ha una infecció a l'organisme.<sup>[57]</sup>

El VIH està format per un genoma de dues cadenes d'RNA (*Ribonucleic acid*) encabides dins una càpsida de forma cònica (tal com es veu en la Figura 1.7 en color blau). L'RNA comparteix la càpsida amb diferents proteïnes que faciliten i fan possible les diferents etapes del cicle de replicació del virus. A destacar la integrasa i la transcriptasa inversa, que juguen un paper important en l'esmentat cicle de replicació.<sup>[58,59]</sup>

Tot es troba encabit dins una membrana lipídica amb forma esfèrica d'uns 100 nm de diàmetre que conté les glicoproteïnes gp41 i gp120 (a la Figura 1.7 en color verd i violeta respectivament), les dues essencials per l'etapa d'unió del virió amb la cèl·lula hoste. Aquesta membrana prové de la bicapa lipídica de la cèl·lula hoste, ja que n'escindeix un tros quan s'alliberen els virions per gemmació.<sup>[59]</sup>

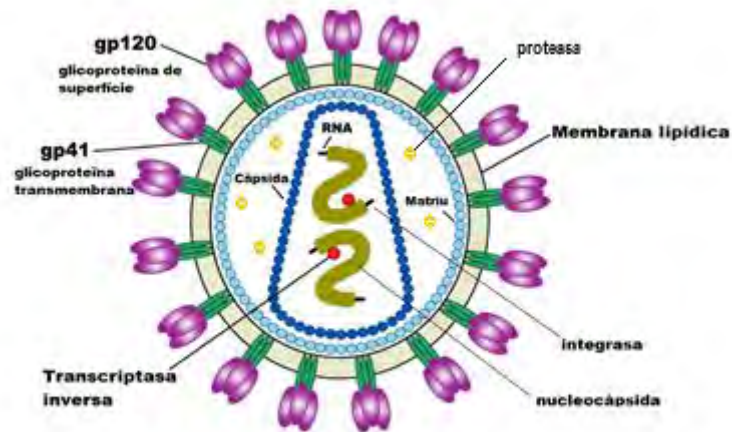


Figura 1.7. Estructura del VIH (figura adaptada de [www.slvhealth.org](http://www.slvhealth.org)).

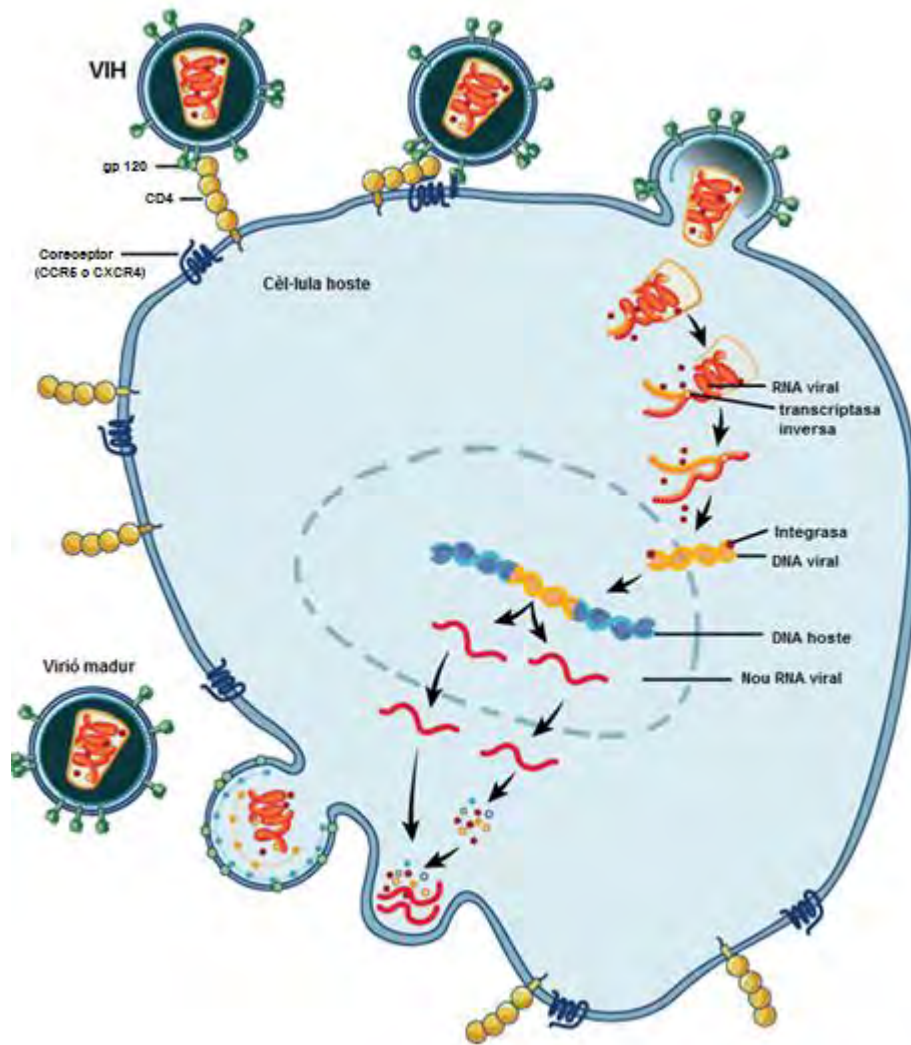
### 1.2.3.2- Cicle de replicació del VIH

El cicle de replicació del VIH és el mateix que per qualsevol retrovirus, amb la particularitat que ja s'ha indicat anteriorment de que el seu temps de latència dins l'organisme tendeix a ser més llarg.

Per fer-ho, el virus utilitza cèl·lules amb presència del receptor CD4 en la seva membrana. Aquest receptor és el que permet la interacció del virus amb la cèl·lula hoste i la posterior fusió.

El cicle de replicació del VIH es pot dividir fàcilment en dos grans blocs, la fase primerenca i la fase tardana, tanmateix, aquests blocs poden ser dividits en les diferents etapes del cicle de replicació. Així, la fase primerenca comprèn les fases des de la unió del virus amb la cèl·lula fins que el seu material genètic es troba integrat en el DNA d'aquesta, i la fase tardana engloba la resta de cicle fins a l'alliberació dels nous virions al medi.

La Figura 1.8 mostra l'esquema del cicle de replicació íntegre del VIH.



**Figura 1.8.** Cicle de replicació del virus del VIH (figura adaptada de <http://www.niaid.nih.gov>).

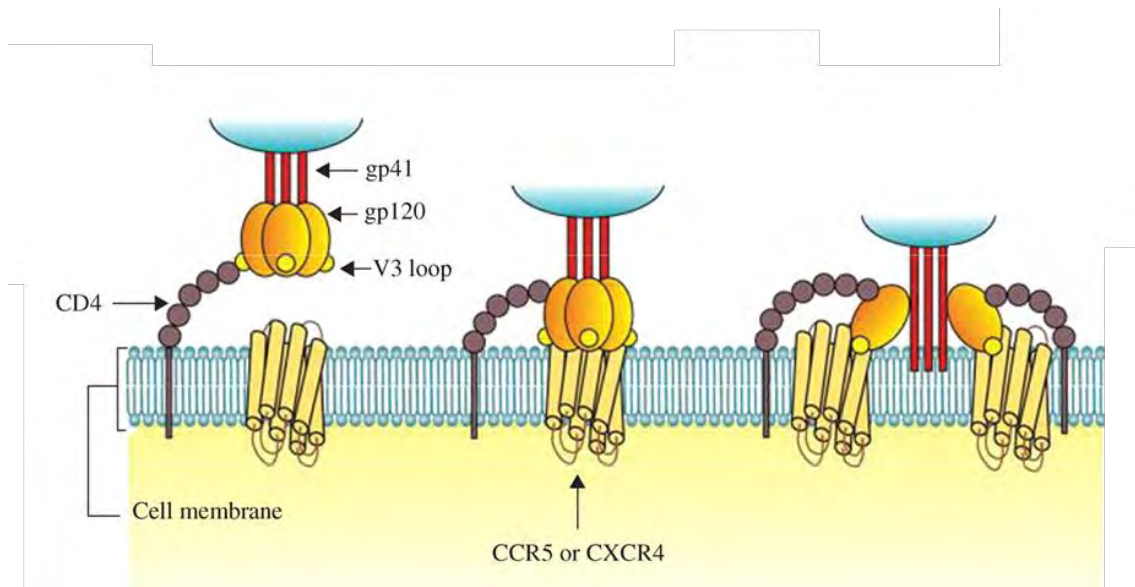
Unió i fusió del virus a la cèl·lula hoste:

Les proteïnes gp120 de la membrana lipídica del VIH s'uneixen als receptors presents en la membrana de la cèl·lula a infectar, com es pot veure a la primera representació de la Figura 1.9 i en la part superior de la Figura 1.8, aquests receptors són els CD4, en la superfície dels limfòcits-T i els macròfags (principals responsables de la resposta immunitària) així com els monòcits i les cèl·lules dendrítiques.

L'estructura tridimensional del receptor CD4 fou resolta l'any 1990 per Ryu i col·laboradors.<sup>[60]</sup> Es tracta d'una glicoproteïna transmembrana de 58 kDa pertanyent a la família de les immunoglobulines i formada per 433 aminoàcids.<sup>[60]</sup>

Un cop el virió està unit al receptor CD4 formant el complex CD4-gp120 s'incrementa la unió electrostàtica amb els coreceptors CCR5 i/o CXCR4, ambdós receptors units a proteïnes G

(GPCR), mitjançant la regió específica anomenada *loop V3* (en la Figura 1.9 es poden veure representats en groc) de la proteïna gp120.<sup>[58,61,62]</sup> Aquesta unió provoca que aquesta proteïna pateixi un canvi conformacional,<sup>[58,63]</sup> desdoblant-se i permetent que la proteïna gp41 vírica, hidrofòbica, també pateixi un canvi conformacional i s'insereixi dins de la membrana cel·lular. Aquesta inserció forma un porus de fusió que permet l'alliberament de la nucleocàpsida vírica dins el citoplasma cel·lular.<sup>[61,64,65]</sup>



**Figura 1.9.** Procés d'unió del VIH a la cèl·lula hoste (figura adaptada de jac.oxfordjournals.org).

Aquest coreceptor al que s'ha d'unir forçosament després de la unió amb CD4 pot ser tant CXCR4 com CCR5, la utilització d'un o l'altre no és aleatòria, ve determinada el tropisme cel·lular (apartat 1.2.4.1).

La necessitat del virus d'utilitzar aquests coreceptors per poder entrar a la cèl·lula es va identificar l'any 1996.<sup>[51,52,66-68]</sup> Tot i la seva semblança (Figura 1.10), cada un té els seus lligands específics; confirmant així la seva diferenciació. Com ja s'ha indicat anteriorment el coreceptor CXCR4 té tan sols CXCL12 com a lligand, mentre que CCR5 (apartat 1.2.4) és receptor de les quimiocines RANTES, MIP-1 $\alpha$  i MIP-1 $\beta$ .<sup>[63]</sup>

El cicle de replicació es completa amb les etapes de transcripció inversa<sup>[57,65,69-71]</sup>, integració<sup>[58,61,72]</sup>, transcripció<sup>[55]</sup>, traducció<sup>[58]</sup>, assemblatge<sup>[58,73]</sup> i alliberament<sup>[61]</sup>.

En cada una d'aquestes etapes hi ha una o més d'una diana terapèutica de cara a desenvolupar un possible fàrmac contra la malaltia. Des dels inicis de la malaltia es va iniciar la recerca d'una cura, no arribant a hores d'ara a una cura completa però sí a millorar l'esperança i la qualitat de vida dels malalts de SIDA. En aquests moments el tractament que dona millors resultats és l'anomenat HAART (*High Active Antiretroviral Therapy*) que és un conjunt de tres fàrmacs que actuen en dianes diferents, no elimina el virus del cos, però frena el desenvolupament de la malaltia al atacar diferents punts del cicle de replicació. Aquests fàrmacs es classifiquen en

Inhibidors de la transcriptasa inversa anàlegs a nucleòsids (ITIANs), Inhibidors de la transcriptasa inversa no anàlegs a nucleòsids (ITINANs), inhibidors de la proteasa (IP), inhibidors de la integrasa i inhibidors d'entrada. Tot i això, s'han trobat soques del virus resistents a aquest tractament, per això no s'ha aturat la investigació per torbar-ne una cura efectiva i definitiva.<sup>[74,75]</sup>

### 1.2.4- El receptor de quimiocina CCR5

El receptor de quimiocina CCR5, igual que el CXCR4, és una proteïna transmembrana formada per 7 hèlix alfa i que el virus del VIH utilitza de la mateixa forma per entrar dins la cèl·lula hoste (Figura 1.10).<sup>[61]</sup>

Les observacions que inhibint CCR5 s'aconseguia una menor susceptibilitat a la infecció de VIH o un menor rati de la progressió de la malaltia van convertir els coreceptors CCR5 i CXCR4 en dianes principals de l'etapa d'unió del virus del VIH amb la cèl·lula hoste.<sup>[28]</sup>

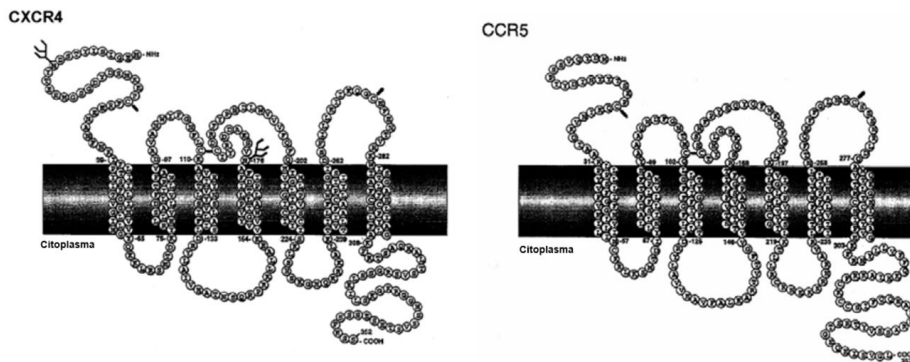


Figura 1.10. Estructura dels receptors de quimiocina CXCR4 i CCR5.<sup>[76]</sup>

Com s'ha comentat anteriorment, la capacitat del virus del VIH d'utilitzar un o altre coreceptor no és a l'atzar, sinó que es deu al tropisme cel·lular.

#### 1.2.4.1- Tropisme del VIH

Les diferents soques del VIH-1 es poden classificar segons el tipus de cèl·lula que infecten; així segons infectin limfòcits T, macròfags o ambdós cèl·lules indistintament es classifiquen en soques T-tròpiques, M-tròpiques i D-tròpiques respectivament.<sup>[77]</sup>

Un altre tipus de classificació, com s'ha comentat anteriorment, és segons el coreceptor que utilitzen per entrar dins la cèl·lula hoste; així s'anomenen X4 les soques que utilitzen el coreceptor CXCR4, R5 per les que utilitzen CCR5 i X4R5 per les soques que tenen la capacitat d'utilitzar els dos coreceptors (Figura 1.11).<sup>[77]</sup>

El que determina la utilització d'un o altre coreceptor és la seqüència d'aminoàcids del domini *loop* V3 de la proteïna gp120 de la membrana vírica.<sup>[78,79]</sup> Els virus R5 que utilitzen CCR5 com a coreceptor d'entrada solen ser els que es transmeten d'un individu a un altre i, per tant, són la soca predominant en les fases inicials de la malaltia, mentre que en les fases més avançades es troben majoritàriament soques del tipus X4 i X4R5.<sup>[78]</sup>

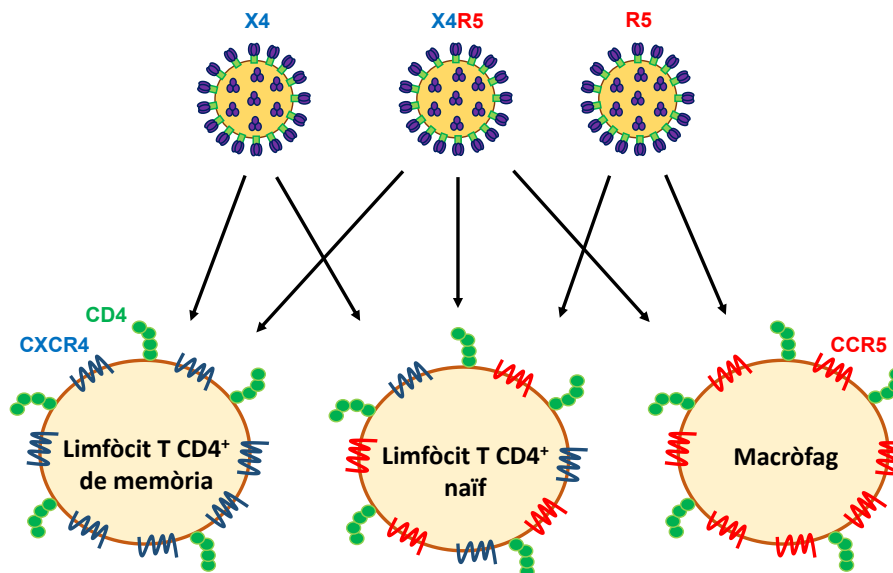
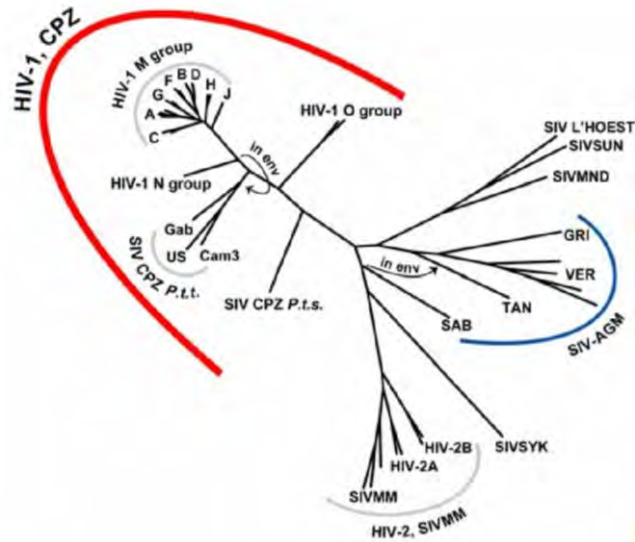


Figura 1.11. Diferents soques de VIH-1 segons el coreceptor utilitzat per entrar a la cèl·lula hoste.

#### 1.2.4.2- Variabilitat genètica del VIH

Degut a la seva alta taxa de mutació en cada cicle de replicació, el VIH és un virus molt variable.<sup>[80]</sup> Els virions es poden classificar en dos grans grups: VIH-1, el més comú, i VIH-2, variant tan sols present a la part occidental d'Àfrica, essent clarament minoritari.

El VIH-1 a la vegada es divideix en 3 grups generals: M (*major*), O (*outlier*) i N (*non-M/non-O*) (Figura 1.12).



**Figura 1.12.** Relacions filogenètiques dels lentivirus en primats (figura adaptada de [www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov)).

El grup M es correspon al 90% de les infeccions i es divideix en diferents subtipus: A, B, C, D, F, G, H, J i K.<sup>[81,82]</sup> El genoma viral més comú a Europa és el B.

Un estudi filogenètic descobreix l'origen del VIH-1 en el retrovirus SIVcpz (Simian immunodeficiency virus). Es creu que el virus va passar dels ximpanzés als humans i va mutar fins a la forma actual.<sup>[83]</sup> S'estima que aquest contagi entre espècies va transcórrer entre l'any 1902 i 1921 i que en la regió centre-occidental africana es va anar diversificant en els diferents subtipus.<sup>[84]</sup>

## 1.2.5- CXCR4 i el càncer

### 1.2.5.1- El càncer en la societat

El càncer és un terme que engloba més de 200 malalties.<sup>[85]</sup> Cada una d'aquestes malalties pot tenir característiques completament diferents de la resta; això les pot definir com a malalties independents amb les seves causes, evolució i tractament. Tot i això, totes elles tenen una característica en comú: les cèl·lules canceroses adquireixen la capacitat de multiplicar-se i disseminar-se per l'organisme sense cap tipus de control.<sup>[85]</sup>

No és una malaltia nova, el seu coneixement es remunta a l'antiga Grècia on Hipòcrates (460-370 a.C.) va donar-li el nom de *carcinosis* i *carcinoma* per anomenar els tumors que formaven úlceres i els que no en formaven.<sup>[86]</sup>



El càncer és la segona causa de mort en els països desenvolupats. Actualment milions de persones a tot el món estan convivint amb el càncer o n'ha tingut.<sup>[86]</sup> Es calcula que un de cada dos homes i una de cada tres dones desenvoluparà un càncer al llarg de la seva vida.<sup>[87]</sup>

A Catalunya es diagnostiquen aproximadament uns 33.700 casos nous de càncer cada any, dels quals 20.000 corresponen a homes i 13.700 a dones, sent superior a la mitjana europea en el cas dels homes i per sota de la mitjana en el cas de les dones.<sup>[87]</sup> Els tumors més freqüents en el cas dels homes són els de pròstata (21,3%), pulmó (15,1%), còlon (15,0%), bufeta (11,2%) i faringe (3,9%) representant el 66,5% del total de tumors diagnosticats (Figura 1.13). En el cas de les dones, els tumors més freqüents són els de mama (28,6%), còlon (15,3%), cos d'úter (5,4%), pulmó (3,9%) i els limfomes no Hodgkin (3,7%) representant el 56,9% del total (Figura 1.13).<sup>[87]</sup> En les dones resulta preocupant el cas del càncer de pulmó, que respecte a períodes anteriors ha passat d'ocupar l'onzena posició a la quarta.



**Figura 1.13.** Gràfiques en percentatge dels tumors més freqüents en homes i dones a Catalunya.<sup>[87]</sup>

Anualment a Catalunya moren aproximadament 15.700 persones a causa del càncer, aquest fet converteix el càncer en la primera causa de mortalitat en homes i la segona en les dones després de les malalties de l'aparell circulatori.<sup>[87]</sup>

Com s'ha indicat, s'anomena tumor a un conjunt de cèl·lules que tenen la capacitat de créixer i dividir-se sense control. Aquests tumors es divideixen en benignes quan no tenen la capacitat d'envair teixits i òrgans adjacents i en malignes quan sí que ho fan i a més tenen la capacitat de traslladar-se i proliferar en altres parts de l'organisme (metàstasi) i és el que anomenem càncer.<sup>[85]</sup>

Cada tipus de càncer té les seves pròpies característiques i la seva progressió i evolució depèn de múltiples factors, però es poden identificar una sèrie de fases o estadis comuns entre ells:

- **Fase d'inducció o iniciació tumoral:** Es tracta de l'etapa més llarga de la malaltia (pot durar fins a 30 anys) i no es pot diagnosticar ja que no produeix cap tipus de símptoma. En aquest estadi les cèl·lules pateixen els canvis cel·lulars que li proporcionen les característiques de multiplicació descontrolada i la capacitat d'invasió (carcinogènesi).<sup>[85]</sup> Aquestes cèl·lules es coneixen com a

cèl·lules iniciades. S'anomena agents carcinògens a les substàncies que provoquen aquests canvis en la cèl·lula. Cal més d'una sola mutació, però, per desencadenar el procés de formació de tumors.<sup>[88]</sup>

Si sobre les cèl·lules iniciades interfereixen nous agents carcinògens aquest procés s'accelera i la divisió cel·lular serà més ràpida. Les noves cèl·lules mutades es coneixen com a cèl·lules promocionades.<sup>[85,87]</sup>

-Fase *in situ*: Acostuma a tenir una durada de 5-10 anys. La malaltia ja es pot diagnosticar, però la lesió cancerosa és microscòpica i tan sols localitzada en el lloc d'origen, a més no apareixen símptomes ni molèsties fet que el fa de difícil detecció.<sup>[85,87]</sup>

-Fase d'invasió local: En aquest estadi la lesió comença estendre's a teixits o òrgans adjacents. En aquest punt ja comencen a aparèixer símptomes i la malaltia ja és de diagnosi més fàcil. Tot i això, aquests símptomes depenen molt del tipus de càncer i, per tant, també la facilitat per detectar-lo.

-Fase d'invasió a distància: La malaltia es dissemina fora del lloc d'origen. Els símptomes són complexos i la malaltia s'agreuja considerablement en dispersar-se a altres òrgans i teixits, aquest procés d'invasió s'anomena metàstasi.<sup>[85,87]</sup>

### 1.2.5.2- Metàstasi

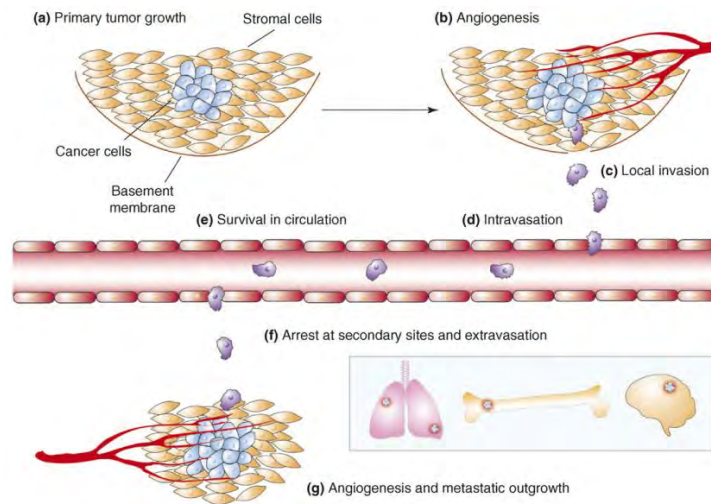
La migració regulada i l'acolliment de cèl·lules mare als nínxols dels diferents teixits és un pas vital durant el procés embrionari o en la reparació de teixits, però quan aquest mecanisme s'utilitza per a la disseminació de cèl·lules tumorals s'anomena metàstasi.<sup>[89]</sup>

Tot i el que pugui semblar, la metàstasi és un procés complex i organitzat. Les cèl·lules tumorals no es disseminen i creixen en qualsevol punt a l'atzar sinó que la disseminació en certs òrgans en concret es veu afavorida i ve acompanyada d'un procés de canvi del microentorn molt elaborat. A l'hora d'organitzar aquest microentorn, les cèl·lules tumorals es comuniquen amb les cèl·lules del seu voltant segregant factors de creixement i altres citocines i quimiocines.<sup>[89]</sup>

El procés de metàstasi s'inicia en el punt en el que el tumor principal ja està desenvolupat, arriba al límit del teixit i envaeix la membrana. Les cèl·lules tumorals, llavors, responen a senyals contextuais i sotmetent-se a una transició epiteliomesènquima canvia les seves característiques per adquirir motilitat cel·lular i capacitat invasiva (cèl·lules violetes en la Figura 1.14).<sup>[90]</sup> Aquestes cèl·lules s'anomenen cèl·lules de metàstasi, que són capaces d'entrar dins el torrent sanguini bé directament o via el sistema limfàtic. Un cop han entrat dins el sistema circulatori, es traslladen a través del cos fins que són capturades i introduïdes dins el microentorn del nou teixit o òrgan. En aquest punt les cèl·lules de metàstasi poden romandre latents o començar a desenvolupar un

nou tumor amb la conseqüent angiogènesi que en permetrà la supervivència i desenvolupament.<sup>[90]</sup>

En aquest procés, doncs, són vitals els processos de migració i angiogènesi. Com s'ha indicat en l'apartat 1.2.2, la unió del receptor de quimiocina CXCR4 amb el seu lligand natural CXCL12 és el mecanisme utilitzat per la migració cel·lular i, a més, el desencadenant de l'angiogènesi dels nous tumors, per tant, novament el receptor CXCR4 és una diana potencial pel tractament d'aquesta malaltia.<sup>[89,91]</sup>



**Figura 1.14.** Esquema del procés de metàstasi. En el quadre es mostren els òrgans on generalment es concentren els casos de metàstasi; pulmó, medulla òssia i cervell.<sup>[90]</sup>

La major part de les teràpies actuals contra el càncer es focalitzen en l'atac al tumor principal, però la majoria dels pacients que moren de càncer (>90%) ho fan a causa de la metàstasi. Tot i això, actualment no hi ha cap fàrmac aprovat pel tractament del procés de metàstasi.<sup>[91]</sup>

### 1.2.5.3- El paper del receptor CXCR4

Degut a la gran varietat de malalties associades al terme càncer, cada tipus diferent de càncer expressa diferents quimiocines i receptors de quimiocina vitals pel seu desenvolupament, però el receptor CXCR4 és l'únic present en la gran majoria dels tipus de càncer. L'any 2004 ja s'havien relacionat les cèl·lules tumorals d'almenys 23 tipus diferents de càncer amb l'expressió de CXCR4,<sup>[18]</sup> com el càncer de mama, pulmó, ovari,<sup>[92]</sup> pàncrees,<sup>[95]</sup> pròstata o leucèmia.<sup>[89,93]</sup>

Alguns estudis suggereixen el vincle entre una expressió alta del lligand CXCL12 i un avenç més accelerat de la malaltia.<sup>[95-98]</sup> Aquest fet s'explica ja que CXCR4 funciona com a factor migratori per cèl·lules canceroses concretes de metàstasi a òrgans que segreguin CXCL12. En el microentorn tumoral, la unió CXCR4/CXCL12 propicia la supervivència i creixement de les cèl·lules canceroses i participa en l'angiogènesi del tumor (generació de nous capil·lars sanguinis), mantenint-lo irrigat i amb capacitat de reparar el seu teixit si és danyat,<sup>[18,35,89]</sup> per

això, els càncers que tenen expressat aquest receptor estan agressivament metastatitzats en òrgans secundaris on l'expressió de CXCL12 es troba sobreexpressat.<sup>[99]</sup>

CXCL12 promou el creixement tumoral directament a través de la seva unió amb el receptor CXCR4 tal com s'ha indicat, però, a més, indirectament, ja que capta cèl·lules endotelials progenitores que són les causants de la neoangiogènesi.<sup>[89]</sup> La segregació de la quimiocina CXCL12 es veu augmentada per diferents fronts al voltant del tumor: per les cèl·lules de l'estroma, els fibroblasts associats al carcinoma (CAF) i per la segregació de la subunitat alfa del factor 1 induïble per hipòxia (HIF-1A).<sup>[93]</sup> Aquesta proteïna es segrega en les cèl·lules tumorals que creixen en condicions baixes d'oxigen i, a part de segregar CXCL12, potencia l'expressió de CXCR4 (fet que afavoreix l'angiogènesi) i permet a les cèl·lules neoplàstiques emergir d'àrees amb alt nivell d'hipòxia.<sup>[93]</sup>

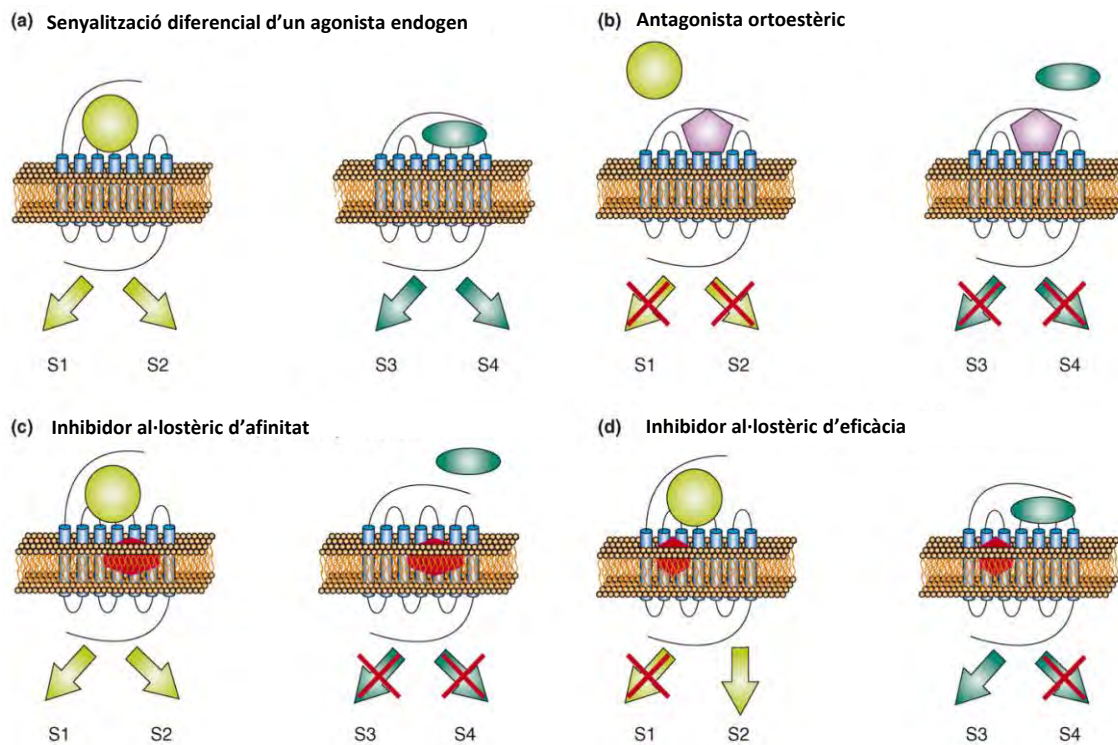
S'ha comprovat que la injecció de fàrmacs inhibidors de CXCR4, com l'AMD3100 o el pèptid T22<sup>[100]</sup>, inicialment sintetitzats contra el VIH, directament a tumors que expressen el receptor, com en el càncer de pulmó, pròstata o ovari, en redueixen dràsticament la metastasi. La supervivència del tumor principal, però, en la major part dels casos no es veu afectada, tot i que en alguns casos sí que s'ha aconseguit reduir-ne la mida.<sup>[35]</sup> Així doncs, tot i no tractar-se d'una cura definitiva de la malaltia, el fet d'inhibir el receptor CXCR4 facilita el tractament posterior amb quimioteràpia. Actualment s'estan aplicant inhibidors de CXCR4 als tractaments anticàncer per comprovar si un conjunt multifàrmac resulta realment efectiu.<sup>[13]</sup>

La inhibició de CXCR4 persegueix<sup>[13]</sup>:

- Interrompre l'adhesió de cèl·lules tumorals a l'estroma (xarxa de teixit connectiu que dona suport a un teixit o òrgan) que els hi facilita la supervivència i resistència a fàrmacs.
- Mobilitzar les cèl·lules tumorals presents a teixits inaccessibles, com la medul·la òssia, i fer-los susceptibles als tractaments de quimioteràpia.
- Bloquejar la migració cel·lular i, per tant, el mecanisme de metastasi.
- Bloquejar la comunicació entre cèl·lules veïnes que ajuda al creixement i supervivència del tumor principal.
- Bloquejar l'angiogènesi en els nous tumors propiciada per la unió CXCR4/CXCL12.

## 1.2.6-Tipus d'inhibició

Es coneixen diferents tipus d'inhibició dels receptors de quimiocina per molècules petites (Figura 1.15).



**Figura 1.15.** Diferents tipus d'inhibició dels receptors de quimiocina. Figura adaptada de [6].

Tal com es mostra en la Figura 1.15, els diferents tipus d'inhibidor que es poden trobar són<sup>[6]</sup>:

- Agonista endogen (a): Caracteritzats per una afinitat selectiva per un perfil d'interacció amb el receptor específic i dinàmic. Indueix o estableix diferents conformacions del receptor, la qual cosa comportarà el desencadenament de diverses rutes metabòliques. Els lligands naturals dels receptors actuen d'aquesta forma.

- Antagonista ortoestèric (b): Lligands que s'uneixen en el mateix lloc d'unió en el receptor que l'agonista endogen (lloc d'unió o lloc ortoestèric), per tant, competeix amb ell per ocupar i bloquejar aquesta posició. Amb aquest bloqueig s'anul·la qualsevol ruta metabòlica que se'n derivi.

Els inhibidors al·lostèrics com els representats en c) i d) són lligands que ocupen el seu propi lloc en el receptor (lloc al·lostèric) no bloquejant el principal lloc d'unió de l'agonista endogen. Aquests inhibidors, però, poden afectar i alterar igualment l'afinitat del receptor amb l'agonista endogen.

- Inhibidors al·lostèrics d'afinitat del receptor (c): Indirectament modulen la capacitat d'unió de l'agonista endogen en el lloc d'unió principal. Pot presentar selectivitat.

- Inhibidors al·lostèrics d'eficàcia del receptor (d): No eviten la unió entre el receptor i l'agonista endogen, però selectivament estableixen una conformació específica del receptor, bloquejant algunes de les vies metabòliques que se'n deriven.

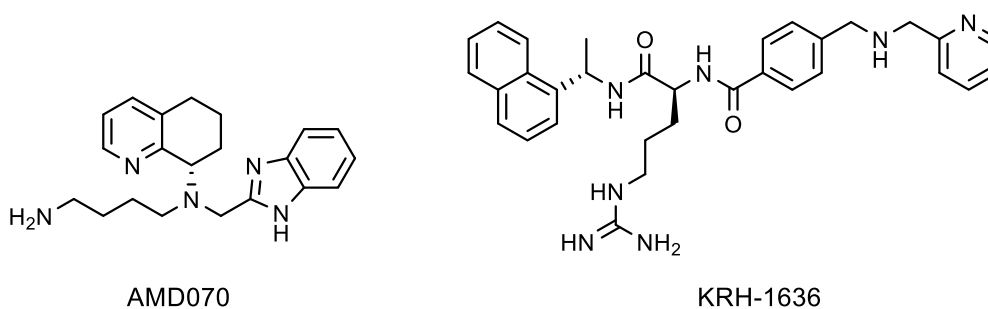
## 1.3- Estat actual

### 1.3.1- Inhibidors de CXCR4

Fins als anys 90, els inhibidors de CXCR4 es centraven en el tractament del virus del VIH-1, des del descobriment del paper d'aquest receptor en l'etapa d'unió del virus del VIH a la cèl·lula hoste. En descobrir-se la funció que CXCR4 tenia en altres processos desencadenants o amb efecte propiciant de malalties, es va començar a investigar-ne les altres possibles aplicacions i la seva disponibilitat com a diana.<sup>[13]</sup>

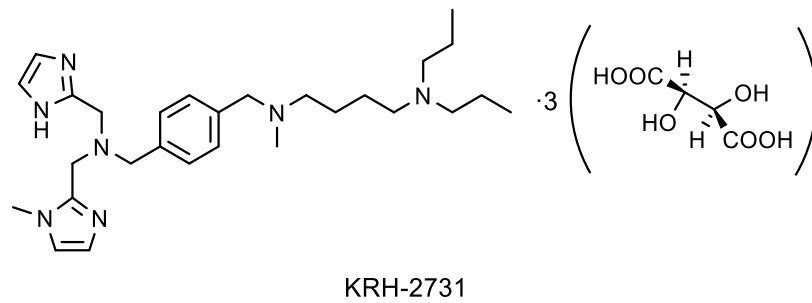
Es distingeixen 4 tipus d'antagonistes i agonistes de CXCR4:

-Antagonistes no peptídics de CXCR4: Molècules petites que actuen com a antagonistes, bloquejant la unió entre el receptor amb el seu lligand natural CXCL12. El biciclam AMD3100 (conegut com a Plerixafor, Mozobil, Figura 1.22) n'és un bon exemple: el millor inhibidor de CXCR4 d'una sèrie de compostos sintetitzats als inicis dels anys 90 (Apartat 1.3.2). Així com l'AMD070<sup>[101,102]</sup> i el KRH-1636<sup>[103]</sup>, ambdós en procés de fase clínica (Figura 1.16).<sup>[13,104]</sup>



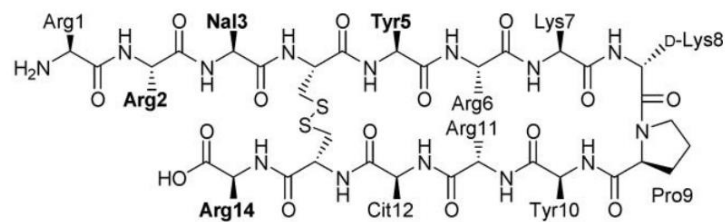
**Figura 1.16.** Estructures de l'AMD070 i KRH-1636.

Actualment s'està treballant en l'obtenció de derivats d'aquest tipus de productes per aconseguir un compost amb bona activitat d'inhibició i baixa toxicitat. El compost KRH-2731 (Figura 1.17) n'és un bon exemple, un compost polinitrogenat considerat molècula petita que resulta 10 vegades més potent que l'AMD070.<sup>[106,108]</sup> Tot i aconseguir millorar l'activitat d'alguns dels compostos existents, però, es segueix treballant en tots els fronts per aconseguir trobar el compost que reuneixi tots els requisits per a poder esdevenir un fàrmac efectiu.



**Figura 1.17.** Estructura del compost KRH-2731.

-Antagonistes peptídics de CXCR4: Pèptids amb la capacitat d'inhibir el receptor i evitar la seva unió amb CXCL12 tal com el T140 i els seus derivats. Aquesta sèrie d'inhibidors peptídics van ser descoberts mentre es buscava un pèptid natural amb activitat anti-VIH.<sup>[13]</sup> El pèptid T140 (Figura 1.18) és el pèptid amb millor activitat inhibidora de CXCR4, actuant com a agonista invers, però va resultar molt poc estable en dissolució, per tant es va utilitzar com a cap de sèrie i es va modificar per augmentar aquesta estabilitat. D'aquí en van sorgir tota una sèrie de derivats peptídics inhibidors de CXCR4 que actualment es troben en fase clínica.<sup>[13]</sup>

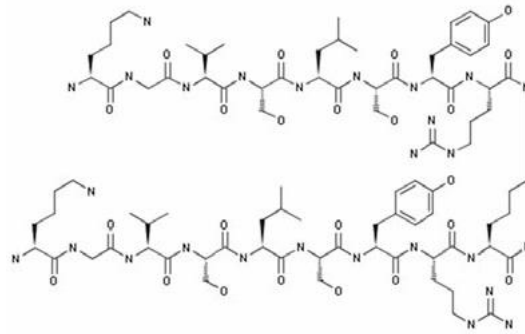


**Figura 1.18.** Estructura del pèptid T140. Imatge de [107].

-Anticossos de CXCR4. Hi ha estudis en els que es demostra una inhibició significativa de l'entrada del VIH i de la migració de cèl·lules tumorals utilitzant l'anticòs 12G5 de CXCR4 per neutralitzar la seva interacció amb CXCL12.<sup>[105]</sup> Les teràpies d'anticossos són altament específiques, a més, l'expressió diferenciada d'antígens entre cèl·lules sanes i cèl·lules tumorals la fan una bona teràpia contra el càncer.<sup>[13]</sup>

-Agonistes i antagonistes modificats de CXCL12. Com els pèptids CTCE-9908 o CTCE-0214, ambdós aprovats per la FDA pel tractament d'algun tipus de càncer.<sup>[18]</sup>

El pèptid CTCE-9908 (Figura 1.19), una variant del lligand CXCL12 per l'extrem N-terminal, s'ha utilitzat per comprovar que bloquejant el receptor CXCR4 es redueix considerablement la metàstasi en 8 tipus diferents de càncer en models de murí.<sup>[35]</sup> A més de presentar una reducció considerable del tumor principal en alguns casos.<sup>[35]</sup> Per això, actualment és un dels inhibidors de CXCR4 capdavanters que es troba en fases clíniques I i II, tot i que està demostrant un poder anticancerigen força moderat.<sup>[109]</sup>



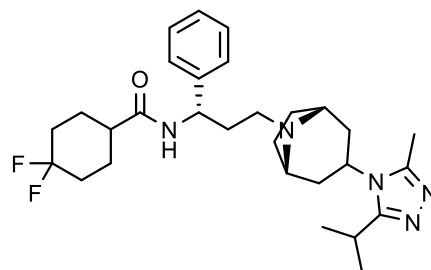
CTCE-9908

**Figura 1.19.** Estructura del pèptid CTCE-9908, inhibidor de CXCR4. Actualment en fase II/III. Imatge de [109].

Malauradament, la major part dels compostos dissenyats per inhibir CXCR4 presenten poca selectivitat, creant-se inhibicions creuades entre receptors.<sup>[6]</sup> Per aquest motiu, la major part dels fàrmacs que estan sent investigats com a inhibidors d'entrada del VIH, per exemple, no s'estan centrant tant en CXCR4 (exceptuant els anteriorment mencionats, per exemple) com en les altres dianes potencials del pas d'unió del virus amb la cèl·lula hoste, com serien el coreceptor CCR5, la proteïna CD4 o la proteïna vírica gp120.<sup>[104]</sup>

En blocar el receptor CXCR4 es poden generar problemes hematopoètics, vasculars o cardíacs.<sup>[43]</sup> El problema de combinar AMD3100 amb quimioteràpia és que el fàrmac treu les cèl·lules mare de la medul·la òssia (la finalitat d'utilitzar-lo és per treure les cèl·lules tumorals d'aquest entorn) i les fa susceptibles a ser atacades per agents citotòxics. Normalment en quedarien protegides.<sup>[43]</sup>

El Maraviroc (Figura 1.20) n'és un exemple, una molècula petita, polinitrogenada, amb l'objectiu d'inhibir l'entrada del VIH a la cèl·lula hoste, però centrat en inhibir el coreceptor CCR5. El problema és que tan sols és capaç de frenar la infecció del VIH-1 amb tropisme R5, per tant, tot i estar aprovat pel tractament del VIH (Celsenti), cal combinar-lo amb altres fàrmacs antiretrovirals i utilitzar-lo sols en adults que presentin aquesta soca concreta.<sup>[6]</sup> A més, la funció de CCR5 no és completament coneguda, la qual cosa pot comportar greus efectes secundaris al llarg del temps.



Maraviroc

**Figura 1.20.** Estructura del Maraviroc.



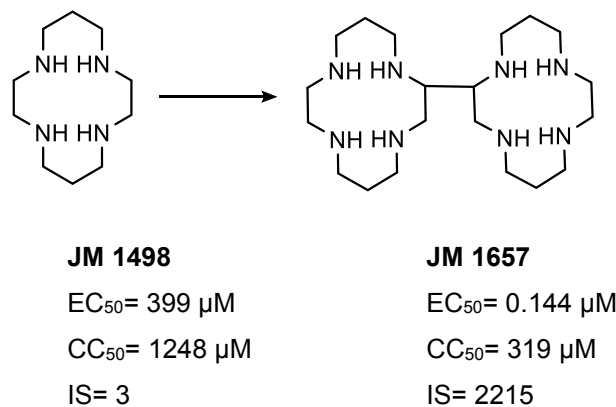
Per avaluar si una molècula presenta activitat anti-VIH, es parla de tres paràmetres principalment:

- $EC_{50}$ : concentració efectiva 50, o sigui, la quantitat necessària per inhibir el 50% de la mort cel·lular a causa del VIH o la quantitat necessària per provocar el 50% de la mort cel·lular en cèl·lules tumorals.
- $CC_{50}$ : concentració citotòxica 50, o sigui, la quantitat necessària per produir la mort del 50% de les cèl·lules degut a la toxicitat del compost.
- IS (índex de selectivitat): el quocient de  $CC_{50}$  entre  $EC_{50}$ .

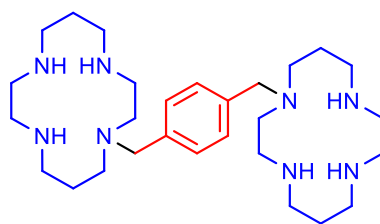
### 1.3.2- Compostos ciclàmics

Els estudis de compostos inhibidors de transcriptasa inversa o inhibidors de la proteasa van quedar en segon lloc a nivell d'investigació mundial en el moment en què es van descobrir els compostos ciclàmics i la seva capacitat per inhibir l'etapa d'entrada del virus a la cèl·lula hoste.

A Johnson Matthey, l'any 1990, s'estava sintetitzant el ciclám JM1498 (1,4,8,11-tetraazaciclotetradecà) a gran escala quan es va obtenir com a impuresa el JM1657, amb dos macrocicles com el JM1498 units per un enllaç C-C. Es va aïllar i es van obtenir resultats d'activitat sorprenentment millors que el seu predecessor (Figura 1.21).<sup>[110]</sup> Aquesta millora de resultats es va atribuir al enllaç C-C que s'havia format, per tant, el mateix grup de recerca es va dedicar a sintetitzar diferents compostos ciclàmics amb diferents espaiadors per veure'n l'efecte. Això els va portar al descobriment de la molècula que, fins al moment, ha donat millors valors d'activitat enfront el VIH, l'anomenat AMD3100 (Figura 1.22), on l'espaiador és una cadena *p*-fenilbismetilènica.<sup>[111]</sup>



**Figura 1.21.** Evolució de la investigació amb el JM 1498 i JM 1657 amb els seus valors d'activitat corresponents. (avaluats en cèl·lules MT-4 infectades per VIH-1 (IIIb)).



**AMD3100**

**Figura 1.22.** Estructura de la molècula AMD3100 amb l'espaiador marcat en vermell i els ciclams en blau; amb uns valors de  $EC_{50}$ = 1-10nM i  $CC_{50}$ >500 $\mu$ M, per tant una IS aproximada de 100000. (valors avaluats en cèl·lules MT-4 infectades per VIH-1 (IIIb)).

L'AMD3100, altrament anomenat biciclám (Figura 1.22), va resultar ser cardiotòxic i amb poca biodisponibilitat, inutilitzant-lo com a fàrmac contra el VIH, tot i que la seva capacitat per mobilitzar les cèl·lules mare hematopoètiques va fer que la FDA l'aprovés l'any 2008 com a fàrmac (Plerixafor, Mozobil) contra leucèmia i en pacients amb limfomes no-Hodgkin en combinació amb el *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF). Tot i els impediments que van descartar la molècula com a agent anti-VIH, es va poder treure una sèrie de característiques d'ella que permetessin millorar les molècules que s'estaven sintetitzant.<sup>[112]</sup>

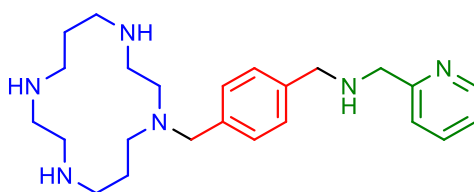
- Cal que hi hagi dos macrocicles, però no és necessari que siguin iguals.
- L'espaiador és important, cal que hi sigui present, i confereix part de l'activitat a la molècula. A part, s'ha comprovat que el fet que el espaiador sigui un anell aromàtic és vital per oferir uns resultats d'activitat satisfactoris.<sup>[111,112]</sup>
- Allargar molt el nombre de baules que uneixen l'espaiador amb els macrocicles en fa disminuir l'activitat.
- Els grups NH dels macrocicles poden conferir càrrega a la molècula, clau per a la interacció amb el receptor CXCR4.
- L'elevada basicitat que confereixen els múltiples grups NH dels ciclams és la causant de la cardiotoxicitat de la molècula.<sup>[112]</sup>

Tot i aquests problemes, l'AMD3100 continua sent avui en dia l'inhibidor de CXCR4 més investigat i el cap de sèrie de la major part de recerques centrades en les variacions de ciclams per a aquest propòsit. La seva capacitat per mobilitzar les cèl·lules mare hematopoètiques en la medul·la espinal provoca que estigui sent utilitzat com a fàrmac per mobilitzar les cèl·lules mare sanguínies perifèriques en casos de trasplantament de medul·la i es troba en fase clínica pel tractament de la metàstasi en diferents tipus de càncer.<sup>[6,113,114]</sup>

A més, es va comprovar que el Plerixafor resultava ser un agonista al·lostèric del receptor CXCR7, fet que el feia un fàrmac encara més interessant en el camp del tractament de diferents tipus de càncer.<sup>[115]</sup>

### 1.3.3- Monociclams

Amb l'objectiu de reduir la cardiotoxicitat i augmentar la biodisponibilitat del biciclams, es va pensar a substituir un dels ciclams per un grup polinitrogenat més petit i amb el menor nombre de grups NH presents en ell. Així es van aconseguir molècules com l'AMD3465 (Figura 1.23) amb activitat anti-VIH i que presentava millores respecte a l'AMD3100 enfront la toxicitat i la biodisponibilitat.<sup>[112]</sup>



AMD3465

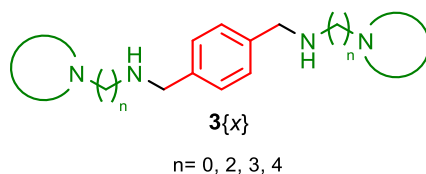
**Figura 1.23.** Estructura de la molècula AMD3465 amb el nou grup polinitrogenat marcat en verd; amb uns valors d'activitat de  $CC_{50}$ :  $>300 \mu\text{M}$  i  $EC_{50}$ : 12.3 nM (valors avaluats en cèl·lules MT-4 infectades per VIH-1 (IIIb)).<sup>[112]</sup>

## 1.4- El Grup d'Enginyeria Molecular (GEM) i els inhibidors de CXCR4

Al Grup d'Enginyeria Molecular (GEM) d'IQS es treballa des de l'any 2003 en un programa d'investigació sobre disseny, síntesi i avaluació de l'activitat anti-VIH de nous compostos. Aquest recorregut s'ha realitzat en col·laboració amb el Laboratori de Retrovirologia de la Fundació IrsiCaixa a l'Hospital Germans Trias i Pujol, el qual realitza l'avaluació d'activitat anti-VIH de les molècules sintetitzades. Aquest programa ha estat finançat en part per la Marató de TV3 (projecte 020930), pel *Ministerio de Educación y Ciencia* (projecte SAF-2007-63622-C02-01) i, més recentment, pel *Ministerio de Economía y Competitividad* (projecte SAF-2010-C21617-C02-02).

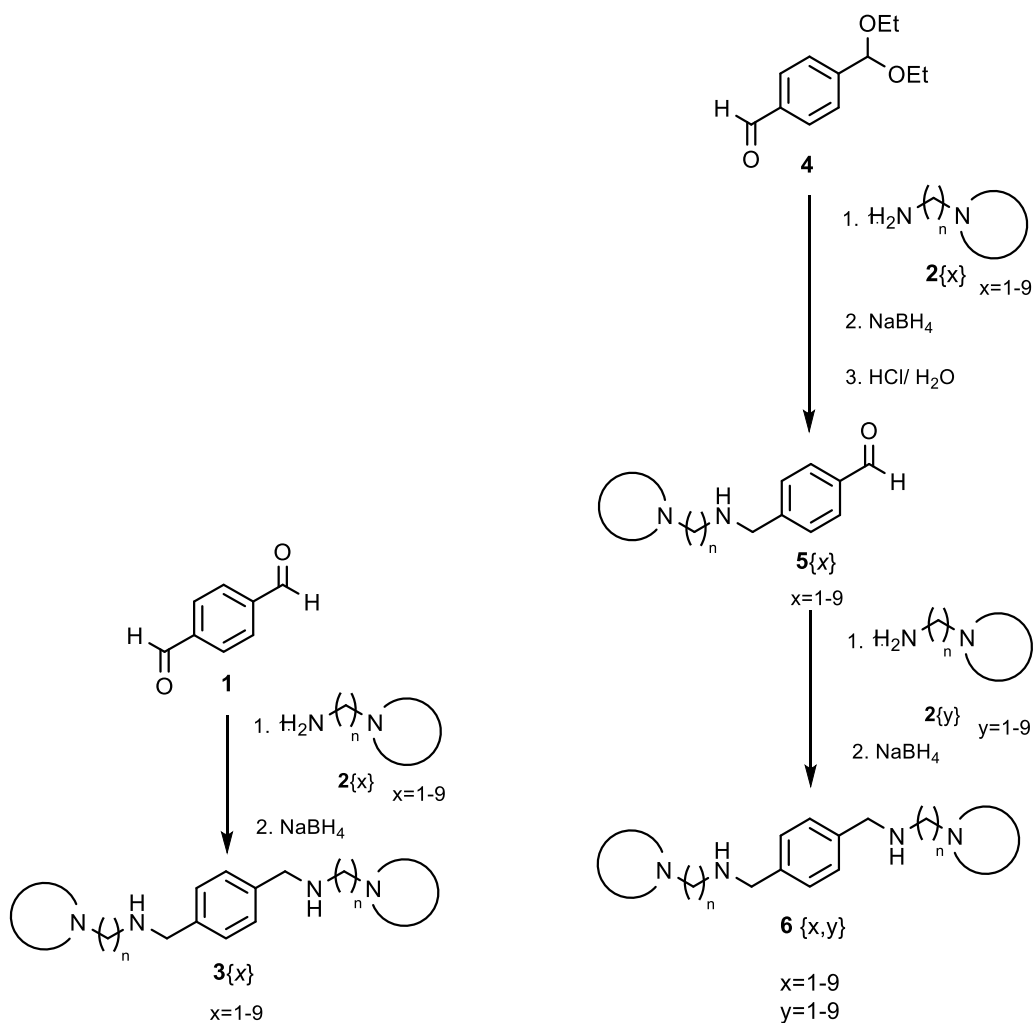
Veient els bons resultats obtinguts amb els monociclams, es va pensar en partir de l'espaiador *p*-fenilbismetilènic i substituir els dos ciclams per estructures polinitrogenades, semblants a les que havien donat bons resultats a altres grups de recerca.

Un d'aquests grups substituents amb el que es va pensar van ser amines que en el seu conjunt, un cop unides a l'espaiador, imitessin l'estructura dels ciclams de la molècula de partida. Es va crear una quimioteca combinatòria de forma que les amines escollides presentessin una distància entre àtoms de nitrogen (*n*) entre zero i tres baules, fet que els faria imitar la distància a la que es trobarien en un ciclams. Posteriorment es va estendre l'estudi a quatre baules (Figura 1.24).



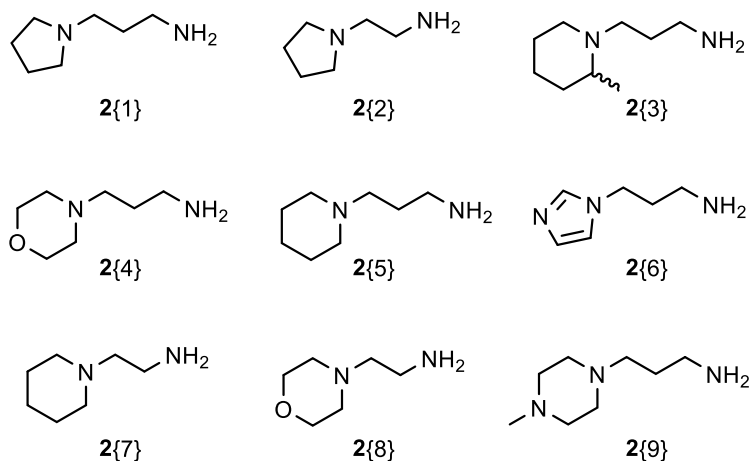
**Figura 1.24.** Estructura general dels compostos polinitrogenats que es volien sintetitzar en el GEM.

S. Pettersson, en la seva tesi doctoral,<sup>[16]</sup> va sintetitzar una quimioteca de compostos polinitrogenats inhibidors del coreceptor d'entrada CXCR4 per reacció del tereftaldehid (**1**) amb diferents amines primàries **2{x}** (Figura 1.25) mitjançant aminació reductora. Alhora, també va sintetitzar estructures del mateix tipus però no simètriques a partir del 4-(dietoximetil)benzaldehid (**4**) fent-lo reaccionar igualment amb amines primàries **2{x}** i una següent desprotecció de l'acetal per obtenir un intermedi aminobenzaldehid **5** que, finalment, es feia reaccionar de nou per aminació reductora amb una amina primària **2{y}** diferent a la ja usada en el primer pas (Figura 1.25).



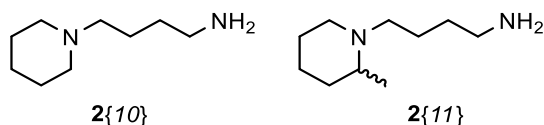
**Figura 1.25.** Ruta sintètica d'obtenció de poliamines simètriques **3{x}** i no simètriques **6{x,y}** sent n = 0,2,3.

Algunes de les amines primàries  $2\{x\}$  utilitzades en aquell estudi van ser les representades en la Figura 1.26.



**Figura 1.26.** Algunes de les amines primàries  $2\{x\}$  utilitzades en el GEM.<sup>[116,117]</sup>

Posteriorment, L.Ros va ampliar la distància entre els àtoms de nitrogen de les amines a quatre baules utilitzant les amines  $2\{10\}$  i  $2\{11\}$  (Figura 1.27).<sup>[118]</sup>

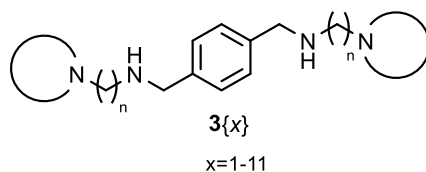


**Figura 1.27.** Amines amb cadena tetrametilènica utilitzades en la tesi de L. Ros.<sup>[118]</sup>

Amb la síntesi d'aquesta quimioteca s'arribà a un seguit de conclusions:

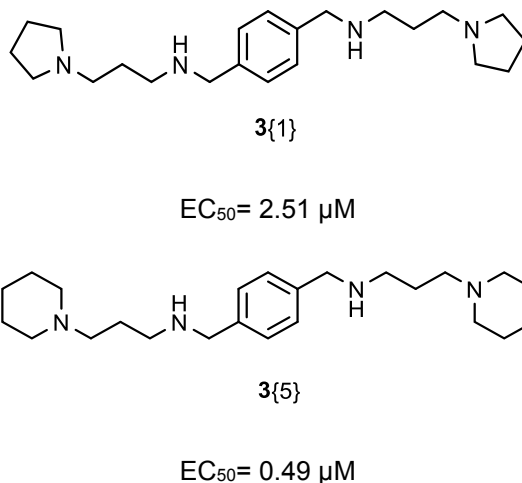
Els compostos sintetitzats amb amines amb una cadena trismetilènica són les més actives enfront el VIH. Es pot corroborar en l'anàlisi de resultats de la Taula 1.1 <sup>[116,118]</sup> en el cas de les molècules  $3\{1\}$  i  $3\{2\}$  on la molècula amb la cadena trismetilènica aconseguix una millora dels valors d'activitat anti-VIH respecte la  $3\{2\}$ . D'altra banda, la molècula amb cadena tetrametilènica  $3\{10\}$  millora el resultat de la  $3\{7\}$  amb la cadena etilènica, però segueix sent més baix que el valor  $EC_{50}$  de la  $3\{5\}$  amb la cadena trismetilènica.

**Taula 1.1.** Resultats d'activitat anti-VIH avaluats per a les molècules **3{x}**.<sup>[116,118]</sup> Els resultats es presenten en unitats de  $\mu\text{M}$  per tal de ser comparables.



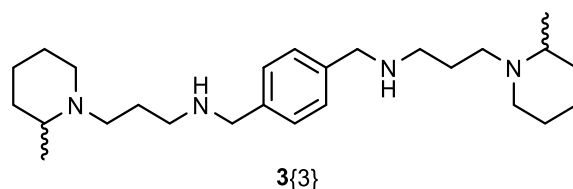
Amina	Molècula	n	EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	CC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
<b>2{2}</b>	<b>3{2}</b>	2	>75.64	>75.64
<b>2{1}</b>	<b>3{1}</b>	3	31.51	>69.72
<b>2{7}</b>	<b>3{7}</b>	2	>32.63	32.63
<b>2{5}</b>	<b>3{5}</b>	3	0.36	>64.67
<b>2{10}</b>	<b>3{10}</b>	4	0.69	>60.29

La molècula presenta més activitat anti-VIH si l'heterocicle de l'amina té més flexibilitat conformacional. Això s'observa clarament en comparar les activitats de les molècules **3{1}** i **3{5}** <sup>[116]</sup> (Figura 1.28) com a exemple, on la molècula amb més flexibilitat, la **3{5}**, millora el resultat d'activitat quasi un ordre de magnitud respecte la **3{1}**.



**Figura 1.28.** Molècules **3{1}** i **3{5}** amb els seus corresponents valors de EC<sub>50</sub> en  $\mu\text{M}$  sintetitzades per S. Pettersson.<sup>[116]</sup>

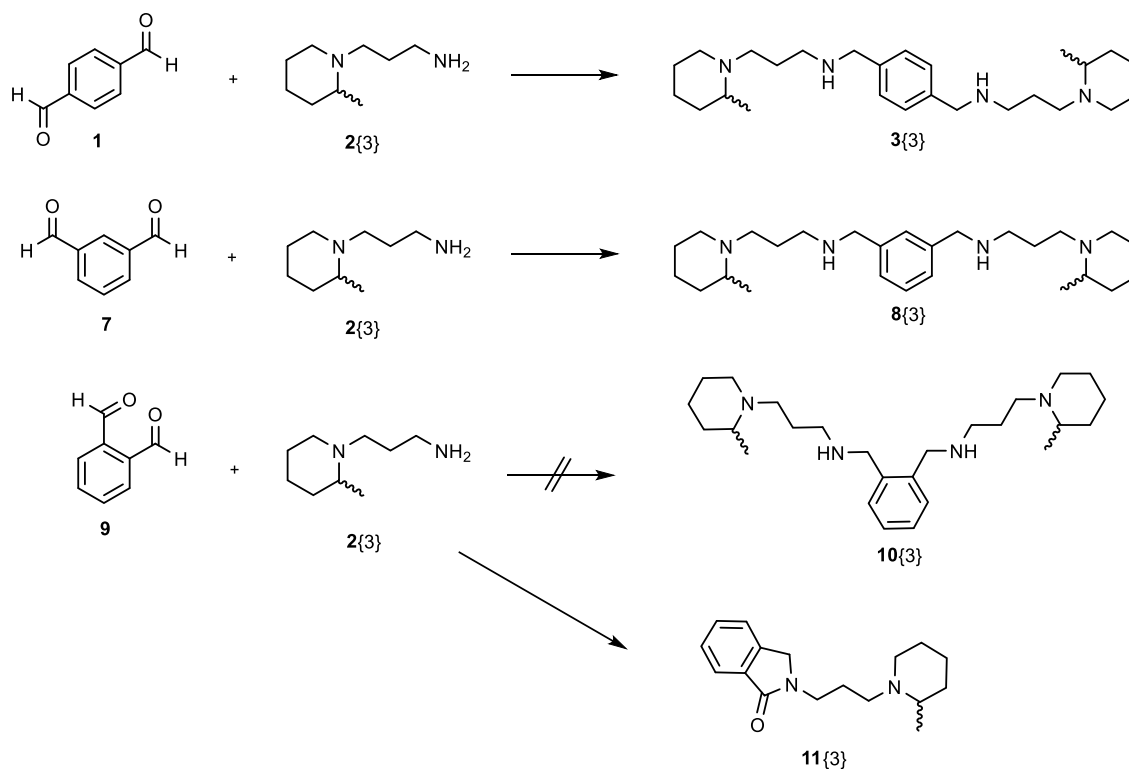
D'altra banda, es va trobar que l'amina **2{x}** que donava a la molècula la major activitat anti-VIH va ser la 3-aminopropil-N-pipecolina (**2{3}**) (Figura 1.29).



$$EC_{50} = 0.12 \mu\text{M} (0.05 \mu\text{g/ml})$$

**Figura 1.29.** Molècula **3{3}** amb el seu valor de  $EC_{50}$  corresponent, sintetitzada per S. Pettersson.<sup>[116]</sup>

Finalment es va comprovar experimentalment que tenir els substituents en posició *para* confereix millor activitat que si aquests es troben en posició *meta*. La substitució en *orto* no és possible realitzar-la, degut a la obtenció de la desoxoftalimida **11{x}** en comptes del producte desitjat (Figura 1.30). En la Taula 1.2 es poden comparar els valors d'activitat.



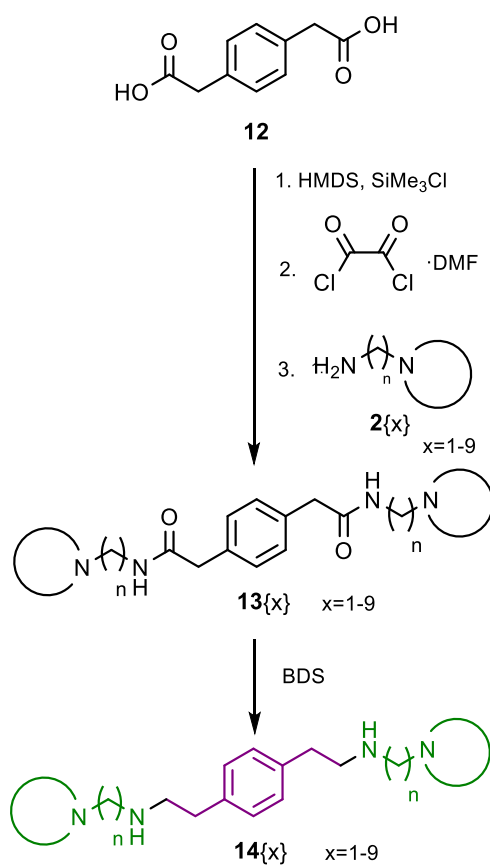
**Figura 1.30.** Substitucions en *orto* **10{x}**, *meta* **8{x}** i *para* **3{x}** de l'espaiador en l'anell aromàtic. Molècules sintetitzades per S. Pettersson.<sup>[116]</sup>

**Taula 1.2.** Resultats d'activitat anti-VIH per les molècules **3{3}** i **8{3}**<sup>[116]</sup> es pot corroborar que la substitució *para* és més activa enfront el VIH que la substitució *meta*. En aquest cas els valors de EC<sub>50</sub> són comparables en µg/ml ja que els diferents compostos tenen el mateix pes molecular.

Molècula	EC <sub>50</sub> (µg/ml)
<b>3{3}</b>	0.05
<b>8{3}</b>	0.07

Posteriorment, R. Puig de la Bellacasa en la seva tesi doctoral,<sup>[117]</sup> va continuar la recerca començada per S. Pettersson i va decidir estudiar la influència que tenia l'espaiador entre l'anell aromàtic i les amines sobre l'activitat anti-VIH de la molècula.

Com a producte de partida es va partir de l'àcid 1,4-fenilendiàcètic (**12**) en comptes del tereftaldehid (**1**) que es amb el que s'havien realitzat les síntesis anteriors. Es va formar el clorur d'àcid d'aquest diàcid **12** per a fer-lo més reactiu. Llavors es va fer reaccionar amb la sèrie d'amines **2{x}** per a obtenir les amides **13{x}**, que tan sols precisaven d'una reducció amb el complex borà-sulfur de dimetil (BDS) per a rendir les tetraamines finals **14{x}** (Figura 1.31).

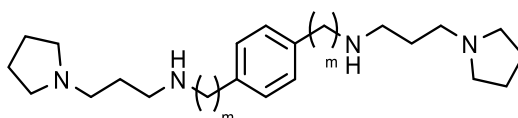


**Figura 1.31.** Ruta sintètica per la obtenció de poliamines amb separació de dues baules entre l'anell aromàtic central i l'amina dissenyada i utilitzada per R. Puig de la Bellacasa.<sup>[117,119]</sup>



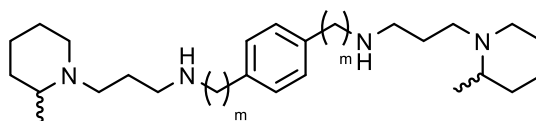
Així es va obtenir una nova quimioteca de compostos polinitrogenats **14{x}** aquesta vegada amb una separació de dues baules a l'espaiador entre l'anell aromàtic central i les amines laterals. Comparant els resultats d'activitat anti-VIH d'aquestes noves molècules amb les seves equivalents d'una sola baula obtingudes per S. Pettersson es va concloure que amb aquest nou espaiador els resultats milloraven en un ordre de magnitud tal com es veu en les Taules 1.3 i 1.4.<sup>[116,117]</sup>

**Taula 1.3.** Comparació de resultats d'activitat anti-VIH de les molècules **3{1}** i **14{1}**.<sup>[116,117]</sup>



Molècula	m	EC <sub>50</sub> (μM)
<b>3{1}</b>	1	2.51
<b>14{1}</b>	2	0.17

**Taula 1.4.** Comparació de resultats d'activitat anti-VIH per a les molècules **3{3}** i **14{3}**.<sup>[116,117]</sup>



Molècula	m	EC <sub>50</sub> (μM)
<b>3{3}</b>	1	0.12
<b>14{3}</b>	2	0.07

L. Ros va continuar la recerca en el GEM en aquest mateix camp investigant quins efectes tindria la inclusió de grups metil en la posició benzilica de l'espaiador. Per a sintetitzar aquesta nova família de molècules es va utilitzar el 1,4-diacetilbenzè (**15a**) o el 4-acetilbenzaldehid (**15b**) com a producte de partida, depenent de si es volia introduir un metil en una o en les dues posicions i es va fer reaccionar amb les amines primàries **2{x}** que ja s'havien utilitzat anteriorment en el grup. Es va haver d'utilitzar tetraisopropòxid de titani (IV) com a catalitzador degut al fet que els grups cetona presenten menor reactivitat que els grups aldehid. Així es van obtenir les tetraamines metilades **16a{x}** i **16b{x}** (Figura 1.32).<sup>[118]</sup>

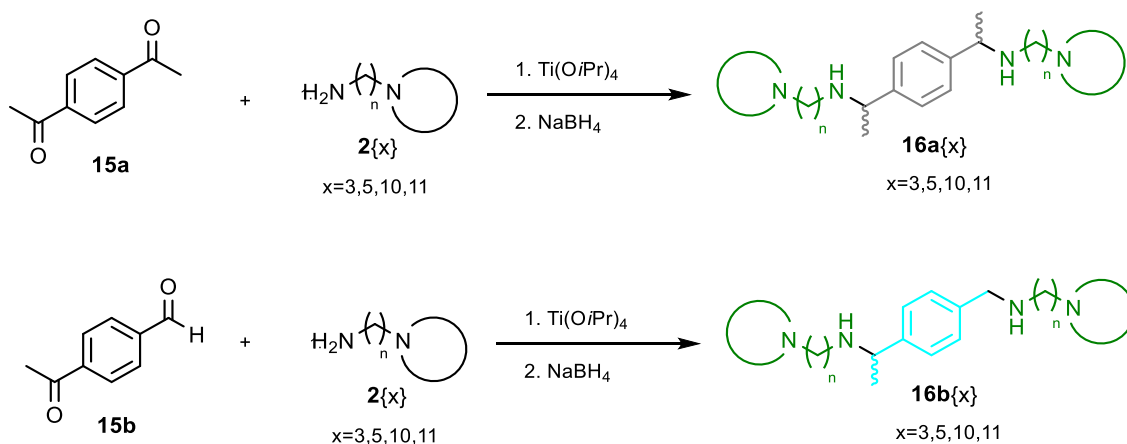
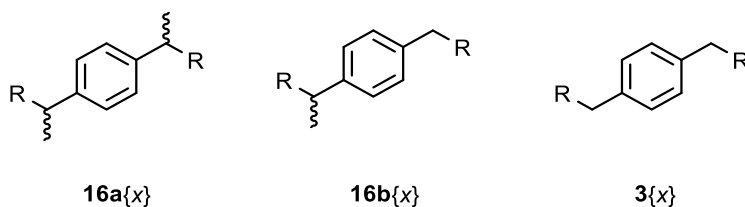


Figura 1.32. Síntesi de les poliamines metilades **16a{x}** i **16b{x}**.<sup>[118]</sup>

Amb aquesta nova quimioteca i analitzant els valors representats en la Taula 1.5, es pot comprovar com la inclusió d'un grup metil en posició benzílica a l'espaiador no afecta als resultats d'activitat antiviral, ja que es mantenen en el mateix ordre de magnitud. Però es pot veure també que la metilació simètrica dels dos costats de l'espaiador empitjora lleugerament els resultats.

Taula 1.5. Comparació de valors d'activitat entre les molècules **3{x}**, **16a{x}** i **16b{x}** per a comprovar l'efecte de metilar l'espaiador en posició benzílica.<sup>[116,117]</sup>

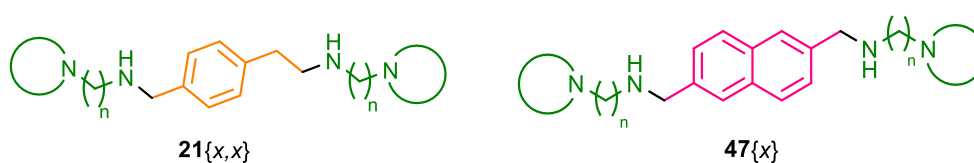


Molècula	R	EC <sub>50</sub> (µM)
<b>3{3}</b>	<b>2{3}</b>	0.12
<b>16a{3}</b>	<b>2{3}</b>	0.25
<b>16b{3}</b>	<b>2{3}</b>	0.17
<b>3{5}</b>	<b>2{5}</b>	0.42
<b>16a{5}</b>	<b>2{5}</b>	1.01
<b>16b{5}</b>	<b>2{5}</b>	0.34

Arribats a aquest punt, per seguir augmentant la varietat de quimioteques dissenyades i sintetitzades al grup hi ha dues vies possibles a seguir: Modificar de nou l'espaiador buscant noves variacions que no s'allunyin de l'anell aromàtic present en les molècules **3{x}**, **14{x}** i

**16a/b**{x} o bé escollir un espaiador ja utilitzat i buscar noves amines laterals que busquin conferir millors resultats d'inhibició de CXCR4.

S'han investigat els efectes de variar les cadenes laterals a banda i banda de l'espaiador, però el que no s'ha fet encara és comprovar l'efecte d'un espaiador no simètric, amb diferent número de baules entre l'anell aromàtic central i les amines laterals. Per això, es pensa en sintetitzar una nova sèrie de molècules no simètriques (**21**{x,x}) anàlogues a AMD3100 on l'espaiador entre l'anell aromàtic central i el grup NH de les amines tingui una i dues baules respectivament (Figura 1.33). A més, es pensa en un segon espaiador naftalènic que generi una nova família **47**{x} per comprovar l'efecte que tindrà aquest nou espaiador de cara a l'activitat antiviral de la molècula.

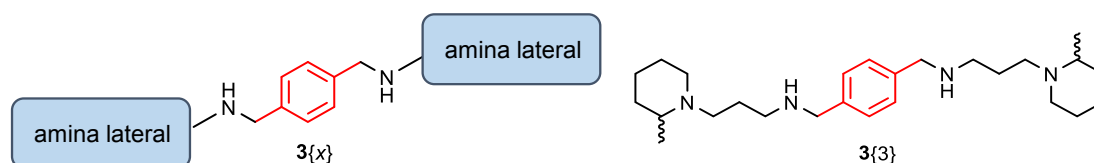


**Figura 1.33.** Estructures generals dels anàlegs d'AMD3100 que es volen sintetitzar i avaluar.

La decisió d'utilitzar aquest segon espaiador naftalènic ve del fet de buscar un nou espaiador diferent dels sintetitzats anteriorment en els que s'havien intentat una gran diversitat de modificacions al voltant de l'espaiador *p*-fenilbismetilènic de l'AMD3100. Així el nou espaiador naftalènic es distancia de lo fet anteriorment, però mantenint l'aromaticitat d'aquest i el caràcter hidrofòbic, característiques que afavoreixen a l'activitat antiviral. A més, aquest nou espaiador aporta rigidesa al nucli de la molècula, característica que cal avaluar si provoca una millora de la capacitat d'inhibició de CXCR4 o no.

De cara a buscar noves amines laterals o modificacions a una amina ja sintetitzada anteriorment al grup, es decideix partir de l'espaiador *p*-fenilbismetilènic i en concret de l'amina **3**{3} sintetitzada per S. Pettersson<sup>[116]</sup> i que resulta ser un dels compostos més actius sintetitzats al GEM (Figura 1.34). La decisió d'escollir aquest espaiador i no el de dos baules utilitzat per R. Puig de la Bellacasa<sup>[117]</sup> rau en el fet que presenta més facilitat sintètica i no precisa d'una reducció de grups amida fet que ens permetrà una major diversitat sintètica.

En el cas que un compost dels sintetitzats en el present treball sobresortís i superés els valors d'activitat de la ja mencionada **3**{3} caldria estudiar la síntesi del seu homòleg amb l'espaiador de dues baules **14**{x}.

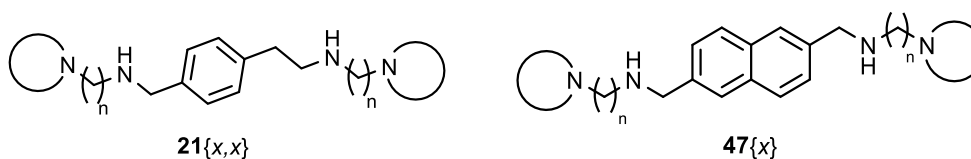


**Figura 1.34.** Espaiador *p*-fenilbimetilènic que s'usarà per sintetitzar noves tetraamines potencialment inhibidores de CXCR4. A la dreta, estructura del compost **3{3}**, producte que es prendrà com a cap de sèrie de cara a les noves modificacions per intentar-ne millorar la capacitat inhibidora.

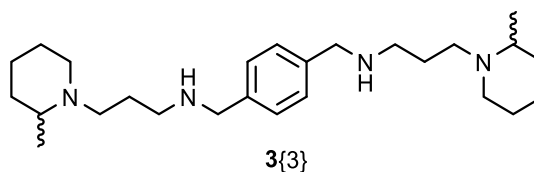
## 1.5- Objectius

Arribats a aquest punt, i amb els resultats obtinguts que s'han detallat en l'apartat 1.4 es plantegen els següents objectius pel present treball:

1. Disseny i síntesi de noves quimioteques de compostos polinitrogenats amb un espaiador no simètric d'estructura **21{x,x}** i amb un espaiador naftalènic **47{x}** potencialment inhibidors del receptor de quimiocina CXCR4.



2. Disseny i síntesi de noves estructures derivades del compost tetraamínic **3{3}** amb l'objectiu de millorar-ne la capacitat d'inhibició de CXCR4.



3. Avaluar i analitzar els resultats d'activitat anti-VIH i anticancerosa dels nous compostos sintetitzats i la seva comparació amb les molècules anàlogues sintetitzades anteriorment al GEM d'IQS.

## Bibliografia

- [1] A. Mantovani; The chemokine System: redundancy for robust outputs. *Immunol. Today* **1999**, 20, 254-257.
- [2] B. Debnath, S. Xu, F. Grande, A. Garofalo, N. Neamati; Small Molecule Inhibitors of CXCR4. *Theranostics* **2013**; 3 (1), 47-75
- [3] S.J. Allen, S.E. Crown, T.M. Handel; Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol.* **2007**; 25, 787-820.
- [4] J.G. Cyster; Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science.* **1999**, 286, 2098-2102.
- [5] A. Zlotnik, O. Yoshie; Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* **2000**, 12 (2), 121-127.
- [6] M. Allegretti, R. Bertini, C. Bizzarri, A. Beccari, A. Mantovani, M. Locati; Allosteric inhibitors of chemoattractant receptors: opportunities and pitfalls. *Trends in Pharmacological Sciences* **2008**, 29 (6), 280-286.
- [7] T.M. Handel, P.J. Domaille; Heteronuclear (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer. *Biochemistry* **1996**, 35 (21), 6569-6584.
- [8] J.W. Murphy, Y. Cho, A. Sachpatzidis, C. Fan, M.E. Hodsdon, E. Lolis; Structural and Functional Basis of CXCL12 (Stromal Cell-derived Factor-1 $\alpha$ ) Binding to Heparin. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (13), 10018-10027.
- [9] A. Mantovani; The chemokine System: redundancy for robust outputs. *Immunol. Today* **1999**, 20, 254-257.
- [10] B. Wu, E.Y.T. Chien, C.D. Mol, G. Fenalti, W. Liu, V. Katritch, R. Abagyan, A. Brooun, P. Wells, F.C. Bi, D.J. Hamel, P. Kuhn; Handel, T.M.; Cherezov, V.; and Stevens, R.C.; Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* **2010**, 330, 1066-1071.
- [11] J.H. Kehrl; Chemoattractant receptor signaling and the control of lymphocyte migration. *Immunol. Res.* **2006**, 34, 211-227.

- [12] Web Fonds National de la Recherche Luxembourg (www.fnr.lu). Data de consulta: 15-10-2015.
- [13] J.A. Burger, A. Peled; CXCR4 antagonists: targeting the microenvironment in leukemia and other cancers. *Leukemia* **2009**, 23, 43-52.
- [14] P.Maurice, M. Kamal, R. Jockers; Asymmetry of GPCR Oligomers Supports Their Functional Relevance. *Trends. Pharmacol. Sci.* **2011**, 32, 514-520.
- [15] A. Levoye, K. Balabanian, F. Baleux, F. Bachelerie, B. Lagane; CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* **2009**, 113 (24), 6085-6093.
- [16] T. Nagasawa; Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, 6, 107-116.
- [17] B. Moser, M. Wolf, A. Walz, P. Loetscher; Chemokines: múltiple levels of leukocyte migration control. *Trends. Immunol.* **2004**, 25, 75-84.
- [18] J.A. Burger, D.J. Stewart, O. Wald, A. Peled; Potential of CXCR4 antagonists for the treatment of metastatic lung càncer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2011**, 11 (4), 621-630.
- [19] T. Nagasawa, T. Nakajima, K. Tachibana, H. Lizasa, C. Bleul, O. Yoshie, K. Matsushima, N. Yoshida, T.A. Springer, T. Kishimoto; Molecular Cloning and Characterization of a Murine Pre-B-Cell Growth-Stimulating Factor/stromal Cell-Derived Factor 1 Receptor, a Murine Homolog of the Human Immunodeficiency Virus 1 Entry Coreceptor Fusin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, 93, 14726-14729.
- [20] L. Yu, J. Cecil, S.B. Peng, J. Schrementi, S. Kovacevic, D. Paul, E.W. Su, J. Wang; Identification and Expression of Novel Isoforms of Human Stromal Cell-Derived Factor 1. *Gene.* **2006**, 374, 174-179.
- [21] M. Shirozu, T. Nakano, J. Inazawa, K. Tashiro, H. Tada, T. Shinohara, T. Honjo; Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* **1995**, 28 (3), 495-500.
- [22] C.T. Veldkamp, F.C. Peterson, A.J. Pelzek, B.F. Volkman; The monomer–dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin. *Protein Sci.* **2005**, 14 (4), 1071-1081.

- [23] C.L. Salanga, T.M. Handel; Chemokine oligomerization and interactions with receptors and glycosaminoglycans: the role of structural dynamics in function. *Exp. Cell Res.* **2011**, 317 (5), 590-601.
- [24] M. Baggiolini; Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **1998**, 392 (6676), 565-568.
- [25] F. Sallusto, P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C.R. Mackay, S. Qin, A. Lanzavecchia; Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* **1998**, 28 (9), 2760-2769.
- [26] Y.R. Zou, A.H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi, D.R. Littma; Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **1998**, 393, 595-599.
- [27] M. De La Luz Sierra, F. Yang, M. Narazaki, O. Salvucci, D. Davis, R. Yarchoan, H.H. Zhang, H. Fales, G. Tosato; Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood* **2004**, 103 (7), 2452-2459.
- [28] J.A. Burger, A. Bürkle; The CXCR4 chemokine receptor in acute and chronic leukaemia: a marrow homing receptor and potential therapeutic target. *British Journal of Haematology.* **2007**, 137, 288-296.
- [29] P. Tamamis, C.A. Floudas; Elucidating a Key Component of Cancer Metastasis: CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) Binding to CXCR4. *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, 54, 1174-1188.
- [30] E.L. Elisseeva, C.M. Slupsky, M.P. Crump, I. Clark-Lewis, B.D. Sykes; NMR studies of active N-terminal peptides of stromal cell-derived factor-1. Structural basis for receptor binding. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (35), 26799-26805.
- [31] C.T. Veldkamp, C. Seibert, F.C. Peterson, N.B. De la Cruz, J.C. Haugner, H. Basnet, T.P. Sakmar, B.F. Volkman; Structural Basis of CXCR4 Sulfotyrosine Recognition by the Chemokine SDF-1/CXCL12. *Sci. Signal* **2008**, 1 (37), ra4.
- [32] M.P. Crump, J.H. Gong, P. Loetscher, K. Rajarathnam, A. Amara, F. Arenaza-Seisdedos, J.L. Virelizier, M. Baggiolini, B.D. Sykes, I. Clark-Lewis; Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *The EMBO Journal* **1997**, 16 (23), 6996-7007.

- [33] C. Jiayu, X.M. Zijun, D. Lijuan, S. Qi, Y. Lihui, P. Lan, Y. Ken, M. Ganiraju, Z. Li, et al; Dysregulated CXCR4 expression promotes lymphoma cell survival and independently predicts disease progression in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* **2015**, 6 (8), 5597-5614.
- [34] R.K. Bommakanti, E.A. Dratz, D.W. Siemsen, A.J. Jesaitis; Extensive contact between Gi2 and N-formyl peptide receptor of human neutrophils: mapping of binding sites using receptor mimetic peptides. *Biochemistry* **1995**, 34, 6720-6728
- [35] D. Wong, W. Korz; Translating an antagonist of chemokine Receptor CXCR4: From bench to bedside. *Clin Cancer Res.* **2008**, 14 (24), 7975-7980.
- [36] O.G. Blanco, M. Solanas, I. Costa, E. Escrich; El Citoesqueleto de actina: Una perspectiva desde la biología molecular del cáncer. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* **2002**, 21 (2), 115-122.
- [37] S. Okabe, S. Fukuda, Y.J. Kim, M. Niki, L.M. Pelus, K. Ohyashiki, P.P. Pandolfi, H.E. Broxmeyer; Stromal cell-derived factor 1- $\alpha$ /CXCL12-induced chemotaxis of T cells involves activation of the RasGAP-associated docking protein p62Dok-1. *Blood* **2006**, 105, 474-480.
- [38] B.A. Teicher, S.P. Fricker; CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Cancer Res.* **2010**, 16 (11), 2927-2931.
- [39] J.B. Rubin; Only in congenial soil: the microenvironment in brain tumorigenesis. *Brain Pathol.* **2009**, 19 (1), 144-149.
- [40] Z.J. Cheng, J. Zhao, Y. Sun, W. Hu, Y.L. Wu, B. Cen, G.X. Wu, G. Pei; Beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (4), 2479-2485.
- [41] K. Balabanian, A. Levoye, L. Klemm, B. Lagane, O. Hermine, J. Harriague, F. Baleux, F. Arenzana-Seisdedos, F. Bachelier; Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *J. Clin. Investigation* **2008**, 118 (3), 1074-1084.
- [42] T. Kawai, H.L. Malech; WHIM syndrome: congenital immune deficiency disease. *Curr. Opin. Hematol.* **2009**, 16 (1), 20-26.



- [43] C.C. Bleul, M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski, T.A. Springer; The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocs HIV-1 entry. *Nature* **1996**, 382, 829-833.
- [44] J.S. Smolen, J.R. Kalden, R.S. Maini; Rheumatoid Arthritis. *Springer-Verlag*. Berlin **1992**. ISBN: 978-3-642-76191-1.
- [45] C. Morimoto, P.L. Romain, D.A. Fox, P. Anderson, M. DiMaggio, H. Levine, S.F. Schlossman; Abnormalities in CD4+ T-lymphocyte subsets in inflammatory rheumatic diseases. *Am. J. Med.* **1988**, 84 (5), 817-825.
- [46] T. Nanki, K. Hayashida, H.S. El-Gabalawy, S. Suson, K. Shi, H.J. Girschick, S. Yavuz, P.E. Lipsky; Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J. Immunol.* **2000**, 165 (11), 6590-6598.
- [47] H. Tamamura, N. Fujii; The therapeutic potential of CXCR4 antagonists in the treatment of HIV infection, cancer metastasis and rheumatoid arthritis. *Expert Opin. Ther. Targets* **2005**, 9 (6), 1267-1282.
- [48] K. Balabanian, B. Lagane, J.L. Pablos, L. Laurent, T. Planchenault, O. Verola, C. Lebbe, D. Kerob, A. Dupuy, O. Hermine, J.F. Nicolas, V. Latger-Cannard, D. Bensoussan, P. Bordigoni, F. Baleux, F. Le Deist, J.L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, F. Bachelierie; WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood* **2005**, 105 (6), 2449-2457.
- [49] P.A. Hernandez, R.J. Gorlin, J.N. Lukens, S. Taniuchi, J. Bohinjec, F. Francois, M.E. Klotman, G.A. Diaz; Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat. Genet.* **2003**, 34 (1), 70-74.
- [50] L. Dotta, L. Tassone, R. Badolato; Clinical and genetic features of Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis (WHIM) syndrome. *Curr. Mol. Med.* **2011**, 11 (4), 317-325.
- [51] F. Arenaza-Seisdedos; SDF-1/CXCL12: a chemokine in the life cycle of HIV. *Front. Immunol.* **2015**, 6: 256.

- [52] E. Oberlin, A. Amara, F. Bachelier, C. Bessia, J.L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, O. Schwartz, J.M. Heard, I. Clark-Lewis, D.F. Legler, M. Loetscher, M. Baggiolini, B. Moser; The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* **1996**, 382 (6594), 833-835.
- [53] Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). UNAIDS Report on the global epidemic 2013. <http://www.unaids.org/en/>. Data de consulta: 30/03/2016.
- [54] Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). AIDS by the numbers 2015. <http://www.unaids.org/en/>. Data de consulta: 30/03/2016.
- [55] L. Montagnier; 25 Years after HIV discovery: Prospects for cure and vaccine (Nobel Lecture). *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48 (32), 5815-5826.
- [56] J.M. Coffin, S.H. Hughes, H.E. Varmus; Retroviruses. *Cold Spring Harbor Lab. Press.* New York, **1997**. ISBN: 0-87969-571-4
- [57] A.J. Solari; Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina. *Ed. Médica Panamericana.* Madrid, **2004**. ISBN: 84-7903-926-4.
- [58] S. Sierra; Kupfer, B.; Kaiser, R.; Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol.* **2005**, 34, 233-244.
- [59] S.P. Goff; Retroviridae: The retroviruses and their replication. *Fields Virology.* Lippincott Williams & Wilkins. New York. **2001**.
- [60] S.E. Ryu, P.D. Kwong, A. Truneh, T.G. Porter, J. Arthos, M. Rosenberg, X.P. Dai, N.H. Xuong, R. Axel, R.W. Sweet, W.A. Henrickson; Cristal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4. *Nature* **1990**, 348, 419-426.
- [61] E.O. Freed; HIV-1 replication. *Som. Cell Mol. Genet.* **2001**, 26, 13-33.
- [62] E.A. Berger, G. Alkhatib; HIV gp120 interactions with coreceptors: insight from studies with CCR5-based peptides. *Eur. J. Med. Res.* **2007**, 12, 403-407.
- [63] S.G. Ward, J. Bacon, J. Westwick; Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity* **1998**, 9, 1-11.
- [64] D.C. Chan, P.S. Kim; HIV entry and its inhibition. *Cell (Cambridge, Mass.)* **1998**, 93 (5), 681-684

- [65] D. Pieribone; (AIDS Community Research Initiative of America). The HIV life cycle. <http://www.thebody.com>, **2003**. Data de consulta: 13/05/2012.
- [66] G. Alkhatib, C. Combadiere, C.C. Broder, F. Yeng, P.E. Kennedy, P.M. Murphy, E.A. Berger; CC CKR5: a RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **1996**, 272, p. 1955-1958.
- [67] H. Deng, R. Liu, W. Willmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R.E. Sutton, C.M. Hill, C.B. Davis, S.C. Peiper, T.J. Schall, D.R. Littman, N.R. Landau; Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **1996**, 381, 661-666.
- [68] T. Dragic, V. Litwin, G.P. Allaway, S.R. Martin, Y. Huang, K.A. Nagashima, C. Cayanan, P.J. Maddon, R.A. Koup, J.P. Moore, W.A. Paxton; HIV-1 entry into CD4<sup>+</sup> cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **1996**, 384, 184-187.
- [69] R.A. Weiss; Retrovirus classification and cell interactions. *J. Antimicrobiol. Chemoter.* **1996**, 37 (suppl. B), 1-11.
- [70] C. Isel, E. Westhof, C. Massire, F.J. Le Grice, B. Ehresmann, C. Ehresmann, R. Marquet; Structural basis for the specificity of the initiation of HIV-1 reverse transcription. *Embo. J.* **1999**, 18 (4), 1038-1048.
- [71] J.J. Sierra García de Quevedo; Taxonomía y virus de la inmunodeficiencia humana. *Rev. Mex. Patol. Clin.* **2004**, 51, 37-41.
- [72] Y. Jenkins, M. McEntee, K. Weis, W.C. Greene; Characterization of HIV-1 Vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *J. Cell Biol.* **1998**, 143 (4), 875-885.
- [73] N.E. Kohl, E.A. Emini, A. Schleif, J. Davis, J.C. Heimbach, R.A.F. Dixon, E.M. Scolnick, I.S. Sigal; Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, 85 (13), 4686-4690.
- [74] A.B. Williams; New horizons: antiretroviral therapy in 1997. *J. Assoc. Nurses AIDS Care* **1997**, 8 (4), 26-38.
- [75] H. McManus, J.F. Hoy, I. Woolley, M.A. Boyd, M.D. Kelly, B. Mulhall, N.J. Roth, K. Petoumenos, M.G. Law, the Australian HIV Observational Database; Recent trends in early stage response to combination antiretroviral therapy in Australia. *Antiviral Therapy* **2015**, 20, 131-139.

- [76] D.S. Dimitrov, X. Xiao, D.J. Chabot, C.C. Broder; HIV coreceptors. *J. Membrane Biol.* **1998**, 166, 75-90.
- [77] M.M. Goodenow, R.G. Collman; HIV-1 coreceptors preference is distinct from target cell tropism: adual-parameter nomenclature to definí viral phenotypes. *J. Leukoc. Biol.* **2006**, 80, 965-972.
- [78] P. Lusso; HIV and the chemokine System: 10 years later. *EMBO J.* **2006**, 25, 447-456.
- [79] T. Dragic; An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co.receptors function. *J. Gen. Virol.* **2001**, 82, 1807-1814.
- [80] B.D. Preston, B.J. Poiesz, L.A. Loeb; Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **1988**, 242, 1168-1171.
- [81] J.D. Reeves, R.W. Doms; Human immunodeficiency virus type 2. *J. Gen. Virol.* **2002**, 83, 1253-1265.
- [82] H.I. Requejo; Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev. Saúde Pública* **2006**, 40, 331-345.
- [83] B.F. Keele, F. Van Heuverswyn, Y. Li, E. Bailes, J. Takehisa, M.L. Santiago, F. Bibollet-Ruche, Y. Chen, L.V. Wain, F. Liegeois, S. Loul, E.M. Ngole, Y. Bienvenue, E. Delaporte, J.F. Brookfield, P.M. Sharp, G.M. Shaw, M. Peeters, B.H. Hahn; Chimpanzes reservoris of pandèmic and nonpandemic HIV-1. *Science* **2006**, 313, 523-526.
- [84] B. Korber, M. Muldoon, J. Theiler, F. Gao, R. Gupta, A. Lapedes, B.H. Hahn, S. Wolinsky, T. Bhattacharya; Timing the ancestor of the VIH-1 pandemic strains. *Science* **2000**, 288, 1789-1796.
- [85] Asociación Española Contra el Cáncer. <http://www.aecc.es>. Data de consulta: 17/03/2016.
- [86] American Cancer Society. <http://www.cancer.org>. Data de consulta: 16/03/2016.
- [87] Generalitat de Catalunya. <http://cancer.gencat.cat>. (Dades del període 2003-2007). Data de consulta 17/03/2016.

- [88] E.R. Fearon, B. Vogelstein; A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **1990**, 61 (5), 759-767.
- [89] A. Orimo, P.B. Gupta, D.C. Sgroi, et al; Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **2005**, 121 (3), 335-348.
- [90] L. Ma, R.A. Weinberg; Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends in Genetics* **2008**, 24 (9), 448-456.
- [91] J. Chen, Z.Y. Xu-Monette, L. Deng, Q. Shen, G.C. Manyam, A. Martinez-Lopez, L. Zhang, et al; Dysregulated CXCR4 expression promotes lymphoma cell survival and independently predicts disease progression in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* **2015**, 6 (8), 5597-5614.
- [92] F. Balkwill; Cancer and the chemokine network. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4 (7), 540-550.
- [93] J.A. Burger, T.J. Kipps; CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* **2006**, 107, 1761-1767.
- [94] T. Wehler F. Wolfert, C.C. Schimanski, I. Gockel, W. Herr, S. Biesterfeld, J.K. Seifert, H. Adwan, M.R. Berger, T. Junginger, P.R. Galle, M. Moehler; Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by pancreatic cancer correlates with advanced disease. *Oncology Rep.* **2006**, 16 (6), 1159-1164.
- [95] P.L. Wagner, E. Hyjek, M.F. Vazquez, et al; CXCL12 and CXCR4 in adenocarcinoma of the lung: association with metastasis and survival. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **2009**, 137 (3), 615-621.
- [96] K. Oonakahara, W. Matsuyama, I. Higashimoto, M. Kawabata, K. Arimura, M. Osame; Stromal-derived factor-1 $\alpha$ /CXCL12-CXCR4 axis is involved in the dissemination of NSCLC cells into pleural space. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2004**, 30(5), 671-677.
- [97] G. Chen, Z. Wang, X.Y. Liu, F.Y. Liu; High-level CXCR4 expression correlates with brain-specific metastasis of non-small cell lung cancer. *World J. Surg.* **2011**, 35 (1), 56-61.
- [98] O. Wald, U. Izhar, G. Amir, et al; CD4<sup>+</sup>CXCR4<sup>high</sup>CD69<sup>+</sup>T cells accumulate in lung adenocarcinoma. *J. Immunol.* **2006**, 177 (10), 6983-6990.

- [99] A. Müller, B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M.E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S.N. Wagner, J.L. Barrera, A. Mohar, E. Verástegui, A. Zlotnik; Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **2001**, 410 (6824), 50-56.
- [100] T. Murakami, W. Maki, A.R. Cardones, et al; Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Res.* **2002**, 62, 7328-7334.
- [101] S. Fricker, R. Mosi, V. Anastassova, J. Labrecque, R. Wong, R. Skerlj, G. Bridger, D. Huskens; The orally bioavailable allosteric CXCR4 HIV-1 entry inhibitor AMD11070. *Retrovirology* **2012**, 9 (supl. 1), 7.
- [102] J.B. Crawford, G. Chen, D. Gauthier, T. Wilson, B. Carpenter, I.R. Baird, E. McEachern, A. Kaller, C. Harwig, B. Atsma, R.T. Skerlj, G.J. Bridger; AMD070, a CXCR4 Chemokine Receptor Antagonist: Practical Large-Scale Laboratory Synthesis. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, 12 (5), 823-830.
- [103] K. Ichiyama, S. Yokoyama-Kumakura, Y. Tanaka, R. Tanaka, K. Hirose, K. Bannai, T. Edamatsu, M. Yanaka, Y. Niitani, N. Miyano-Kurosaki, H. Takaku, Y. Koyanagi, N. Yamamoto; A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity. *PNAS* **2003**, 100 (7), 4185-4190.
- [104] Department of Health & Human Services. <http://infosida.nih.gov>. Data de consulta 02/04/2016.
- [105] M.J. Endres, P.R. Clapham, M. Marsh, et al; CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* **1996**, 87 (4), 745-756.
- [106] E. Murakami, A. Yoshida, S. Kumakura, R. Tanaka, S. Mitsuhashi, K. Hirose, et al. KRH-2731: an orally bioavailable CXCR4 antagonist in vivo. [Resum LbA01]. Actes de 15th International AIDS Conference **2004**, Juliol 11-16; Bangkok.
- [107] T. Narumi, R. Hayashi, K. Tomita, K. Kobayashi, N. Tanahara, H. Ohno, T. Naito, E. Kodama, M. Matsuoka, S. Oishi, N. Fujii; Synthesis and biological evaluation of selective CXCR4 antagonists containing alkene dipeptide isosteres. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 616-621.

- [108] J. Stephenson; Researchers buoyed by novel HIV drugs: will expand drug arsenal against resistant virus. *JAMA* **2007**, 297 (14), 1535-1536.
- [109] D. Wong, P. Kandagatla, W. Korz, S.R. Chinni; Targeting CXCR4 with CTCE-9908 inhibits prostate tumor metastasis. *BMC Urol.* **2014**, 14, 12.
- [110] E. De Clercq, N. Yamamoto, R. Pauwels, M. Baba, D. Schols, H. Nakashima, J. Balzarini, Z. Debyser, B. A. Murrer, et al. Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus (HIV)-1 and HIV-2 replication by a class of bicyclams interacting with a viral uncoating event. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, 89 (12), 5286-5290.
- [111] E. De Clercq, N. Yamamoto, R. Pauwels, J. Balzarini, M. Witvrouw, K. De Vreese, Z. Debyser, B. Rosenwirth, P. Peichl, et al. Highly potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus by the bicyclam derivative JM3100. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38 (4), 668-674.
- [112] S. Hatse, K. Princen, E. De Clercq, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, P. E. Hernandez-Abad, R. T. Skerlj, G. J. Bridger, D. Schols. AMD3465, a monomacrocyclic CXCR4 antagonist and potent HIV entry inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, 70 (5), 752-761.
- [113] H.E. Broxmeyer, et al; Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J. Exp. Med.* **2005**, 201, 1307-1318.
- [114] M.C.P. Smith, K.E. Luker, J.R. Garbow, J.L. Prior, E. Jackson, D. Piwnica-Worms, G.D. Luker; CXCR4 Regulates Growth of Both Primary and Metastatic Breast Cancer. *Cancer Research* **2004**, 64 (23), 8604-8612.
- [115] I. Kalatskaya, Y.A. Berchiche, S. Gravel, B.J. Limberg, J.S. Rosenbaum, N. Heveker; AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol Pharmacol.* **2009**, 75, 1240-1247.
- [116] S. Pettersson; Diseño, selección y síntesis de Nuevos inhibidores de entrada del VIH. Tesis doctoral. Escola Tècnica Superior IQS, Universitat Ramon Llull, Barcelona 2009.
- [117] R. Puig de la Bellacasa; Disseny, síntesi i avaluació biològica d'inhibidors potencials de les etapes inicials del cicle de replicació de VIH. Tesis doctoral, Escola Tècnica Superior IQS, Universitat Ramon Llull, Barcelona, 2010.

- [118] L. Ros; Disseny i síntesi de noves quimioteques de potencials inhibidors d'entrada del VIH. Tesi doctoral, Escola Tècnica Superior IQS, Ramon Llull, Barcelona, 2011.
- [119] S. Pettersson, V.I. Pérez-Nueno, L. Ros-Blanco, R. Puig de la Bellacasa, M.O. Rabal, X. Batllori, B. Clotet, I. Clotet-Codina, M. Armand-Ugon, J. Esté, J.I. Borrell, J. Teixidó; Discovery of novel non-cyclam polynitrogenated CXCR4 coreceptor inhibitors. *Chem. Med. Chem.* **2008**, 3 (10), 1549-1557.

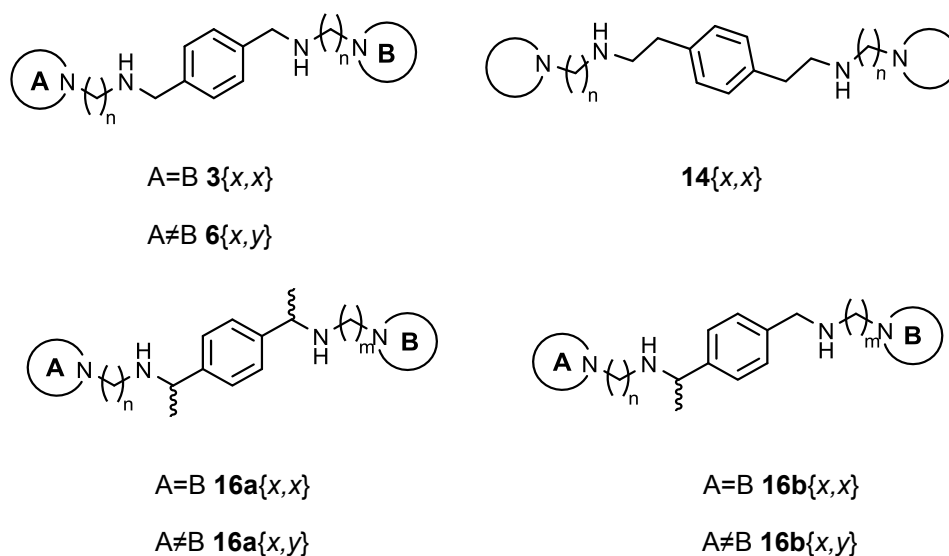


## 2- SÍNTESI DE TETRAAMINES AMB NOUS ESPAIADORS



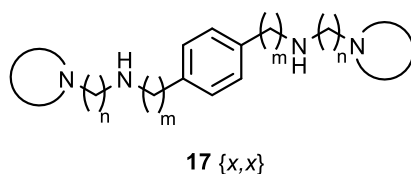
## 2.0- Antecedents a IQS

En les tesis doctorals de S. Petterson, R. Puig de la Bellacasa i L. Ros realitzades al GEM (Grup d'Enginyeria Molecular) d'IQS, es van dissenyar i sintetitzar diverses quimioteques de compostos polinitrogenats potencialment inhibidors del receptor CXCR4. Entre aquesta varietat, inicialment es van obtenir compostos simètrics  $3\{x,x\}$  i no simètrics  $6\{x,y\}$  amb l'espaiador *p*-fenilbismetilènic.<sup>[1]</sup> Posteriorment, es va modificar aquest espaiador ampliant les cadenes laterals a dos grups etil  $14\{x,x\}$ <sup>[2]</sup> o afegint un grup metil a les posicions benzíliques de formes simètriques  $16a\{x,x\}$  i  $16b\{x,x\}$  o no simètriques  $16a\{x,y\}$  i  $16b\{x,y\}$ .<sup>[3]</sup> Es va utilitzar una gran varietat d'amines laterals per a cada espaiador, donant un ampli espectre de diversitat molecular (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Estructures generals dels compostos sintetitzats anteriorment al GEM. El valor de n depèn de cada amina lateral que es col·loqui tal com s'ha mostrat en la gran diversitat d'amines  $2\{x\}$ .<sup>[1,2,3]</sup>

Resultat d'aquests treballs es va trobar que les molècules  $17\{x,x\}$  amb l'espaiador on  $m=2$  a ambdós costats presentaven millors valors d'activitat anti-VIH que els compostos homòlegs amb l'espaiador on  $m=1$  (Figura 2.2).



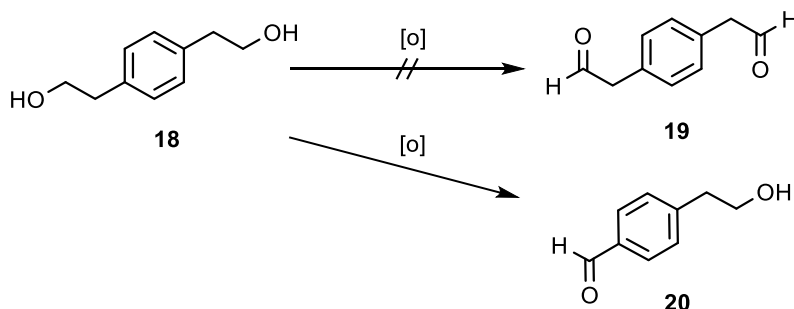
**Figura 2.2.** Estructura general de les tetraamines dissenyades i sintetitzades al GEM.

Arribats a aquest punt, es pensa en seguir ampliar la diversitat d'aquestes quimioteques realitzant noves modificacions a l'espaiador.

## 2.1- Nou espaiador no simètric

### 2.1.1- Anteriorment al GEM

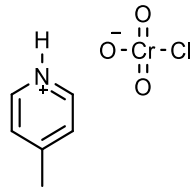
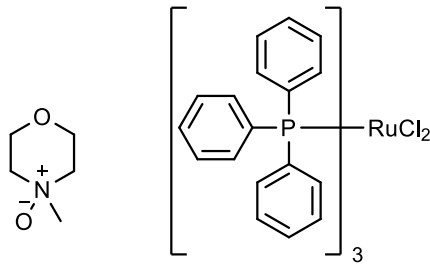
R. Puig de la Bellacasa, en la seva tesi doctoral, va trobar que mentre intentava realitzar la reacció d'oxidació del 1,4-fenilendietanol (**18**) a 1,4-fenilendiacetaldehid (**19**) utilitzant diferents oxidants, en alguns casos aquesta oxidació no tenia lloc de forma completa a banda i banda de l'anell aromàtic, en comptes d'això es generava una sobreoxidació en un sol extrem obtenint com a producte majoritari el *p*-(2-hidroxietil)benzaldehid (**20**) (Figura 2.3).<sup>[2]</sup>



**Figura 2.3.** Reacció per a l'oxidació del 1,4-fenilendietanol (**18**).

Els dos oxidants amb els quals aquesta reacció no desitjada tenia lloc eren el clorocromat de  $\gamma$ -picolina ( $\gamma$ -PCC) i l'*N*-òxid d'*N*-metilmorfolina (NMO). Es mostren en la Taula 2.1.

Taula 2.1. Oxidants utilitzats per a oxidar el 1,4-fenilendietanol (**18**) per obtenir *p*-(2-hidroxiètil)benzaldehyd (**20**).<sup>[2]</sup>

Estructura	Condicions de reacció
 <p>The structure shows a 3-methylpyridinium cation (gamma-picoline) and a chromium(VI) dichloride complex (gamma-PCC) with two double-bonded oxygens and one single-bonded oxygen.</p>	<p>Clorocromat de <math>\gamma</math>-picolina (<math>\gamma</math>-PCC) en <math>\text{CH}_2\text{Cl}_2</math> durant 4h a <math>T_{\text{amb}}</math><sup>[4]</sup></p>
 <p>The structure shows N-methylmorpholine N-oxide (NMO) and a ruthenium(II) complex with three trisphenylphosphine ligands and two chloride ligands, shown as a trimeric complex.</p>	<p>NMO i diclorotris(trifenilfosfina) de ruteni (II) en acetona durant 24 hores a <math>T_{\text{amb}}</math>.</p>

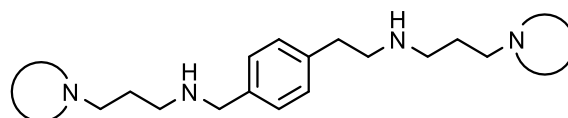
En ambdós casos s'obtenen rendiments acceptables (70%) tot i que amb la primera metodologia ( $\gamma$ -PCC) s'obté un cru de reacció amb més impureses presents.

Aquest subproducte **20** no va interessar en el seu moment i es van descartar els dos oxidants, ja que no servien per a l'obtenció del producte desitjat **19**.

En aquest treball s'ha pensat doncs en aprofitar el *p*-(2-hidroxiètil)benzaldehyd (**20**) com a producte de partida per a la síntesi d'un nou espaiador no simètric per a l'obtenció d'una nova família de tetraamines no simètriques. En aquesta molècula (**20**) ja es disposa d'un i dos carbonis respectivament a banda i banda de l'anell aromàtic aportant així el punt de trencament de simetria que es busca en l'espaiador.

### 2.1.2- Disseny de la nova quimioteca

Amb el nou espaiador no simètric, l'estructura general dels compostos **21**{*x*,*x*} a obtenir es mostra a la Figura 2.4.

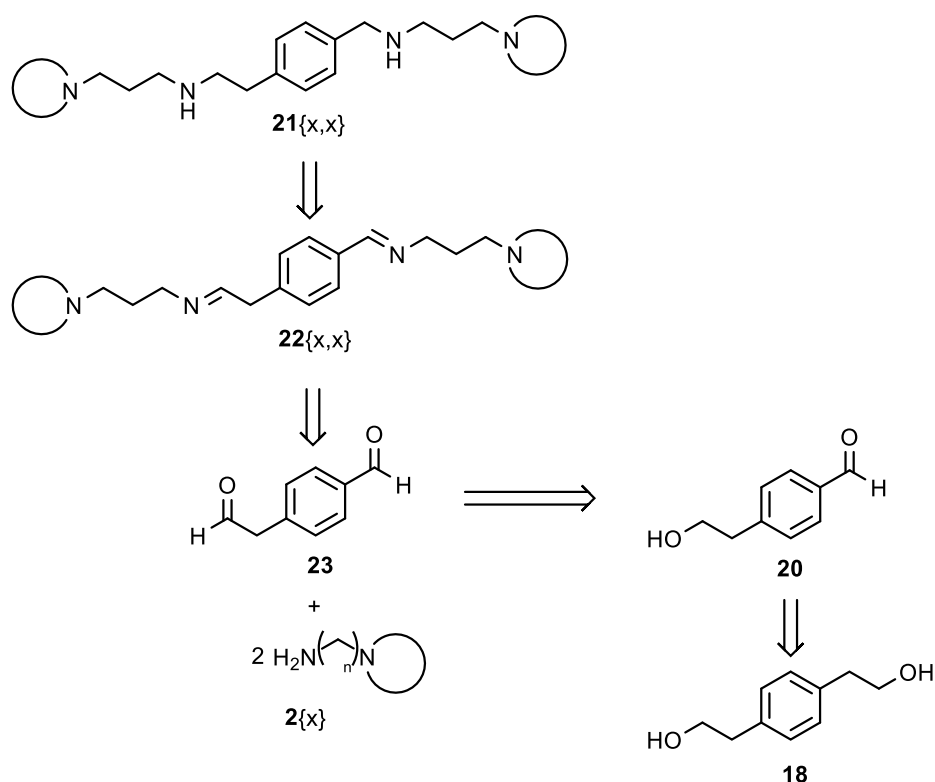


**21**{*x*,*x*}  
x=1-9

Figura 2.4. Estructura general dels compostos polinitrogenats no simètrics que es volen sintetitzar.

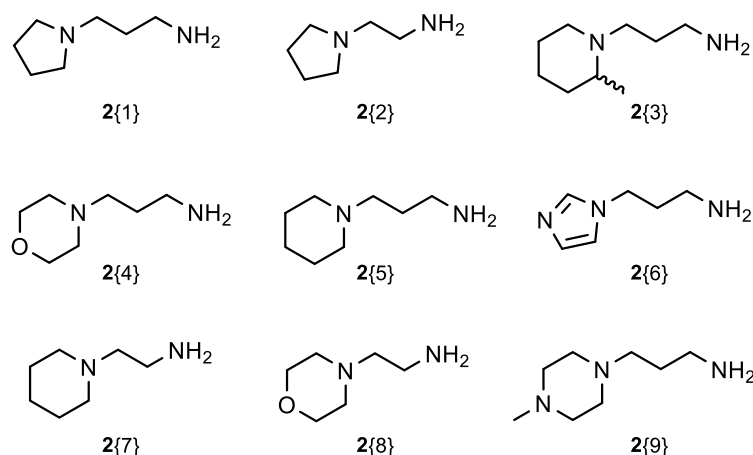
Es dissenya una ruta sintètica que permeti arribar als productes desitjats **21**{x,x} a partir del *p*-(2-hidroxietil)benzaldehid (**20**) com a producte de partida fent la retrosíntesi (Figura 2.5) en base als treballs de S. Petterssen, R. Puig de la Bellacasa i L. Ros realitzats prèviament.

Per tant, per a arribar a una diamina **21**{x,x} caldrà reduir una diimina (**22**{x,x}), que provindrà de la reacció del dialdehid corresponent **23** amb dos equivalents d'amina primària **2**{x}. Aquest dialdehid **23** no es troba disponible comercialment, per tant cal obtenir-lo oxidant el *p*-(2-hidroxietil)benzaldehid (**20**) (tampoc disponible comercialment) per l'extrem de l'alcohol.



**Figura 2.5.** Anàlisi retrosintètica dels compostos polinitrogenats **21**{x,x}.

Per a poder comparar els valors d'activitat anti-VIH amb anàlegs sintetitzats al GEM i veure l'efecte que aquest nou espaiador no simètric produeix, s'escullen algunes de les amines primàries **2**{x} usades anteriorment per l'equip (Figura 2.6).

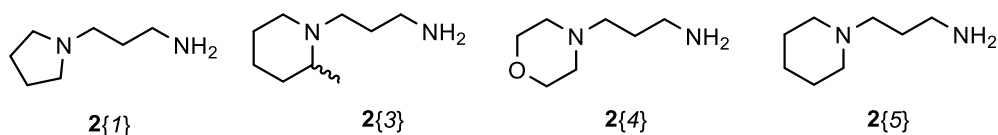


**Figura 2.6.** Algunes de les amines  $2\{x\}$  més característiques utilitzades anteriorment en el GEM per a la síntesi de compostos polinitrogenats anàlegs a l'AMD3100.

D'aquesta selecció d'amines se'n fa una segona selecció per quedar-nos amb les més representatives i així obtenir resultats concloents estalviant esforç sintètic.

Es selecciona la 3-aminopropil-*N*-morfolina  $2\{4\}$ , no tant pels resultats d'activitat anti-VIH que havia donat anteriorment, més aviat baixos, sinó pel fet que és l'amina que millors rendiments ha donat en reaccions similars d'aminació reductora. Per tant, s'escull utilitzar-la per comprovar la viabilitat de la nova ruta sintètica.

Un cop optimitzada la ruta sintètica es pensa en utilitzar les amines  $2\{1\}$ ,  $2\{3\}$  i  $2\{5\}$  (Figura 2.7), ja que són les amines comercialment assequibles que havien donat millors resultats d'activitat antiviral en molècules simètriques anàlogues.



**Figura 2.7.** Selecció d'amines utilitzades per a la síntesi dels compostos  $21\{x,x\}$

Així doncs, amb aquesta selecció d'amines laterals, les noves tetraamines no simètriques  $21\{x,x\}$  a obtenir són les que es mostren en la Figura 2.8.

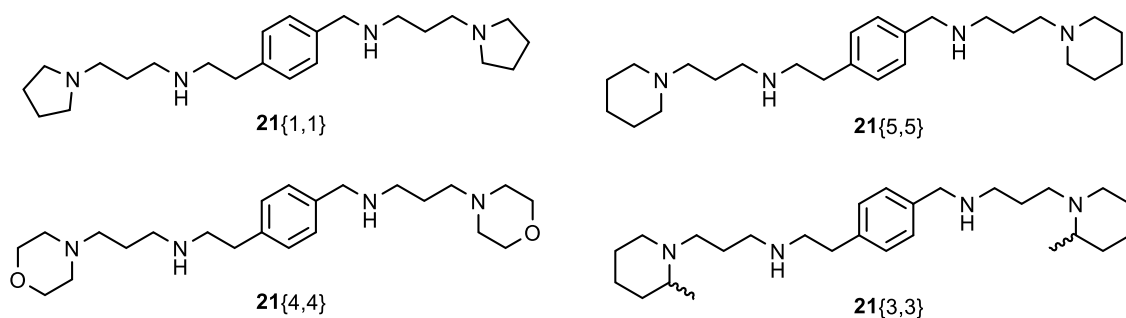


Figura 2.8. Tetraamines no simètriques  $21\{x,x\}$  a sintetitzar.

### 2.1.3 - Síntesi de *p*-(2-hidroxietil)benzaldehyd

El primer pas per a obtenir el nou espaiador no simètric consisteix en la síntesi del *p*-(2-hidroxietil)benzaldehyd (**20**). Es parteix de les condicions que millors resultats havien donat en el treball de R. Puig de la Bellacasa<sup>[2]</sup> basades en la metodologia de K.B. Sharpless i col·laboradors<sup>[5]</sup> en què s'utilitza NMO (*N*-metilmorfolina-*N*-òxid) com a oxidant i diclorotris(trifenilfosfina) de ruteni (II) com a catalitzador per a aconseguir una ruptura oxidant del producte **18**. R. Puig de la Bellacasa descriu aquesta transformació (Figura 2.9) amb un rendiment aproximat del 70%, tot i que s'havia realitzat només una sola vegada donat que no tenia utilitat de cara als objectius de la tesi en qüestió.

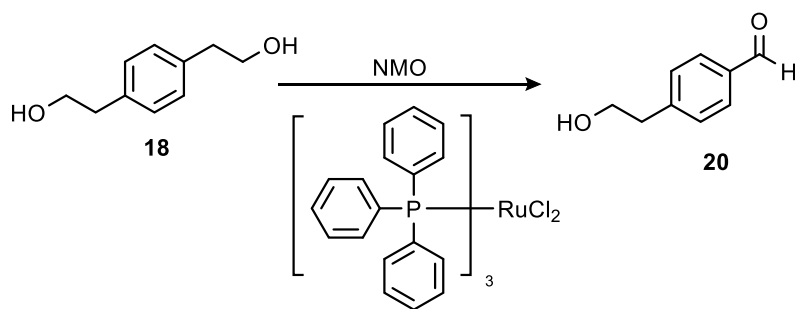


Figura 2.9. Reacció d'oxidació del 1,4-fenilendietanol (**18**) per a obtenir el *p*-(2-hidroxietil)benzaldehyd (**20**).

Es segueix la metodologia descrita per K.B. Sharpless i col·laboradors<sup>[5]</sup>, dissolent el 1,4-fenilendietanol (**18**) i 0.07 equivalents del catalitzador diclorotris(trifenilfosfina) de ruteni (II) en acetona anhidre i afegint 7 equivalents de NMO dissolt en el mateix dissolvent gota a gota. Controlant la reacció per CCF, es deixa entre 3 i 5 hores agitant a temperatura ambient, el temps necessari per obtenir la màxima conversió possible. Després d'una separació cromatogràfica emprant sílice com a fase estacionària i una mescla hexà/acetat d'etil com a eluent amb una rampa de concentració de 100:0 a 0:100 en 45 minuts, s'obté el producte desitjat **20**, però amb un rendiment del 7%, molt inferior a l'esperat.



En l'espectre de  $^1\text{H}$ -RMN (Figura 2.10) es confirma l'obtenció del producte desitjat **20** i s'identifica el senyal característic del grup aldehid a 10 ppm.



**Figura 2.10.** Espectre de  $^1\text{H}$ -RMN del *p*-(2-hidroxietil)benzaldehyd (**20**).

Tractant-se del primer pas de la ruta de síntesi, tot i haver obtingut el producte amb una puresa acceptable, cal millorar-ne el rendiment. S'intenta millorar la reacció modificant alguns dels paràmetres, però en tots els casos el resultat és el mateix; el rendiment no s'aconsegueix millorar significativament, arribant a un màxim del 15%.

Com s'havia vist en la tesi de R. Puig de la Bellacasa, l'altra via per a obtenir el producte **20** desitjat era utilitzant el  $\gamma$ -PCC (Clorocromat de  $\gamma$ -picolina) com a oxidant<sup>[4]</sup> però en posar-ho en pràctica es veu que el rendiment no millora notablement (màxim de 25%) i que el producte obtingut presenta un alt nivell d'impureses.

### 2.1.4- Nova ruta sintètica

Es pensa en replantejar la ruta sintètica per a obtenir el *p*-(formilmetil)benzaldehyd (**23**) ja que la plantejada anteriorment no aporta ni els rendiments adequats ni la puresa satisfactòria. La nova ruta sintètica ha de rendir el mateix producte ja que s'utilitzarà de la mateixa forma que s'utilitzava el tereftaldehid (**1**) en el treball de S. Pettersson a l'hora de sintetitzar les tetraamines per aminació reductora.

Així doncs, es va dissenyar l'obtenció del dialdehyd **23** a partir del *p*-metilbenzaldehyd (**24**) el qual per bromació en la posició benzílica hauria de permetre obtenir el derivat bromat **25**. La posterior protecció de l'aldehyd en forma d'acetal **26** seguida de reacció de Grignard amb ortoformiat de trimetil rendiria el diacetal **27** que per hidròlisi àcida conduiria a **23** (Figura 2.11).

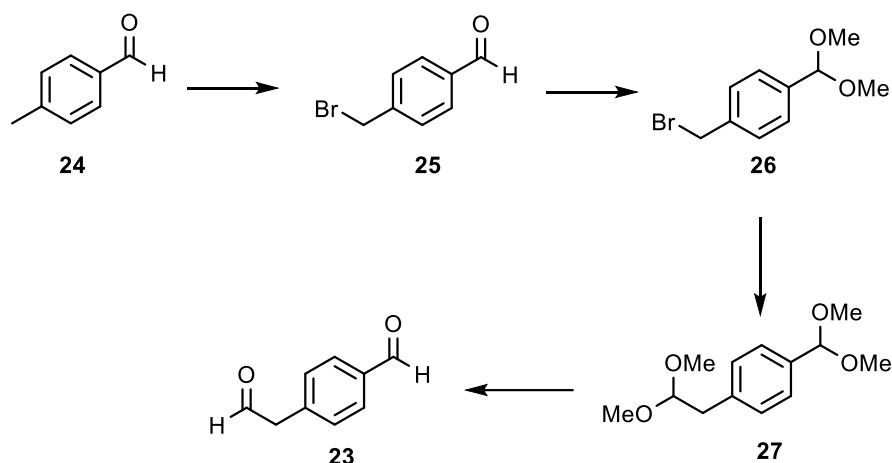


Figura 2.11. Nova ruta sintètica proposada per obtenir el compost dialdehid **23**.

#### 2.1.4.1- Síntesi del *p*-(bromometil)benzaldehid

El primer pas de la nova síntesi comporta una bromació del metil en posició benzílica del compost **24** per a rendir el *p*-(bromometil)benzaldehid (**25**). Existeixen diverses metodiques a la literatura per a aconseguir-ho. S'escull la metodologia proposada per Yu i col·laboradors<sup>[6]</sup> en la que utilitza *N*-bromosuccinimida (NBS) com a font de brom i peròxid de benzoil com a catalitzador per a realitzar la bromació en tetraclorur de carboni com a dissolvent (Figura 2.12). S'escull aquesta perquè era la que s'adequa millor a les condicions del laboratori.

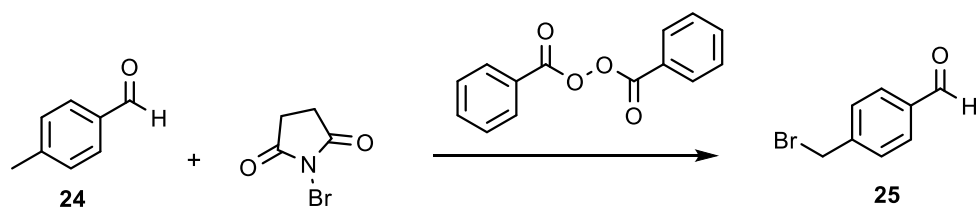
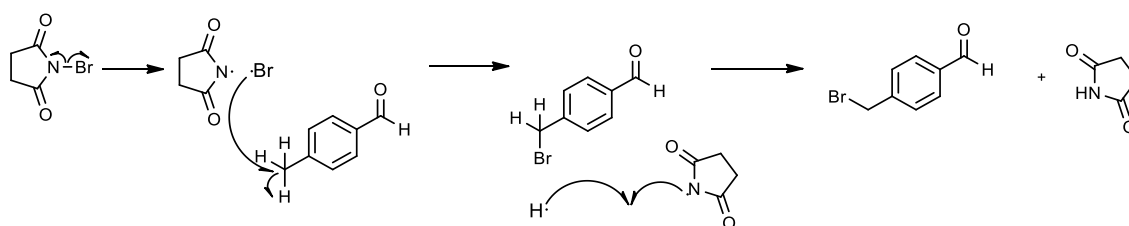


Figura 2.12. Reacció de bromació proposada per Yu i col·laboradors.<sup>[6]</sup>

Aquesta classe de reacció, anomenada de Wohl-Ziegler, és del tipus radicalari on l'NBS allibera un radical brom que és el que s'intercanvia amb un protó del metil en posició benzílica. La succinimida radical, llavors, captura el radical hidrogen obtenint-se per una banda el *p*-bromometilbenzaldehid (**25**) i per l'altra la succinimida. És important per a la bona realització d'aquesta reacció que el dissolvent sigui tetraclorur de carboni per evitar que l'NBS reaccioni amb el dissolvent. També és important la presència d'un peròxid com a catalitzador que iniciï la reacció radicalària. El mecanisme es representa en la Figura 2.13<sup>[7]</sup>.



**Figura 2.13.** Mecanisme de la reacció radicalària de Wohl-Ziegler per a la formació del compost bromat **25**.<sup>[7]</sup>

Es porta a terme la reacció amb la metodologia de Yu i col·laboradors<sup>[6]</sup>, tenint especial cura per recuperar el tetraclorur de carboni un cop utilitzat, per a poder-lo destil·lar i tornar a utilitzar en futures reaccions degut a les limitacions de compra d'aquest dissolvent regulat pel Protocol de Montreal.<sup>[8]</sup>

S'afegeix l'NBS lentament sobre una dissolució del *p*-metilbenzalhid (**24**) en  $\text{CCl}_4$  i en presència del peròxid de benzoil catalític que porta una hora a reflux. Es deixa a reflux durant dues hores més. Passat aquest temps es filtra. Tot i haver obtingut el producte desitjat, en el cru de reacció s'obtenen també nombrosos subproductes, per tant, es purifica el cru obtingut amb una separació cromatogràfica utilitzant sílice com a fase estacionària i hexà/acetat d'etil com a eluent amb una rampa de concentració de 100:0 a 90:10 en 15 minuts. S'obté el producte desitjat **25** però tan sols amb un rendiment del 9%.

Es comprova que realment s'ha obtingut el compost **25** per  $^1\text{H}$ -RMN i  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 2.14) identificant els senyals característics del grup aldehid i del metilè en posició benzílica i que s'ha aconseguit purificar després del pas de la columna cromatogràfica automàtica.

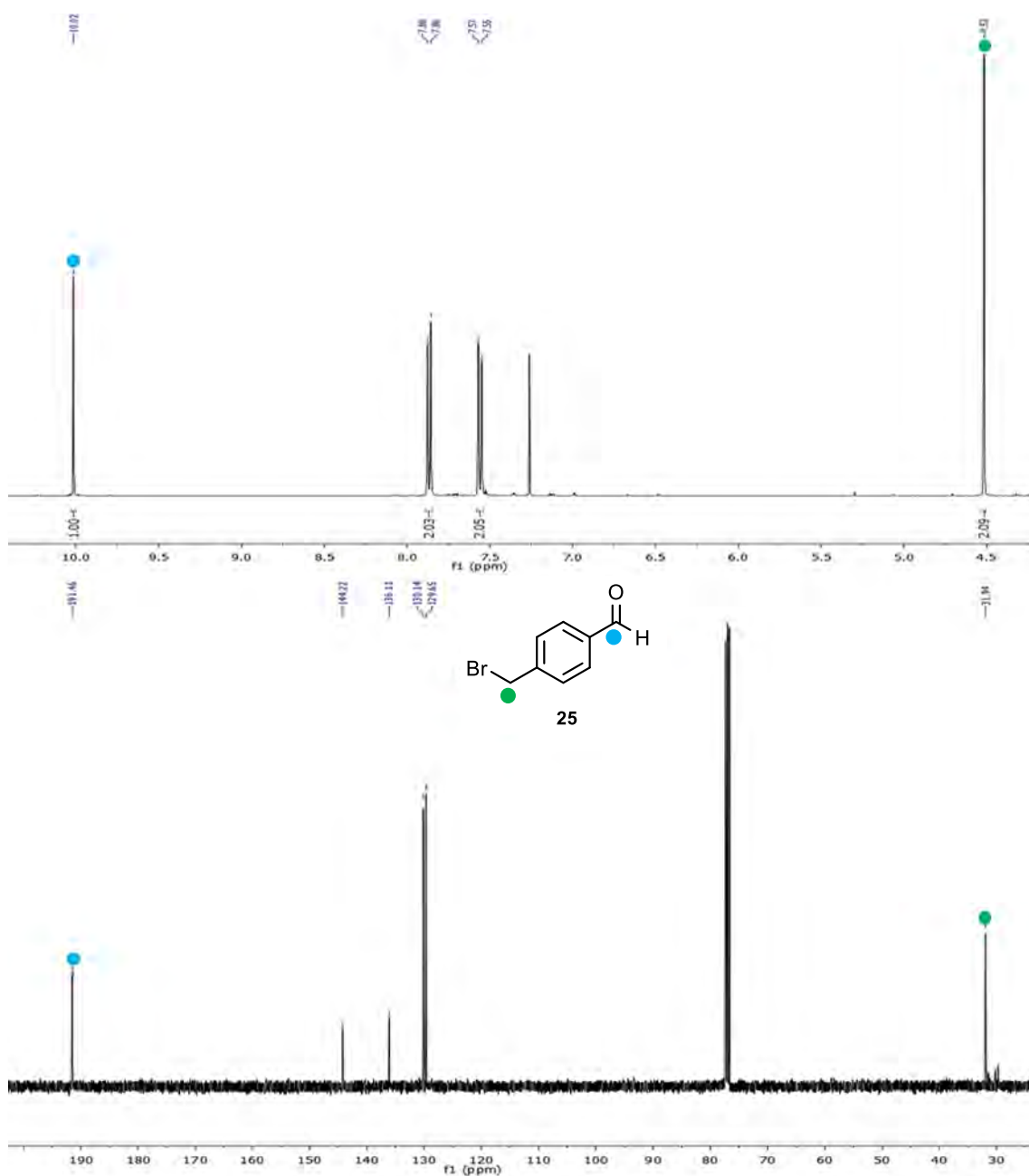
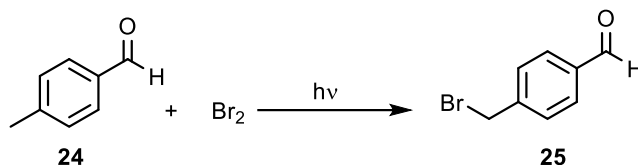


Figura 2.14. <sup>1</sup>H-RMN i <sup>13</sup>C-RMN del *p*-(bromometil)benzaldehyd (**25**).

L'*N*-bromosuccinimida, en presència del peròxid de benzoïl i amb l'ajuda de l'alta temperatura en la que té lloc la reacció, pot descompondre donant lloc a Br<sub>2</sub>, creant un medi oxidant que pot oxidar el compost desitjat **25** i el producte de partida **24**. Aquesta presència de Br<sub>2</sub> es pot deduir per la formació de vapors vermellors a mesura que s'afegeix l'NBS. També es pot formar HBr per la interacció dels radicals Br· i H· presents en el medi, procedents de les diferents etapes de la reacció. Aquestes reaccions secundàries podrien explicar el baix rendiment de la reacció. A més, realitzant un estudi espectroscòpic del cru de reacció s'han pogut identificar formes oxidades dels compostos **24** i **25**.

Aquest problema d'oxidació i formació de subproductes no es pot evitar en cap cas, tot i que s'intenta una addició més gradual de l'NBS, una disminució de la temperatura de reacció o una menor quantitat de catalitzador.

Yu i col·laboradors descriuen també la mateixa reacció de bromació del 4-metilbenzaldehyd (**24**) per obtenir el compost **25** però utilitzant una metodologia diferent amb brom com a agent de bromació enlloc de l'NBS (Figura 2.15).<sup>[6]</sup>

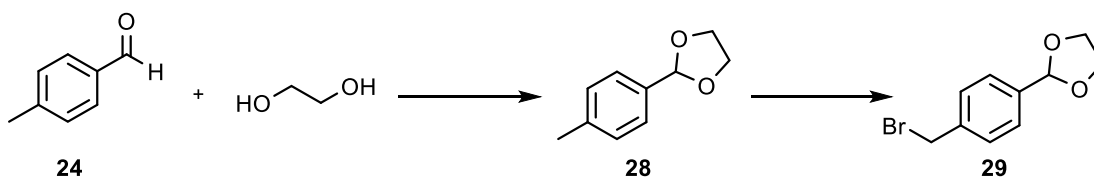


**Figura 2.15.** Reacció de bromació alternativa proposada per Yu i col·laboradors.<sup>[6]</sup>

Es realitza la reacció tal com figura a l'article de Yu i col·laboradors procurant que hi hagi contacte amb llum solar. L'àcid bromhídric generat en la reacció es recull en una trampa de gasos bàsica. Tot i els diversos intents, no s'aconsegueix obtenir un rendiment superior al 19%, a més a més, el producte **25** obtingut es troba impurificat tot i haver-se realitzat una cromatografia de columna amb sílice com a fase estacionària i hexà/acetat d'etil com a eluent amb una rampa de concentració de 100:0 a 90:10 en 15 minuts. Per això cal descartar aquesta ruta sintètica i valorar altres opcions.

#### 2.1.4.2- Protecció del grup aldehyd

Com que es va veure que les impureses majoritàries en els processos de bromació del producte **24** eren espècies oxidades tant del mateix compost **24** com del producte final **25**, es va pensar en solucionar aquest problema protegint el grup aldehyd present amb un grup acetal, ja que aquest és el punt més susceptible de ser oxidat. Un cop protegit, es podria prosseguir amb la bromació del metil en posició benzílica (Figura 2.16).



**Figura 2.16.** Reacció de protecció del grup aldehyd del compost **24** amb la posterior bromació.<sup>[9]</sup>

Es tracta el compost **24** utilitzant toluè com a dissolvent, etilenglicol per formar el grup protector acetal i àcid *p*-toluensulfònic com a catalitzador. Tenint cura d'anar eliminant l'aigua formada *in situ* amb un muntatge Dean-Stark per a desplaçar la reacció cap al producte desitjat **28** mentre s'escalfa a reflux durant 45 minuts. Passat aquest temps, es prossegueix amb el *work-up*, que consisteix en afegir una dissolució de NaOH al cru de reacció seguit d'una sèrie de rentats amb aigua. Després d'eliminar el dissolvent a pressió reduïda, s'obté el producte **28** amb un rendiment del 89%.

### 2.1.4.3- Bromació de la molècula **28**

Es procedeix a bromar el metil en posició benzílica del compost **28** aconseguit en el punt anterior. S'opta per utilitzar la metodologia proposada per Yu i col·laboradors<sup>[6]</sup> ja que ja s'havia utilitzat anteriorment per bromar aquesta posició. Un cop purificat el cru de reacció obtingut mitjançant cromatografia de columna automàtica amb sílice com a fase estacionària i hexà/acetat d'etil com a eluent amb una rampa de concentració de 100:0 a 90:10 en 15 minuts, s'observa que el producte majoritari no és el compost **29**, sinó que les condicions àcides i oxidants provoquen l'obertura del grup protector acetal en comptes de bromar la posició desitjada donant lloc al compost **30** no desitjat (Figura 2.17).

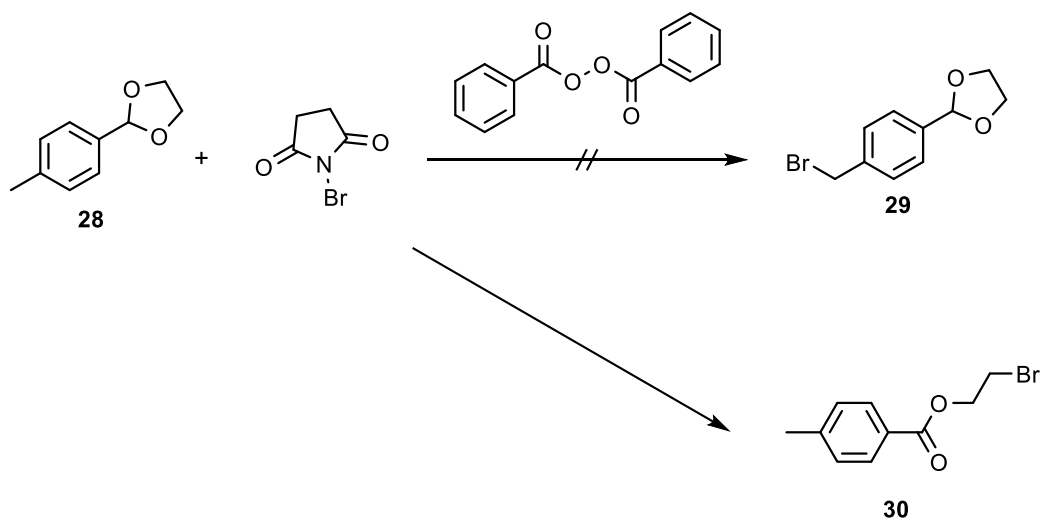
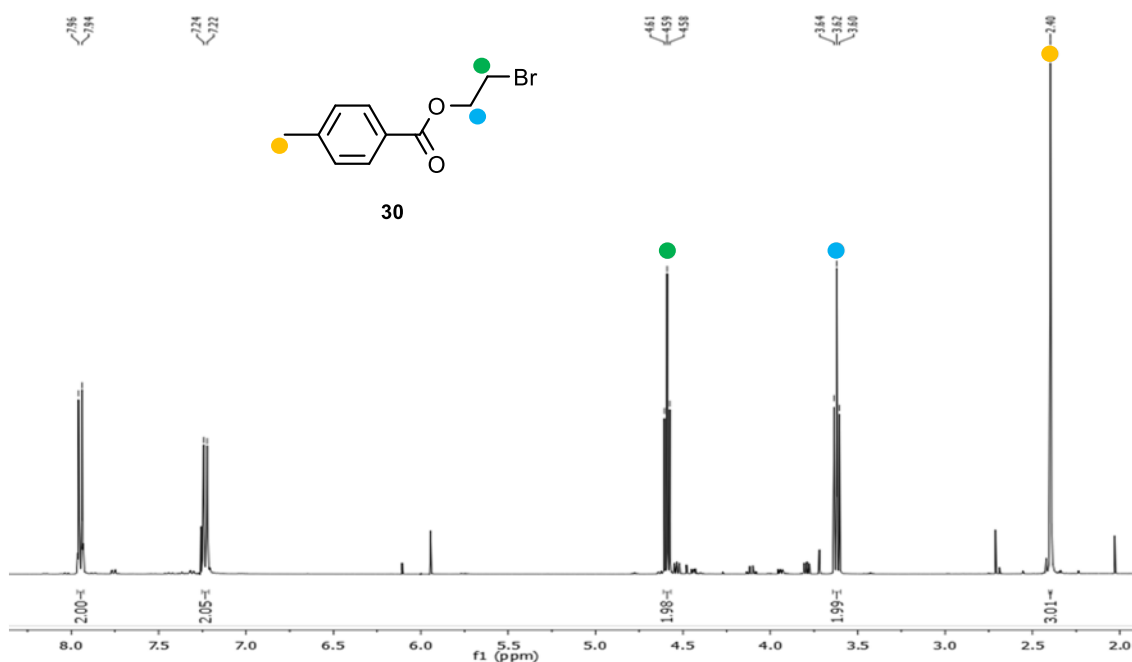


Figura 2.17. Reacció de bromació del producte **28**.

Podem explicar aquest comportament mitjançant la desprotecció parcial del grup acetal en presència de medi àcid. L'absència d'aigua en el medi de reacció impedeix la hidròlisi completa de l'acetal, però l'HBr generat *in situ* pot obrir l'acetal per rendir el producte no desitjat **30**.



**Figura 2.18.** Espectroscòpia  $^1\text{H}$ -RMN del compost **30** obtingut en l'intent de bromació del metil en posició benzílica del compost **28**.

Espectroscòpicament es confirma l'obtenció del producte no desitjat **30** tant per  $^1\text{H}$ -RMN (Figura 2.18) com en l'espectre de  $^{13}\text{C}$ -RMN on apareix el senyal del grup carbonil a 166 ppm.

En conseqüència d'aquests resultats i veient que el grup acetal no serveix com a grup protector ja que no suporta les condicions de reacció, es pensa en canviar novament de ruta sintètica.

### 2.1.5- Utilització d'un grup imina com a grup protector

Es pensa en iniciar la ruta sintètica i utilitzar la imina formada com a grup protector per poder procedir a la bromació del metil en posició benzílica. D'aquesta forma s'evita la presència del grup aldehid en el moment de l'addició de l'NBS per a realitzar la bromació que és el que dona problemes en l'apartat 2.1.4. La nova ruta sintètica resulta tal com es mostra a la Figura 2.19.

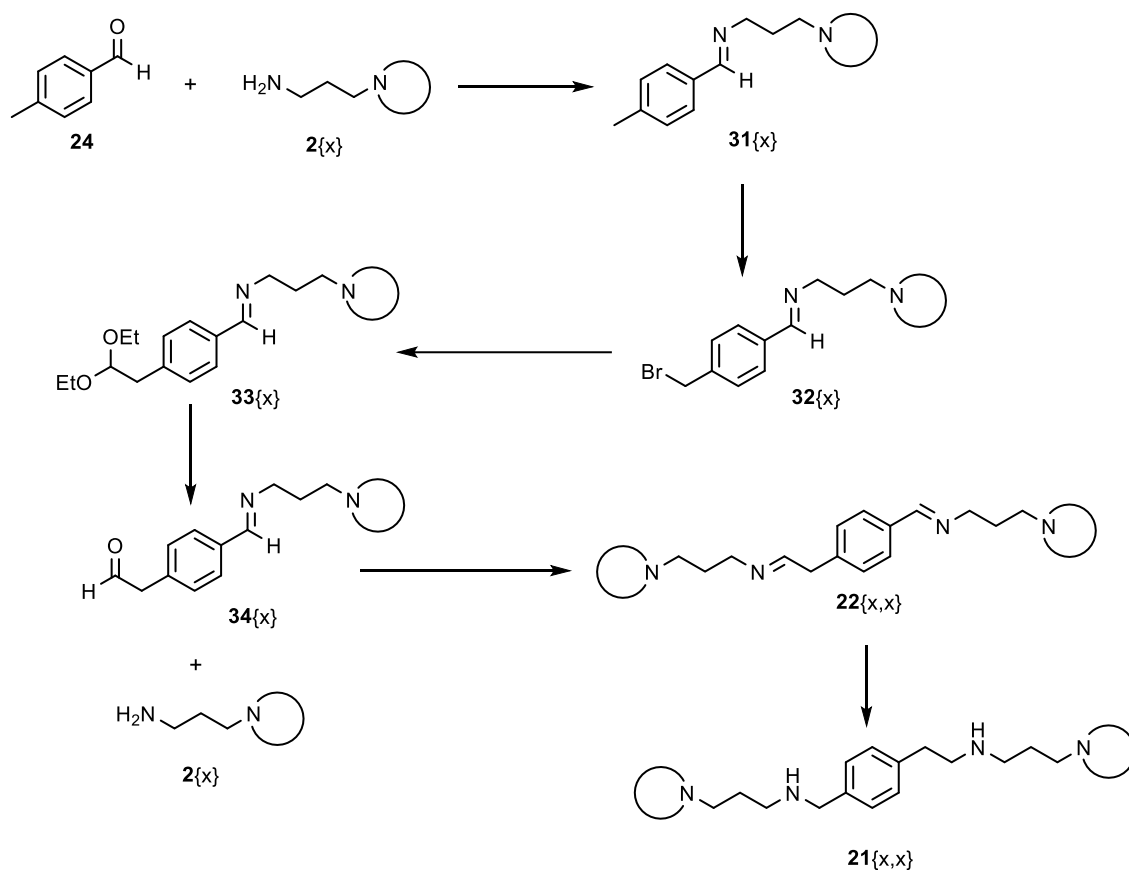


Figura 2.19. Nova ruta sintètica per la obtenció del producte **21{x,x}**.

### 2.1.5.1- Formació de la imina

El primer pas per a obtenir les tetraamines **21{x,x}** desitjades és, doncs, la formació de la imina **31{x}**. La metodologia escollida per a obtenir les imines a partir de la reacció entre un grup aldehid i una amina primària és l'etapa inicial de les aminacions reductores ja utilitzades al grup en reaccions homòlogues.<sup>[1,10]</sup>

L'amina escollida per a realitzar la reacció i veure si la ruta és viable és la 3-aminopropil-*N*-morfolina (**2{4}**). S'escull aquesta amina perquè, com s'ha indicat anteriorment, és la que anteriorment ha donat millors rendiments (Figura 2.20).

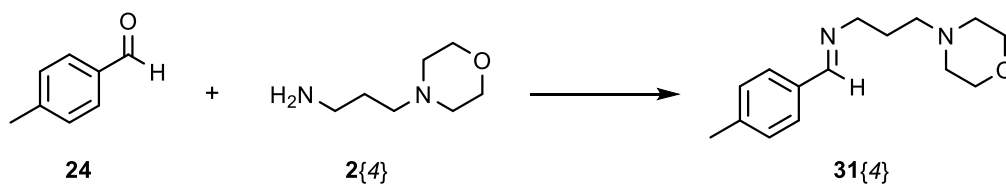
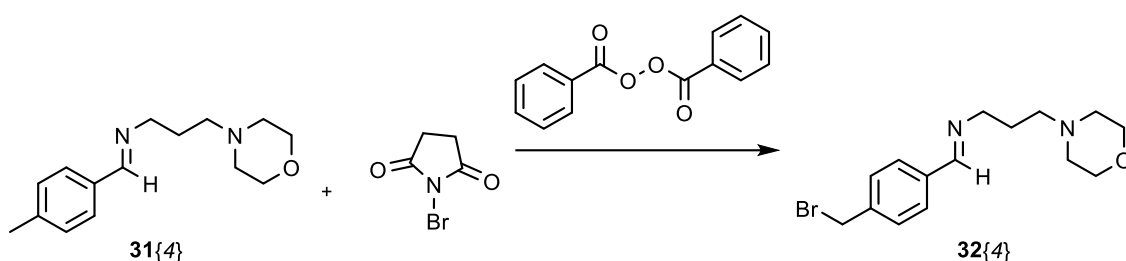


Figura 2.20. Reacció de formació de la imina **34{4}**.



Es segueix la metodologia emprada per S. Pettersson proposada per Gómez i col·laboradors,<sup>[10]</sup> fent reaccionar el 4-metilbenzaldehyd (**24**) amb un equivalent de l'amina **2{4}** en metanol anhidre i amb sulfat de sodi com a captador d'aigua. Es deixa agitant a temperatura ambient durant 7 hores i es filtra. Un cop purificat s'obté el producte **31{4}** amb un rendiment del 89%. Es comprova la seva obtenció mitjançant l'assignació dels senyals característics en els espectres de RMN de <sup>1</sup>H-RMN i <sup>13</sup>C-RMN; destaca la desaparició dels senyals característics del grup aldehyd, fet que ens demostra que els productes de partida han reaccionat completament.

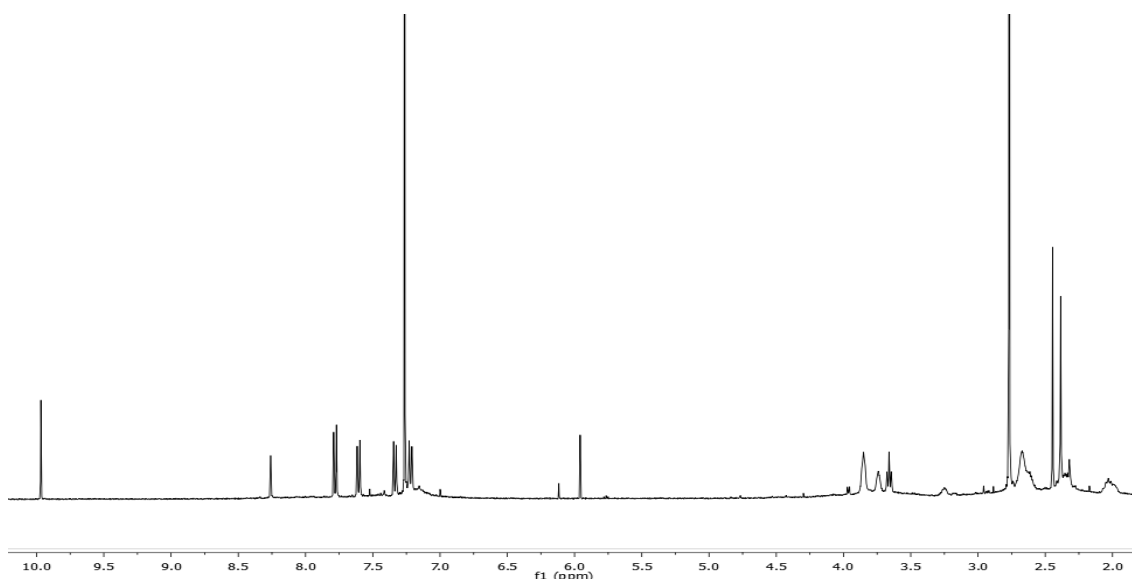
Es prossegueix amb la reacció de bromació del metil en posició benzílica per així obtenir el producte **32{4}** (Figura 2.21).



**Figura 2.21.** Reacció de formació del compost **32{4}** a partir de la bromació amb NBS del metil en posició benzílica de la molècula **31{4}**.

Es porta a terme la mateixa metodologia utilitzada anteriorment per a la bromació de la posició benzílica proposada per Yu i col·laboradors<sup>[6]</sup> amb NBS com a agent bromant i anhídrid benzoic com a catalitzador. En l'anàlisi espectroscòpica del cru de reacció es pot veure clarament que el producte **31{4}** no ha suportat les condicions de reacció i ens trobem davant una mescla complexa de diversos productes i subproductes de reacció.

Sense realitzar una purificació es pot veure en el <sup>1</sup>H-RMN (Figura 2.22) un senyal a 10 ppm corresponent al grup aldehyd, per tant, les condicions àcides de la reacció han provocat el trencament del grup imina.

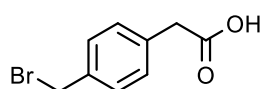


**Figura 2.22.**  $^1\text{H}$  RMN del cru de reacció obtingut on s'aprecia clarament que no s'ha obtingut el producte desitjat **32**{4}.

Es decideix no continuar amb aquesta nova ruta sintètica proposada, ja que s'ha comprovat que el grup imina com a grup protector no suporta les condicions a les que es veu sotmesa la reacció. En veure que en les diferents proves per a bromar el metil en posició benzílica no s'han obtingut resultats satisfactoris, es decideix replantejar la ruta sintètica i partir d'un nou producte de partida que no requereixi d'aquest pas de bromació.

### 2.1.6- Nou producte de partida i nova ruta sintètica

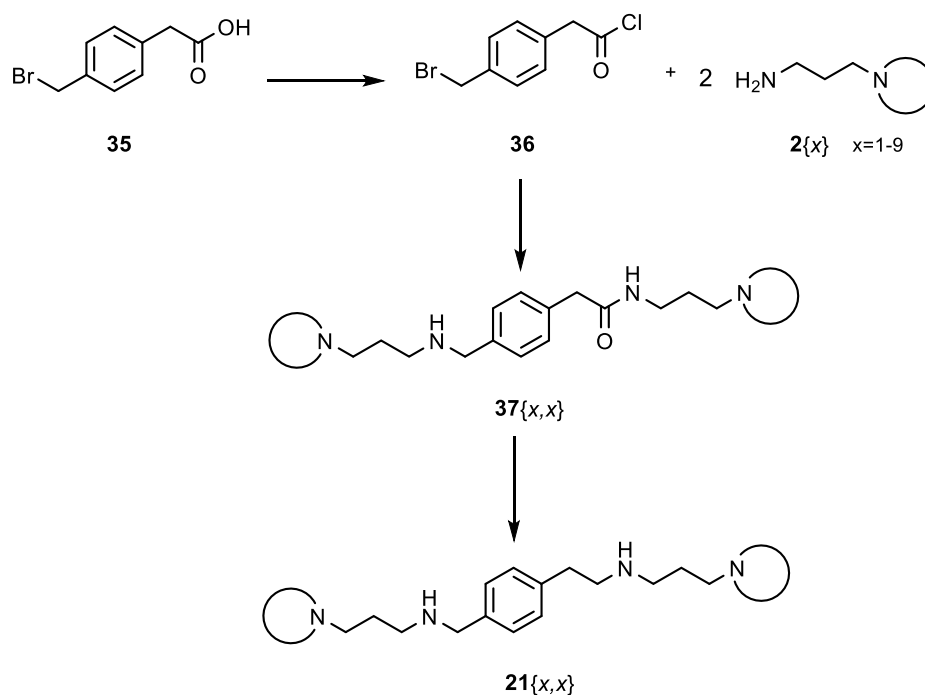
Es realitza una cerca de productes comercialment accessibles que serveixin com a punt de partida per a una nova ruta sintètica que rendeixi les tetraamines objectiu **21**{x,x}. Es troba l'àcid 2-(4-bromometil)fenil)acètic (**35**). Aquesta molècula, com es pot veure en la Figura 2.23, ja disposa del nombre de baules metilèniques desitjades a banda i banda de l'anell aromàtic i, a més a més, es troba bromada en el metil en posició benzílica que s'estava intentant aconseguir.



**35**

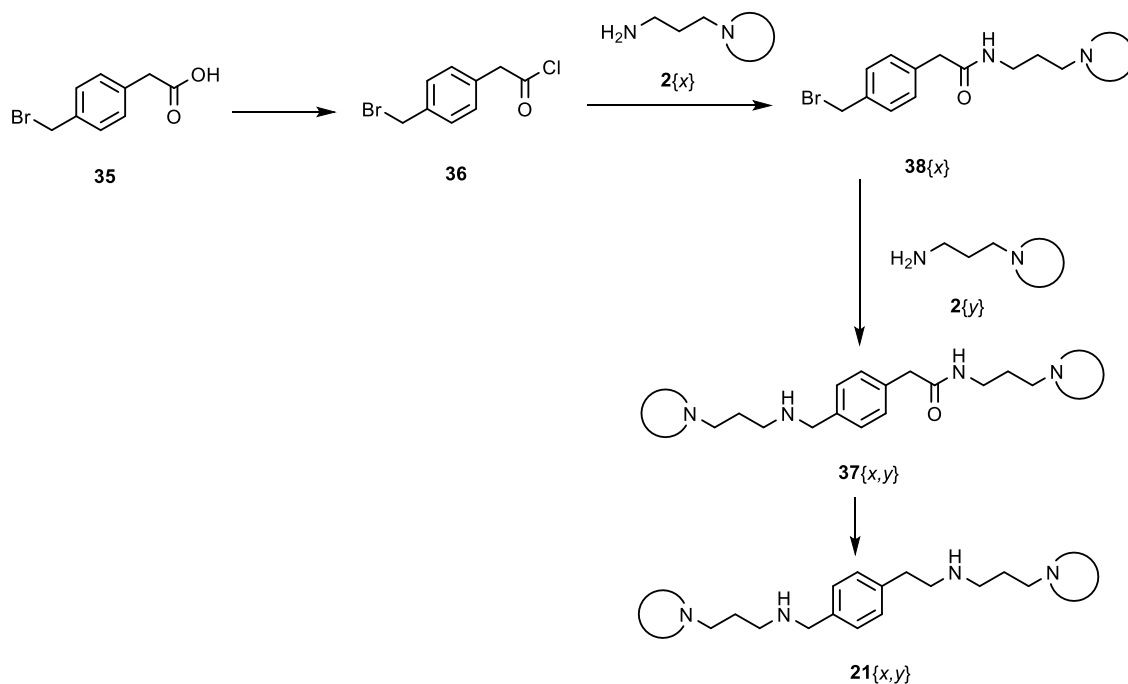
**Figura 2.23.** Estructura de l'àcid 2-(4-bromometil)fenil)acètic (**35**).

Es planteja una nova ruta sintètica que, partint de **35**, permeti accedir en el menor nombre de passos possibles als compostos **21**{x,x} (Figura 2.24).



**Figura 2.24.** Ruta sintètica per obtenir els productes finals  $21\{x,x\}$  a partir de l'àcid 2-(4-bromometil)fenil)acètic (**35**).

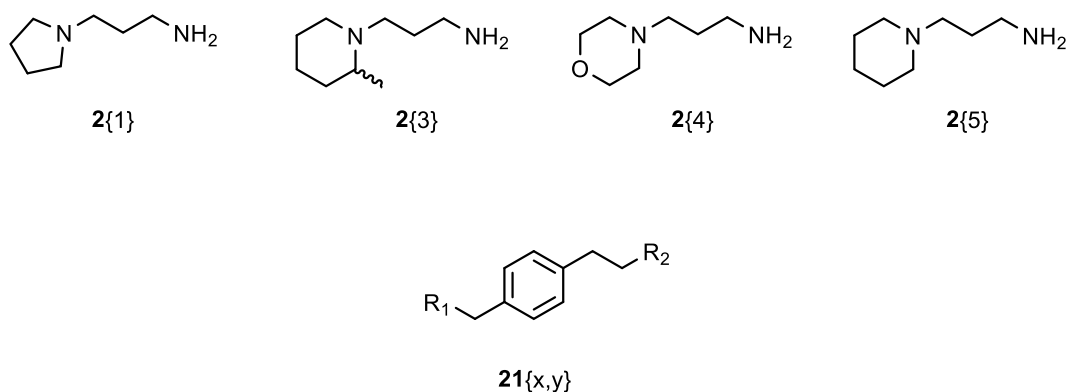
Aquesta ruta sintètica, a més, permet la inclusió de dues amines diferents a banda i banda de l'anell gràcies a la diferència de reactivitat dels dos extrems de l'intermedi **36**. Per aquest motiu es reestructura la ruta sintètica representada en la Figura 2.25 per a poder obtenir tetraamines no simètriques que continguin amines laterals diferents a banda i banda de l'anell aromàtic central en la mateixa molècula (Figura 2.25).



**Figura 2.25.** Nova ruta sintètica per a sintetitzar els compostos  $21\{x,y\}$  a partir de l'àcid 2-(4-bromometil)fenil)acètic (**35**).

El fet de tenir diferents funcionalitats en l'espaiador central no simètric provoca que les dues posicions possibles de substituir per una amina no siguin equivalents. La possibilitat de la doble substitució condueix a que les molècules possibles de ser sintetitzades a partir de les 9 amines presents a la Figura 2.6 sigui de 81. Cal fer, per tant, una selecció que en redueixi el número.

Com ja s'ha comentat, es redueix el nombre d'amines laterals a 5, les seleccionades en la Figura 2.7. Aquesta reducció fa que el número de tetraamines possibles es redueixi a 16 (Taula 2.2). D'aquestes 16 possibles es decideix de sintetitzar-ne 6 (Figura 2.27), els motius per seleccionar concretament aquests 6 compostos són els següents:



**Figura 2.26.** Estructura de les amines laterals  $2\{x\}$  a utilitzar i estructura general de les amines  $21\{x,y\}$ .

**Taula 2.2.** Recompte de les 16 amines  $21\{x,y\}$  possibles fent reaccionar el clorur d'àcid **26** amb les amines  $2\{1-5\}$ .

$R_1 / R_2$	$2\{1\}$	$2\{3\}$	$2\{4\}$	$2\{5\}$
$2\{1\}$	$21\{1,1\}$	$21\{3,1\}$	$21\{4,1\}$	$21\{5,1\}$
$2\{3\}$	$21\{1,3\}$	$21\{3,3\}$	$21\{4,3\}$	$21\{5,3\}$
$2\{4\}$	$21\{1,4\}$	$21\{3,4\}$	$21\{4,4\}$	$21\{5,4\}$
$2\{5\}$	$21\{1,5\}$	$21\{3,5\}$	$21\{4,5\}$	$21\{5,5\}$

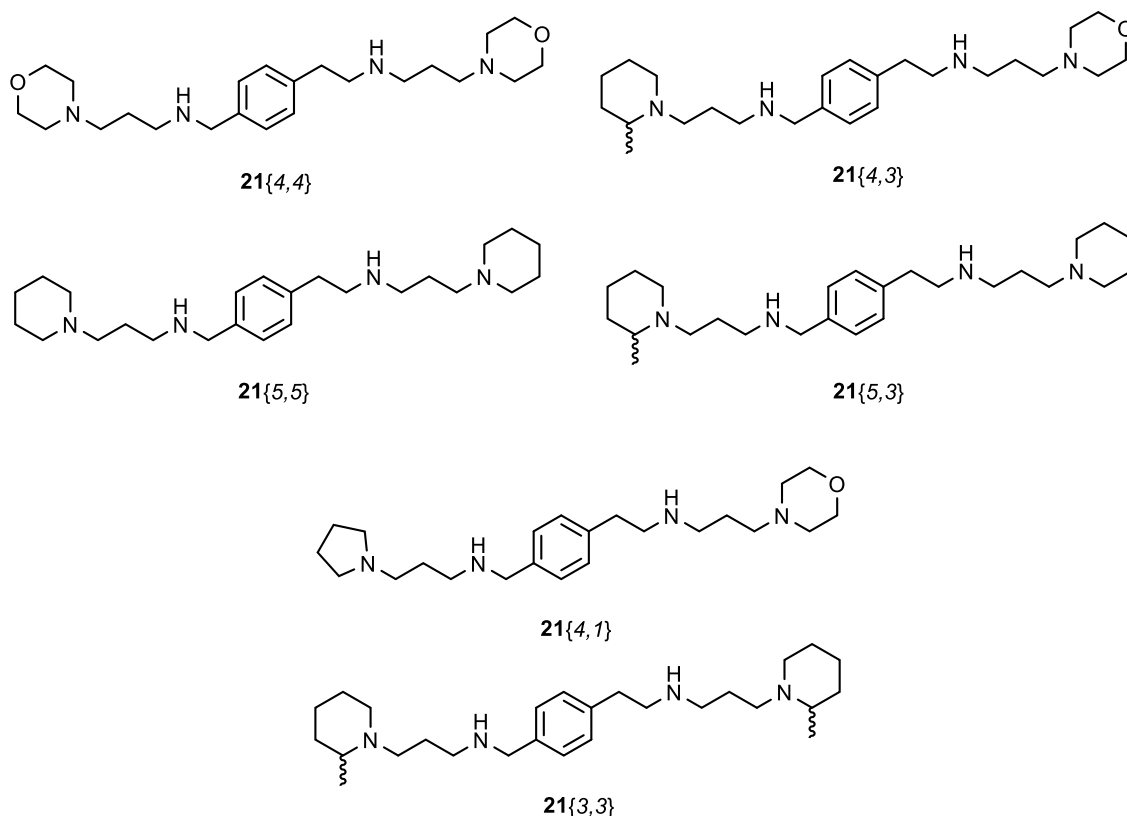


Figura 2.27. Molècules  $21\{x,y\}$  objectiu.

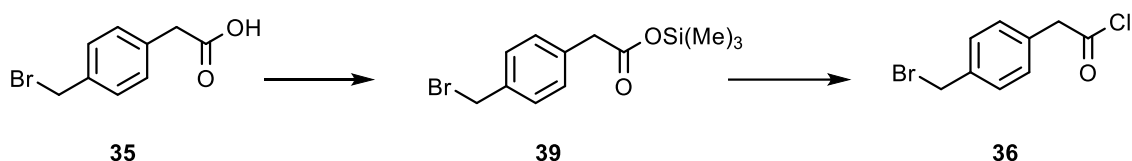
- Les molècules simètriques  $21\{3,3\}$ ,  $21\{4,4\}$  i  $21\{5,5\}$  ja es trobaven seleccionades en els primers estadis de la recerca. S'opta per eliminar la molècula  $21\{1,1\}$  com a objectiu ja que anteriorment no havia presentat ni els millors resultats d'activitat ni els millors valors de rendiment.<sup>[1-3,11]</sup>
- La molècula no simètrica  $21\{4,1\}$  es selecciona per comprovar que la ruta sintètica usant dues amines diferents a banda i banda de l'anell és viable ja que utilitzar dues de les amines que anteriorment havien donat millors resultats de rendiment.
- Es selecciona la molècula  $21\{4,3\}$  perquè conté l'amina  $2\{3\}$ , que és l'amina que millors resultats d'activitat biològica ha donat en molècules anàlogues sintetitzades anteriorment. També ens permetrà veure quin efecte té aquesta amina dins l'estructura en el referent a l'activitat anti-VIH, ja que la podrem comparar amb els resultats obtinguts de les altres molècules  $21\{4,y\}$  sintetitzades. A més, degut al fet que l'amina  $2\{4\}$  no presenta activitat antiviral a les quantitats màximes assajades, permetrà veure l'efecte de  $2\{3\}$  de forma aïllada.
- Finalment, la molècula  $21\{5,3\}$  es troba seleccionada perquè de les molècules no simètriques restants sembla la més interessant, ja que conté l'amina  $2\{3\}$  i l'amina  $2\{5\}$

que són les que han donat millors resultats d'activitat anti-VIH en molècules anàlogues sintetitzades prèviament en el GEM.<sup>[1-3,11]</sup>

### 2.1.6.1- Síntesi del clorur d'àcid 36

Es disposa de dues metodologies per a l'obtenció d'un clorur d'àcid a partir d'un àcid carboxílic: mitjançant un intermedi sililèster o utilitzant clorur de tionil com a reactiu.

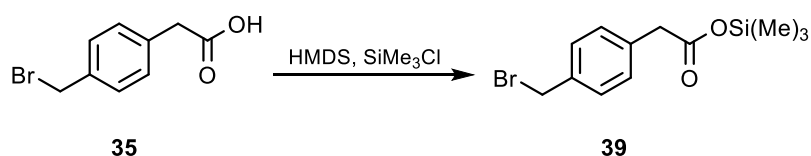
Mitjançant un intermedi sililèster:



**Figura 2.28.** Reacció de formació del clorur de 4-(bromometil)fenilacetil (**36**) a partir de l'àcid 4-(bromometil)fenilacètic (**35**) passant per l'intermedi 2-(4-(bromometil)fenil)acetat de trimetilsilil (**39**).

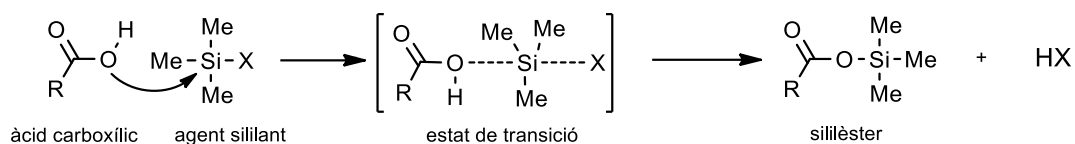
S'utilitza la metodologia usada per R. Puig de la Bellacasa basada en el treball de Pedersen i col·laboradors.<sup>[12]</sup> En aquesta s'obté el clorur d'àcid desitjat a partir d'un silil d'èster. En aquest cas, el tractament de **35** amb hexametildisilazà (HMDS) per a rendir el silil èster **39** que, posteriorment, es tracta amb clorur d'oxalil per a obtenir el clorur d'àcid **36** (Figura 2.28).

Seguint la metodologia de Pedersen i col·laboradors, per a aconseguir la sililació es deixa a reflux durant 16 hores una dissolució d'1,2-dicloroetà anhidre que conté per cada mol d'àcid, en aquest cas l'àcid 4-(bromometil)fenilacètic (**35**), dos mols d'HMDS (hexametildisilazan) i una quantitat catalítica de TMCS (trimetilclorosilà). Passat aquest temps, s'elimina el dissolvent a pressió reduïda obtenint-se directament l'èster sililat desitjat **39** (Figura 2.29) amb un rendiment del 97%.



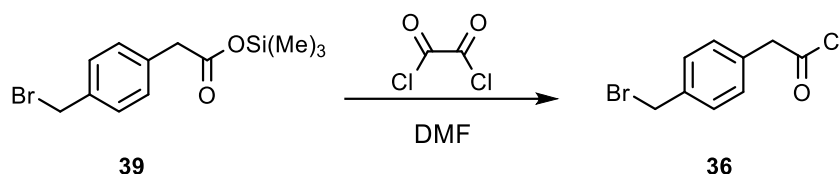
**Figura 2.29.** Obtenció del 2-(4-(bromometil)fenil)acetat de trimetilsilil (**39**) a partir de l'àcid 4-(bromometil)fenilacètic (**35**).

El mecanisme general per a la formació d'aquest èster sililat passa per un estat de transició bimolecular quan l'oxigen del grup OH de l'àcid carboxílic realitza un atac nucleòfil al silici de l'agent sililant, llavors es genera l'èster en expulsar el grup sortint (Figura 2.30).<sup>[13]</sup>



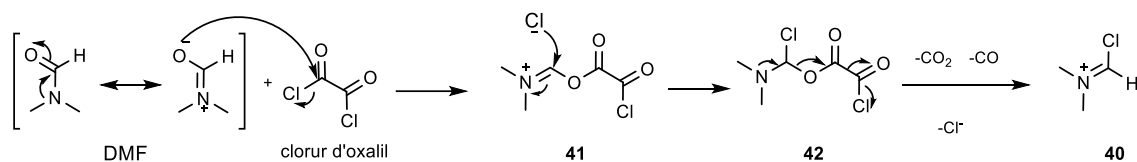
**Figura 2.30.** Mecanisme de reacció de la formació d'un sililèster a partir d'un àcid carboxílic.<sup>[13]</sup>

A partir del sililèster **39** es procedeix a l'obtenció del clorur d'àcid **36** utilitzant clorur d'oxalil en presència de dimetilformamida (DMF) com a catalitzador (Figura 2.31).



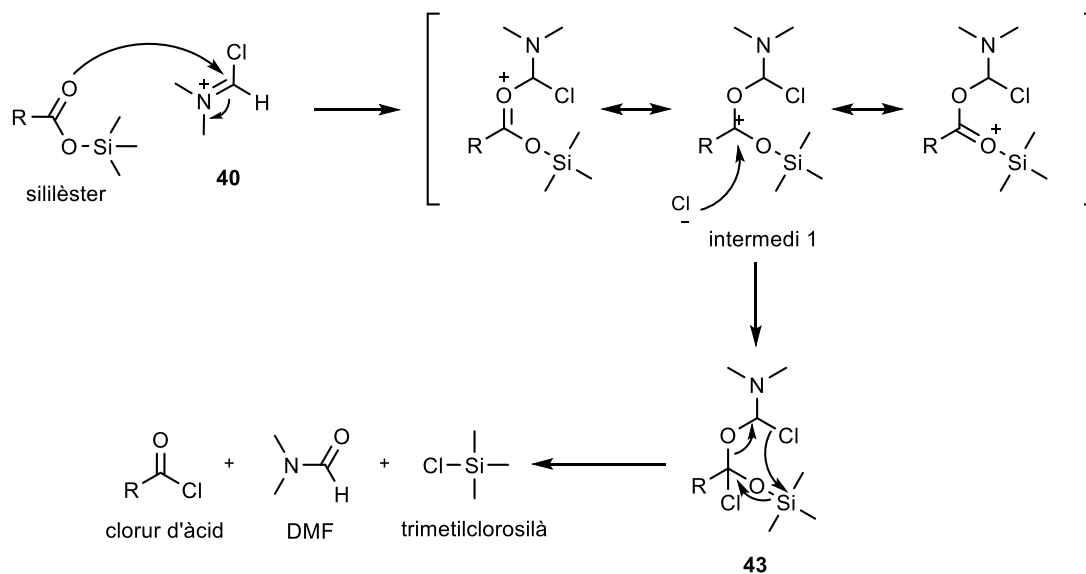
**Figura 2.31.** Reacció d'obtenció del clorur de 4-(bromometil)fenilacetil (**36**) a partir del 2-(4-(bromometil)fenil)acetat de trimetilsilil (**39**)

La reacció del clorur d'oxalil amb DMF és bàsica perquè la reacció funcioni, ja que sinó la formació del clorur d'àcid seria molt lenta. La causa és que aquesta reacció dona un catió imínic anomenat reactiu de Vilsmeier (**40**) que sent un intermedi de la reacció en provoca l'augment de la velocitat de la reacció (Figura 2.32).<sup>[14-17]</sup>



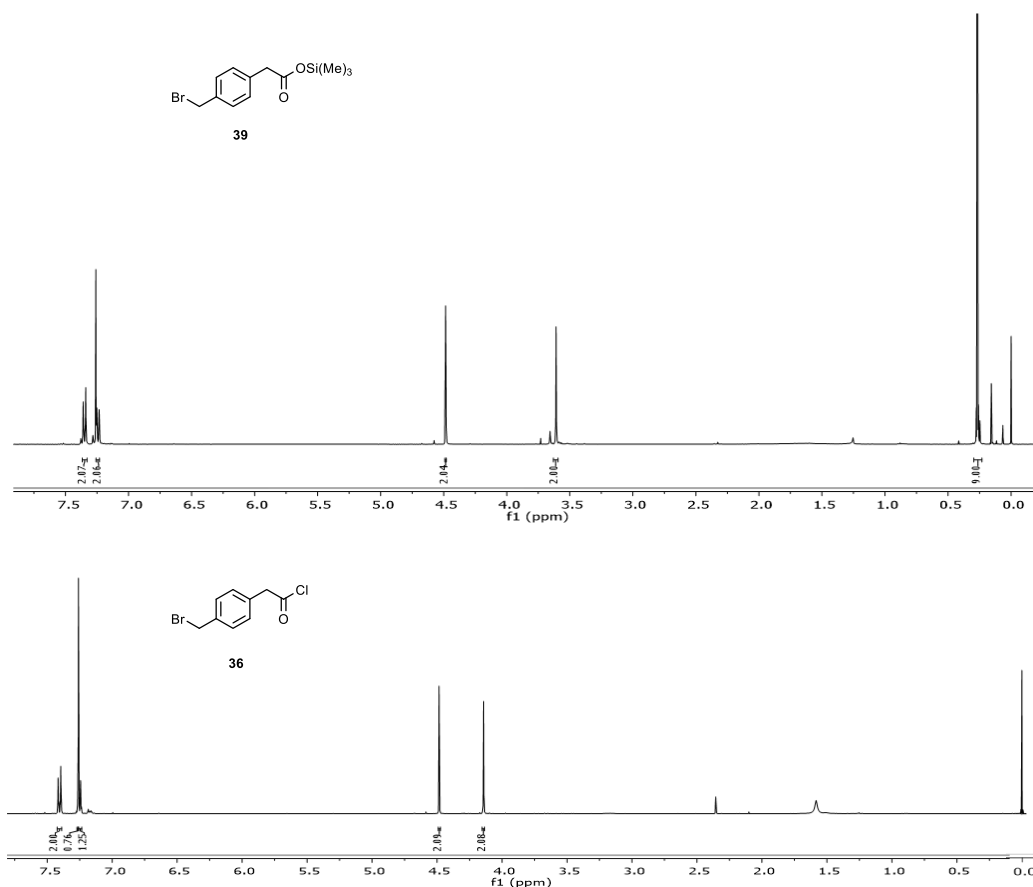
**Figura 2.32.** Mecanisme de reacció de formació del reactiu de Vilsmeier (**40**) a partir de dimetilformamida i clorur d'oxalil.

Aquest reactiu de Vilsmeier (**40**), generat en el si de reacció, és atacat per l'oxigen del grup carbonil de l'èster sililat donant lloc a un intermedi, com es veu en el mecanisme de la Figura 2.33, on aquest mateix carboni passa a tenir encara més caràcter electròfil. Aquest carboni de l'intermedi pateix un atac nucleòfil per part d'un clorur del medi per donar lloc a un segon intermedi **43**, que per reordenació electrònica intramolecular genera el clorur d'àcid desitjat, DMF i trimetilclorosilà.<sup>[15,17]</sup>



**Figura 2.33.** Mecanisme de reacció per a la formació del clorur d'àcid a partir d'un sillilèster i el reactiu de Vilsmeier(40).<sup>[17]</sup>

En el cas que ens ocupa, l'èster sillilat **39** es dissol en diclorometà on s'hi afegeixen 2.2 mols de clorur d'oxalil per cada mol del producte de partida **39** i DMF de forma catalítica. Es deixa en agitació durant una hora a 0°C i una hora més a temperatura ambient. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i es confirma la formació del clorur d'àcid **36** amb un rendiment quantitatiu.



**Figura 2.34.** Comparativa entre els espectres <sup>1</sup>H-RMN dels compostos **39** i **36**.



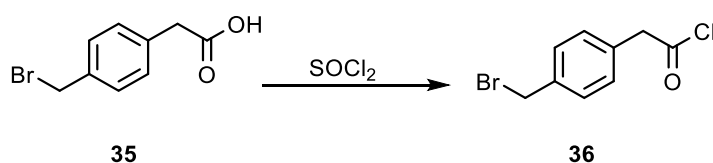
A la Figura 2.34 es mostra l'espectroscòpia de protó comparativa entre el compost **36** i el producte siliat **39**.

Es pot veure clarament la desaparició del senyal corresponent als protons dels grups metil a 0.25 ppm entre l'espectre superior del siliat **39** i l'espectre de la part inferior corresponent al clorur d'àcid **36**.

#### Mitjançant la utilització de clorur de tionil:

Segons el procediment de X. Chai i col·laboradors,<sup>[19]</sup> la via que utilitza clorur de tionil per la formació de clorurs d'àcid proporciona excel·lents rendiments i a la vegada aconseguix reduir el temps de reacció de 20h a 5h.

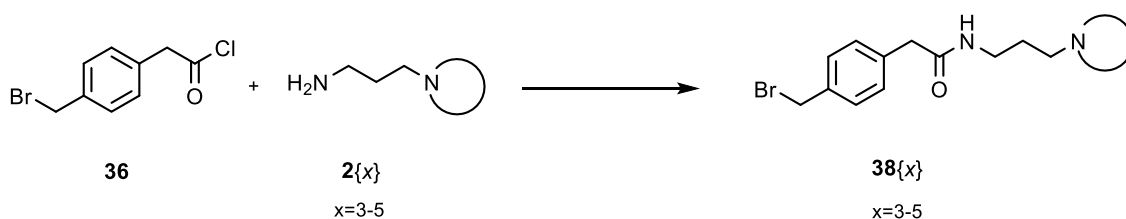
Es segueix doncs el procediment proposat per X. Chai en la qual per cada mol d'àcid 4-(bromometil)fenilacètic (**35**) s'afegeixen 1.1 mols de clorur de tionil dissolts en toluè. Després de 5 hores a 90°C s'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'obté el clorur d'àcid **36** amb un rendiment quantitatiu (Figura 2.35). Es comprova espectroscòpicament per <sup>1</sup>H-RMN i <sup>13</sup>C-RMN confirmant-se que es tracta del producte desitjat i que coincideixen amb els aconseguits mitjançant l'intermedi siliat.



**Figura 2.35.** Reacció d'obtenció del clorur d'àcid **36** a partir de la reacció de l'àcid 4-(bromometil)fenilacètic (**35**) amb clorur de tionil.

#### **2.1.6.2- Síntesi de les amides **38{x}****

Un cop obtingut el clorur d'àcid **36**, es procedeix a fer-lo reaccionar amb les diferents amines primàries **2{x}** donant lloc a la formació de les diferents amides **38{x}** (Figura 2.36) necessàries per sintetitzar les tetraamines seleccionades a partir de la Taula 2.2.



**Figura 2.36.** Síntesi de les amides **38{x}** a partir de l'àcid 4-(bromometil)fenilacètic (**36**).

Es troben diverses metodiques que descriuen la formació d'amides per la reacció entre un clorur d'àcid i una amina primària.<sup>[19-21]</sup> Però en moltes de les metodologies es genera àcid clorhídric *in situ*, aquest àcid pot formar el clorhidrat de l'amina **2{x}** que s'està utilitzant per formar l'amida. Aquest fet provoca la disminució dràstica del rendiment (com a màxim s'obtindria un 50%).<sup>[19]</sup>

Es decideix llavors utilitzar el procediment de Barge i col·laboradors<sup>[22]</sup>, posat en pràctica ja anteriorment en el GEM per L. Ros.<sup>[3]</sup> En ell s'utilitza una base inorgànica, en aquest cas carbonat potàssic, en suspensió en el dissolvent orgànic. Al neutralitzar l'àcid clorhídric generat s'obté CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O. Aquesta aigua pot causar problemes si reacciona amb el clorur d'àcid que utilitzem com a producte de partida, disminuint el rendiment. Per això cal utilitzar un excés d'aquesta base inorgànica. En les proves inicials amb un excés de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> es veu que evoluciona satisfactòriament i que dóna millors resultats que els experiments anteriors en els que s'utilitzava trietilamina.

En aquest procediment es dissol l'amina primària **2{x}** en acetonitril a 0°C amb un excés de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> com a base i es procedeix a l'addició lenta del clorur d'àcid **36** també dissolt en acetonitril. Es deixa agitant a temperatura ambient tota la nit (16h) per, posteriorment, filtrar el carbonat potàssic i evaporar el dissolvent a pressió reduïda. El cru de reacció obtingut té una puresa bastant elevada, però les impureses resultaran més difícils de separar per cromatografia de columna en etapes posteriors degut a la semblança de polaritats entre amines i amides. Per això es realitza un filtrat cromatogràfic amb alúmina com a fase estacionària i diclorometà com a eluent. S'obtenen les amides **38{x}** amb una puresa elevada. Per comprovar que la reacció ha tingut lloc amb èxit, es comprova amb un espectre COSY (Figura 2.37).

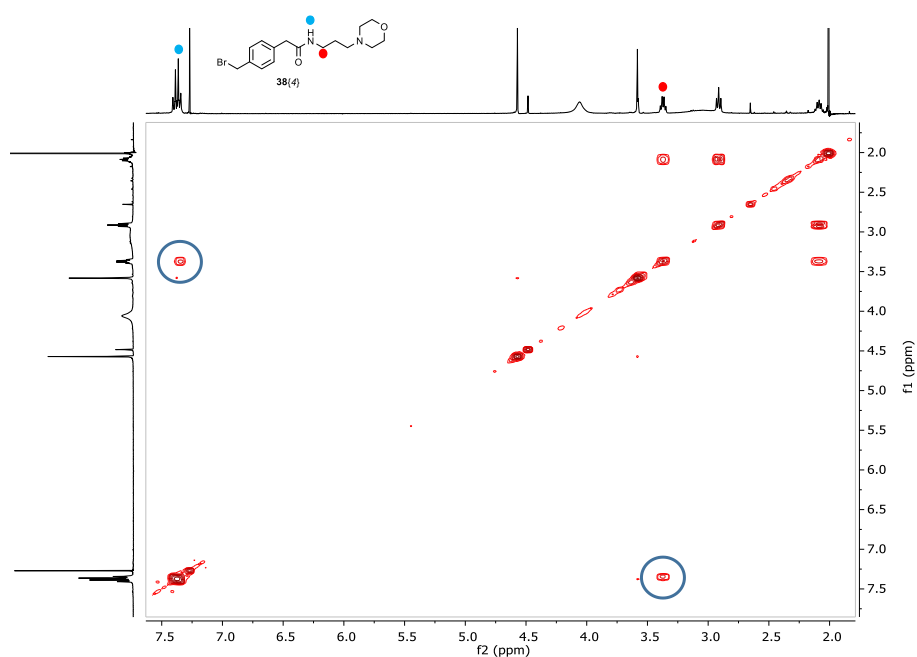


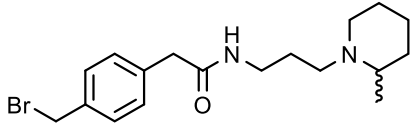
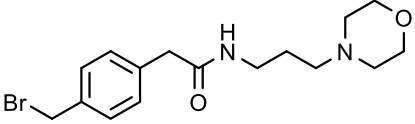
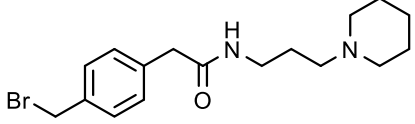
Figura 2.37. Espectre COSY de la molècula **38{4}**.

Per a visualitzar-ho, en la Figura 2.37 es mostra el cas de l'amida **38{4}**; en ella es pot veure un senyal marcat a 3.3 ppm que és el que indica l'acoblament entre el grup NH de l'amida i els protons del primer carboni de la cadena trimetilènica. Aquest acoblament no és present en l'amina de partida **2{4}**, els protons amínics de la qual apareixen a 1.9 ppm com un singlet i sense acoblaments.

Per a agilitzar el procés, es decideix substituir la realització de la reacció a temperatura ambient, per la qual es necessiten 20h, per realitzar la reacció en microones a 100°C en 25 minuts. Espectroscòpicament no s'aprecien diferències, així que es passa a utilitzar el microones com a font de calefacció en tots els casos.

En el cas concret en el que l'amina que es fa reaccionar és la 3-aminopropil-*N*-morfolina **2{4}**, el filtrat cromatogràfic es substitueix per una suspensió en cloroform, ja que s'observa que quan es dissol el cru de reacció en cloroform per realitzar proves espectroscòpiques, queda un precipitat oliós no soluble. Es decideix evaporar tot el dissolvent del cru i fer la suspensió en cloroform amb tot el cru. Resulta que l'amida **38{4}** es solubilitza en el cloroform mentre que les impureses queden sense solubilitzar en forma d'oli. Tot i això, per <sup>1</sup>H-RMN s'observa que una petita part del producte desitjat també queda atrapat en l'oli insoluble. Els compostos **38{x}** sintetitzats es reuneixen a la Taula 2.3 amb els seus respectius rendiments.

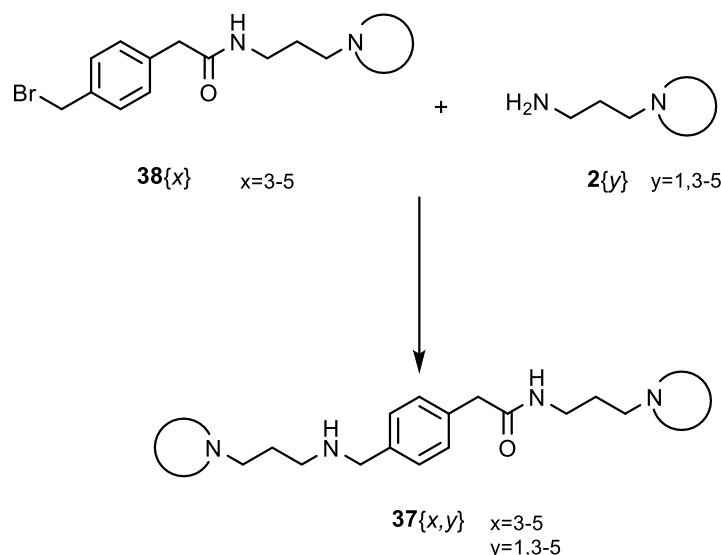
Taula 2.3. Compostos **38{x}** sintetitzats amb els seus respectius rendiments.

Molècula	Nom	Rendiment
	<b>38{3}</b>	20%
	<b>38{4}</b>	68%
	<b>38{5}</b>	30%

Els rendiments mostrats corresponen a la formació del clorur d'àcid juntament amb la reacció de formació de l'amida, ja que el primer pas és quantitatiu. Com era d'esperar, per les altres vegades prèvies que s'han utilitzat aquestes amines **2{x}** en el GEM, la reacció amb la 3-aminopropil-*N*-morfolina (**2{4}**) dóna uns rendiments molt més elevats que quan s'utilitzen altres amines.

### 2.1.6.3- Síntesi dels compostos $37\{x,y\}$ amina-amida

Un cop obtingudes les amides  $38\{x\}$ , es fan reaccionar amb les diferents amines  $2\{y\}$  per obtenir les molècules  $37\{x,y\}$  que contenen en un dels extrems una amina i a l'altre conservarien l'amida. Per a la seva obtenció es fa reaccionar les amines primàries  $2\{y\}$  amb els compostos  $38\{x\}$  corresponents, tal com es mostra a la Figura 2.38.



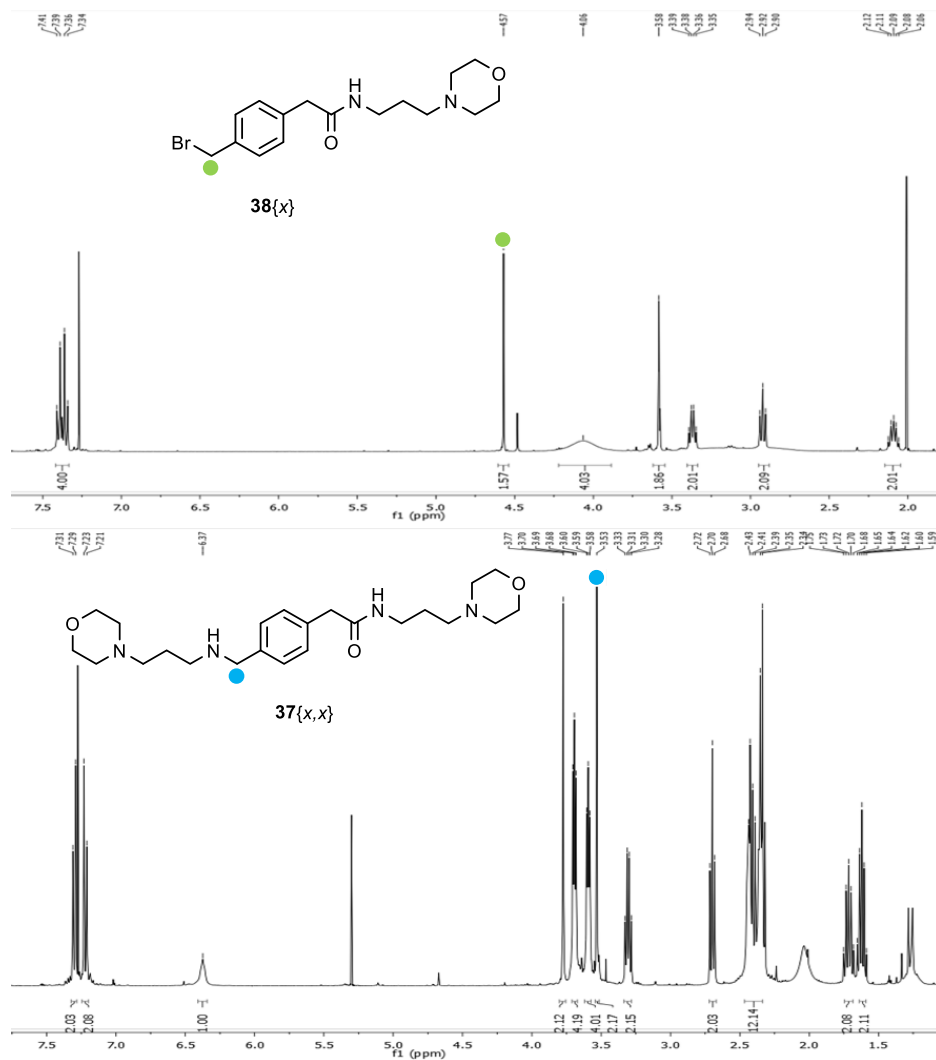
**Figura 2.38.** Reacció de formació dels compostos  $37\{x,y\}$  a partir de les amides  $38\{x\}$ .

Es decideix utilitzar com a metodologia sintètica la mateixa emprada per l'acilació, és a dir, calefacció de  $38\{x\}$  i  $2\{y\}$  en acetonitril i en presència de  $K_2CO_3$  per a neutralitzar el HBr generat *in situ*.

En realitzar la reacció utilitzant calefacció microones a  $100^\circ C$  durant 25 minuts, s'observa que la reacció no es produeix en gran mesura. Comprovant per CCF es veu que la major part del producte de partida queda sense reaccionar, per això es decideix mantenir el temps de reacció en 25 min però augmentar la temperatura de  $100^\circ C$  a  $150^\circ C$  per compensar la menor reactivitat del brom en posició benzílica respecte al clorur d'àcid.

Així doncs, es dissol un mol de l'amina primària  $2\{y\}$  amb un excés de  $K_2CO_3$  com a base en acetonitril a  $0^\circ C$ , un mol del compost  $38\{x\}$  també dissolt en acetonitril s'addiciona gota a gota (el corresponent a la molècula  $37\{x,y\}$  que es volia aconseguir). Es porta a  $150^\circ C$  durant 25 minuts per calefacció de microones. El cru es purifica realitzant una columna cromatogràfica automàtica d'alúmina bàsica amb una rampa d'eluent de diclorometà amb metanol i amoníac (100:0:0 a 98:2:0.5 en 60 minuts). Finalment s'obtenen els compostos  $37\{x,y\}$  desitjats amb rendiments compresos entre el 20% i el 70%.

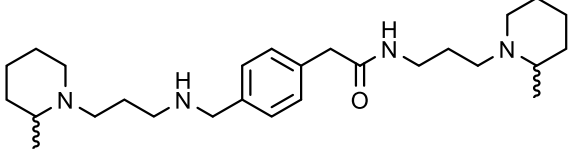
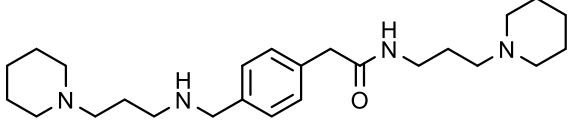
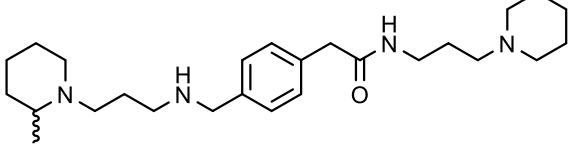
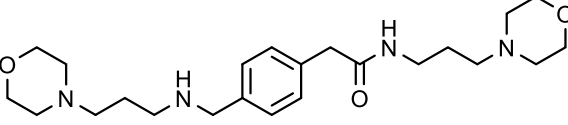
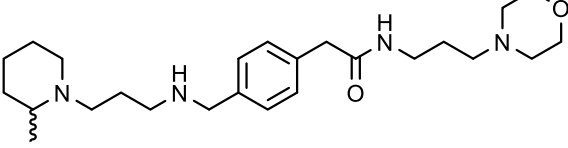
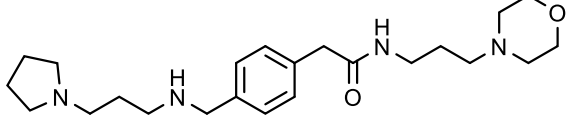
Es comprova l'obtenció de les molècules desitjades comparant els espectres de  $^1\text{H}$ -RMN, ja que el senyal dels protons del carboni geminal del brom en la molècula **38**{x} apareixen a 4.6 ppm mentre que un cop enllaçada la segona amina **2**{y} els mateixos protons apareixen al voltant de 3.5 ppm (Figura 2.39).



**Figura 2.39.** Comparació dels espectres de  $^1\text{H}$ -RMN per al cas concret de les molècules **38**{4} i **37**{4,4}.

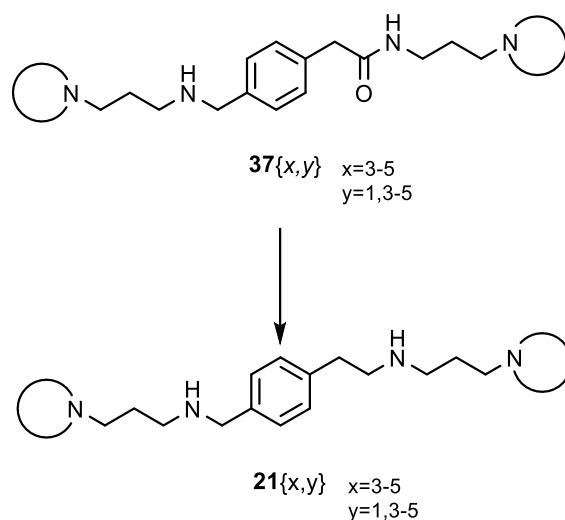
En la Taula 2.4 es mostra el llistat de molècules **37**{x,y} sintetitzades de la selecció feta de la Taula 2.2.

**Taula 2.4.** Taula de resultats de rendiment per les molècules sintetitzades  $37\{x,y\}$  a partir dels compostos  $38\{x\}$ .

Molècula	Nom	Rendiment
	$37\{3,3\}$	32%
	$37\{5,5\}$	18%
	$37\{5,3\}$	27%
	$37\{4,4\}$	34%
	$37\{4,3\}$	20%
	$37\{4,1\}$	30%

#### 2.1.6.4- Reducció de les molècules $37\{x,y\}$

L'últim pas necessari per transformar les molècules  $37\{x,y\}$  en les tetraamines  $21\{x,y\}$  consisteix en realitzar la reducció del grup amida per donar un grup amina tal com es representa en la Figura 2.40.

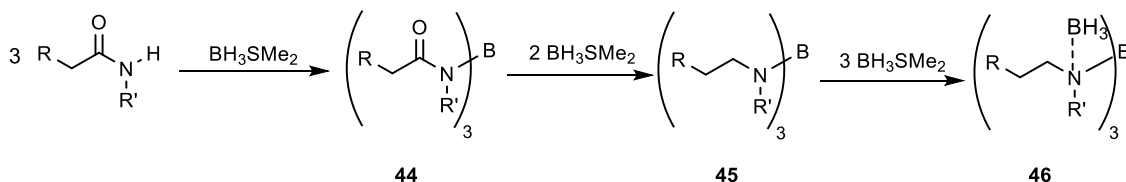


**Figura 2.40.** Reacció de reducció de les molècules **37**{x,y} per obtenir les molècules finals **21**{x,y}.

Hi ha diverses metodologies per reduir una amida monosubstituïda com la que ens trobem en les molècules que ens ocupen;<sup>[23-25]</sup> però donada la semblança amb les quimioteques sintetitzades anteriorment en el GEM per R. Puig de la Bellacasa i L. Ros,<sup>[2,3]</sup> es decideix en primera instància utilitzar les mateixes condicions de reacció, concretament amb borà ( $BH_3$ ) com a reductor.

Anteriorment s'havia utilitzat el complex de borà tetrahidrofuran ( $BH_3 \cdot THF$ ), però en la tesi doctoral de R. Puig de la Bellacasa<sup>[2]</sup> es van demostrar les millors característiques del complex borà-sulfur de dimetil ( $BH_3 \cdot SMe_2$ ) (BDS) com a reductor.

Les etapes de la reducció amb BDS descrites per H. C. Brown<sup>[26]</sup> es representen en la Figura 2.41. El procés comença amb la reacció del borà amb els hidrògens de tres amides, formant un intermedi **44**. Tot seguit dos borans redueixen els tres carbonils i formen la nova forma molecular **45**. Finalment tres noves molècules de borà formen un complex amb l'intermedi **45** per a formar el complex **46**. Un cop format el complex borà **46** aquest es pot trencar per alliberar les tres amines amb una hidròlisi àcida seguida d'un rentat posterior amb NaOH.<sup>[26]</sup>



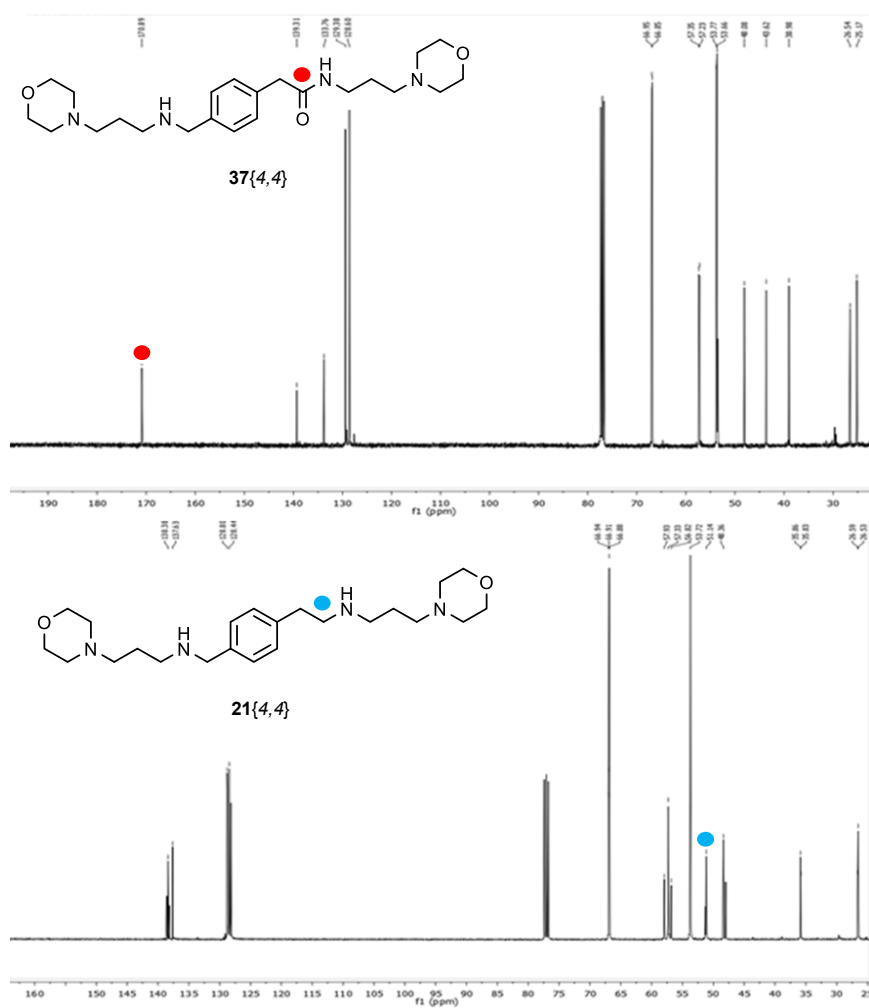
**Figura 2.41.** Etapes de reacció per a la reducció d'un grup amida utilitzant el complex borà-sulfur de dimetil (BDS) segons el treball de H. C. Brown.<sup>[26]</sup>

Com s'observa a la Figura 2.41, s'utilitzen 6 mols de BDS per cada 3 mols d'amida que es volen reduir, per tant la relació es de 2:1. A fi d'assegurar la conversió complerta, en aquest cas s'utilitza un excés de 6:1.

Es segueix la metodologia adaptada del treball realitzat per Masuko i col·laboradors<sup>[27]</sup> i per Routaboul i col·laboradors<sup>[28]</sup>. Es dissol la corresponent amida **37**{x,y} en THF, per, seguidament, afegir-hi el BDS lentament en fred amb una proporció en excés de 6:1. Es porta a reflux durant 6 hores. Posteriorment s'afegeix una dissolució de HCl/MeOH 1.25 M per a realitzar la hidròlisi àcida, i es deixa una hora més a reflux, passat aquest temps s'elimina el dissolvent a pressió reduïda i es redissol el sòlid obtingut amb una dissolució de NaOH (10%), realitzant diverses extraccions amb clorur de metilè. Finalment s'asseca sobre sulfat magnèsic anhidre i s'evapora el dissolvent, obtenint la corresponent tetraamina **21**{x,y} en forma d'oli que es purifica per cromatografia automàtica de columna utilitzant alumina bàsica com a fase estacionària i com a eluents una mescla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub> amb una rampa de 100:0:0 a 98:2:0.5 en 60 minuts. Amb aquest procediment s'obtenen els productes desitjats **21**{x,y} amb rendiments compresos entre el 30% i el 50%.

L'assignació de les estructures **21**{x,y} es realitza mitjançant espectroscòpia de <sup>1</sup>H-RMN i <sup>13</sup>C-RMN. Especialment rellevant és la desaparició del senyal de carboni a 170 ppm corresponent al grup carbonil de les molècules **21**{x,y}. Un exemple comparatiu es mostra en la Figura 2.42.





**Figura 2.42.** Comparació dels espectres  $^{13}\text{C}$ -RMN de la molècula **37{4,4}** i la **21{4,4}** en la que s'aprecia la desaparició del senyal característic del grup carbonil.

En la Taula 2.5 es mostren els rendiments obtinguts per les diferents molècules **21{x,y}** sintetitzades tant el del pas de reducció final com el rendiment global per a la síntesi de la molècula.

Taula 2.5. Conjunt de molècules objectiu **21**<sub>{x,y}</sub> sintetitzades amb els seus respectius rendiments.

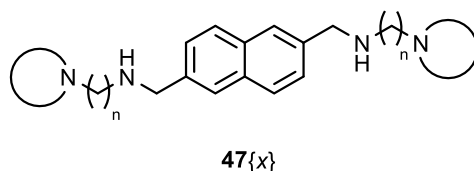
Molècula	Nom	Rendiment	Rendiment global
	<b>21</b> <sub>{3,3}</sub>	45%	3%
	<b>21</b> <sub>{4,4}</sub>	46%	11%
	<b>21</b> <sub>{4,1}</sub>	48%	10%
	<b>21</b> <sub>{4,3}</sub>	47%	6%
	<b>21</b> <sub>{5,5}</sub>	37%	2%
	<b>21</b> <sub>{5,3}</sub>	36%	3%

S'observa que els rendiments globals són força baixos. Això és degut a la necessitat de realitzar una separació cromatogràfica en cada pas per a separar el producte desitjat de les impureses, que presenten una polaritat molt semblant. Aquestes separacions no han pogut ser completes en cap dels passos, obligant a descartar-ne part del producte desitjat per estar impurificat amb el corresponent producte de partida.

## 2.2- Espaiador naftalènic

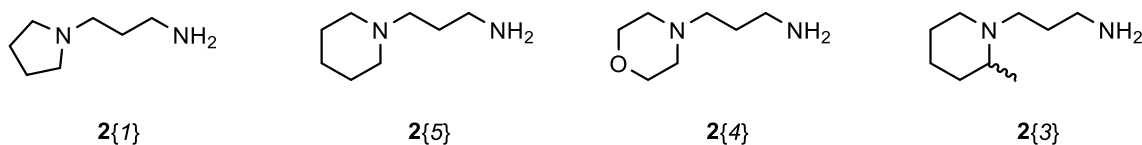
Fins a aquest moment tan sols s'han utilitzat variants de l'espaiador *p*-fenilbismetilènic present al compost AMD3100, variant-ne les cadenes metilèniques laterals tal com es mostra en la Figura 2.1 i en la nova quimioteca sorgida de l'apartat 2.1. Per aquest motiu, en el present treball es pensa en introduir un nou espaiador que no es tracti d'una variació directa dels ja utilitzats.

Per no trencar completament amb l'espaiador fenílic que proporciona bons resultats d'activitat anti-VIH, s'opta per un espaiador naftalènic. S'escull aquest perquè tot i tractant-se d'un espaiador diferent i no una variació dels anteriors, manté el caràcter cíclic i aromàtic. Així, en la Figura 2.43 es mostra l'estructura general de les noves molècules a sintetitzar.



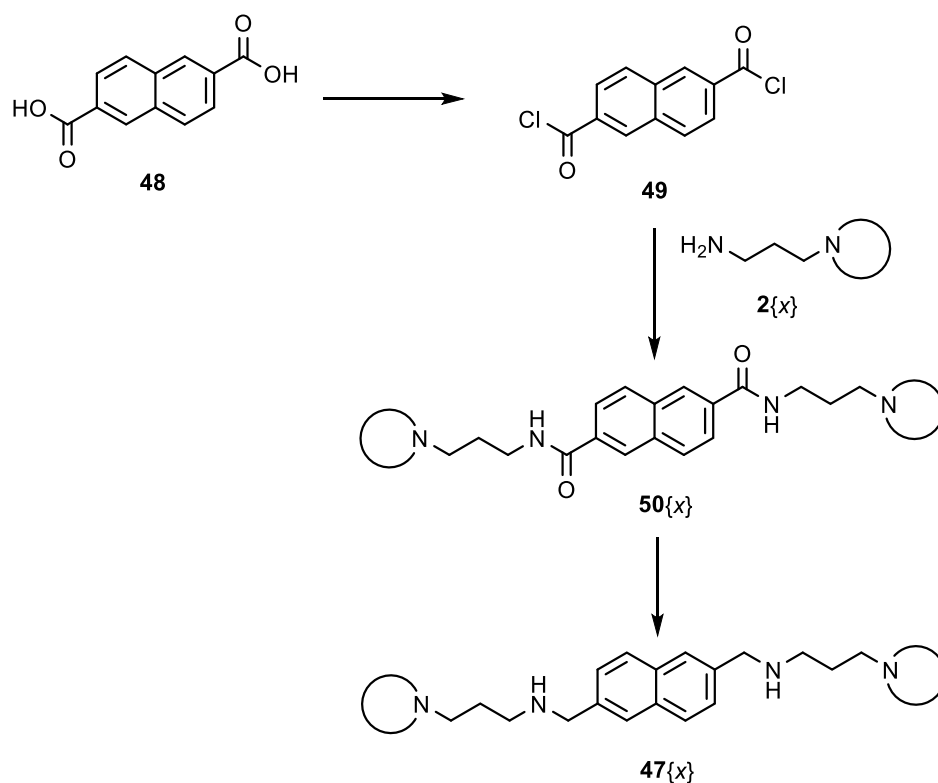
**Figura 2.43.** Estructura general de les molècules **47{x}** amb el nou espaiador naftalènic.

Les amines laterals escollides són les mateixes que en la quimioteca de l'espaiador no simètric (apartat 2.1) que ja havien estat utilitzades en altres quimiotèques del grup anteriorment. Això permet poder comparar els resultats dels compostos anàlegs i veure així l'efecte que genera el nou espaiador (Figura 2.44).



**Figura 2.44.** Amines laterals escollides per a la nova quimioteca.

La ruta sintètica proposada per a obtenir els compostos **47{x}** objectiu és la que es mostra en la Figura 2.45.



**Figura 2.45.** Ruta sintètica per a l'obtenció de les molècules objectiu **47{x}**.

Es parteix de l'àcid naftalè-2,6-dicarboxílic (**48**) del qual se n'obté el clorur d'àcid corresponent **49**. El clorur d'àcid es fa reaccionar amb l'amina primària desitjada **2{x}** per substitució nucleofílica per obtenir l'amida **50{x}**, que es redueix per rendir les tetraamines **47{x}** objectiu.

### 2.2.1- Obtenció del clorur d'àcid **49**

En el cas que ocupa l'apartat 2.1.6.1 ja s'ha obtingut un clorur d'àcid a partir de l'àcid carboxílic corresponent per dues vies possibles (detallades en el mateix apartat).

En el cas concret de l'àcid carboxílic **48**, la formació del clorur d'àcid **49** mitjançant clorur de tionil segons la metodologia proposada per X. Chai i col·laboradors<sup>[18]</sup> no rendeix el producte desitjat a causa de la seva baixa solubilitat en toluè.

Per tant, s'opta per la via alternativa de dos passos del treball de Pedersen i col·laboradors<sup>[12]</sup> vist també en l'apartat 2.1.6.1 en el cas de l'espaiador no simètric.

El primer dels dos passos és la formació d'un sililèster dissolvent l'àcid carboxílic en 1,2-dicloroetà anhidre amb dos equivalents d'HMDS (hexametildisilazan) i trimetilclorosilà en quantitat catalítica. Al cap de 17h a reflux s'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'obté el sililèster desitjat amb un rendiment del 99% (Figura 2.46).

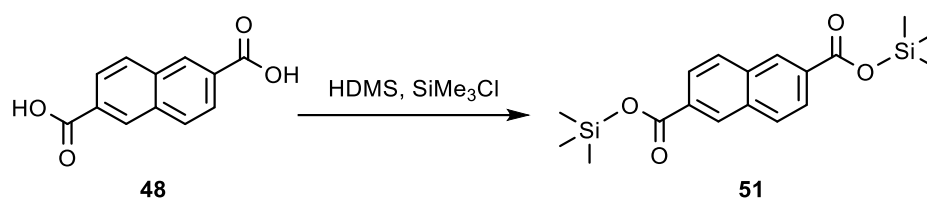


Figura 2.46. Reacció de formació del sililèster **51** a partir de l'àcid carboxílic **48** corresponent.

Un cop obtingut l'intermedi sililèster **51**, es procedeix a obtenir el clorur d'àcid corresponent; aquesta reacció té lloc posant en contacte l'intermedi **51** amb 2.2 equivalents de clorur d'oxalil i quantitat catalítica de DMF. Es deixa en agitació en bany de gel una hora i una hora més a temperatura ambient. En eliminar el dissolvent a pressió reduïda s'obté el clorur d'àcid **49** desitjat en forma de sòlid blanc cristal·lí amb un rendiment del 99% (Figura 2.47).

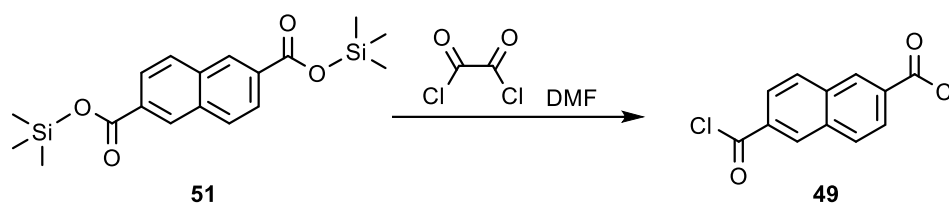
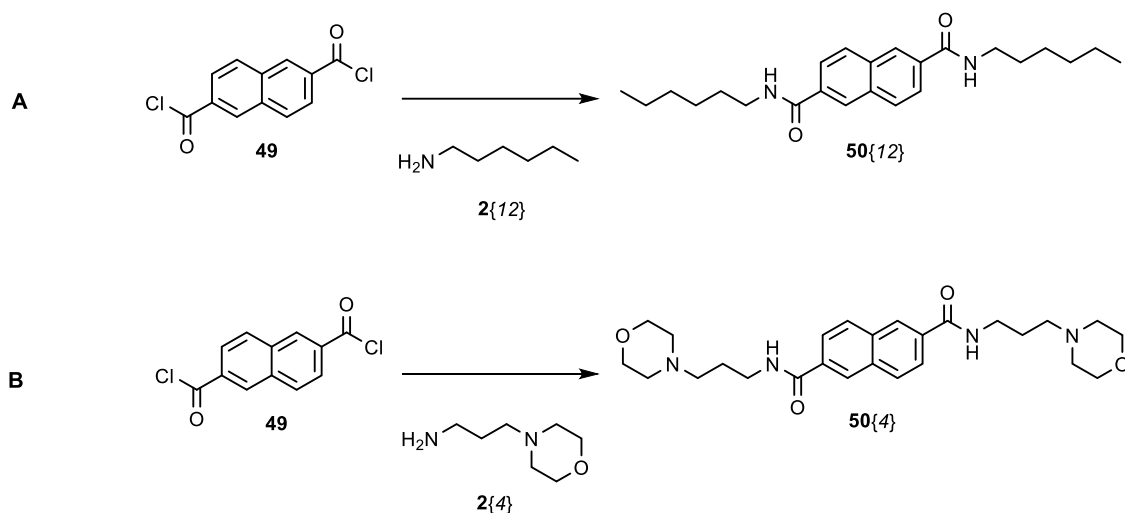


Figura 2.47. Reacció de formació del clorur d'àcid **49** a partir del sililèster **51**.

### 2.2.2- Obtenció de les diamides **50{x}**

Per a l'obtenció de les diamides **50{x}** per substitució nucleofílica del clorur d'àcid **49** amb l'amina corresponent **2{x}**, s'utilitza la metodologia descrita per Schotten i col·laboradors<sup>[19]</sup> en la que s'utilitza una base orgànica (triètilamina) per a neutralitzar l'àcid clorhídric generat *in situ*, evitant així que aquest reaccioni amb les amines primàries **2{x}**.

Per optimitzar la ruta sintètica, es decideix utilitzar les amines primàries **2{12}** i **2{4}** (Figura 2.48). En el cas de la primera, per tractar-se d'una amina composta tan sols per una cadena alifàtica, fet que permet veure la viabilitat de la reacció sense interacció dels diferents heterocicles. La segona amina **2{4}** ja s'havia utilitzat anteriorment per a optimitzar una nova ruta sintètica degut als seus alts rendiments i la seva disponibilitat comercial. En aquest cas, tot i tractant-se d'una metodologia ja posada en pràctica anteriorment, es decideix fer les proves d'optimització a causa de la baixa solubilitat que havia presentat el nou espaiador, que podria portar problemes en la reactivitat.



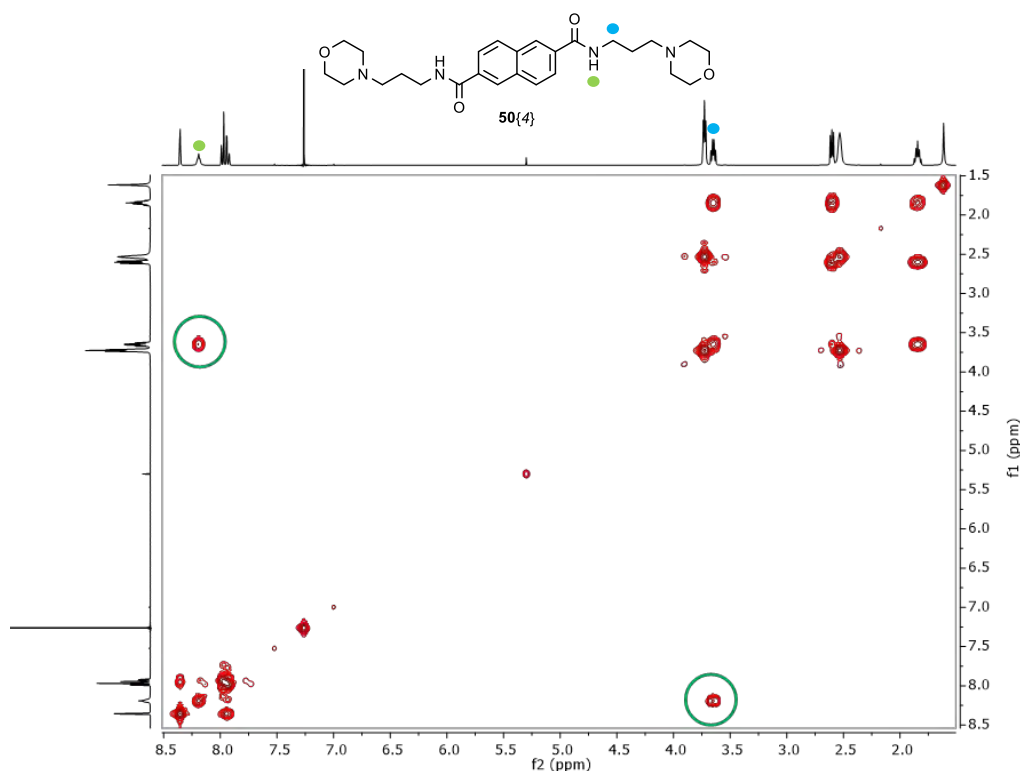
**Figura 2.48.** Reacció de formació de les diamides **50{12}** i **50{4}**.

El clorur d'àcid **49** es dissol en diclorometà en un bany de gel. S'afegeix gota a gota una mescla de 2 equivalents de l'amina primària **2{x}** i 4 equivalents de trietilamina. Es deixa agitant a temperatura ambient durant 19h.

En el cas de l'amina **2{12}** (reacció A), apareix un precipitat blanc cristal·lí corresponent al producte diamida **50{12}** que tan sols ha de ser filtrat. El rendiment obtingut és del 60% amb una alta puresa.

En la reacció B, el precipitat obtingut no és pur, per tant requereix d'una purificació mitjançant un rentat amb una dissolució al 25% en pes de  $K_2CO_3$  seguit d'extraccions de  $CH_2Cl_2/H_2O$ . Finalment s'acaba de purificar mitjançant una columna cromatogràfica automàtica d'alúmina bàsica amb una rampa d'eluent de diclorometà amb metanol i amoníac (100:0:0 a 98:2:0.5 en 50 minuts). En evaporar a pressió reduïda el dissolvent, s'obté la diamida desitjada **50{4}** amb un rendiment del 52%.

Es comprova l'obtenció de les molècules desitjades **50{4}** i **50{12}** mitjançant un espectre COSY en el que es poden identificar els seus senyals característics i on es pot veure clarament l'acoblament entre el protó del grup NH i els protons del primer carboni de la cadena metilènica de l'amina lateral tal com es mostra en la Figura 2.49 pel cas concret de la diamida **50{4}**.



**Figura 2.49.** Espectre COSY del compost **50{4}** on hi ha senyalat l'acoblament entre els protons del grup NH i els protons del metilè adjacent.

S'intenta reduir el temps de reacció realitzant la reacció en microones en comptes de calefacció estàndard, però el cru de reacció que en sorgeix és molt més complex i en dificulta la purificació. Per tant s'opta per seguir la metodologia descrita anteriorment sense alteracions.

La reacció amb la resta d'amines laterals en cap cas desemboca en la precipitació espontània del producte desitjat excepte en el cas en el que s'utilitza l'amina **2{1}** per tant es segueix la via descrita per la diamida **50{4}**. En la Taula 2.6 es presenten els diferents rendiments obtinguts per a cada un.

**Taula 2.6.** Compostos **50{x}** amb els rendiments respectius.

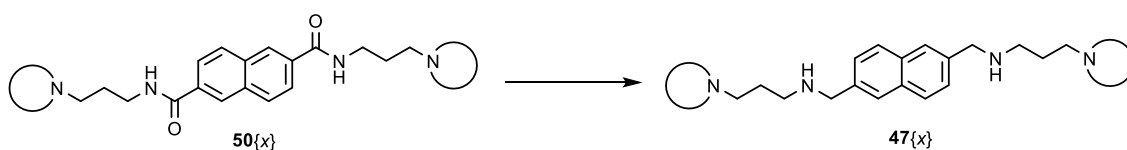
Molècula	Nom	Rendiment
	<b>50{12}</b>	60%
	<b>50{4}</b>	52%

Molècula	Nom	Rendiment
	<b>50{5}</b>	56%
	<b>50{3}</b>	49%
	<b>50{1}</b>	86%

Al contrari que en casos anteriors del grup, el millor rendiment no correspon a la reacció amb la 3-aminopropil-*N*-morfolina (**50{4}**) tal com hauríem esperat sinó al compost **50{1}** realitzat a partir de la 3-aminopropil-*N*-pirrolidina. Aquesta dada s'explica pel fet que el compost **50{1}** precipita espontàniament en el si de la reacció no precisant de passos de purificació.

### 2.2.3- Reducció de les diamides **50{x}**

Un cop obtingudes totes les diamides **50{x}** desitjades, es procedeix a realitzar l'últim pas de la ruta sintètica proposada; la reducció per a obtenir les tetraamines objectiu (Figura 2.50).



**Figura 2.50.** Reacció de reducció de les diamides **50{x}** per obtenir les tetraamines **47{x}**.

Tal com ja s'ha mostrat en el cas de l'espaiador no simètric, s'usa la metodologia proposada per Masuko i col·laboradors<sup>[27]</sup> en la que utilitza el complex de borà-sulfur de dimetil (BDS) com a agent reductor. Es dissol la diamida en THF, es posa en un bany de gel, i seguidament s'afegeix el BDS gota a gota en una relació 6:1 respecte a cada grup amida a reduir, per tant, 12 equivalents per a cada equivalent de molècula **50{x}**.

Tot i que la metodologia proposada per Masuko i la que havíem utilitzat prèviament al grup descriu un reflux de 6h, a causa de la baixa solubilitat dels productes amb l'espaiador naftalènic



es comprova que la conversió no és completa. En treballs com els de Pardo i col·laboradors<sup>[29]</sup> o Young i col·laboradors<sup>[30]</sup> per molècules semblants s'augmenta el temps de reacció a 17-20h. Per assegurar la màxima conversió es comprova que en el nostre cas cal deixar la reacció a reflux durant 18h.

Posteriorment, s'afegeix una dissolució HCl/MeOH 1.25M fins a pH àcid i es deixa 3 hores agitant a temperatura ambient. Passat aquest temps, s'afegeix gota a gota i en fred una dissolució de NaOH 13M fins a aconseguir pH bàsic. Finalment es realitza una extracció amb clorur de metilè.

El cru obtingut no és pur, tot i que s'identifica perfectament el compost final desitjat com a producte majoritari, per tant encara cal un pas de purificació final. Anteriorment en utilitzar aquesta metodologia, s'havia purificat mitjançant una cromatografia automàtica de columna, però en aquest cas, el resultat obtingut encara queda impurificat tot i la separació cromatogràfica, per tant, s'opta per purificar mitjançant la formació de clorhidrats.

Tenint en compte que disposem de 4 nitrògens protonables, es necessitarien 4 equivalents d'HCl per cada equivalent de tetraamina (2 en el cas de **47**{12}), per assegurar la completa formació i que totes les sals formades estiguin en forma de tetraclorhidrat, s'afegeix un lleuger excés d'HCl/MeOH 1.25M i es deixa agitant a temperatura ambient durant 3h. Passat aquest temps es pot apreciar la formació d'un sòlid blanc. Es filtra el sòlid i es neteja amb acetona i MeOH. Finalment es dissol en aigua, es neutralitza amb una dissolució de NaOH (10%) i s'extreu amb diclorometà.

En eliminar el dissolvent a pressió reduïda s'obtenen les tetraamines desitjades **47**{x}.

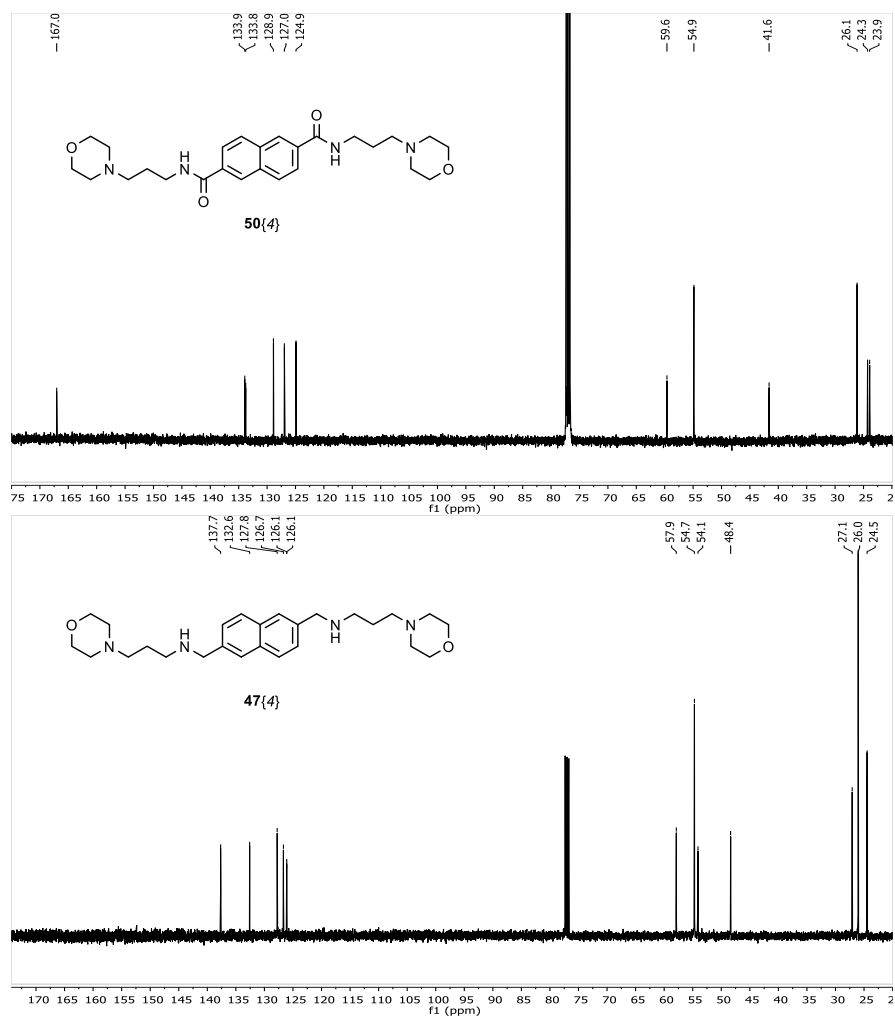
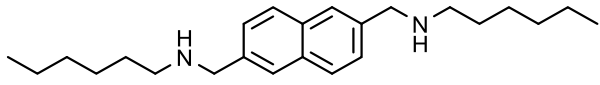
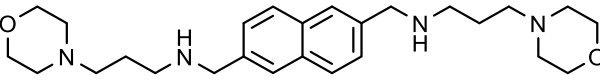
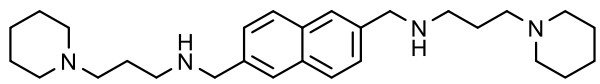
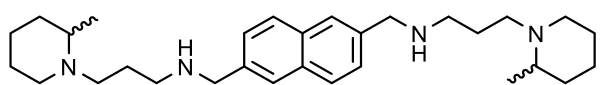
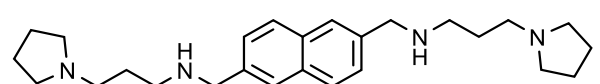


Figura 2.51. Comparació dels espectres de <sup>13</sup>C-RMN dels compostos **50(4)** i **47(4)**.

Es comprova la correcta reducció i obtenció de les tetraamines **47{x}** desitjades mitjançant espectroscòpia RMN tant de protó com de carboni, essent essencial per a la comprovació el fet de veure desaparèixer el senyal de <sup>13</sup>C-RMN del carbonil del grup amida al voltant de 170 ppm (Figura 2.51).

En la Taula 2.7 es mostren els rendiments obtinguts en la reducció de les diferents diamides **50{x}** per obtenir les tetraamines objectiu **47{x}**, així com els rendiments globals per a la síntesi de cada compost.

**Taula 2.7.** Compostos **47{x}** amb els seus rendiments respectius i el rendiment global per a obtenir-los.

Molècula	Nom	Rendiment	Rendiment Global
	<b>47{12}</b>	15%	9%
	<b>47{4}</b>	49%	25%
	<b>47{5}</b>	55%	30%
	<b>47{3}</b>	36%	17%
	<b>47{1}</b>	45%	38%

Tots els rendiments en el pas de la reducció de les diamides són semblants, al voltant del 40-50% excepte el cas concret de la molècula **47{12}** en el que és de tan sols el 15%, aquesta baixa reactivitat és conseqüència de la seva baixa solubilitat, cosa que en dificulta la reducció.

Els rendiments globals d'obtenció, tot i ser més elevats que en el cas dels espaiadors no simètrics (Taula 2.5), es queden al voltant del 30%. Aquesta disminució és deguda principalment als diversos passos de purificació realitzats, tals com la columna cromatogràfica, la formació de clorhidrats en l'obtenció de la diamida o les diverses extraccions líquid-líquid en ambdós passos finals.

### 2.3- Anàlisi dels resultats d'activitat anti-VIH

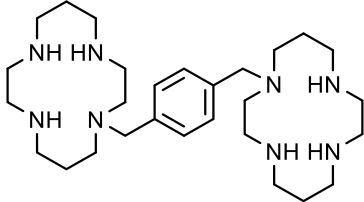
Un cop sintetitzades totes les molècules objectiu amb els dos nous espaiadors, es procedeix a l'avaluació de la seva activitat biològica.

Les avaluacions biològiques han estat portades a terme pel grup del Dr. Esté al Laboratori de Retrovirologia de la Fundació IrsiCaixa de l'Hospital Germans Trias i Pujol mitjançant un assaig colorimètric de MTT (bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazole), sal de color groc que només metabolitzen les cèl·lules vives reduint-la a sal de formazan, de color lilós<sup>[31]</sup>. Les cèl·lules usades en l'assaig són del tipus MT-4 (línia cel·lular de cèl·lules T humanes aïllades en pacients amb leucèmia de cèl·lules T) i s'infecten amb la soca NL4-3 *wild type* amb les que es comprova

la viabilitat de les cèl·lules MT-4 infectades ( $EC_{50}$ ) i sense infectar ( $CC_{50}$ ) després d'haver estat incubant durant 5 dies el sistema.

S'avaluen els valors d' $EC_{50}$  (concentració efectiva 50, la quantitat necessària per inhibir el 50% de la mort cel·lular a causa del VIH-1 en aquest cas) i  $CC_{50}$  (concentració citotòxica 50, la quantitat necessària per provocar la mort del 50% de les cèl·lules degut a la toxicitat del compost) per a les nostres famílies de molècules (Taulas 2.10 i 2.12) i per a l'AMD3100 (Taula 2.8), usada com a compost de referència. Les Taulas 2.9 i 2.11 mostren els resultats d'activitat obtinguts anteriorment en el grup per molècules anàlogues a les sintetitzades.

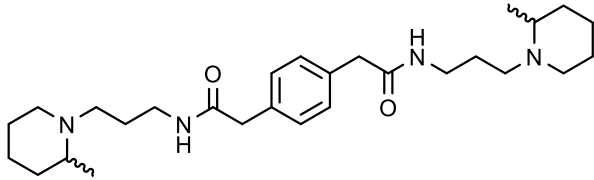
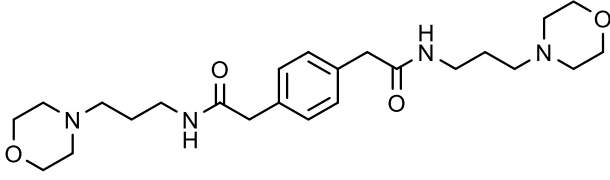
**Taula 2.8.** Dades d'activitat anti-VIH per a la molècula AMD3100 obtingudes en un assaig paral·lel realitzat per a les nostres molècules objectiu. La soca de VIH utilitzada és la NL4-3 wt en cèl·lules MT-4.

Molècula	Nom	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	$CC_{50}$ ( $\mu$ M)
	AMD3100	0.003	>1.989

S'analitzaran dues característiques de les noves molècules: els nous espaiadors i la presència del grup funcional amida.

Anteriorment, com es pot veure en la Taula 2.9, ja s'havien avaluat compostos amb la funcionalitat amida present. Els presents en aquesta taula són els anàlegs dels productes sintetitzats en el present treball, que ens ajudaran a posar en perspectiva els resultats obtinguts.

**Taula 2.9.** Valors d'activitat anti-VIH dels anàlegs més propers sintetitzats al GEM per R. Puig de la Bellacasa.<sup>[2]</sup> Tots els resultats estan en unitats en unitats de  $\mu$ M i s'han avaluat amb la soca de VIH NL4-3 wt en cèl·lules MT-4.

Molècula	Nom	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	$CC_{50}$ ( $\mu$ M)
	13{3}	144.47	>265.58
	13{4}	>279.91	>279.91

Molècula	Nom	EC <sub>50</sub> (µM)	CC <sub>50</sub> (µM)
	<b>13{5}</b>	>282.37	>282.37
	<b>13{1}</b>	>155.81	>155.81

En la Taula 2.10 es mostren els resultats d'EC<sub>50</sub> i CC<sub>50</sub> (en µM) obtinguts per a les monoamides **37**{x,y} i les diamides **50**{x} sintetitzades.

**Taula 2.10.** Valors d'activitat anti-VIH per a les molècules objectiu **37**{x,y} i **50**{x}. Tots els resultats estan en unitats en unitats de µM i s'han avaluat amb la soca de VIH NL4-3 wt en cèl·lules MT-4.

Molècula	Nom	EC <sub>50</sub> (µM)	CC <sub>50</sub> (µM)
	<b>37{3,3}</b>	1.01	>56.47
	<b>37{4,4}</b>	>59.73	>59.73
	<b>37{4,1}</b>	>62.10	>62.10
	<b>37{4,3}</b>	6.72	>58.05
	<b>37{5,5}</b>	2.54	>60.29

Molècula	Nom	EC <sub>50</sub> (µM)	CC <sub>50</sub> (µM)
	<b>37{5,3}</b>	1.39	>58.32
	<b>50{4}</b>	>53.35	>53.35
	<b>50{12}</b>	>65.35	>65.35
	<b>50{5}</b>	19.67	>53.80
	<b>50{3}</b>	29.02	>50.74
	<b>50{1}</b>	>57.26	>57.26

Com es pot observar en la Taula 2.10, cap de les monoamides **37**{x,y} o diamides **50**{x} presenta citotoxicitat a la concentració màxima assajada (25 µg/mL).

En quant a l'activitat antiviral, les monoamides **37**{4,4} i **37**{4,1} no presenten activitat a la concentració màxima assajada (25 µg/mL), fet en principi previsible, ja que la 3-aminopropil-*N*-morfolina (**2**{4}) de partida ha donat en general pitjors resultats en treballs previs<sup>[1-3]</sup>.

En el cas de les monoamides que han donat certa activitat no s'ha obtingut cap valor extraordinari a destacar. Les molècules **37**{3,3} i **37**{5,3} són les més actives (EC<sub>50</sub>= 1.01 µM i EC<sub>50</sub>= 1.39 µM respectivament), seguit de la **37**{5,5} i **37**{4,3} (EC<sub>50</sub>= 2.54 µM i EC<sub>50</sub>= 6.72 µM respectivament).

Si s'analitzen els valors d'activitat de les molècules anàlogues sintetitzades anteriorment al GEM (Taula 2.9), la diamida **13**{3} basada en la 3-aminopropil-*N*-pipercolina (**2**{3}) és l'única que resulta activa a la concentració màxima avaluada tot i no presentar un valor destacable. És perfectament explicable, doncs, que les amides que incorporen aquesta unitat o el derivat piperidínic siguin les

que presenten millor activitat anti-VIH, i que la monoamida **37**{3,3} que incorpora la pipercolina per duplicat sigui també la que presenti el millor resultat antiviral.

Les diamides **50**{x} segueixen el mateix patró. Els compostos **50**{1}, **50**{4} i **50**{12} no presenten activitat anti-VIH de la mateixa manera que en el cas de les monoamides **37**{x,y} i les diamides **13**{x}. De la mateixa forma, les molècules que incorporen en la seva estructura les unitats pipercolina i piperidina (**2**{3} i **2**{5}) sí que presenten certa activitat. Aquesta activitat antiviral novament és insuficient per a poder parlar de molècules amb activitat anti-VIH destacable.

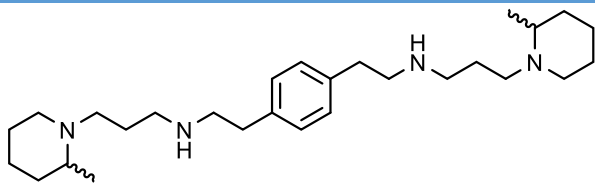
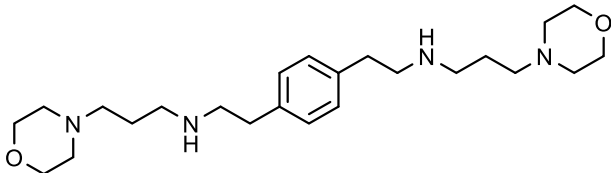
Finalment, comparant els resultats de la Taula 2.10 s'observa clarament com les monoamides **37**{x,y} resulten significativament més actives enfront el VIH que les diamides **50**{x}, excepte en les molècules que no presenten activitat a la màxima concentració assajada en les que els resultats no es poden posar en perspectiva.

Aquesta observació és atribuïble al fet que les molècules **37**{x,y} presenten simultàniament la funcionalitat amida i amina, mentre que les **50**{x} i **13**{x} són doblement amides. En conseqüència, queda clar que la funcionalitat amida no és adequada per aconseguir millor eficàcia inhibidora.

Centrant l'atenció en els compostos tetraamínics **21**{x,y} i **47**{x} objectiu, es procedeix a l'anàlisi dels resultats d'activitat EC<sub>50</sub> i CC<sub>50</sub> (en µM) obtinguts.

En la Taula 2.11 queden representats els valors d'activitat antiviral obtinguts en compostos anteriors sintetitzats en el GEM anàlegs als de nova síntesi realitzats en el present treball.<sup>[1-3]</sup>

**Taula 2.11.** Valors d'activitat anti-VIH dels compostos **3**{x}, **6**{x,y} i **14**{x} sintetitzats anteriorment al GEM.<sup>[1-3]</sup> La soca de VIH utilitzada és la NL4-3 wt en cèl·lules MT-4.

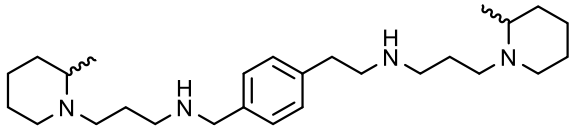
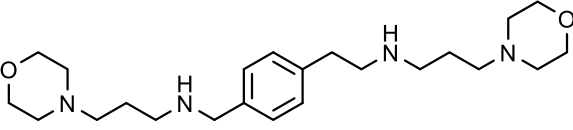
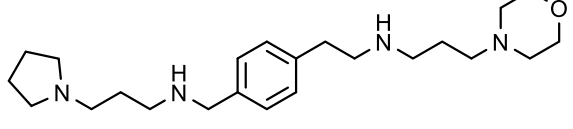
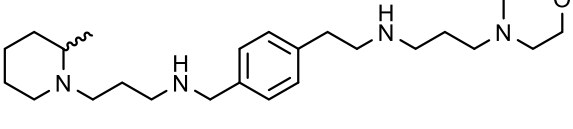
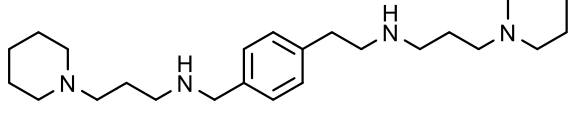
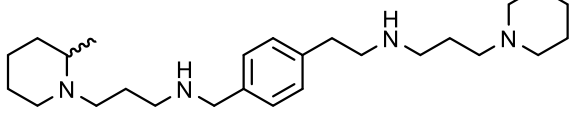
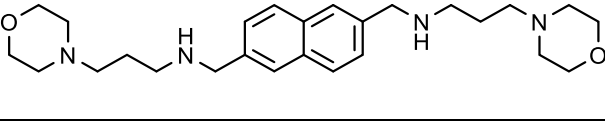
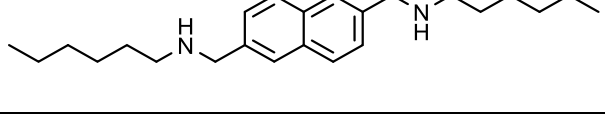
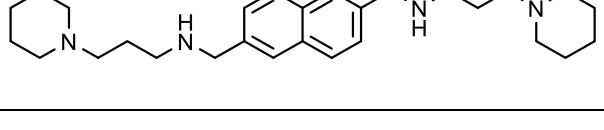
Molècula	Nom	EC <sub>50</sub> (µM)	CC <sub>50</sub> (µM)
	<b>14</b> {3}	0.072	117.450
	<b>14</b> {4}	49.520	>241.269

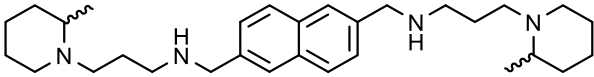
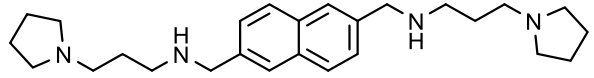
Molècula	Nom	EC <sub>50</sub> (µM)	CC <sub>50</sub> (µM)
	<b>14{5}</b>	0.101	>113.343
	<b>14{1}</b>	0.176	95.699
	<b>3{3}</b>	0.121	>60.289
	<b>3{4}</b>	>320.053	>320.053
	<b>3{5}</b>	0.362	64.653
	<b>6{3,4}</b>	1.242	>62.093
	<b>6{1,4}</b>	4.271	>66.745
	<b>3{1}</b>	2.510	90.359

En la Taula 2.12 es reuneixen els valors d'activitat anti-VIH obtinguts per les noves tetraamines **21{x,y}** i **47{x}** objectiu del present treball.



**Taula 2.12.** Valors d'activitat anti-VIH dels compostos **21**{x,y} i **47**{x}. La soca de VIH utilitzada és la NL4-3 wt en cèl·lules MT-4.

Molècula	Nom	EC <sub>50</sub> (µM)	CC <sub>50</sub> (µM)
	<b>21</b> {3,3}	0.114	>58.316
	<b>21</b> {4,4}	>61.791	>61.791
	<b>21</b> {4,1}	9.725	>64.335
	<b>21</b> {4,3}	1.694	>60.004
	<b>21</b> {5,5}	0.325	>62.400
	<b>21</b> {5,3}	0.087	>60.289
	<b>47</b> {4}	>56.740	>56.740
	<b>47</b> {12}	1.748	1.748
	<b>47</b> {5}	0.269	26.932

Molècula	Nom	EC <sub>50</sub> (µM)	CC <sub>50</sub> (µM)
	<b>47{3}</b>	0.191	21.110
	<b>47{1}</b>	0.683	29.271

De les noves molècules sintetitzades (Taula 2.12), tan sols **21{4,4}** i **47{4}** no resulten actives a la concentració màxima assajada (25 µg/mL) i ja es tracta dels resultats esperats, ja que la 3-aminopropil-*N*-morfolina (**2{4}**) emprada com a amina de partida sempre ha donat resultats d'activitat més aviat discrets.<sup>[1-3]</sup>

De les noves tetraamines presents a la Taula 2.12, cal destacar els compostos **21{3,3}**, **21{5,5}** i **21{5,3}** de les tetraamines amb l'espaiador no simètric que són els que presenten millors valors d'activitat (EC<sub>50</sub>= 0.114 µM, EC<sub>50</sub>= 0.325 µM i EC<sub>50</sub>= 0.087 µM respectivament). I els compostos **47{5}** i **47{3}** de les tetraamines amb l'espaiador naftalènic (amb EC<sub>50</sub>= 0.269 µM i EC<sub>50</sub>= 0.191 µM respectivament). Aquests resultats confirmen que les amines 3-aminopropil-*N*-piperidina **2{5}** i 3-aminopropil-*N*-pipecolina **2{3}** són les que proporcionen millor activitat antiviral a les molècules que les contenen.

El valor presentat per la molècula **21{5,3}** (EC<sub>50</sub>= 0.087 µM) és, si més no, sorprenent, ja que si s'analitzen els valors d'activitat de la resta de compostos **21{x,y}**, aquests es situen a mig camí dels valors de les molècules **21{x,x}** i **21{y,y}** substituïdes bilateralment per la mateixa amina.

A mode d'exemple; si s'agafa el valor EC<sub>50</sub> de la molècula **21{4,3}** (EC<sub>50</sub>= 1.694 µM) i els de les seves anàlogues bisubstituïdes **21{4,4}** (EC<sub>50</sub>= 61.791 µM) i **21{3,3}** (EC<sub>50</sub>= 0.114 µM) s'observa que el valor d'activitat de la primera es troba en mig dels altres dos. El mateix passa en el cas de les amides representades a la Taula 2.10 (fins i tot en el cas de la molècula **37{5,3}**) o amb les tetraamines **6{1,4}** i **6{3,4}** sintetitzades anteriorment al grup (Taula 2.11).

Ara bé, si s'agafa el valor d'EC<sub>50</sub> de la tetraamina **21{5,3}** (EC<sub>50</sub>= 0.087 µM), s'observa que no compleix aquesta premissa, ja que resulta més activa que les dues molècules homòlogues **21{3,3}** (EC<sub>50</sub>= 0.114 µM) i **21{5,5}** (EC<sub>50</sub>= 0.325 µM), millorant en un ordre de magnitud el valor d'EC<sub>50</sub>.

Tal com es podia preveure, els resultats obtinguts per les molècules **21{x,y}** són un entremig entre els valors d'activitat de les molècules **3{x}** i **6{x,y}** d'una baula metilènica i els de les molècules **14{x}** amb dues baules metilèniques.

Per exemple, amb els valors obtinguts per la molècula que conté la 3-aminopropil-*N*-pipecolina, l'amina més activa; la molècula **3{3}** amb una sola baula, té una EC<sub>50</sub>= 0.121 µM, el seu equivalent de dues baules, la molècula **14{3}**, presenta una EC<sub>50</sub>= 0.072 µM. Es podria deduir

que com que la nostra molècula té una i dues baules respectivament, el seu valor d'EC<sub>50</sub> tindria un valor entremig. Efectivament, l'EC<sub>50</sub> de la molècula **21**{3,3} és de 0.114 μM. Es pot treure la conclusió que, estructuralment, un espaiador amb dues baules metilèniques presenta millors valors d'activitat que amb una sola baula.

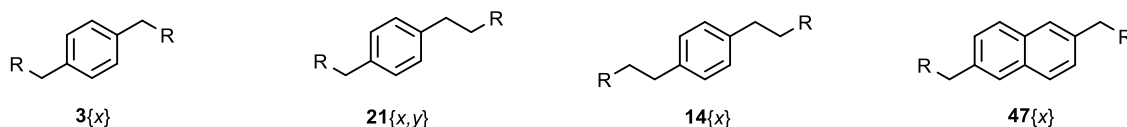
Per a la resta de molècules doblement substituïdes amb la mateixa amina a banda i banda **2**{*x*}, el patró es repeteix, donant uns valors entremig dels obtinguts per molècules amb una baula i dues baules. Sempre, per això, són més propers als valors de les molècules amb una baula que amb dues baules, sent aquestes últimes més actives.

En els compostos **47**{*x*} amb el nou espaiador naftalènic, es pot comprovar que resulten menys actius que els seus anàlegs amb espaiador benzílic, tot i que no segueixen un patró definit; com es pot veure en la Taula 2.12.

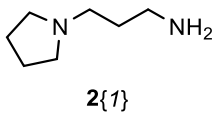
Per exemple, en el cas de la 3-aminopropil-*N*-pípecolina (**2**{3}), la molècula amb l'espaiador naftalènic resulta la menys activa de les 4; mentre que en el cas de la 3-aminopropil-*N*-piperidina (**2**{5}), resulta ser la segona més activa, darrera **14**{5} amb l'espaiador simètric amb dues baules a banda i banda. Per tant no segueixen un patró com en el cas dels espaiadors fenílics amb diferent nombre de baules a banda i banda de l'anell, però en cap cas cap compost ha resultat més actiu que el seu anàleg *p*-fenilbisetilènic (**14**{*x*}).

En la Taula 2.13 es posen en comparació els valors d'activitat dels diferents compostos homòlegs que s'han sintetitzat amb els diferents espaiadors.

**Taula 2.13.** Comparació de resultats entre anàlegs de la mateixa molècula amb els diferents espaiadors sintetitzats al GEM.<sup>[1,2]</sup> La soca de VIH utilitzada és la NL4-3 wt en cèl·lules MT-4. Remarcat hi ha el millor valor d'activitat anti-VIH per a cada anàleg.



Amina	Espaiador	Molècula	EC <sub>50</sub> (μM)
 <b>2</b> {5}	<b>3</b> { <i>x</i> }	<b>3</b> {5}	0.362
	<b>21</b> { <i>x,y</i> }	<b>21</b> {5,5}	0.325
	<b>14</b> { <i>x</i> }	<b>14</b> {5}	0.101
	<b>47</b> { <i>x</i> }	<b>47</b> {5}	0.269
 <b>2</b> {3}	<b>3</b> { <i>x</i> }	<b>3</b> {3}	0.121
	<b>21</b> { <i>x,y</i> }	<b>21</b> {3,3}	0.114
	<b>14</b> { <i>x</i> }	<b>14</b> {3}	0.072
	<b>47</b> { <i>x</i> }	<b>47</b> {3}	0.191

Amina	Espaiador	Molècula	EC <sub>50</sub> (µM)
 2{1}	3{x}	3{1}	2.510
	14{x}	14{1}	0.176
	47{x}	47{1}	0.683

Per tant, es pot concloure que és preferible l'estructura simètrica **14{x}** amb un espaiador amb dues baules a banda i banda de l'anell per a la síntesi de tetraamines simètriques.

Destacar el compost **47{12}** en la Taula 2.12, que resulta ser tòxic. Aquest fet és sorprenent, ja que cap altra molècula del mateix tipus sintetitzada en el present treball havia mostrat toxicitat a la concentració màxima assajada. Tanmateix, en tractar-se d'una molècula de prova per a optimitzar la ruta sintètica sense cap altre interès sintètic, no es dóna més importància a aquest fet.

Pel que fa a les molècules substituïdes no simètricament amb amines diferents a cada costat de l'espaiador, tan sols es poden comparar les molècules **21{x,y}** amb les molècules **6{x,y}** sintetitzades per S. Pettersson (Taula 2.11). Es comprova en ambdós casos que els resultats dels nous compostos **21{x,y}** (Taula 2.12) empitjoren els obtinguts amb els compostos **6{x,y}**, per tant, per a la síntesi de tetraamines no simètriques es conclou que resulten millors les que contenen un espaiador simètric d'una baula (no hi ha antecedents d'amines no simètriques amb espaiador de dues baules).

## Bibliografia

- [1] S. Pettersson. Diseño, selección y síntesis de nuevos inhibidores de entrada del VIH. Tesis doctoral. Escola Tècnica Superior IQS, Universitat Ramon Llull, Barcelona, 2009.
- [2] R. Puig de la Bellacasa; Disseny, síntesi i avaluació biològica d'inhibidors potencials de les etapes inicials del cicle de replicació de VIH. Tesis Doctoral, Escola Tècnica Superior IQS, Universitat Ramon Llull, Barcelona, 2010.
- [3] L. Ros; Disseny i síntesi de noves quimioteques de potencials inhibidors d'entrada del VIH. Tesis Doctoral, Escola Tècnica Superior IQS, Universitat Ramon Llull, Barcelona, 2011.
- [4] R. A. Fernandes, P. Kumar; PCC-mediated novel oxidation reactions of homobenzylic and homoallylic alcohols. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44 (6), p. 1275-1278.
- [5] K. B. Sharpless, K. Akashi, K. Oshima; Ruthenium-catalyzed oxidation of alcohols to aldehydes and ketones by amine-N-oxides. *Tetrahedron Lett.* **1976** (29), p. 2503-2506.
- [6] C. Yu, B. Zhao, Y. Zhao, J. Lin; A new route for the synthesis of ozagrel hydrochloride. *Org. Prep. And Proced. Inter.* **2010**, 42 (2), 183-185.
- [7] C.Djerassi; Brominations with N-bromosuccinimide and related compounds. The Wohl-Ziegler reaction. *Chemical Reviews* **1948**, 43, 271-317.
- [8] United Nations Environment Programme (UNEP). The Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer. Article 2D.
- [9] L.M. Harwood, C.J. Moody, J.M. Percy; Experimental Organic Chemistry, Standard and Microscale. *Blackwell Science* **1999**, 2d Edition. ISBN: 0-632-04819-0. 436-437.
- [10] S. Gomez, J.A. Peters, T. Maschmeyer; The reductive amination of aldehydes and ketones and the hydrogenation of nitriles: mechanistic aspects and selectivity control. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, 344, 1037-1057.
- [11] S. Pettersson, V.I. Pérez-Nueno, L. Ros-Blanco, R. Puig de la Bellacasa, M.O. Rabal, X. Batllori, B. Clotet, I. Clotet-Codina, M. Armand-Ugon, J. Esté, J.I. Borrell, J. Teixidó; Discovery of novel non-cyclam polynitrogenated CXCR4 coreceptor inhibitors. *Chem. Med. Chem.* **2008**, 3 (10), 1549-1557.

- [12] M.L. Falck-Pedersen, K. Undheim; Asymmetric synthesis of phenylbis(glycines). *Tetrahedron* **1996**, 52 (22), 7761-7770.
- [13] D.R. Knapp; Handbook of analytical derivatization reactions. **1979**, 768.
- [14] S.G. Nelson; Product class 1: acid halides. *Sci. Synth.* **2006**, 20a, 15-52.
- [15] A. Wissner, C.V. Grudzinskas; Reaction of tert-butyldimethylsilyl esters with oxalyl chloride-dimethylformamide: preparation of carboxylic acid chlorides under neutral conditions. *J. Org. Chem.* **1978**, 43 (20), 3972-3974.
- [16] M. Yoshihara, T. Eda, K. Sakaki, T. Maeshima; Conversion of alcohols to alkyl halides using iminium salts. *Synthesis* **1980**, (9), 746-748.
- [17] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers; Nucleophilic substitution of the carbonyl (C=O) group. 12. A: Organic Chemistry. 1ª Edició. *Oxford University Press* **2001**, 279.
- [18] X. Chai, J. Zhang, H. Hu, S. Yu, Q. Sun, Z. Dan, Y. Jiang, Q. Wu; Design, synthesis, and biological evaluation of novel triazole derivatives as inhibitors of cytochrome P450 14a-demethylase. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 1913-1920.
- [19] C. Schotten; Oxidation of piperidine. *Ber.* **1884**, 17, 2544-2547.
- [20] E. Baumann; Preparation of derivatives of carbohydrates. *Ber.* **1886**, 19, 3218-3222.
- [21] W. Reeve, W.M. Eareckson III; Synthesis of some isoquinoline derivatives related to podophyllotoxin. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72, 5195-5197.
- [22] A. Barge, L. Tei, D. Upadhyaya, F. Fedeli, L. Beltrami, R. Stefania, S. Aime, G. Cravotto; Bifunctional ligands based on the DOTA-monoamide cage. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 1176-1184.
- [23] K. Bhandari, V.L. Sharma, S.K. Chatterjee; A convenient method for the reduction of amides to their corresponding amines. *Chemistry & Industry* **1990**, 17, 547-548.
- [24] M. Tudge, et al; Facile reduction of malonate derivatives using NaBH<sub>4</sub>/Br<sub>2</sub>: an efficient route to 1,3-diols. *Tetrahedron* **2008**, 49 (6), 1041-1044.
- [25] S.Y. Wu, et al; Synthesis and insecticidal activity of optically active 2-methoxy-5-phenyl-1,3,2-oxazaphospholidine 2-sulfide. *Agr. Bio. Chemistry* **1989**, 53 (1), 165-174.

- [26] H.C. Brown, Y.M. Choi, S. Narasimhan; Selective reductions 29. A simple technique to achieve an enhanced rate of reduction of representative organic compounds by borane-dimethyl sulfide. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 3153-3163.
- [27] T. Masuko, T. Kusama, H. Nagaoka, K. Metori, Y. Kisawa, M. Miyake; Synthesis of a novel water-soluble NMDA receptor antagonist. *J. Heterocycl. Chem.* **2008**, 45 (2), 383-387.
- [28] L. Routaboul, N. Vanthuynne, S. Gastaldi, G. Gil, M. Bertrand; Highly efficient photochemically induced thiyl radical-mediated racemization of aliphatic amines at 30°C. *J. Org. Chem.* **2008**, 73 (2), 364-368.
- [29] C. Pardo, C. Pirat, J. Elguero; *The Synthesis of a Linear Tröger's Base Derived from Naphthalene: 7H-15H-6,14-methanodinafto[2,3-b:2',3'-f][1,5]diazocine*. *J. Heterocyclic Chem.* **2007**, 44, 1303-1306.
- [30] S.D. Young, J.M. Wiggins, J.R. Huff; *3,4-Dihydrobenz[f]isoquinoline and 3,4-Dihydrobenz[g]isoquinoline*. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 1114-1116.
- [31] F. Denizot, R. Lang; Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **1986**, 89 (2), 271-277.



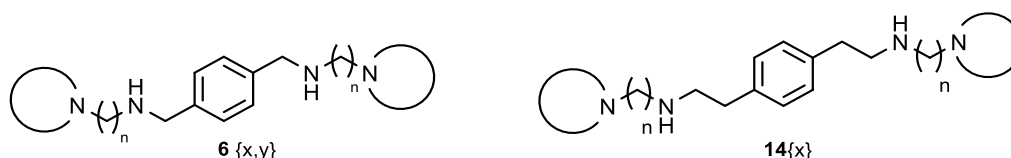


**3- SÍNTESI DE NOUS  
COMPOSTOS A PARTIR  
DEL CAP DE SÈRIE 3{3}**



### 3.0- Antecedents al grup

En el capítol 2 s'ha demostrat que el millor espaiador per a la síntesi de tetraamines és el format per un anell fenílic amb dues baules a banda i banda de l'anell per a tetraamines simètriques (**14**{x}) i el d'un anell fenílic amb una baula a banda i banda de l'anell per a tetraamines no simètriques (**6**{x,y}). A la vegada, s'ha comprovat que, en general, donen millors resultats antivirals les tetraamines simètriques que les no simètriques (Figura 3.1).

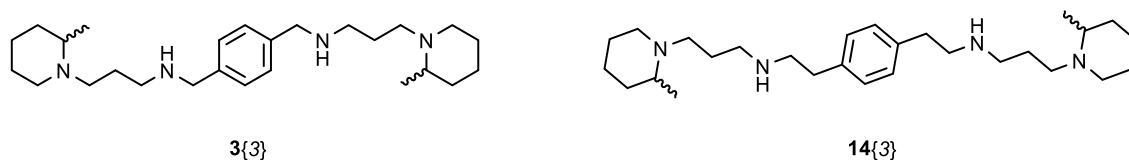


**Figura 3.1.** Estructura general per a les tetraamines simètriques **14**{x} i les tetraamines no simètriques **6**{x,y}.

Amb el conjunt d'espaiadors ja sintetitzats al grup i els nous espaiadors obtinguts en el capítol 2, es pot considerar que la variabilitat d'espaiadors en aquest tipus de productes tetraamínics ja ha estat suficientment estudiada; per això s'opta per obtenir millors valors d'inhibició realitzant modificacions a alguna de les molècules que anteriorment han proporcionat millors resultats.

S'escull el compost **3**{3} com a cap de sèrie tot i que en el capítol 2 s'han trobat productes amb millors resultats i en la tesi de R. Puig de la Bellacasa<sup>[1]</sup> s'havia demostrat que la tetraamina **14**{3} resulta lleugerament més activa enfront al VIH (Figura 3.2). Es decideix utilitzar **3**{3} donat que, tot i demostrar aquesta millora de **14**{x} sobre **3**{x} en tots els casos testats, la seva fàcil obtenció la fa un producte més còmode per treballar-hi. A més a més, el fet que permeti la síntesi de tetraamines no simètriques de forma més fàcil que els compostos no simètrics **21**{x,y} obtinguts al capítol anterior, converteix els compostos **3**{x} en uns productes més atractius de cara al disseny de noves famílies de molècules. En qualsevol cas, si es troba el cas d'una modificació en aquest producte que comporti una millora substancial de l'activitat caldrà estudiar de realitzar-la d'igual forma en el compost anàleg més actiu sintetitzat en el GEM.

Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}

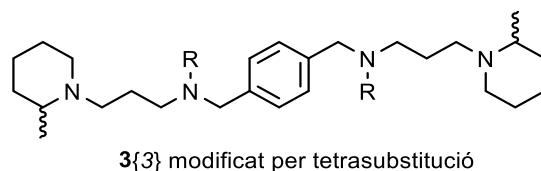


**Figura 3.2.** Tetraamines 3{3} i 14{3} sintetitzades per S. Pettersson i R. Puig de la Bellacasa respectivament en les seves tesis doctorals.<sup>[1,2]</sup> Els valors d'activitat anti-VIH són  $EC_{50} = 0.121 \mu\text{M}$  i  $EC_{50} = 0.072 \mu\text{M}$  respectivament.<sup>[1,2]</sup> Els assaigs d'activitat s'han realitzat amb la soca de VIH NL4-3 wt en cèl·lules MT-4.

## 3.1- Modificacions en la tetraamina 3{3}

### 3.1.1- Tetrasubstitució de l'espaiador

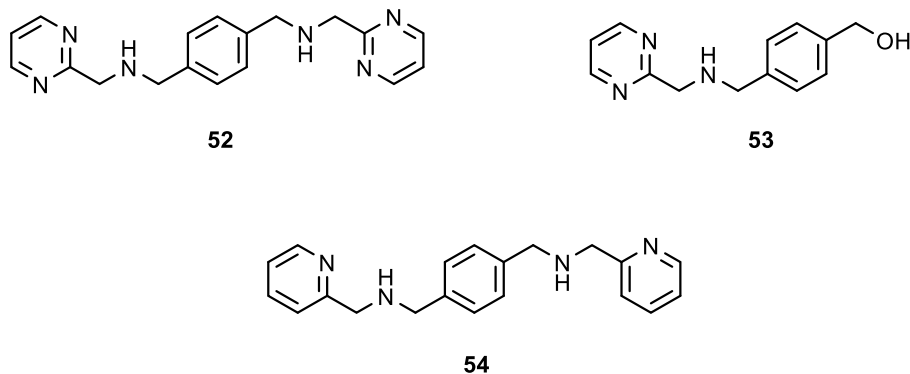
Una de les modificacions possibles que ofereix la tetraamina 3{3} és la introducció de substituents en els dos grups NH que resten a banda i banda de l'anell central (Figura 3.3). Aquesta tetrasubstitució de l'espaiador permetrà noves interaccions amb el receptor però eliminarà el donador de pont d'hidrogen (grups NH).



**Figura 3.3.** Estructura general dels derivats tetrasubstituïts de 3{3}.

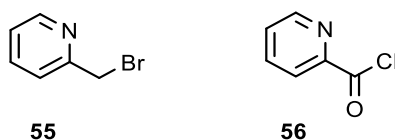
Tot i que l'objectiu de la síntesi d'aquestes molècules és veure l'efecte que té la substitució d'aquests hidrògens i que, per tant, no es considera tant important el substituent que s'hi unirà; és interessant incloure-hi algun substituent diferent dels que ja s'han utilitzat com a amines laterals en el grup, aportant així un tret diferencial.

En fer una recerca per escollir quins sistemes serien interessants d'utilitzar com a substituents es troba la patent de H. Shim i col·laboradors<sup>[3]</sup> on apareixen compostos com els que es mostren en la Figura 3.4 amb uns valors d' $EC_{50}$  respecte la infecció per VIH al voltant de 10 nM.



**Figura 3.4.** Estructura dels compostos **52**, **53** i **54** presents en la patent WO2006074426A2 de Shim i col·laboradors.<sup>[3]</sup>

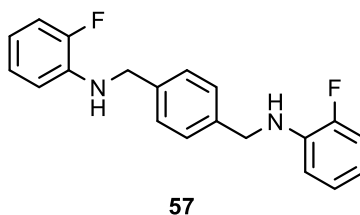
Es pensa doncs en una estructura que inclogui aquest tipus de substituents piridínics. Es troben els productes 2-(bromometil)piridina (**55**) i el clorur de picolinoil (**56**) (Figura 3.5) comercialment assequibles l'anell dels quals és exactament el present en el compost **54** mostrat a la Figura 3.4.



**Figura 3.4.** Estructures de la 2-(bromometil)piridina (**55**) i del clorur de picolinoil (**56**).

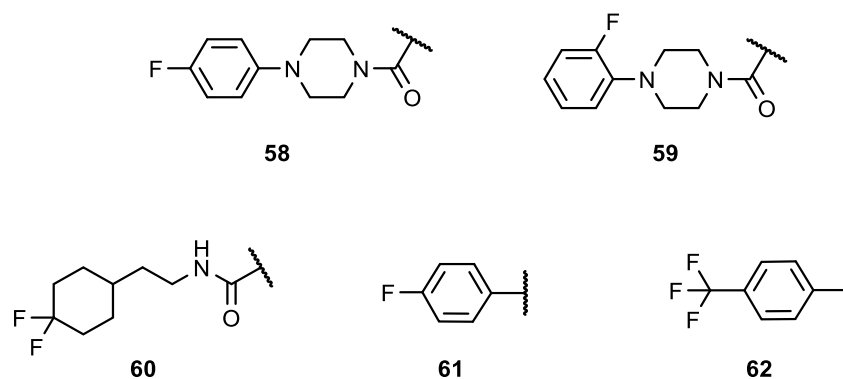
Per altra banda, es pensa en introduir, a més a més, algun substituent que contingui algun altre grup funcional o àtom no present en molècules sintetitzades anteriorment al grup.

Ja en la mateixa patent de Shim i col·laboradors<sup>[3]</sup> una de les estructures presents amb millor activitat conté un àtom de fluor en posició *orto* d'un anell aromàtic (Figura 3.5). Es valora el fluor com a substituent interessant per formar part de l'anell del nou substituent que s'està buscant.



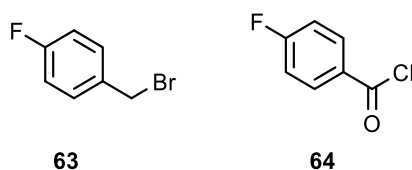
**Figura 3.5.** Estructura del compost **57** present en la patent de Shim i col·laboradors que conté fluor en la seva estructura i amb una  $EC_{50} < 10$  nM.<sup>[3]</sup>

En realitzar una nova cerca bibliogràfica, es troba una nova patent de W. Thomas i col·laboradors<sup>[4]</sup> amb estructures inhibidores de CXCR4 que contenen fluor en els seus anells terminals. En la Figura 3.6 es mostren alguns d'aquests substituents presents que incorporen l'element fluor en les seves estructures.



**Figura 3.6.** Alguns exemples d'heterocicles presents en inhibidors de CXCR4 en el treball de Thomas i col·laboradors que incorporen fluor en les seves estructures.<sup>[4]</sup>

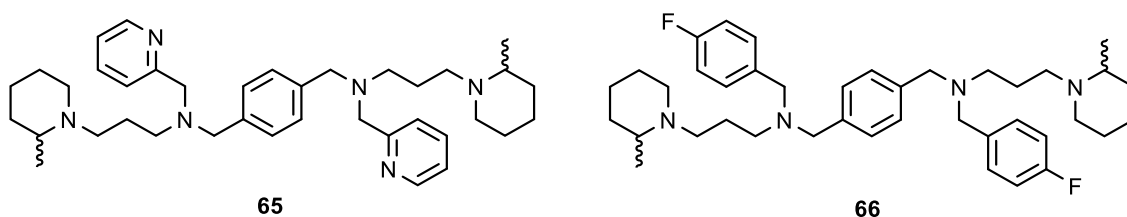
Així doncs, es decideix fer una prova de tetrasubstitució amb un substituent que contingui fluor en la seva estructura. Per fer-les equivalents a les estructures mostrades en la Figura 3.4 es seleccionen els reactius **63** i **64** representats en la Figura 3.7 com a reactius per realitzar la substitució.



**Figura 3.7.** Estructures de 1-(bromometil)-4-fluorobenzil (**63**) i el clorur de fluorobenzoil (**64**) per a realitzar la doble substitució de 3{3}.

Es decideix tenir el fluor en posició *para* per disminuir l'impediment estèric que aquest pot generar en la molècula tetrasubstituïda que incorporarà, a més a més, les amines laterals completes 2{3}.

Seleccionats els dos substituents a utilitzar, les dues molècules tetrasubstituïdes a sintetitzar són les representades en la Figura 3.8. Depenent de si s'utilitza el bromometil derivat o el clorur d'àcid corresponents es tindran dues rutes sintètiques diferents per arribar-hi (Figura 3.9): s'obtidran directament per substitució nucleofílica de la tetraamina 3{3} si s'utilitza el corresponent bromometil derivat i s'haurà de realitzar un últim pas de reducció en el cas d'utilitzar el corresponent clorur d'àcid.



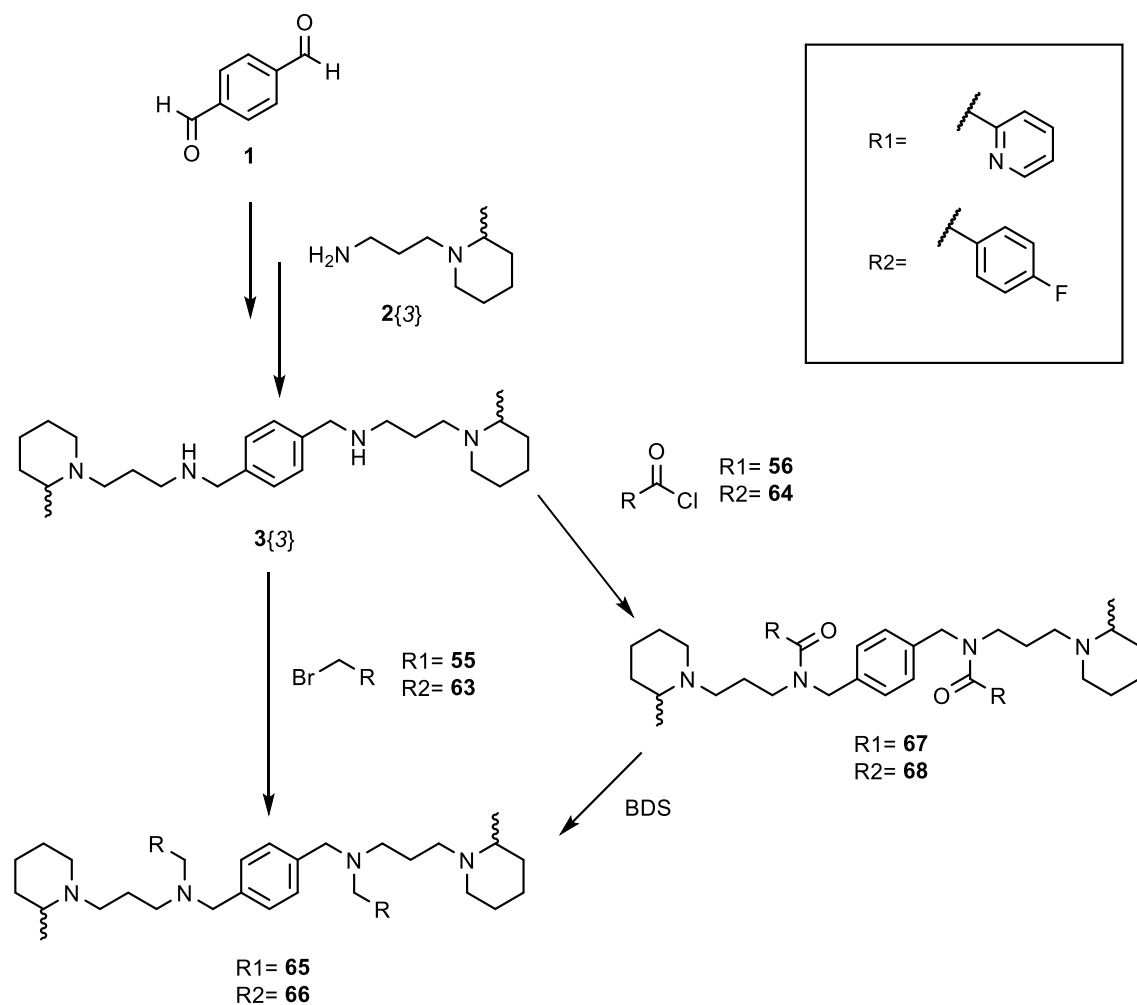
**Figura 3.8.** Compostos objectiu tetrasubstituïts **65** i **66**.

La ruta sintètica a seguir per a obtenir-los és la mostrada en la Figura 3.9. S'obté la tetraamina **3{3}** mitjançant la mateixa metodologia usada anteriorment al grup i, en concret, per a aquesta molècula. Un cop obtinguda, hi ha dues possibles rutes per obtenir els productes **65** i **66** desitjats. Aquest últim pas dependrà del reactiu escollit per a realitzar la substitució.

En el cas d'utilitzar els clorurs d'àcid corresponents **56** i **64** com a reactius de partida, s'usen les mateixes condicions d'acilació utilitzades anteriorment per aquest tipus de reaccions i extretes del treball de Barge i col·laboradors<sup>[5]</sup> usant carbonat de potassi com a base per captar l'àcid generat com a subproducte. Com ja s'ha indicat anteriorment, aquest àcid podria reaccionar amb les tetraamines **3{3}** i reduir així el rendiment de la reacció.

S'obtiniran així els corresponents intermedis amida **67** i **68**, els quals mitjançant una reducció en les condicions de Masuko i col·laboradors<sup>[6]</sup> i Rotaboul i col·laboradors<sup>[7]</sup>, usant el complex borà-sulfur de dimetil (BDS) com a agent reductor, rendiran el corresponent producte tetrasubstituït desitjat **65** i **66**.

En el cas d'utilitzar el derivat bromat **55** i **63** com a reactiu de partida, es portarà a terme la metodologia ja utilitzada per substitucions nucleòfiles d'amines adaptada també del treball de Barge i col·laboradors<sup>[5]</sup> utilitzada anteriorment al grup que ens rendirà directament els compostos **65/66** objectiu.



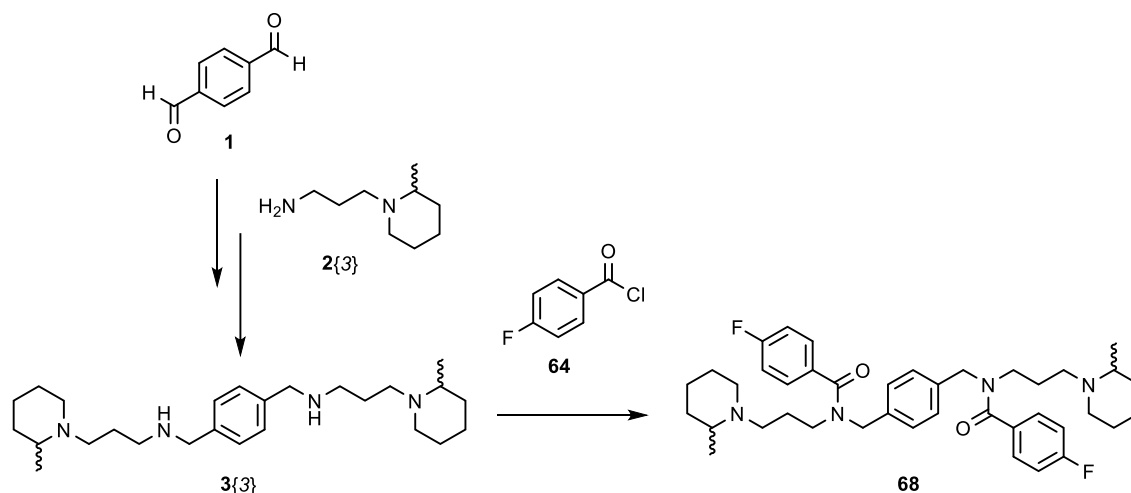
**Figura 3.9.** Esquema de l'obtenció dels productes tetrasubstituïts **65** i **66** amb les dues possibles rutes sintètiques a seguir depenent del reactiu de partida **55/63** o **56/64** escollit.

### 3.1.1.1- Obtenció dels compostos intermedis **67** i **68**

Es decideix comprovar la viabilitat de les dues rutes sintètiques amb els compostos fluorats **63** i **64**, ja que, tal com s'ha vist en la bibliografia citada<sup>[3,4]</sup>, els anells piridínics **55** i **56** tendeix a generar més subproductes i la seva purificació pot ser més complicada.

La primera ruta en ser testada és la que utilitza el derivat clorur d'àcid del compost fluorat **64**. Aquesta ruta consta de dos passos, una primera substitució nucleòfila que rendeix l'amida **68** intermèdia (Figura 3.10), i un segon pas de reducció per l'obtenció de l'amina tetrasubstituïda objectiu.





**Figura 3.10.** Reacció d'obtenció de l'amida **68** intermedi.

S'utilitza la metodologia de Barge i col·laboradors<sup>[5]</sup> per la reacció d'una amina amb un clorur d'àcid. Per a portar-la a terme, es dissol el clorur d'àcid **64** en ACN en un bany de gel, la tetraamina de partida **3{3}** dissolta també en ACN s'afegeix gota a gota. Es deixa a reflux 16 hores amb carbonat de potassi com a base per captar l'àcid clorhídric generat. En filtrar i rotavaporar s'observa la formació del producte **68** desitjat però amb diverses impureses. Es realitza un intent de purificació amb cromatografia automàtica de columna amb alúmina bàsica com a fase estacionària i una fase mòbil composta de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub> 100:0:0 a 95:5:0.5 en 60 minuts. El resultat, però, no és satisfactori. El producte segueix estant impurificat. En intentar algunes noves condicions de purificació es comprova que no és possible obtenir-lo pur. A més, hi ha indicis que ens porten a pensar que el producte desproporciona en les condicions de la columna cromatogràfica.

En veure les complicacions generades per l'obtenció de l'amida intermèdia, es decideix testar la segona ruta possible per a obtenir els productes tetrasubstituïts desitjats en la que es parteix del derivat bromometilat **63** corresponent (Figura 3.11).

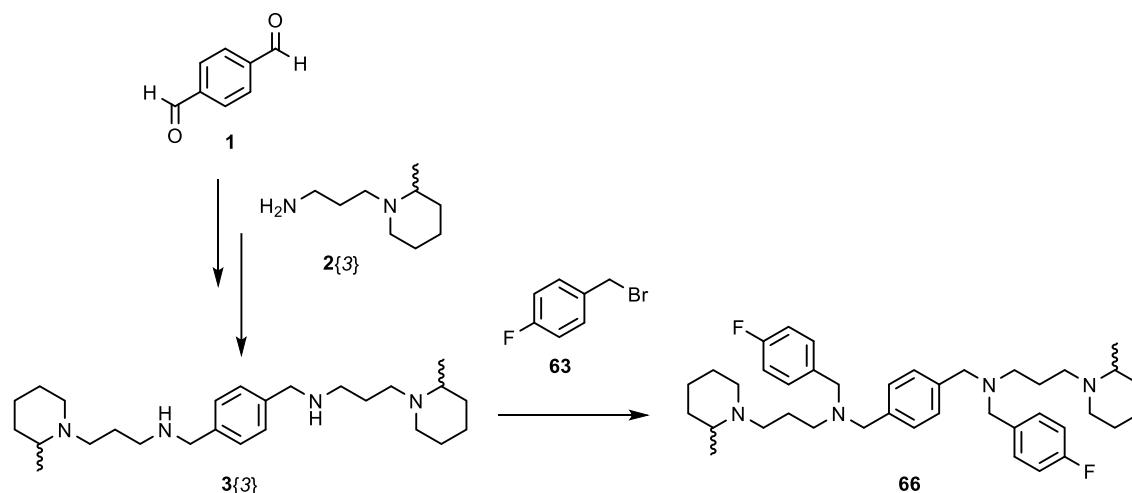
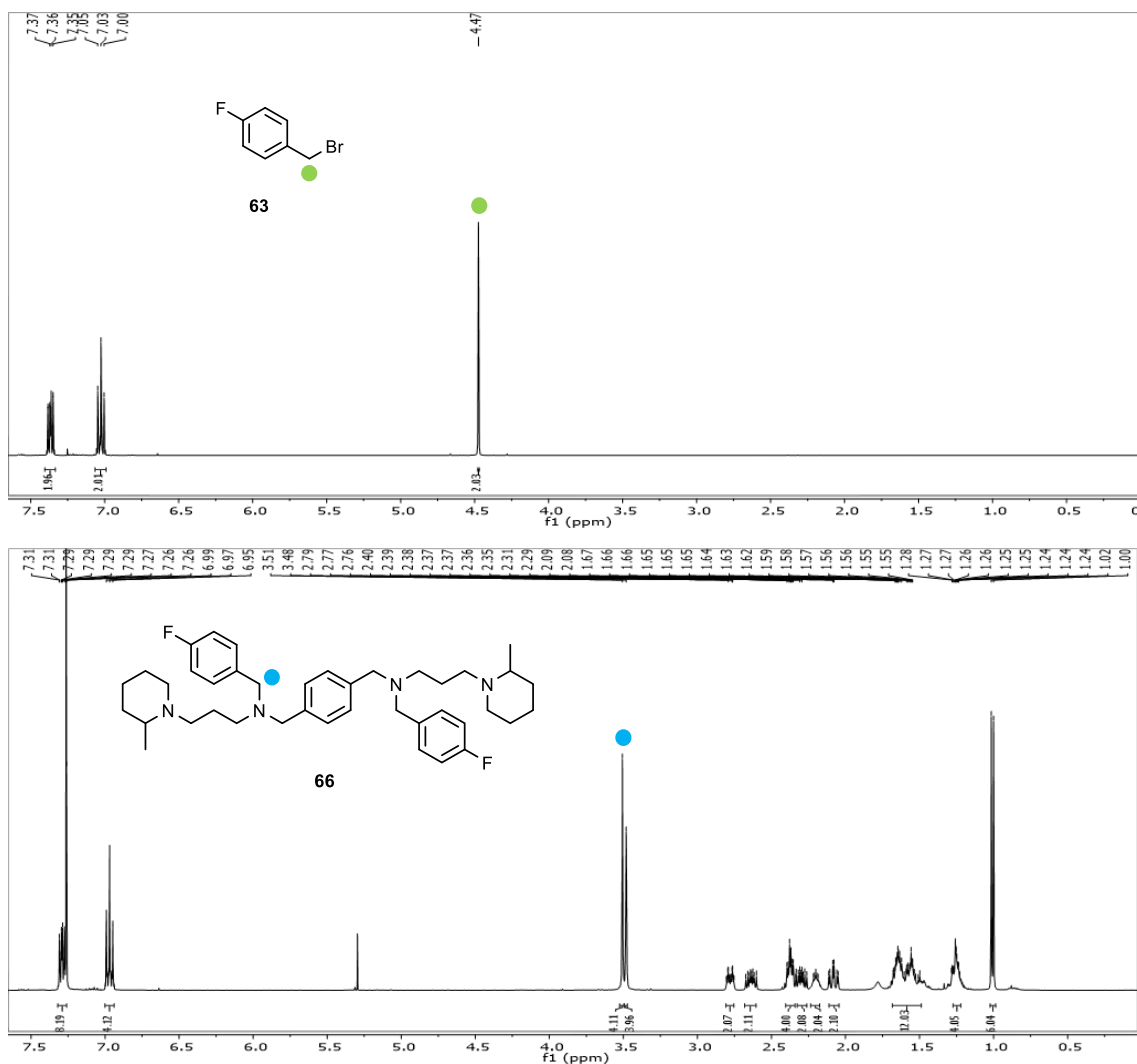


Figura 3.11. Esquema de la reacció per a l'obtenció del producte tetrasubstituit 66.

Un cop obtinguda la tetraamina 3{3}, es procedeix a realitzar la substitució nucleòfila dels protons dels dos grups NH presents a la molècula. Com s'ha indicat, es segueix la metodologia adaptada i utilitzada anteriorment al grup i en aquest mateix treball en la que la el bromur de *p*-fluorobenzil (63) es dissol en ACN anhidre en un bany de gel, seguidament s'afegeix la tetraamina 3{3} dissolta en ACN gota a gota, i en la que s'utilitza carbonat de potassi com a base per captar els protons alliberats durant la reacció. Es deixa la dissolució agitant a temperatura de reflux durant 16 hores.

El cru de reacció mostra una gran predominança del producte tetrasubstituit 66 desitjat, però cal purificar-lo mitjançant una cromatografia automàtica de columna amb alúmina com a fase estacionària i com a eluents una mescla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub> amb una rampa de 100:0:0 a 95:5:0,5 en 55 minuts. Amb aquest pas de purificació s'obté el producte desitjat 66 pur amb un rendiment del 50%.

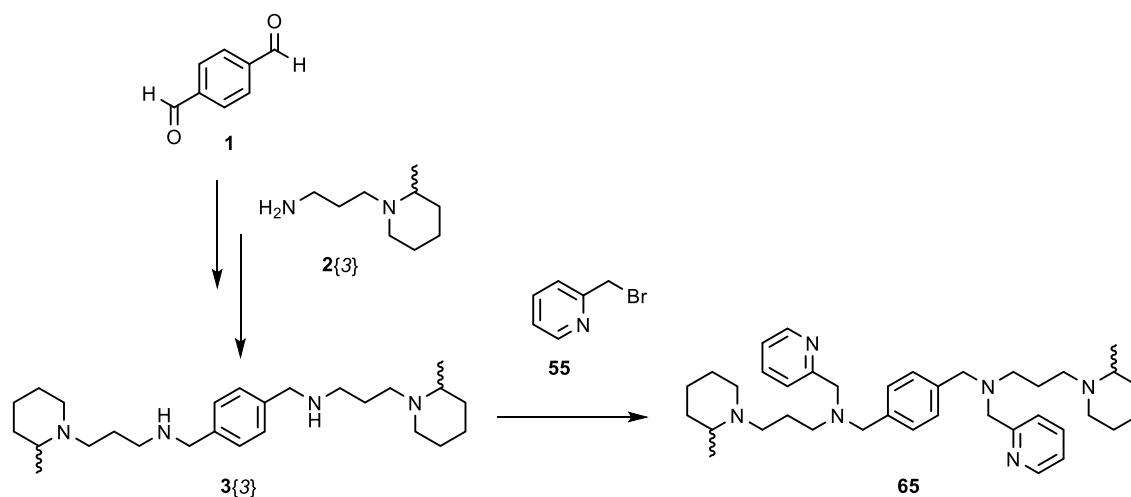
Per comprovar-ne la seva obtenció i la puresa del resultat, es realitza un estudi espectroscòpic que ens permet veure els senyals característics de la molècula (Figura 3.12).



**Figura 3.12.** Espectres  $^1\text{H}$ -RMN del compost **66** objectiu i del reactiu de partida bromat **63**. Els protons en posició benzílica que ens indiquen que la reacció ha tingut lloc amb èxit apareixen marcats,

En els espectres de la Figura 3.12 es mostra l'espectre RMN de protó del compost objectiu **66** on es pot comprovar la formació del compost en comparar-lo amb l'espectre RMN de protó del producte de partida bromat **63**. En ells es pot veure clarament que la substitució ha tingut lloc si s'observen els senyals corresponents als protons en posició benzílica de l'anell fluorat. En el cas del reactiu de partida bromat, aquests apareixen a 4,5 ppm mentre que en el cas del producte final tetrasubstituit, els trobem al voltant de 3,5 ppm.

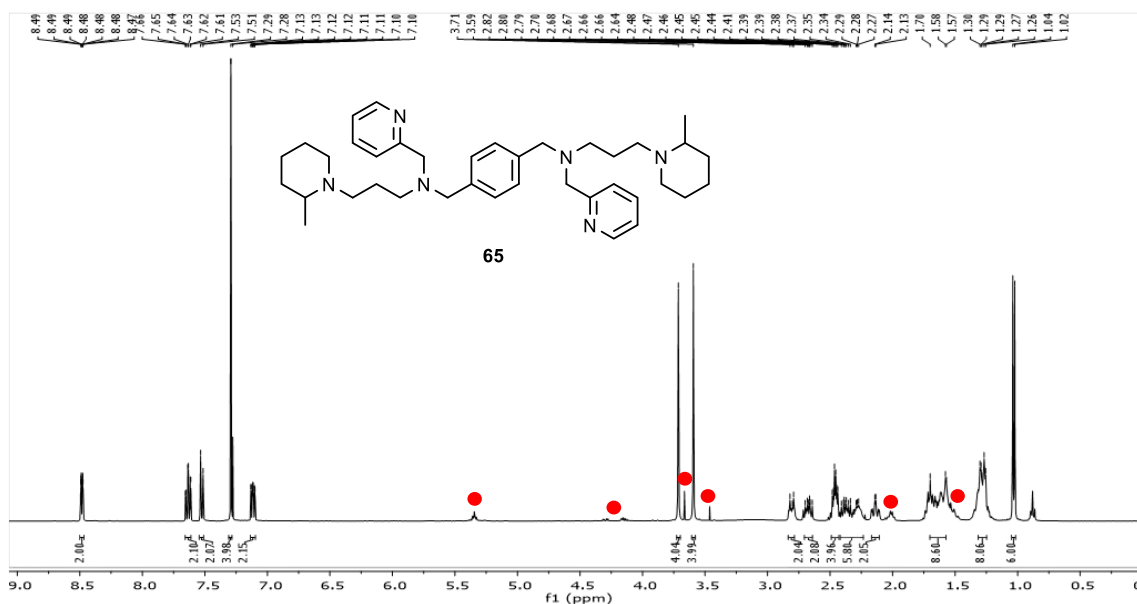
Per tant, es conclou que la millor forma s'obté dels compostos **65/66** tetrasubstituits és la ruta sintètica que utilitza el derivat bromometilat com a reactiu de partida per la substitució. Es procedeix a aplicar aquesta metodologia per la síntesi del compost **65** que incorpora un anell piridínic com a substituent (Figura 3.13).



**Figura 3.13.** Reacció d'obtenció del compost tetrasubstituit **65** objectiu.

Es dissol la 2-(bromometil)piridina (**55**) en ACN en un bany de gel. S'afegeix gota a gota una dissolució de la tetraamina **3{3}** en ACN i es deixa a reflux 18 hores amb carbonat de potassi com a base. Es realitzen extraccions amb aigua i una dissolució 10M de NaOH. En el cru de reacció es percep, per anàlisi per RMN de protó, la formació del producte juntament amb nombroses impureses.

Es purifica mitjançant una cromatografia automàtica de columna amb alúmina bàsica com a fase estacionària i una fase mòbil composta de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub> 100:0:0 a 90:10:0.5 en 50 minuts. Es comprova que el producte s'ha obtingut amb algunes petites impureses. Es forma el clorhidrat deixant-lo 3 hores en agitació amb una dissolució metanòlica de HCl 1,25M. Es rotavapora per obtenir el clorhidrat corresponent, però es tracta d'un sòlid altament higroscòpic; per aquest motiu la purificació resulta difícil de portar a terme. Amb tot, s'aconsegueix un nou grau de puresa (amb un rendiment del 20%), tot i que en l'espectre <sup>1</sup>H-RMN es poden percebre petits senyals d'impuresa (Figura 3.14). Es decideix esperar als resultats d'activitat antiviral; si aquests milloressin l'activitat registrada per **3{3}**, s'optaria per buscar una via de purificació alternativa.



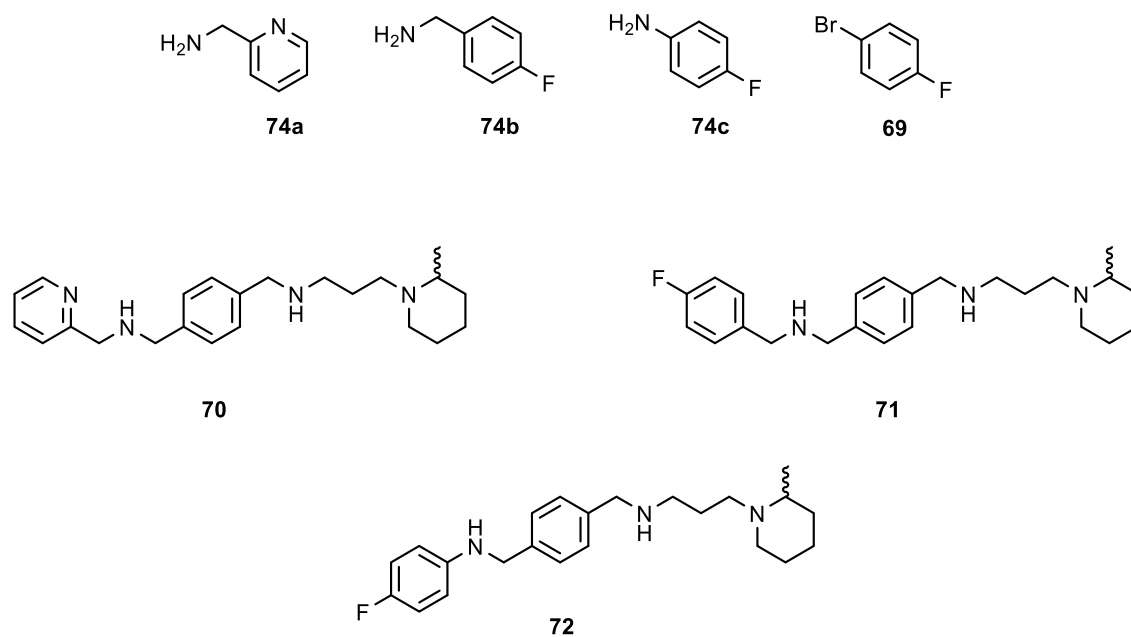
**Figura 3.14.** Espectre <sup>1</sup>H-RMN del compost tetrasubstituint **65**. Marcats en vermell s'indiquen els senyals fruit de les impureses presents que no s'han pogut eliminar en els passos de purificació.

### 3.1.2- Combinacions dels nous substituents amb l'amina 2{3}

Es pensa en sintetitzar tetraamines **6{x}** no simètriques fruit de la combinació de la 3-aminopropil-*N*-pípecolina (**2{3}**) i els nous substituents que s'havien utilitzat en l'apartat 3.1.1 per els compostos tetrasubstituïts. En els compostos anteriors es prioritzava veure l'efecte de la tetrasubstitució, no el que provocaven els substituents en concret. Aquestes noves molècules, però, permetrien veure directament si la presència d'aquests grups en concret provoquen una millora o no en l'activitat antiviral de les tetraamines comparat amb el compost simètric **3{3}**.

Així s'utilitza la 2-aminometilpiridina **74a** per tal d'introduir el substituent piridin-2-metil present en el compost tetrasubstituint **65** anterior. S'afegeix també el substituent *p*-fluorofenil (que serà introduït mitjançant la *p*-fluoroanilina **74c**), que no va ser utilitzat en la tetrasubstitució però que és molt semblant al substituent *p*-fluorofenilmetil (introduït ara gràcies a la *p*-(fluorofenil)metilamina **74b**) que sí que s'ha utilitzat en les molècules anteriors tetrasubstituïdes. El grup *p*-fluorofenil no ha estat utilitzat en les tetrasubstitucions pel fet que és un substituent molt semblant al grup *p*-fluorofenilmetil i s'estava estudiant principalment l'efecte que tenia la substitució dels dos grups NH, no l'efecte que el substituent influïa. Així doncs, les noves molècules a sintetitzar són les mostrades en la Figura 3.15.

Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}



**Figura 3.15.** Estructures dels reactius utilitzats com a substituents **74a**, **74b** i **74c** i del substituent **69** descartat anteriorment per la síntesi de compostos tetrasubstituïts; així com les estructures dels tres compostos a sintetitzar **70**, **71** i **72**.

La ruta sintètica per a obtenir els productes **70**, **71** i **72** objectiu és la representada en la Figura 3.16.

S'utilitza la metodologia adaptada de la usada per S. Pettersson a la seva tesi doctoral<sup>[2]</sup> per a l'obtenció de tetraamines no simètriques.

Es fa reaccionar el 4-(diètoximetil)benzal·hid (**4**) amb un equivalent de 3-aminopropil-*N*-pipercolina (**2**{3}) per realitzar una monoaminació reductora. Posteriorment es desprotegeix l'acetal amb àcid clorhídric. Un cop obtingut l'intermedi **5**{3} monosubstituït, es fa reaccionar de la mateixa manera que la primera amina amb un equivalent de l'amina corresponent **74a**, **74b** o **74c**, per així rendir el corresponent producte **70**, **71** o **72**.

Com en el cas dels compostos tetrasubstituïts de l'apartat 3.1.1, es comprova la viabilitat de la ruta sintètica utilitzant *p*-(fluorofenil)metilamina **74b**, ja que presenta bons resultats i genera pocs subproductes de fàcil separació. Un cop comprovada la viabilitat s'aplica per la resta de compostos.

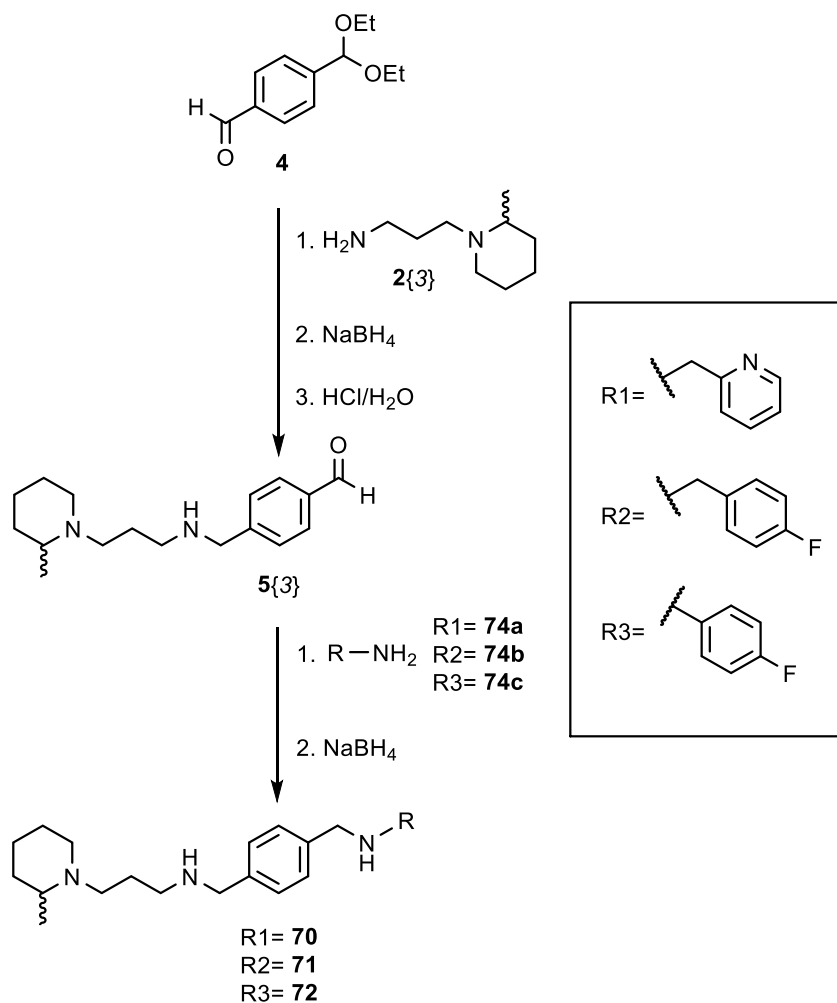


Figura 3.16. Ruta sintètica utilitzada per obtenir els compostos objectiu **70**, **71** i **72**.

### 3.1.2.1- Síntesi de l'intermedi monosubstituit 5{3}

S'utilitza, tal com s'ha dit, la metodologia de S. Pettersson en la que s'obté l'intermedi **5{3}** que ja es troba descrit en la seva tesi doctoral.<sup>[2]</sup> Consisteix en dissoldre el 4-(dietoximetil)benzalhid (**4**) en MeOH i s'afegeix un equivalent de l'amina lateral **2{3}**. Es deixa a reflux 48 hores amb  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  com a base i sota atmosfera de nitrogen. Es redueix la imina formada amb  $\text{NaBH}_4$  afegint-lo a poc a poc i es deixa agitant a temperatura ambient durant 6 hores. En acabar, s'afegeix aigua i s'extreu amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Finalment, es desfà el grup acetal afegint una dissolució d'HCl 2M i es deixa agitant dues hores a temperatura ambient. Es neutralitza el cru de reacció amb una dissolució de NaOH 1M i s'extreu amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Llavors d'eliminar el dissolvent a pressió reduïda, s'obté l'intermedi monosubstituit **5{3}** amb un rendiment del 99%.

Es comprova la seva obtenció i puresa enregistrant el seu espectre d' $^1\text{H}$ -RMN (en el que es poden identificar els senyals característics) i comparant-lo amb les dades obtingudes anteriorment al grup<sup>[2]</sup> (Figura 3.17). Destaca el senyal del protó del grup aldehid a 10 ppm o els

Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}

protons del carboni en posició benzílica a 3.8 ppm. S'aprecia, a més, l'alt grau de puresa obtingut sense necessitat de més passos de purificació.

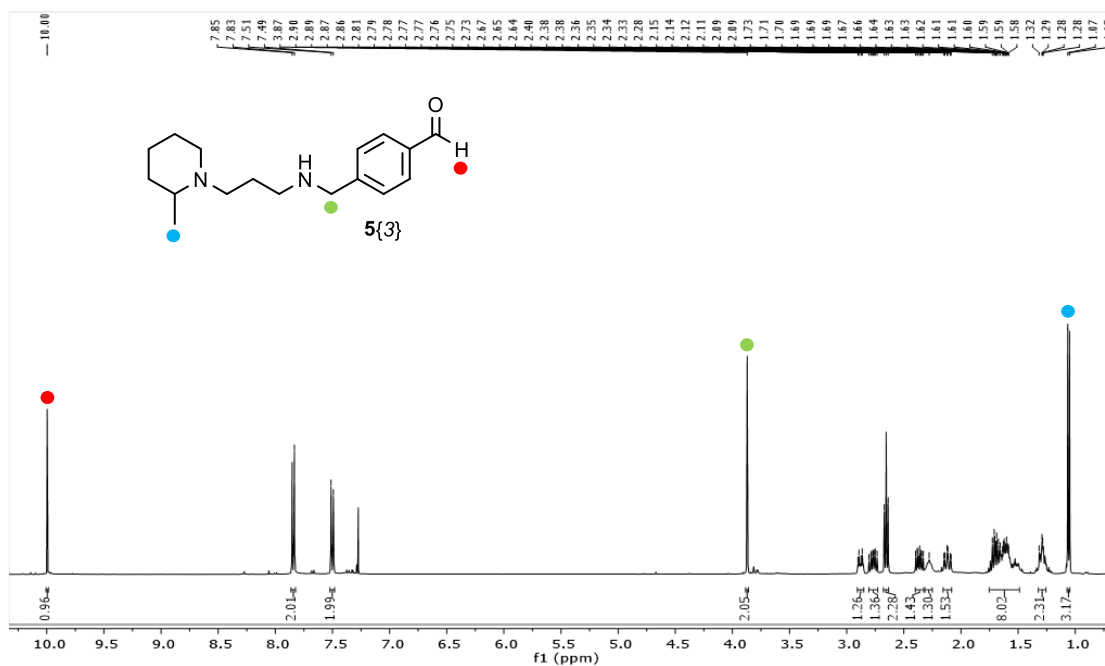


Figura 3.17. Espectre <sup>1</sup>H-RMN de l'intermedi 5{3}.

### 3.1.2.2- Substitució de l'intermedi 5{3}

Un cop obtingut el producte 5{3}, es realitza una segona aminació reductora, aquest cop utilitzant l'amina desitjada (74a, 74b o 74c) per què ens rendeixi els diferents compostos objectiu.

Com ja s'ha indicat, es posa a punt la metodologia utilitzant el reactiu 74b com a substituent, ja que és el substituent que en proves anteriors ens ha proporcionat millors rendiments i puresa.

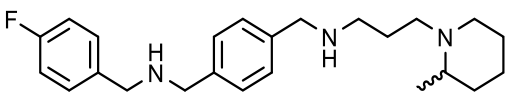
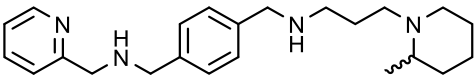
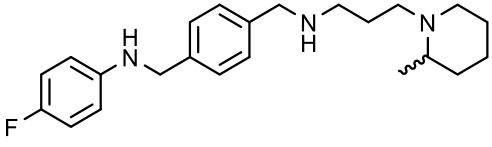
Així, es dissol l'intermedi aldehyd 5{3} en MeOH anhidre amb sulfat de sodi com a deshidratant, s'afegeix l'amina a introduir 74b i es deixa a reflux sota atmosfera de nitrogen durant 40h. En acabar, es filtra el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'afegeix un equivalent de NaBH<sub>4</sub> per reduir la imina formada. Es deixa agitant a temperatura ambient durant 6h i finalment s'extreu amb aigua i clorur de metilè. En eliminar el dissolvent a pressió reduïda s'obté l'amina 71 objectiu amb un rendiment del 88%.

Es comprova la seva obtenció i la seva puresa amb els espectres d'<sup>1</sup>H-RMN. En la Figura 3.18 es pot apreciar la conversió completa dels reactius amb la desaparició del senyal corresponent al protó del grup aldehyd i l'aparició dels protons corresponents a l'anell aromàtic del nou substituent provinent del reactiu 74b.





Taula 3.1. Rendiments dels productes 70, 71 i 72 objectiu.

Molècula	Nom	Rendiment (%)
	71	88
	70	23
	72	10

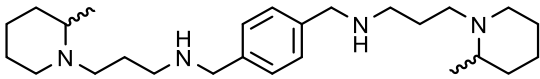
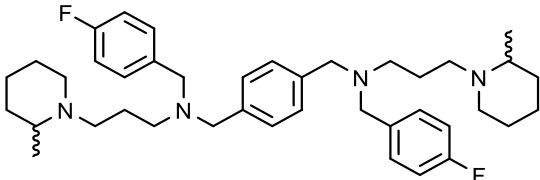
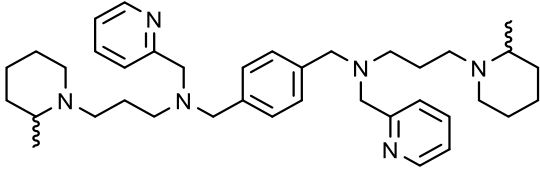
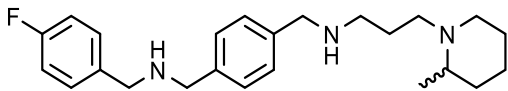
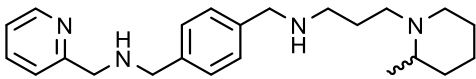
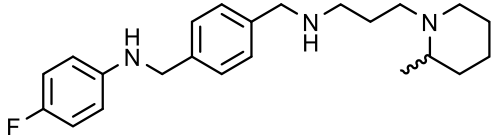
Com estava previst, el compost **71** és el que proporciona el millor rendiment. A més a més, cal ressaltar el baix rendiment obtingut pel compost **72**. Com s'havia comentat anteriorment, la menor flexibilitat del *p*-fluorobromobenzè **74c** podria explicar la menor reactivitat i provocar aquesta dràstica baixada de rendiment respecte a utilitzar l'homòleg amb baula metilènica **74b**.

### 3.1.3- Anàlisi d'activitat anti-VIH

Es realitzen els assaigs anti-VIH dels compostos tetrasubstituïts **65** i **66** i dels nous compostos no simètrics **70**, **71** i **72** al laboratori de Retrovirologia de la Fundació IrsiCaixa de l'Hospital Germans Trias i Pujol mitjançant un assaig colorimètric de MTT amb cèl·lules MT-4 i infectades amb la soca NL4-3 *wild type*.<sup>[8]</sup>

En la Taula 3.2 s'indiquen els valors d'activitat antiviral obtinguts per aquests compostos així com el resultat de la tetraamina **3{3}** de referència.

**Taula 3.2.** Dades d'activitat anti-VIH per els compostos tetrasubstituïts **65** i **66** i dels compostos no simètrics **70**, **71** i **72**, així com el valor corresponent a la tetraamina **3{3}** que s'agafa com a referència. La soca de VIH utilitzada és la NL4-3 wt en cèl·lules MT-4.

Molècula	Nom	EC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
	<b>3{3}</b>	0.121	>60.289
	<b>66</b>	>0.761	0.761
	<b>65</b>	1.809	>41.884
	<b>71</b>	1.069	8.265
	<b>70</b>	0.546	41.278
	<b>72</b>	1.299	5.818

Analitzant la taula es pot comprovar que cap de les modificacions fetes a la tetraamina **3{3}** aconseguix millorar els seus resultats d'activitat anti-VIH.

Es pot apreciar també l'efecte que té la presència del fluor en la molècula. Els compostos que contenen fluor presenten toxicitat. El marge entre l'EC<sub>50</sub> i la CC<sub>50</sub> és molt petit, per tant, encara que aquest fos molt baix quedaria inhabilitat com a fàrmac antiviral ja que està atacant igualment a les cèl·lules sanes.

Les molècules que contenen l'anell piridínic **65** i **70** presenten baixa toxicitat, millorant en aquest aspecte als compostos amb fluor en la seva estructura, fins i tot el compost **70** resulta ser el més actiu enfront el VIH del conjunt de les noves molècules sintetitzades tot i no superar la tetraamina **3{3}** de referència. Entre els compostos **65** i **70**, es pot veure com la molècula bisubstituïda **70** presenta millor activitat antiviral que el seu anàleg tetrasubstituït **65**, a més, les dues molècules tetrasubstituïdes es mantenen en un rang d'activitat anti-VIH igual que el de les amines no

simètriques sintetitzades, per tant sembla que la tetrasubstitució de l'espaiador no representa un tret diferencial respecte la resta de molècules doblement substituïdes.

Aquest fet podria explicar-se amb la conclusió, ja treta anteriorment al grup, que les molècules amb millor mobilitat i per tant amb més flexibilitat conformacional aporten millors valors d'activitat anti-VIH. Les molècules tetrasubstituïdes veuen limitada la seva mobilitat a causa de l'impediment estèric exercit pels nous substituents en els grups NH de banda i banda de l'anell.

Finalment, comparant els valors d'activitat dels compostos **71** i **72**, veiem que la presència o no de la baula metilènica i, per tant, l'augment de mobilitat de la molècula **71** respecte **72** no sembla afectar als resultats anti-VIH.

### 3.1.4- Nou compost naftalènic **73** amb substituents d'anell de piridina

Els resultats anteriors mostren que l'anell piridínic sembla ser un bon substituent per aconseguir activitat antiviral, tal com ja havien observat Shim i col·laboradors<sup>[3]</sup> en el cas del compost **54** (Figura 3.19), es podria pensar en utilitzar l'espaiador amb dues baules metilèniques a banda i banda de l'anell benzílic per obtenir un nou candidat. Ara bé, tal com s'ha vist en apartats anteriors, les reaccions necessàries per introduir el substituent piridínic generen nombrosos subproductes i crus de reacció complexos. Aquest fet, unit a la major complexitat de la via sintètica necessària per introduir l'espaiador *p*-fenilbisetilènic, desaconsella abordar la seva síntesi. Per contra, l'espaiador naftalènic usat en el capítol 2, tot i no millorar els valors d'activitat dels compostos amb l'espaiador *p*-fenilbismetilènic, confereix als productes resultants una baixa solubilitat, fet que facilita la seva purificació. Així doncs, es procedeix a la síntesi del compost tetraamínic **73** (Figura 3.19). En el cas de que s'aconsegueixin millorar els valors anti-VIH del compost de referència 3{3} es procedirà a assajar la síntesi del compost anàleg a **54** però amb l'espaiador *p*-fenilbisetilènic.

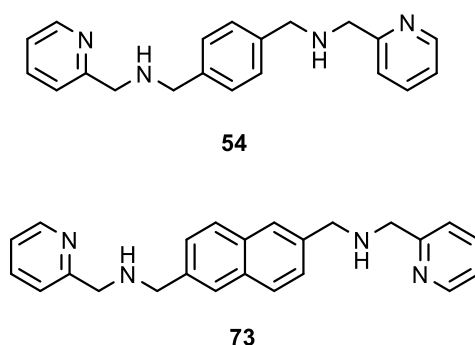
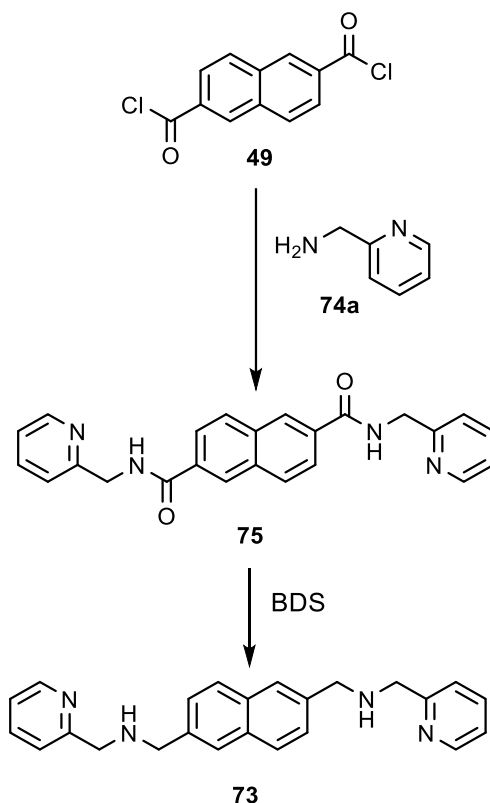


Figura 3.19. Estructures del compost **54** descrit per Shim et al i del nou compost **73**.

La ruta sintètica per a obtenir **73** és la mateixa utilitzada per els compostos amb l'espaiador naftalènic **47{x}** del capítol 2 (Figura 3.20).



**Figura 3.20.** Ruta sintètica per l'obtenció del producte naftalènic **73**.

A partir del clorur d'àcid de l'espaiador naftalènic, obtingut tal com s'indica en l'apartat 2.2.1, per reacció amb l'amina **74a** que incorpora l'anell piridínic s'obté l'intermedi amida **75**, aquest es redueix amb BDS per rendir el compost **73** objectiu.

### 3.1.4.1- Formació de l'intermedi amida **75**

Un cop obtingut el diclorur d'àcid **49**, es procedeix a realitzar la substitució amb l'amina piridínica **74a** a banda i banda de l'espaiador. S'utilitza de nou la metodologia adaptada de Barge i col·laboradors<sup>[5]</sup>, però aquest cop tenint en compte la baixa solubilitat dels productes de partida i que es preveu que tinguin també el producte final **73**.

Es dissol el clorur d'àcid naftalènic **49** en clorur de metilè en fred i s'afegeix trietilamina com a base i l'amina **74a** gota a gota. Es deixa agitant a temperatura ambient durant 17h i precipita el producte intermedi **75** desitjat.

El sòlid resultant es filtra i es neteja de possibles impureses amb clorur de metilè. S'obté el producte intermedi **75** desitjat amb un 67% de rendiment. Es comprova la seva puresa mitjançant espectroscòpia de <sup>1</sup>H-RMN (Figura 3.21) on s'identifiquen els senyals característics.



**Figura 3.21.** Espectre <sup>1</sup>H-RMN de l'intermedi amida **75** amb els senyals característics assignats. L'espectre està realitzat amb DMSO com a dissolvent.

Es pot veure com la capacitat de precipitar en el medi de reacció que li confereix l'espaiador naftalènic evita la presència d'impureses que normalment acompanya la formació de compostos amb el substituent piridínic com s'ha vist en casos anteriors.

### 3.1.4.2- Obtenció del compost naftalènic **73**

La reducció de l'intermedi amida **75** es realitza amb BDS i de nou segons la metodologia proposada per Masuko i col·laboradors<sup>[6]</sup> i Routaboul i col·laboradors<sup>[7]</sup> adaptada a la baixa solubilitat tant del producte de partida com del compost final **73**. De la mateixa forma que amb els compostos amb l'espaiador naftalènic del capítol 2, es suspèn l'intermedi **75** en THF en un bany de gel i s'afegeix el BDS a poc a poc en petites porcions. Un cop s'ha afegit tot l'agent reductor, es porta la dissolució a temperatura de reflux durant 21 hores.

En acabar, s'afegeix HCl 1,25M en MeOH i es deixa agitant a temperatura ambient durant 3 hores per formar el clorhidrat. En eliminar el dissolvent a pressió reduïda, el sòlid obtingut es neteja amb acetona i es neutralitza amb una dissolució de NaOH 1M. En extreure amb clorur de metilè i aigua s'obté el producte desitjat **73** amb un rendiment del 41%.

En la Figura 3.22 es mostra l'espectre <sup>1</sup>H-RMN del producte **73** amb els principals senyals assignats. Es pot apreciar l'aparició del senyal del metilè fruit de la reducció del grup carbonil a 3.96 ppm.



**Figura 3.22.** Espectre  $^1\text{H}$ -RMN del producte **73** objectiu amb els senyals característics assignats. L'espectre està realitzat amb DMSO com a dissolvent.

### 3.1.4.3- Anàlisi de l'activitat anti-VIH del compost naftalènic **73**

Es realitza l'assaig anti-VIH al laboratori de Retrovirologia de la Fundació IrsiCaixa de l'Hospital Germans Trias i Pujol del nou producte per comprovar si s'ha millorat l'activitat amb aquest nou substituent respecte a l'anàleg naftalènic que incorpora la 3-aminopropil-*N*-pipecolina (**47{3}**). En la Taula 3.3 es representen els valors d'activitat del nou compost **73** així com del seu intermedi diamida **75** i l'anàleg **47{3}** amb l'espaiador naftalènic però amb l'amina **2{3}** com a substituent a banda i banda de l'espaiador.

**Taula 3.3.** Valors d'activitat anti-VIH dels nous compostos **73** i **75**, amb la tetraamina **47{3}** com a referència. La soca de VIH utilitzada és la NL4-3 wt en cèl·lules MT-4.

Molècula	Nom	EC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)	IS
	<b>47{3}</b>	0.191	21.110	110.52
	<b>75</b>	>63.063	>63.063	-
	<b>73</b>	5.102	>67.846	13.298

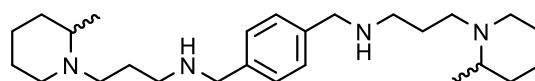
Es pot veure que el compost **75** amb la funcionalitat amida no resulta actiu a la concentració màxima assajada de 25 µg/ml tal com es preveia, ja que, com ja s'ha vist anteriorment, la funcionalitat amida no proporciona bons resultats d'activitat anti-VIH als compostos que la contenen.

En comparar les tetraamines **73** i **47{3}**, es pot apreciar com el nou compost **73** no aconsegueix millorar els valors d'activitats conferits per l'amina lateral **2{3}** en el mateix espaciador. El valor de CC<sub>50</sub> de la molècula naftalènica **73** sí que és major a la CC<sub>50</sub> del compost de referència **47{3}**. Donat que el valor d'EC<sub>50</sub> empitjora i el de CC<sub>50</sub> millora, per veure si realment hi ha una millora o no dels resultats en aquest cas es calcula l'índex terapèutic d'ambdós productes on es veu com el compost amb la pipercolina com a heterocicle posseeix un índex terapèutic molt més ampli tot i tenir un valor de toxicitat més elevat, per tant el canvi de substituent no ha aportat una millora de cara a inhibir CXCR4.

Per tant, amb la inclusió del nou anell piridínic com a heterocicle lateral no s'ha aconseguit millorar l'activitat antiviral, per aquest motiu es decideix no seguir la recerca al voltant del substituent amb anell piridínic en no mostrar senyals de millora.

## 3.2- Nous heterocicles per a la síntesi de tetraamines

Donat que tots els esforços realitzats en les modificacions al voltant de la tetraamina **3{3}** (Figura 3.23), que com recordem és un dels compostos amb millor activitat anti-VIH sintetitzats al grup, no han reeixit, es decideix explorar nous heterocicles laterals per veure si així es poden aconseguir millors resultats antivirals.



**3{3}**

**Figura 3.23.** Estructura de la tetraamina **3{3}**.

Per a fer-ho, es decideix utilitzar la química computacional per explorar el màxim de diversitat estructural al voltant de l'estructura de **3{3}** i sintetitzar-ne tan sols una selecció dels millors candidats alternatius. Això ens servirà per veure si aquesta és una bona ruta per seguir la recerca o si, al contrari, cal refer el plantejament.

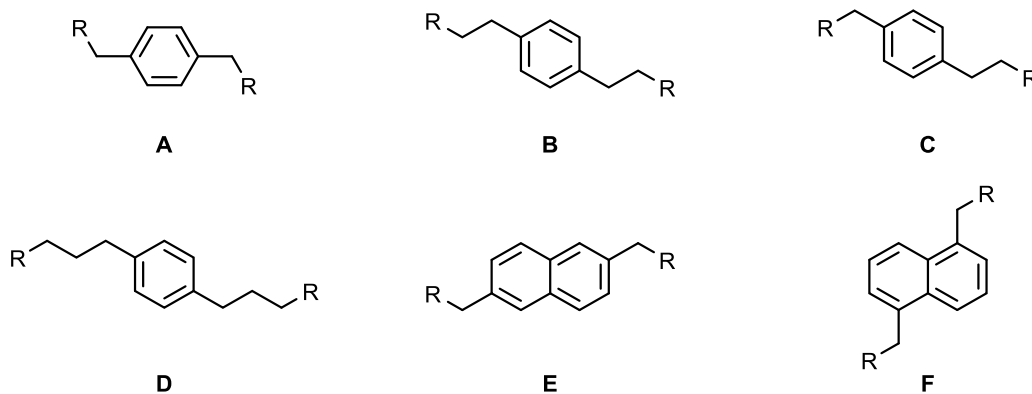
Amb el desig d'ampliar la diversitat enfront els compostos inhibidors de CXCR4 sintetitzats anteriorment al grup, es decideix explorar aquesta diversitat tant en els heterocicles com en l'espaiador, afegint nous espaciadors als ja utilitzats anteriorment al grup.



La cadena metilènica que uneix l'espaiador amb l'heterocicle, però, s'opta per mantenir-la en 3 baules metilèniques, ja que també s'ha explorat l'ampliació i reducció d'aquesta<sup>[1,2,9]</sup>, essent la trismetilènica la que millors valors d'inhibició ha proporcionat i no es veu tant potencial de millora en aquest aspecte.

### 3.2.1- Construcció de la quimioteca

Es decideix utilitzar espaiadors dels ja utilitzats anteriorment al grup amb algunes variacions. Aquesta decisió de no incloure grans canvis en els espaiadors es pren per evitar canviar completament la ruta sintètica a utilitzar un cop ja ha estat optimitzada, així com per preservar l'estructura tetraamínica que sembla ser la que millors valors d'inhibició proporciona.<sup>[1,2,9]</sup> Es seleccionen sis espaiadors (Figura 3.24) entre els quals hi ha, com s'ha indicat, espaiadors ja utilitzats com els **A** i **B**,<sup>[1,2]</sup> o **C** i **E** (en el present treball) i alguns espaiadors nous que presenten petites variacions d'aquests, com **D** i **F**.



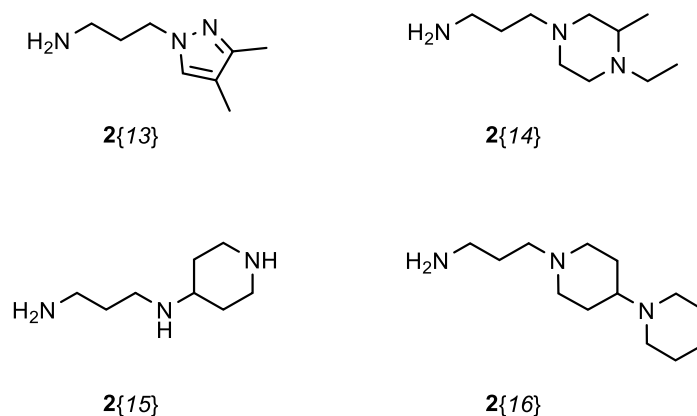
**Figura 3.24.** Estructura dels espaiadors escollits per la formació de la quimioteca.

Com ja s'ha indicat, a l'hora d'escollir les amines laterals es parteix de dues premisses:

-La cadena metilènica de les amines que separa els dos grups N ha d'estar formada per tres baules metilèniques.

-Els heterocicles terminals han de presentar estructures diferents a les ja utilitzades anteriorment en el grup.

S'afegeix la condició que aquestes amines siguin comercialment assequibles. Amb aquestes condicions, es seleccionen un total de 235 amines laterals possibles extretes dels catàlegs comercials de les principals empreses distribuïdores de productes químics. Alguns exemples d'aquestes amines seleccionades es mostren en la Figura 3.25.



**Figura 3.25.** Alguns exemples d'amines laterals 2{x} utilitzades per a la construcció de la quimioteca.

S'utilitza el programari *Molecular Operating Environment* (MOE)<sup>[10]</sup> per generar la quimioteca combinatòria. De la combinació dels 6 espaiadors amb aquestes 235 possibles amines laterals seleccionades en sorgeix una quimioteca de 331350 molècules (tenint en compte que les tetraamines resultants poden ser tant simètriques com no simètriques). Una selecció de molècules d'aquesta mida precisa un temps de càlcul massa elevat que en dificulta el treball. Per això es decideix realitzar un filtratge que en redueixi el nombre però que alhora sigui una selecció representativa de la totalitat de compostos generats.

S'inicia la reducció de la quimioteca eliminant de la selecció algunes amines laterals. S'eliminen aquelles que no presenten molta diferència respecte als heterocicles ja utilitzats al grup i aquelles que podrien comportar dificultats en la ruta sintètica d'obtenció de les tetraamines. Amb aquesta selecció més acurada s'obté un llistat de 180 amines laterals que combinades amb els 6 possibles espaiadors ens genera una quimioteca de 194400 molècules. Segueix sent una selecció massa gran així que es decideix reduir-ne el volum realitzant una selecció per diversitat seguit d'una selecció focalitzada dels millors candidats.

### 3.2.2- Reducció de la quimioteca

Així doncs, es decideix realitzar un filtrat previ de la quimioteca fins a obtenir una mida manejable que ens comporti un temps de càlcul raonable.

Inicialment es decideix filtrar segons les regles de Lipinski.<sup>[11]</sup> Mitjançant el mateix programa MOE<sup>[10]</sup>, es realitza una predicció de quines molècules de les obtingudes tenen més possibilitats de complir aquestes regles, presentar millor biodisponibilitat i tenir més probabilitat de resultar un possible fàrmac. No obstant això, després d'aplicar aquest filtre, la quimioteca tan sols es redueix fins al voltant de les 137000 molècules, un nombre encara massa elevat per poder treballar.

Abans de continuar amb el filtratge s'optimitza la geometria de totes les molècules que componen la quimioteca i es determinen els descriptors 2D i 3D inclosos a les Taules 3.4 i 3.5 que són els mateixos utilitzats dins la tesi doctoral de S. Pettersson.<sup>[2]</sup>

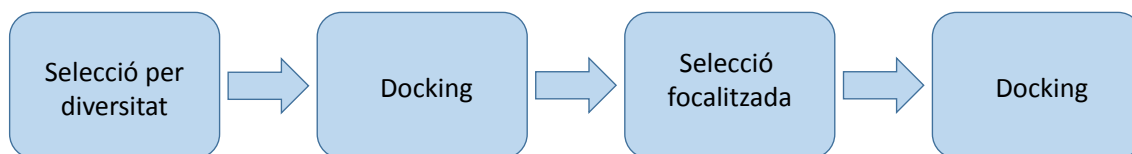
Taula 3.4. Descriptors 2D utilitzats.

DESCRIPTORS 2D	
<b>Propietats físiques</b>	apol, bpol, density Weight, Fcharg, mr, SMR, Weight, logP (o/w), logS, reactive, SlogP, TPSA, vdw_vol i vdw_area.
<b>Àrees de superfície subdividides</b>	Slog_VSA(0-9) i SMR_VSA(0-7).
<b>Número d'àtoms i enllaços</b>	a_aro, a-count, a_heavy, a_ICM, a_IC, a_nH, a_nB, a_nC, a_nN, a_nO, a_nF, a_nP, a_nS, a_nCl, a_nBr, a_nI, b_1rotR, b_ar, b_count, b_double, b_heavy, b_rotN, b_rotR, b_single, b_triple, rings, VAdjMa i VadjEq.
<b>Topològics</b>	chi0, chi0_C, chi1, chi1_C, chi0v, chi0v_C, chi1v, chi1v_C, Kier1, Kier2, Kier3, KierFlex, Zagreb, balabanJ, radius, diameter, petitjeanSC, petitjean, VDistEq, VDistMa, weinerPol i weinerPath.
<b>Característiques farmacològiques</b>	a_acc, a_acid, a_base, a_don, a_hyd, vsa_acc, vsa_acid, vsa_base, vsa_don, vsa_hyd, vsa_other i vsa_pol.
<b>Càrregues parcials</b>	Q_PC+, PEOE_PC+, Q_PC-, PEOE_PC-, Q_RPC, PEOE_RPC-, Q_VSA_POS, PEOE_VSA_POS, Q_VSA_NEG, PEOE_VSA_NEG, Q_VSA_PPOS, PEOE_VSA_PPOS, Q_VSA_PNEG, PEOE_VSA_PNEG, Q_VSA_HYD, PEOE_VSA_HYD, Q_VSA_POL, PEOE_VSA_POL, Q_VSA_FPOS, PEOE_VSA_FPOS, Q_VSA_FNEG, PEOE_VSA_FNEG, Q_VSA_FPPOS, PEOE_VSA_FPPOS, Q_VSA_FPNEG, PEOE_VSA_FPNEG, Q_VSA_FHYD, PEOE_VSA_FHYD, PEOE_VSA(-6 - +6).

Taula 3.5. Descriptors 3D utilitzats.

DESCRIPTORS 3D	
<b>Energia potencial</b>	E, E_ang, E_ele, E_nb, E_oop, E_sol, E_str, E_strain, E_tor, E_vdw, E_rele, E_rnb, E_rso i E_rvdw.
<b>Superfície, forma i volum</b>	ASA, vol, rgyr, pmi, pmiX, pmiY, pmiZ, glob, dens i VSA.
<b>Càrrega dependent de la conformació</b>	ASA+, ASA-, ASA_H, ASA_P, DASA, CASA-, DCASA, CASA-, DCASA, FASA+, FASA-, FCASA-, CASA, FASA_H, FASA_P i dipole.

Per seguir reduint el nombre de molècules de la quimioteca es procedeix segons l'esquema mostrat en la Figura 3.26.



**Figura 3.26.** Esquema a seguir per reduir la mida de la quimioteca.

Segons s'indica, es realitza una selecció de diversitat obtenint així una selecció de les molècules més representatives de la quimioteca. A part dels descriptors 2D i 3D anteriors s'inclouen nous descriptors d'anàlisi de components principals (PCA). L'anàlisi per PCA és una tècnica de reduir la dimensió d'un conjunt de dades, en el nostre cas l'objectiu es reduir el nombre de descriptors.

El resultat és un *set* de descriptors d'una mida inferior, ortogonals i normalitzats. S'utilitzen els 12 primers descriptors PCA que representen més del 80% de la variància dels descriptors. No s'augmenta aquest nombre ja que llavors perdria sentit el fet d'haver utilitzat PCA per reduir la dimensionalitat de descriptors.

Per a fer-ho es distribueixen les molècules en l'espai en funció dels descriptors seleccionats. Aquest espai es divideix en 5000 subespais i de cada un d'aquests subespais s'agafa una sola molècula representativa. El resultat és una quimioteca de 5000 molècules que representen tota la diversitat de la quimioteca original de 137000 molècules.

Un cop s'ha obtingut la selecció de les 5000 molècules més representatives per diversitat, s'optimitza la seva geometria i es realitza un *docking* per *Virtual Screening* (MOE<sup>[10]</sup>), que consisteix en realitzar el *docking* mitjançant l'estructura optimitzada de cada compost fixada. Es tracta d'una simplificació necessària si es volen obtenir resultats amb un temps raonable.

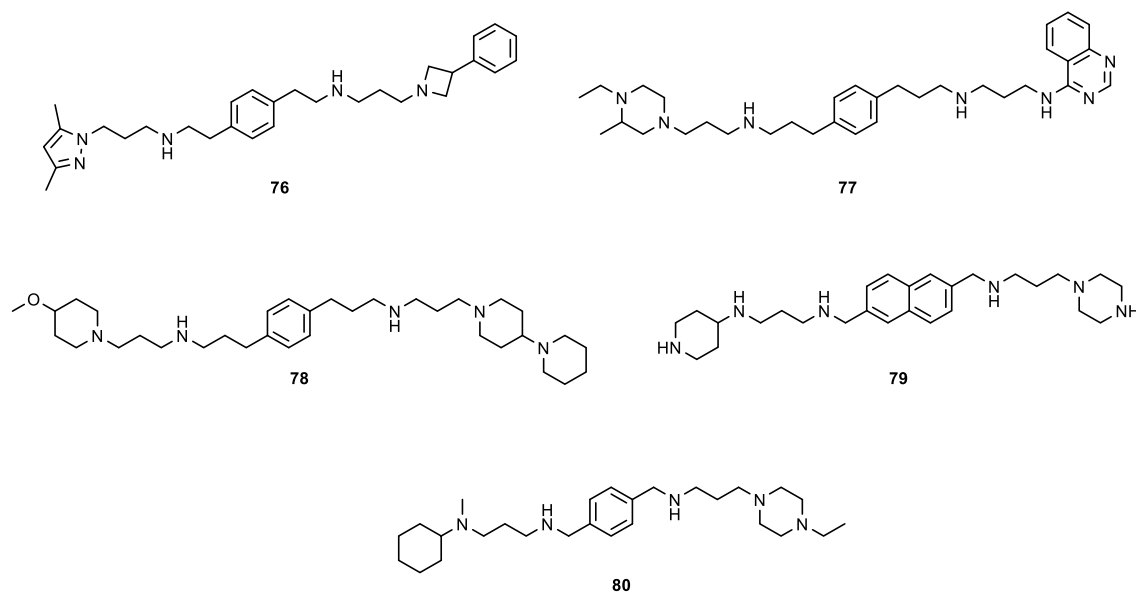
Aquest *docking* es focalitza en el lloc d'unió inhibidor-proteïna mitjançant una caixa tridimensional delimitada manualment (*grid*). Aquest lloc d'unió ja va ser validat anteriorment al GEM en el treball de J.M. Planesas.<sup>[12]</sup> Es realitza amb el mètode *Simulated Annealing* (SA) basat en els mètodes Monte Carlo amb les molècules obtingudes de la selecció per diversitat. En resulten 4 molècules amb la millor predicció d'inhibició.

A aquestes molècules resultants del *docking* anterior se'ls hi realitza una selecció focalitzada, que es tracta de seleccionar, de cada una, un grup de molècules al seu voltant segons criteri de similitud en funció dels descriptors seleccionats inicialment. Cal ajustar els paràmetres de selecció per evitar tornar a tenir una quimioteca massa extensa i difícil de treballar. Aquesta nova selecció focalitzada rendeix una quimioteca de 6638 molècules.

### 3.2.3- Docking

S'utilitza el mateix programari utilitzat anteriorment (MOE)<sup>[10]</sup> per realitzar el *docking* de la quimioteca resultant del filtratge. Com en el cas anterior, es realitza per *Virtual Screening* i també es focalitza la zona de *docking* delimitant manualment el *grid* a la zona d'unió proteïna-ligand. Cal remarcar que els dos *dockings* realitzats, com s'ha comentat, es realitzen amb les estructures optimitzades i fixades per reduir el temps de càlcul. En conseqüència, els resultats obtinguts també es tractaran d'aproximacions, per tant, és necessari indicar que aquest procés computacional s'ha realitzat per obtenir uns resultats orientatius i no sintetitzar noves molècules a cegues, en cap cas es pot tractar el resultat com un model de predicció totalment acurat.

Es decideix incloure-hi també molècules del grup sintetitzades i avaluades anteriorment per validar el *docking* i tenir una escala aproximada de la predicció d'activitat que haurien de tenir les noves molècules en comparació. Dels resultats obtinguts, es seleccionen les molècules més ben posicionades (Figura 3.27).



**Figura 3.27.** Compostos millor posicionats en el *docking* realitzat enfront a CXCR4.

Un cop es tenen les possibles molècules a sintetitzar, s'analitzen una a una per a comprovar-ne la viabilitat sintètica i el cost d'obtenir-la.

Totes elles, segons el *docking* realitzat, es troben més ben posicionades que qualsevol de les molècules ja sintetitzades i analitzades al grup anteriorment per tant podríem esperar obtenir, en primera instància, valors d'activitat anàlegs o millors. Per comprovar que el *docking* és correcte i que les previsions d'activitat són fiables, es decideix tan sols sintetitzar un dels compostos, ja que en haver utilitzat tantes aproximacions, si el model no és correcte, sintetitzar tots els

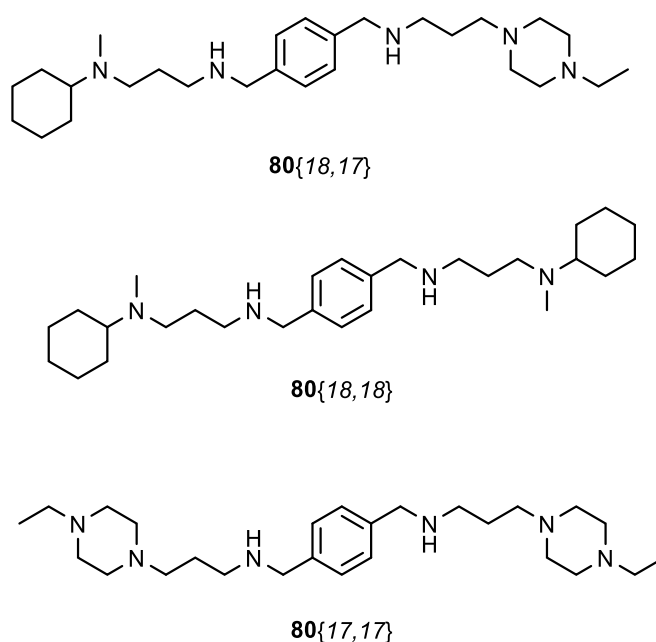
Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}

compostos seria apostar per un cost de temps i econòmic molt elevat sense tenir garanties d'èxit en els resultats d'activitat.

Les molècules **77** i **78** tenen un cost molt elevat de producció fruit de la combinació del cost de les amines laterals utilitzades. Per aquest motiu es decideix no sintetitzar-les.

Els compostos **76** i **79** amb l'espaiador *p*-fenilbisetilènic i el naftalènic, no permeten síntesis no simètriques de tetraamines, per tant s'opta per no escollir-los.

Finalment es decideix sintetitzar el compost no simètric **80**{18,17} així com els seus equivalents simètrics **80**{18,18} i **80**{17,17}, la qual cosa permetrà veure l'efecte de cada una de les amines laterals per separat (Figura 3.28).



**Figura 3.28.** compostos objectiu **80**{18,17}, **80**{18,18}, i **80**{17,17} fruit del *docking* realitzat.

### 3.2.4- Síntesi de les tetraamines **80**{x,y}

Per a la seva síntesi es seguirà la ruta sintètica ja utilitzada anteriorment en el grup per a la síntesi de tetraamines simètriques i no simètriques amb l'espaiador *p*-fenilbismetilènic mitjançant una reacció d'aminació reductora.<sup>[2,9]</sup>

Les amines 3-(4-etil-1-piperazinil)propanamina (**2**{17}) i *N*-(3-aminopropil)-*N*-ciclohexil-*N*-metilamina (**2**{18}) (Figura 3.29) a utilitzar no es troben disponibles comercialment a preus assequibles, per tant s'opta per realitzar la seva síntesi a partir de l'heterocicle en forma d'amina secundària a la que se li enllaçarà la cadena trismetilènica mitjançant una reacció de Gabriel<sup>[13,14]</sup> per a obtenir les amines desitjades per l'obtenció de les diferents tetraamines objectiu.



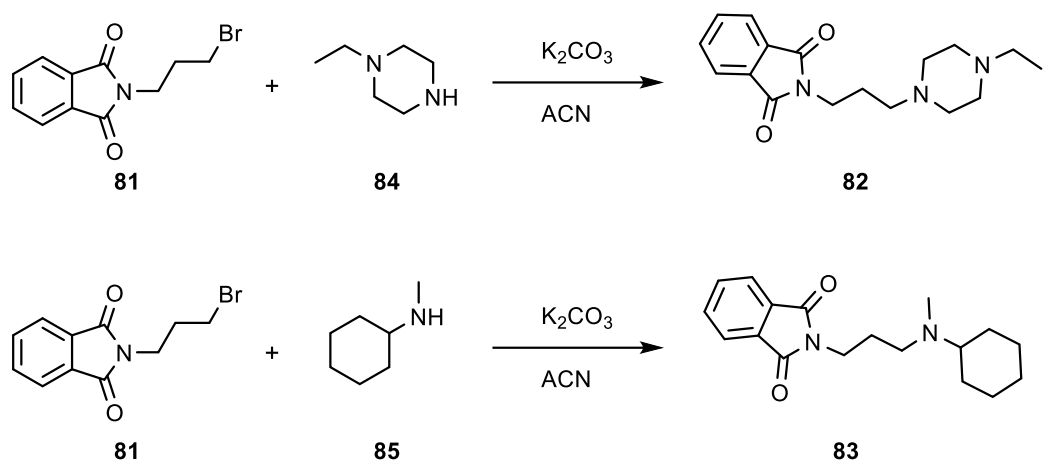


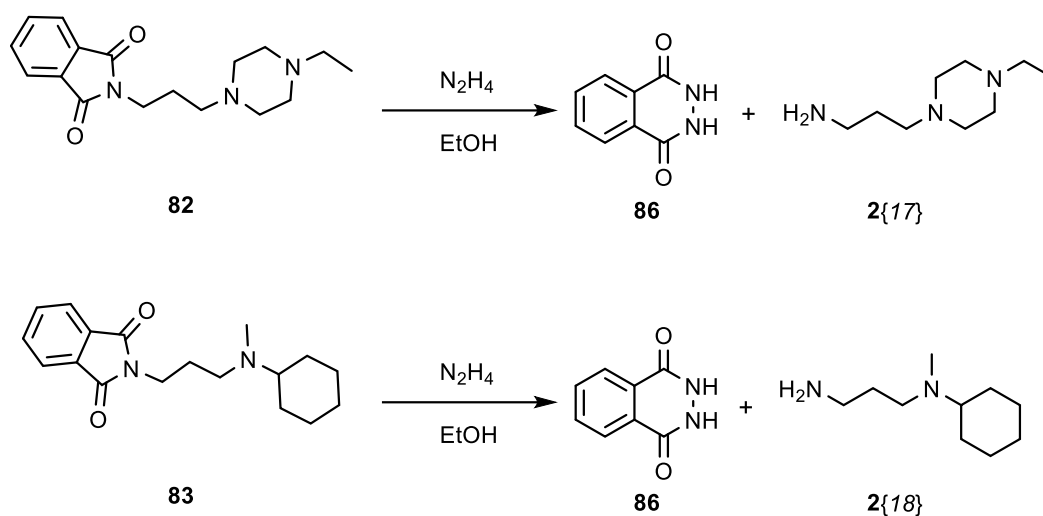
Figura 3.31. reaccions d'obtenció dels intermedis ftalimida **82** i **83**

Taula 3.6. Rendiments d'obtenció dels intermedis ftalimida **82** i **83**.

Molècula	Nom	Rendiment
	<b>82</b>	85%
	<b>83</b>	75%

Seguidament es realitza la desprotecció d'aquests intermedis ftalimida amb hidrazina per rendir l'amina corresponent objectiu i ftalilhidrazina **86** com a subproducte (Figura 3.32).





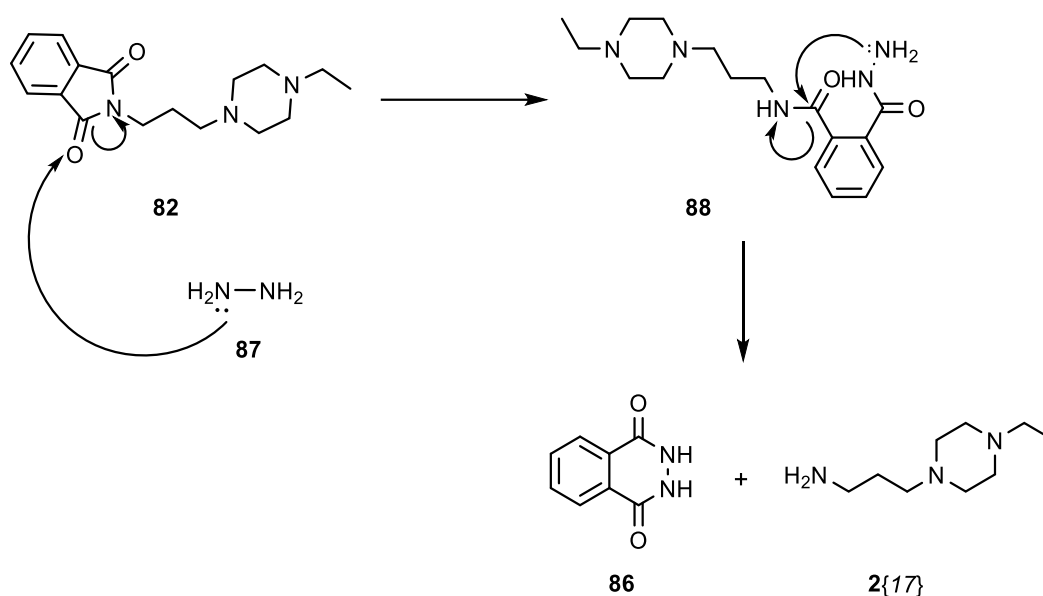
**Figura 3.32.** Reaccions d'obtenció de les amines **2{17}** i **2{18}** a partir de la hidròlisi dels intermedis ftalimida corresponents.

Es fa reaccionar l'intermedi ftalimida **82** i **83** amb un excés d'hidrazina en etanol. Es deixa una hora a reflux i apareix un precipitat blanc corresponent a la ftalilhidrazina (**86**).<sup>[13-17]</sup> En filtrar-lo i eliminar tant el dissolvent com l'excés d'hidrazina a pressió reduïda, s'afegeix acetat d'etil per acabar de fer precipitar les restes de ftalilhidrazina (**86**) que pot haver quedat dissolta en etanol i que en aquestes noves condicions precipitarà. Es filtra de nou i s'elimina l'acetat d'etil a pressió reduïda. S'obtenen les amines **2{17}** i **2{18}** objectiu. Els rendiments respectius es mostren en la Taula 3.7.

**Taula 3.7.** Rendiments d'obtenció de les amines **2{17}** i **2{18}** així com els rendiments globals per obtenir-les a partir de les amines secundàries **84** i **85**.

Molècula	Nom	Rendiment	Rendiment global
	<b>2{17}</b>	85%	72%
	<b>2{18}</b>	46%	34%

El mecanisme proposat per a aquesta reacció d'hidròlisi de les ftalimides **82** i **83** és el que es mostra en la Figura 3.33 on es mostra l'exemple en el cas del producte **82**. La hidrazina ataca un dels carbonils de la ftalimida **82** per trencar-la i obtenir l'intermedi de reacció **88** que automàticament pateix una ciclació interna que en provoca el trencament en ftalilhidrazina (**86**) i l'amina primària **2{x}** desitjada.

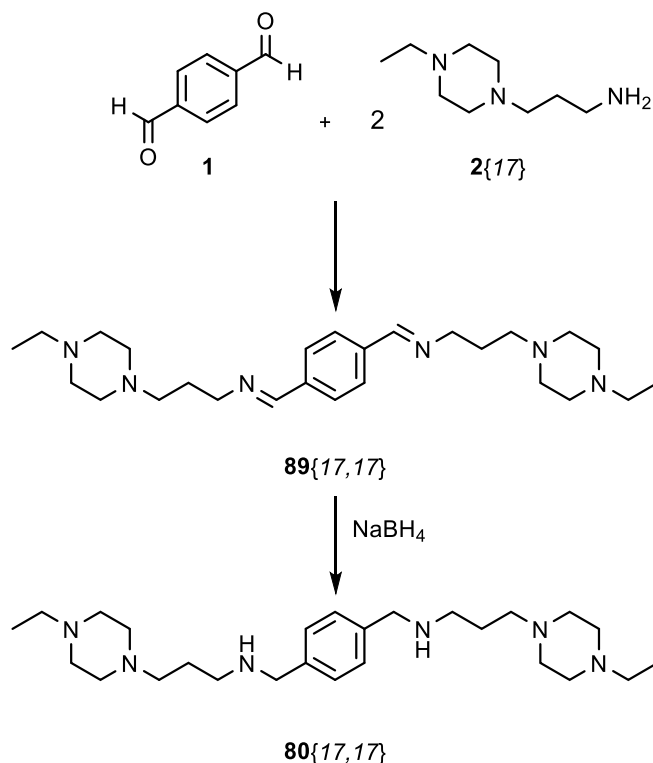


**Figura 3.33.** Mecanisme de reacció de la hidròlisi de l'intermedi ftalimida **82** amb hidrazina (**87**) per rendir l'amina objectiu **2{17}** a través de l'intermedi **88**.

Un cop s'obtenen les amines a utilitzar en la síntesi de les tetraamines objectiu, es comprova la seva puresa mitjançant ressonància magnètica nuclear i la coincidència de les dades espectroscòpiques amb les descrites en la bibliografia.

### 3.2.4.2- Formació de les tetraamines simètriques **80{17,17}** i **80{18,18}**

Com ja s'ha indicat, la ruta sintètica a seguir és una aminació reductora com la que es mostra en la Figura 3.34 amb l'exemple concret de la tetraamina **2{17}**, aquesta ruta ja s'ha utilitzat anteriorment per a l'obtenció d'aquest tipus de productes.<sup>[2,5]</sup>



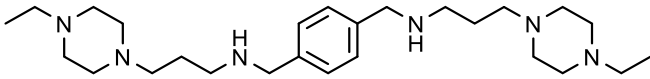
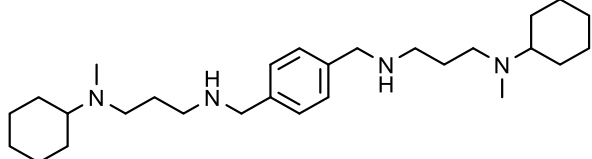
**Figura 3.34.** ruta sintètica per a l'obtenció de les tetraamines **80**{x,x}.

Es fa reaccionar el *p*-tereftaldialdehid **1** amb dos equivalents de la 3-(4-etil-1-piperazinil)propanamina (**2**{17}) sintetitzada en etanol com a dissolvent i sulfat sòdic anhidre com a deshidratant.

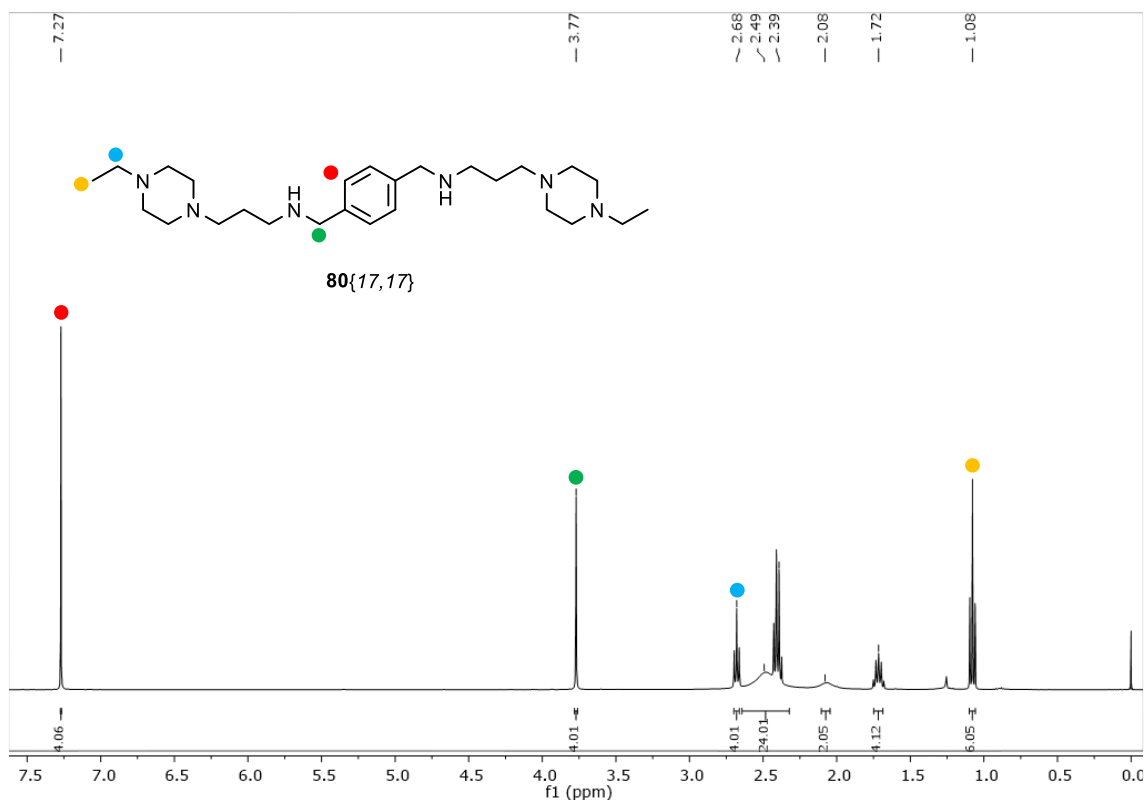
Es realitza la reacció en calefacció de microones a 120°C durant 2 hores. Posteriorment es filtra el sulfat sòdic, s'afegeix borohidrur sòdic per reduir el grup imina i aconseguir la tetraamina **80**{17,17} objectiu i es deixa 8 hores agitant a temperatura ambient. S'elimina el dissolvent a pressió reduïda i s'eliminen impureses mitjançant una extracció líquid-líquid d'aigua i clorur de metilè. S'obté el compost **80**{17,17} amb un rendiment del 51%.

Es segueix el mateix procediment per obtenir el compost **80**{18,18}. En la Taula 3.8 es mostren els rendiments i els rendiments globals tenint en compte la síntesi de les amines corresponents per els dos productes.

**Taula 3.8.** Rendiments i rendiments globals per a l'obtenció de les tetraamines simètriques **80**{17,17} i **80**{18,18} objectiu.

Molècula	Nom	Rendiment	Rendiment Global
	<b>80</b> {17,17}	51%	37%
	<b>80</b> {18,18}	85%	29%

Es comprova la puresa dels compostos obtinguts mitjançant espectroscòpia  $^1\text{H}$ -RMN. En la Figura 3.35 es poden identificar els senyals característics en el cas del compost **80**{17,17} així com l'absència d'impureses sense necessitat de nous passos de purificació.



**Figura 3.35.** Espectre  $^1\text{H}$ -RMN del compost **80**{17,17} amb els senyals característics remarcats.

### 3.2.5- Síntesi de la tetraamina no simètrica 80{18,17}

Per a obtenir la tetraamina **80{18,17}** no simètrica fruit de la combinació de les dues amines **2{17}** i **2{18}** emprades en la síntesis de **80{17,17}** i **80{18,18}** s'utilitza la ruta sintètica adaptada en el treball de S. Pettersson (Figura 3.36).<sup>[2]</sup>



Figura 3.36. Ruta sintètica per obtenir la tetraamina no simètrica **80{18,17}**.

Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}

El primer pas per sintetitzar la tetraamina **80{18,17}** és la substitució unilateral de l'espaiador amb l'amina **2{17}**. Per això es fa reaccionar l'espaiador 2-(4-dietoximetil)fenil)acetaldehid (**4**) amb un equivalent de l'amina **2{17}** en metanol i en presència de sulfat de sodi. La imina resultant es redueix d'igual forma que en altres casos amb borohidruir sòdic i es tracta seguidament amb una dissolució d'HCl 2M per hidrolitzar el grup acetal, posteriorment es neutralitza amb NaOH i s'extreu amb diclorometà. Llavors d'eliminar el dissolvent a pressió reduïda s'obté l'intermedi desitjat 4-(((3-(4-etilpiperazinil)propil)amino)metil)benzaldehid (**5{17}**) amb un rendiment del 65%.

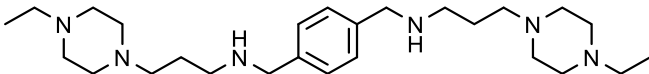
Un cop s'obté l'intermedi **5{17}**, es procedeix a fer-li una segona aminació reductora en les mateixes condicions. Aquest cop s'utilitza un equivalent i mig de l'amina **2{18}**. S'obté la tetraamina **80{18,17}** desitjada amb un rendiment del 88% i, per tant, un rendiment global del 57%.

### 3.2.6- Anàlisi d'activitat anti-VIH dels compostos **80{x,y}**

Un cop es tenen els tres compostos objectiu **80{x,y}**, es procedeix a analitzar el seu poder d'inhibició del receptor CXCR4 a partir d'un assaig anti-VIH. Es decideix fer aquest assaig en aquest punt abans de seguir sintetitzant més productes fruit del *docking* de l'apartat 3.2.3 o de modificar els que hem obtingut. Si els valors antivirals obtinguts són millors que els proporcionats per les quimioteques anteriors del grup tal com indica el *docking* realitzat es seguirà treballant en aquesta línia, en canvi, si no s'aconsegueix una millora, voldrà dir que el model i la selecció utilitzats no són correctes i caldrà fer un pas enrere per trobar una nova família amb la que treballar.

Els assaigs d'activitat anti-VIH es realitzen de la mateixa manera que en els casos anteriors en el Laboratori de Retrovirologia de la Fundació IrsiCaixa de l'Hospital Germans Trias i Pujol, mitjançant un assaig colorimètric amb MTT i amb el mateix equip per a poder comparar-los. Recordem que la soca utilitzada de VIH és la NL4-3 *wild type* i les cèl·lules MT-4 d'un pacient amb leucèmia (Taula 3.9).

**Taula 3.9.** Resultats de  $CC_{50}$  i  $EC_{50}$  de les tetraamines **80{x,y}** juntament amb les molècules de referència AMD3100 i **3{3}**<sup>[2]</sup> en cèl·lules MT-4 amb la soca de VIH NL4-3 wt.

Molècula	Nom	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	$CC_{50}$ ( $\mu$ M)
	<b>80{17,17}</b>	3.955	>11.110

Molècula	Nom	EC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
	80{18,18}	0.473	>11.060
	80{18,17}	0.168	>11.080
	3{3}	0.121	>60.289
	AMD3100	0.003	>1.989

Es pot veure en la taula que el nou compost tetraamínic **80{18,17}** no simètric presenta valors d'activitat antivirals similars als de la tetraamina **3{3}** que es pretenia millorar però presenta pitjors valors de CC<sub>50</sub>, això n'augmenta la toxicitat i fa més petit el rang terapèutic. Amb tot, el resultat obtingut és molt rellevant ja que **80{18,17}** és el primer sistema tetraamínic no simètric amb l'espaiador *p*-fenilbismetilènic sintetitzat pel nostre equip que presenta un valor d'activitat similar a la tetraamina **3{3}** de referència. Ara bé, la predicció realitzada indicava que **80{18,17}** havia de ser molt més activa que **3{3}** cosa que no ha estat certa.

Pel que fa a les tetraamines simètriques **80{17,17}** i **80{18,18}**, podem veure com la segona resulta clarament més activa que la primera. Això ens indica que l'amina lateral **2{18}** proporciona millor capacitat antiviral que **2{17}**.

Si ens fixem en els valors d'activitat dels nous compostos sintetitzats **80{x,y}**, podem concloure que tal com estava previst el compost no simètric **80{18,17}** presenta millors valors anti-VIH que els seus homòlegs simètrics **80{17,17}** i **80{18,18}** tal com s'indicava al *docking*, ja que aquestes no sortien en les primeres posicions tal com ho feia la tetraamina **80{18,17}**.

Es decideix deixar de treballar amb la selecció de compostos obtinguda ja que no aporta millores clares i explorar nous heterocicles amb grups funcionals no introduïts fins al moment en aquests compostos tetraamínics.

### 3.3- Cerca d'un nou cap de sèrie

J. Planesas, durant el decurs de la seva tesi doctoral,<sup>[18]</sup> va proposar realitzar una ampliació de la família de compostos i fer-ne un nou filtrat virtual amb la tècnica de *docking* enfront a CXCR4, aquest cop, però, es decideix tornar a estructures i heterocicles semblants als del compost 3{3}, ja que, tal com s'ha vist en el *docking* realitzat en l'apartat 3.2, en augmentar la diversitat no s'ha aconseguit millorar de forma clara l'activitat anti-VIH. Així doncs, es decideix tornar a estructures semblants a l'anell pipercolínic de la tetraamina 3{3} (Figura 3.37), això sí, amb la possibilitat d'incloure nous grups funcionals sempre que siguin en la posició 2 de l'anell de piperidina present en 3{3}.

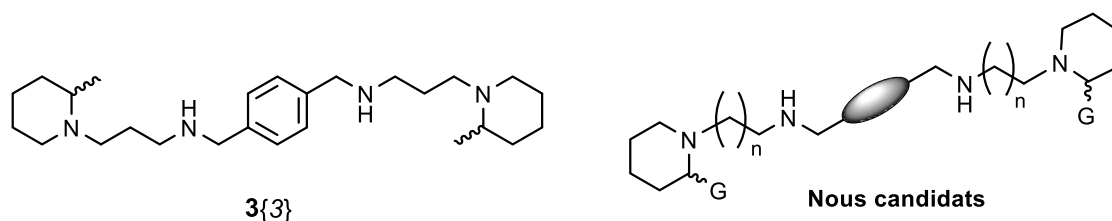


Figura 3.37. Estructura del cap de sèrie 3{3} i estructura general dels nous candidats que conformaran la quimioteca.

#### 3.3.1- Treball computacional

Per generar la quimioteca combinatòria que s'utilitzarà per realitzar el *docking* s'escullen 6 possibles espaiadors (Figura 3.38). En comparació amb els seleccionats pel *docking* de l'apartat 3.2, es mantenen els 3 ja utilitzats al grup (A, B i C) però es decideix canviar els tres que en l'anterior treball computacional havien donat resultats més discrets per 3 nous amb més possibilitats (G, H i I).

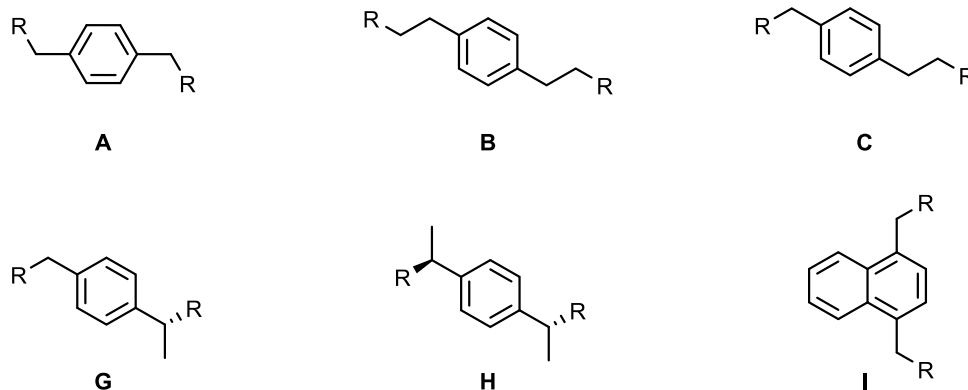


Figura 3.38. Espaiadors utilitzats per a generar la nova quimioteca.

A part, es generen 3 subespaiadors en forma de cadenes metilèniques  $-(CH_2)_n-$  de 2, 3 i 4 baules respectivament, que serviran per unir l'espaiador amb les amines laterals (heterocicles).



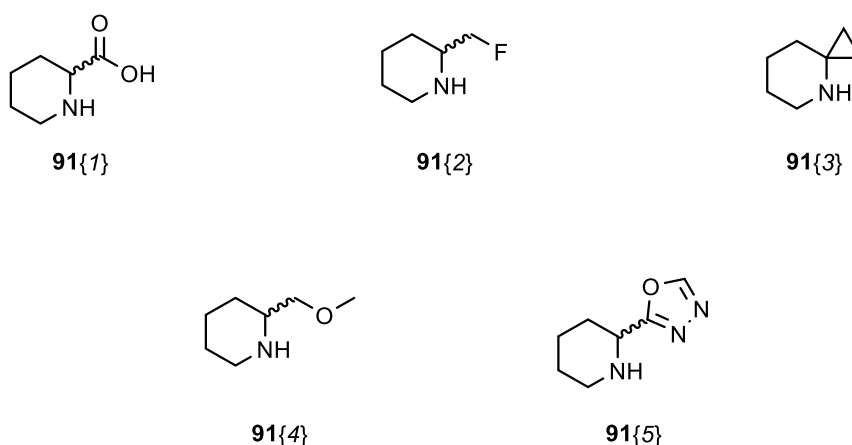
Es seleccionen 78 amines comercials que mantinguin l'anell de pipercolina i introdueixin un grup G que modifiqui les característiques dels compostos finals intentant explorar el màxim de diversitat possible sense perdre la forma final dels productes tetraamínics. Aquestes amines en combinar-les cadascuna amb els tres subespaiadors  $-(CH_2)_n-$  ( $n=2,3,4$ ) proporcionen un conjunt de 264 estructures per combinar de forma simètrica i no simètrica amb els espaiadors mostrats a la Figura 3.38.

Cada quimioteca generada es prepara amb Discovery Studio<sup>[19]</sup> (al qual es té accés gràcies al Servei de Disseny de Fàrmacs (SDF) del CSUC), es filtra segons les regles de Lipinski<sup>[11]</sup> i finalment es realitza el *docking*.

El *docking* resultant fruit de la combinació dels resultats obtinguts de les 6 quimiotèques (una per cada espaiador) s'ordena per la funció de *scoring* DockScore (programa MOE<sup>[10]</sup>). S'utilitzen dos conjunts de validació externa (*test sets*) per validar el model i poder posar en perspectiva les activitats predites per les noves molècules. Aquests *test sets* es poden trobar en treballs anteriors del GEM.<sup>[1,2]</sup> Diversos dels nous compostos de la quimioteca generada queden classificats entre els productes actius dels *test sets* utilitzats.

A més, s'utilitza un farmacòfor creat per S. Pettersson durant la seva tesi<sup>[2]</sup> per fer un cribatge de les estructures a sintetitzar i així tenir més opcions d'obtenir una estructura amb activitat inhibidora de CXCR4.

En analitzar les primeres posicions del *docking* després d'haver aplicat tots els filtres es veu que no hi ha una molècula ben posicionada i que alhora sigui fàcil de sintetitzar, per això s'analitzen les 30 molècules que es troben en les parts més altes de la classificació i es veu que els heterocicles més presents en aquestes estructures són els mostrats en la Figura 3.39.



**Figura 3.39.** Estructures dels heterocicles 91{x} més presents en les molècules més ben posicionades del *docking* realitzat.

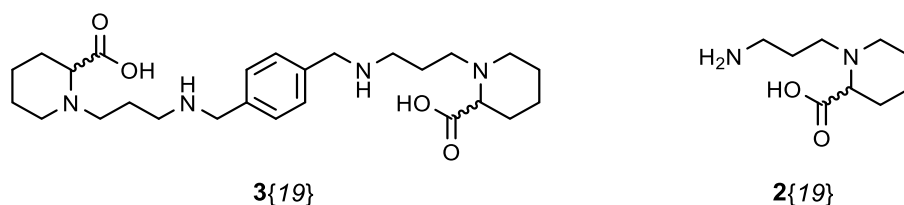
Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}

Essent els heterocicles **91{1}** i **91{2}** els més presents en aquests 30 compostos amb millor activitat predita i concretament estant **91{1}** present en les 4 molècules que ocupen les 4 primeres posicions.

En fer un estudi sobre la disponibilitat comercial d'aquests compostos, es veu que la única assequible econòmicament és **91{1}**, ja que el producte de partida no excedeix els 100€/g. A més, moltes de les estructures presents en aquestes 30 molècules millor posicionades presenten la funcionalitat carbonil o èster en elles. D'altra banda, la presència d'àtoms de fluor en els productes finals ha estat origen de toxicitat en altres proves realitzades anteriorment (Apartat 3.1.3).

Per tot l'exposat, es decideix utilitzar l'heterocicle **91{1}** per sintetitzar l'amina **2{19}** i donar lloc al compost **3{19}** (Figura 3.40). Aquesta molècula no es troba en el *ranking* esmentat anteriorment, però l'espaiador *p*-fenilbismetilènic sí que està present en la major part d'aquestes molècules i com ja s'ha comentat, l'amina lateral d'ambdós costats també.

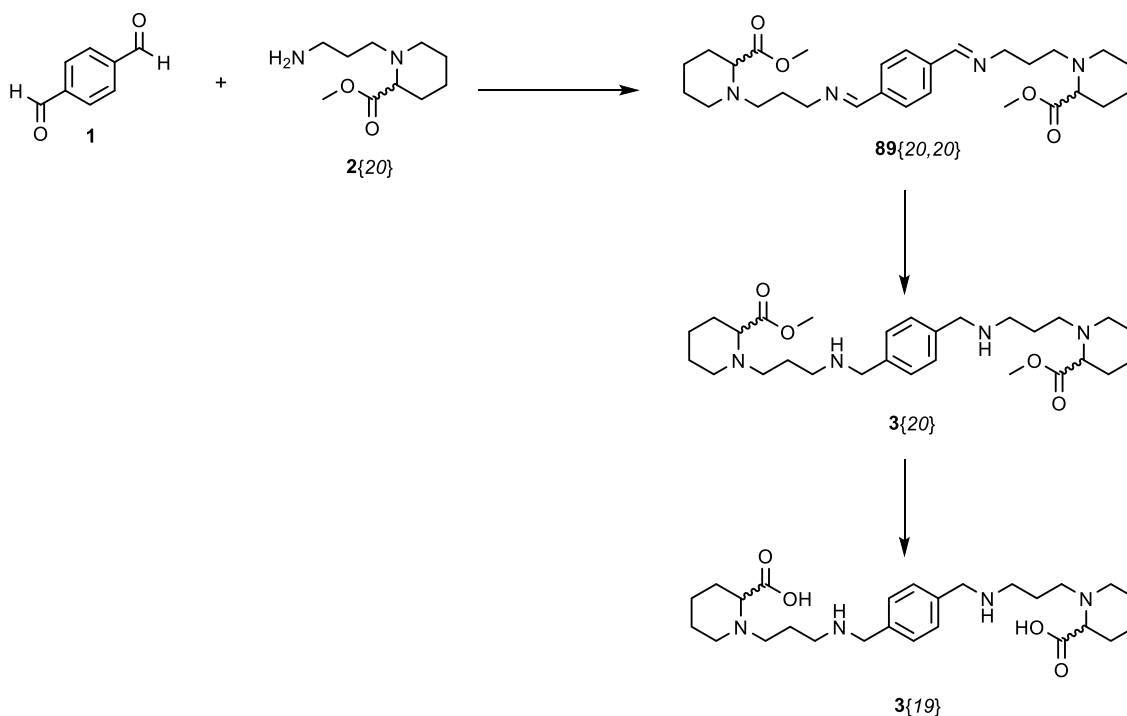
Tot i que l'espaiador *p*-fenilbisetilènic ha aconseguit millorar sempre els valors d'activitat de l'espaiador amb una sola baula metilènica, la ruta sintètica per a obtenir tetraamines a partir d'ell requereix de la reducció d'un grup carbonil, per tant no ens serviria per sintetitzar productes amb l'heterocicle **90{1}** present en ells. Per aquest motiu es descarten els espaiadors **B** i **C** i s'escull **A** com a espaiador a utilitzar.



**Figura 3.40.** Estructura de la tetraamina objectiu **3{19}** i de l'amina primària **2{19}** que incorpora.

A més, es decideix sintetitzar la molècula simètrica ja que cap dels altres substituents presents en la Figura 3.39 són assequibles econòmicament.

La ruta sintètica proposada per obtenir el producte desitjat **3{19}** és la que es mostra en la Figura 3.41, equivalent a la utilitzada anteriorment per tetraamines simètriques.



**Figura 3.41.** Ruta sintètica proposada per a l'obtenció de la tetraamina 3{19} objectiu.

Aquesta ruta, a més, ens permet aïllar i testar l'intermedi èster 3{20}. L'heterocicle èster present en aquest intermedi també està present, tot i que en menys mesura, en algunes molècules més ben classificades del *docking* realitzat.

### 3.3.2- Síntesi de l'amina primària 2{20}

L'amina lateral 2{20} a utilitzar en la ruta sintètica presentada no és assequible comercialment així que cal obtenir-la a partir de l'amina secundària 91{6} de partida de la mateixa manera que ja s'han sintetitzat anteriorment amines laterals no comercials unint a l'heterocicle la cadena trismetilènica tal com es mostra en la Figura 3.42.

Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}

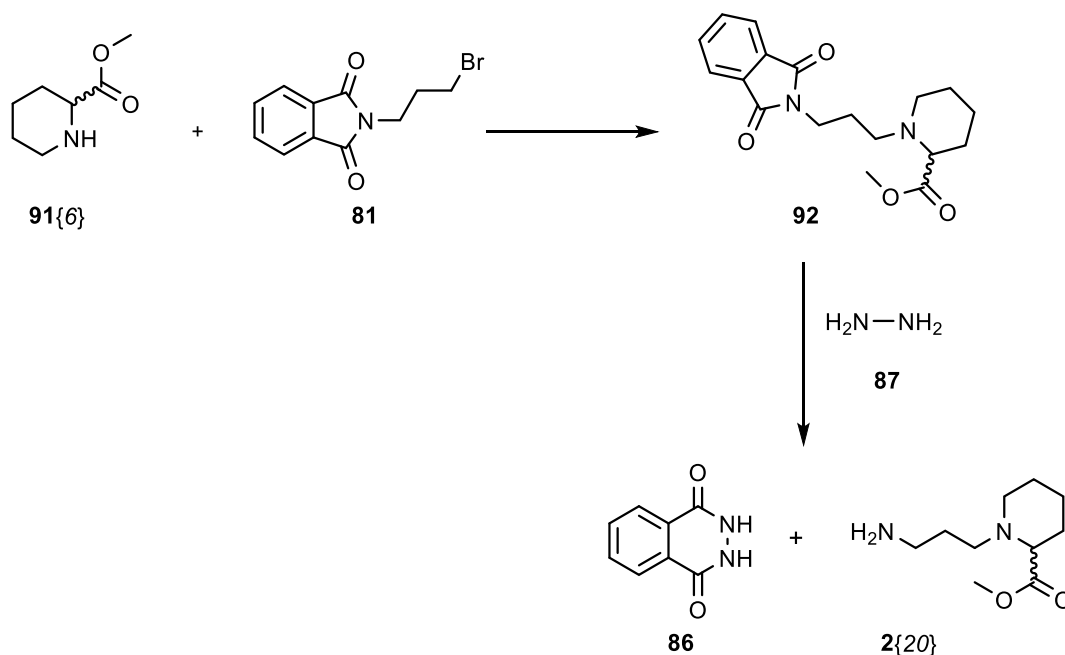


Figura 3.42. Ruta sintètica per obtenir l'amina de partida 2{20}.

### 3.3.2.1- Formació de l'èster 91{6}

Donat que el producte de partida comercial del que disposem és l'àcid pipecolínic (91{1}), el primer pas a realitzar és la protecció del grup àcid formant un èster per evitar reaccions secundàries. S'escull la formació de l'èster metílic per la seva simplicitat a l'hora de desfer-lo i recuperar el grup àcid original.

Aquest tipus de protecció està detalladament descrita en la literatura<sup>[20]</sup> però s'opta per seguir la metodologia proposada per Lamb i col·laboradors<sup>[21]</sup> i de Tong i col·laboradors<sup>[22]</sup> (Figura 3.43).

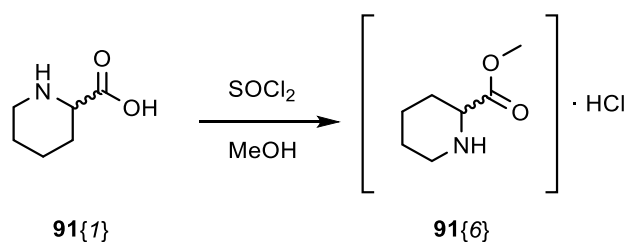


Figura 3.43. Reacció de formació de l'èster 91{6}.

S'utilitza el MeOH com a medi de reacció a part de com a producte de partida, i el clorur de tionil com a reactiu per formar l'intermedi clorur d'àcid del producte de partida 91{1} que reaccionarà amb el metanol per rendir l'èster desitjat 91{6}. Tenint el metanol i el SOCl<sub>2</sub> en excés s'obté l'èster 91{6} en forma de clorhidrat i amb rendiment quantitatiu.

Aquest clorhidrat s'ha de desfer mitjançant extraccions amb una dissolució saturada de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> abans de prosseguir amb el següent pas de la ruta sintètica.

### 3.3.2.2- Obtenció de l'amina 2{20}

Es procedeix a realitzar l'acoblament de **91{6}** amb 1.1 equivalents de la ftalimida **81** en ACN amb presència de carbonat de potassi com a base (Figura 3.44). Després d'estar 48 hores agitant a temperatura de reflux, s'eliminen les impureses mitjançant una extracció de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'obté l'intermedi ftalimida **92** amb un rendiment del 79%.

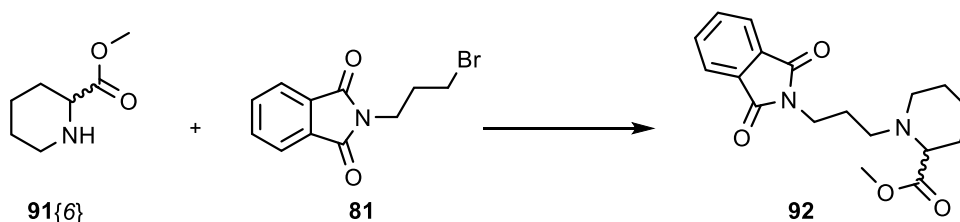


Figura 3.44. Reacció d'obtenció de l'intermedi ftalimida **92**.

Aquest intermedi **92** es dissol en etanol i excés d'hidrazina. Es deixa una hora agitant a temperatura de reflux, es filtra la ftalilhidrazina (**86**) formada i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. S'obté l'amina **2{20}** objectiu (Figura 3.45) que servirà com a reactiu de partida per la ruta sintètica proposada en la Figura 3.41 amb un rendiment del 84%. El rendiment total d'obtenció de l'amina és del 66%. Amb l'anàlisi de l'espectre <sup>1</sup>H-RMN es confirma l'obtenció del producte amb absència d'impureses.

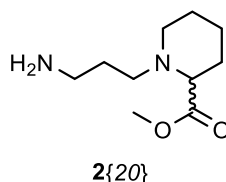


Figura 3.45. Estructura de l'amina **2{20}**.

Es comprova que l'amina descompon amb el temps i cal ser utilitzada immediatament en el moment d'obtenir-se.

### 3.3.2.3- Formació de la imina **89{20,20}**

Tal com s'ha vist en altres exemples d'aminació reductora en el present treball, el primer pas consta de la reacció del tereftaldialdehid (**1**) amb dos equivalents de l'amina lateral a substituir per obtenir la corresponent diimina **89{20,20}**, en aquest cas, dos equivalents de **2{20}** (Figura 3.46).

Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}

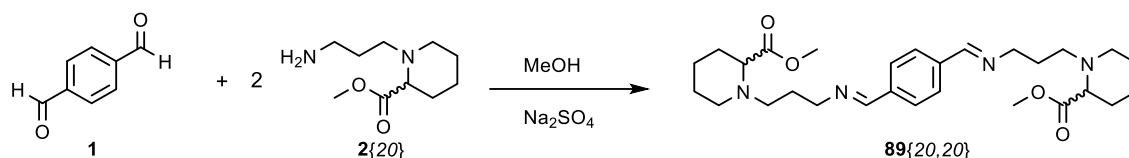


Figura 3.46. Pas de síntesi per l'obtenció de l'intermedi imina 89{20,20}.

La reacció es realitza en MeOH a temperatura de reflux durant 48h i amb sulfat de sodi com a deshidratant.

En realitzar la prova ja s'aprecia per <sup>1</sup>H-RMN un cru de reacció complex a causa de la formació de subproductes.

Es prova a realitzar la reacció a temperatures més baixes i durant menys temps, però el resultat és el mateix. Tant bon punt s'arriba a la temperatura necessària per fer reaccionar els productes de partida 1 i 2{20} es pot apreciar, en poc temps, l'augment d'impureses en el cru de reacció mitjançant espectroscòpia <sup>1</sup>H-RMN.

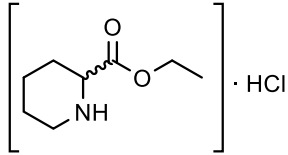
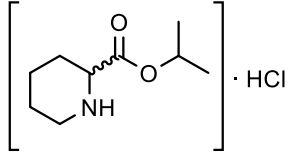
Així doncs, la única solució és intentar purificar aquest cru obtingut. S'opta per una columna cromatogràfica automàtica, però després de trobar les condicions òptimes de separació, quan es porta a terme la purificació es descobreix que el producte queda unit irreversiblement en la fase estacionària i tots els productes que en surten no es corresponen amb la imina 89{20,20} desitjada i present en el cru de reacció. Per tant, es dedueix que el producte descompon en el medi de separació.

En intentar la mateixa separació després del pas de reducció de 89{20,20} a la forma de tetraamina 3{20} ens trobem amb el mateix problema però agreujat. Per això es decideix canviar de grup protector del grup àcid, per veure si amb grups protectors que generin èsters més resistents poden suportar les condicions de la columna cromatogràfica.

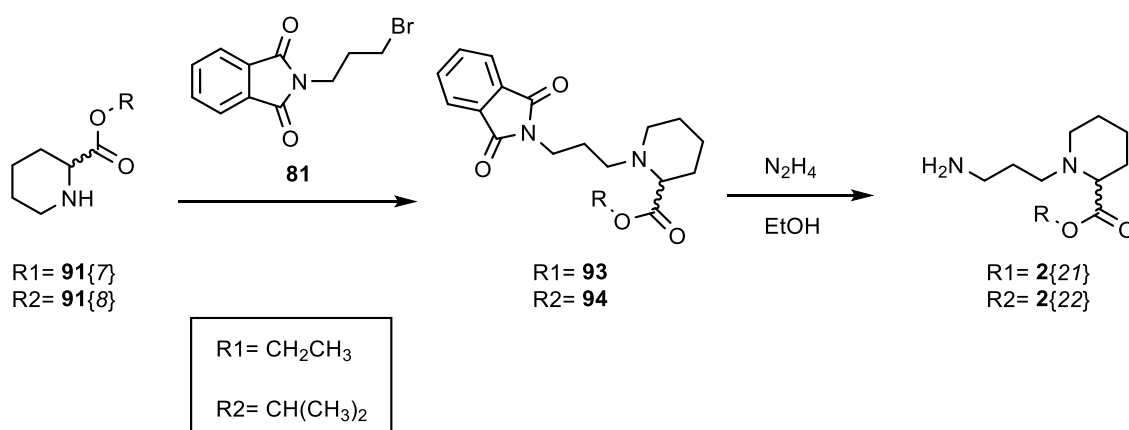
### 3.3.2.4- Nous èsters de partida

Utilitzant la mateixa metodologia proposada per Lamb i col·laboradors<sup>[21]</sup> i en el treball de Tong i col·laboradors<sup>[22]</sup> es sintetitzen nous èsters de l'àcid pipecolínic (91{1}) de partida (Taula 3.10).

Taula 3.10. Nous èsters sintetitzats amb els rendiments obtinguts.

Molècula	Nom	Rendiment
	<b>91{7}</b>	>99%
	<b>91{8}</b>	98%

En ambdós casos es procedeix a la reacció amb la ftalimida **81** i posterior obtenció de l'amina corresponent **2{x}** amb el mateix procediment descrit a l'apartat 3.3.2.2 (Figura 3.47).

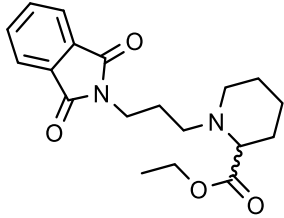
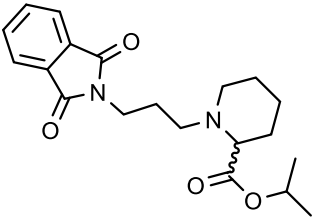
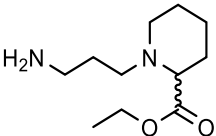


**Figura 3.47.** Reacció d'obtenció de les amines laterals **2{21}** i **2{22}** a partir dels èsters de partida **91{7}** i **91{8}**.

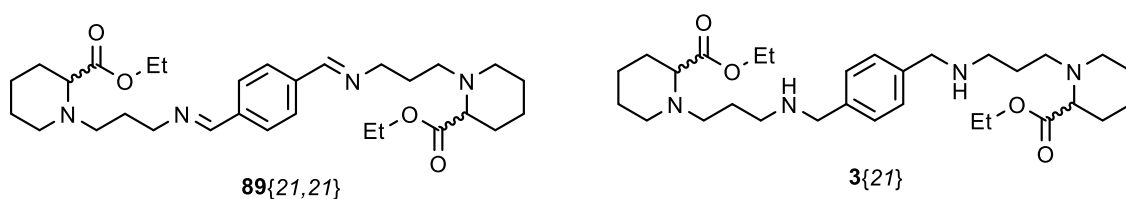
L'amina **2{21}** amb l'èster etílic s'obté sense complicacions. En el cas de l'amina **2{22}** que conté el grup isopropil, s'obté l'intermedi ftalimida amb un rendiment molt baix probablement a causa de l'impediment estèric que suposa el grup isopropil. Per tant, es decideix no seguir treballant amb **2{22}**, ja que encara ens trobem en els primers passos de la ruta sintètica i el rendiment global quedaria molt perjudicat. A més es pensa que amb l'amina que conté l'èster etílic ja es pot comprovar l'efecte que té un èster més resistent que el metílic vist en l'apartat anterior.

Els rendiments obtinguts pels intermedis així com el rendiment global de l'amina **2{21}** es presenten en la Taula 3.11.

**Taula 3.11.** Rendiments obtinguts per l'obtenció dels intermedis ftalimida **93** i **94** i l'amina **2{21}** així com el seu rendiment global.

Molècula	Nom	Rendiment	Rendiment Global
	<b>93</b>	56%	-
	<b>94</b>	9%	-
	<b>2{21}</b>	88%	49%

Un cop es té l'amina **2{21}** es procedeix a realitzar l'aminació reductora per obtenir el compost **3{21}**, via la diimina **89{21,21}** (Figura 3.48), de la mateixa forma com s'ha fet amb l'amina èster metílic en l'apartat 3.3.2.3 amb les condicions més suaus possibles i així intentar evitar que els compostos descomponguin.



**Figura 3.48.** Estructures del compost a sintetitzar **3{21}** i del seu corresponent intermedi diimina **89{21,21}**.

En portar a terme la reacció de formació de la diimina **89{21,21}** amb **2{21}** s'obté, de la mateixa manera com passa amb l'amina èster metílic **2{20}**, un cru de reacció complex que ens indica que la conversió no és completa o que els productes de partida utilitzats no suporten les condicions de reacció utilitzades. Com s'havia comprovat, les condicions no es poden fer més suaus si es vol que la reacció tingui lloc i la purificació mitjançant columna cromatogràfica automàtica queda descartada ja que s'ha comprovat que es perd el producte per enllaç irreversible amb la fase estacionària o per descomposició en el si de la columna.

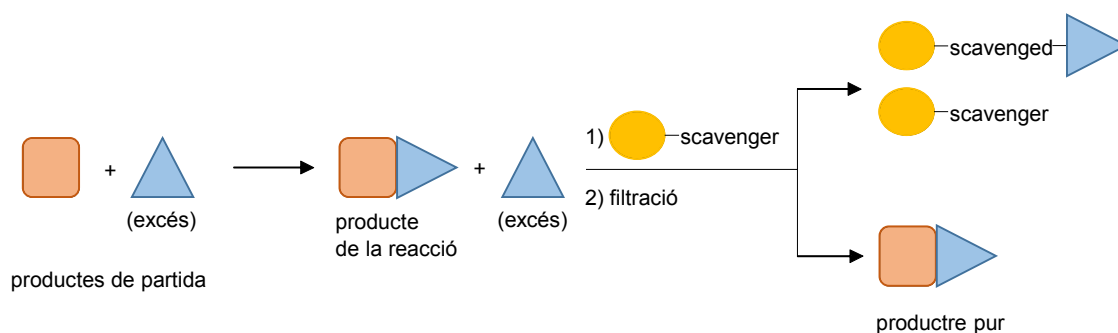


Es procedeix a la reducció de la diimina **89**{21,21} sense purificar i s'observa en l'espectre  $^1\text{H-NMR}$  del cru de reacció que el producte tetraamínic **3**{21} és majoritari, tot i les impureses, per tant sembla que **89**{21,21} sí que suporta les condicions de reacció i, per tant, aquestes impureses han de ser restes de productes de partida que no han reaccionat completament degut a les condicions que s'han fet servir per evitar descomposició.

Es busquen, doncs, noves vies de purificació que permetin l'obtenció del producte tetraamínic **3**{21}. Es pensa en aplicar la tecnologia de resines (*scavengers*) a fi d'eliminar les restes de l'amina primària de partida **2**{21}.

### 3.3.3- Purificació amb *scavengers*

Els *scavengers* són materials polimèrics que retenen o reaccionen amb un excés particular de reactiu o subproducte en el medi de reacció. Una simple filtració permet eliminar aquests *scavengers* units al reactiu en excés per donar lloc a un producte pur, evitant així la necessitat de realitzar una separació per cromatografia de columna (Figura 3.49).<sup>[23-25]</sup>

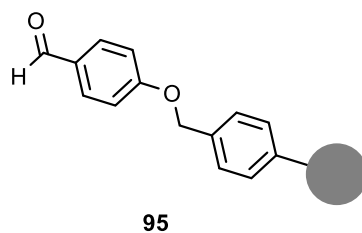


**Figura 3.49.** Esquema del funcionament dels *scavengers* com a mètode de purificació d'una reacció.

Es pensa, doncs, en utilitzar un excés d'amina **2**{21} de partida per assegurar la substitució bilateral de la totalitat de l'espaiador, així l'únic subproducte que hauria d'aparèixer és l'excés d'amina que es capturaria amb *scavengers* un cop finalitzada la reacció.

#### 3.3.3.1- Selecció del *scavenger* i optimització de la reacció

Es selecciona la 4-benziloxibenzaldehyd poliestirè HL **95** (Figura 3.50) com a resina a utilitzar. Com que el nostre reactiu en excés és una amina primària, aquesta resina hi reaccionarà pel grup aldehyd formant un grup imina. El principal avantatge d'aquesta tècnica és que tan sols filtrant la resina posteriorment eliminarem l'amina en excés, amb això ens assegurem que les condicions de purificació no alteren el producte tetraamínic.



**Figura 3.50.** Estructura del 4-benziloxibenzaldehid poliestirè HL **95**.

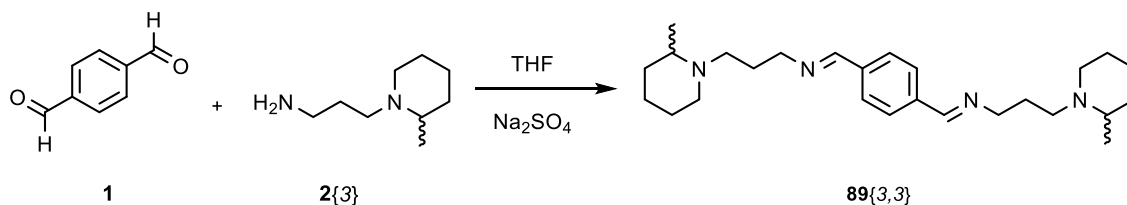
Per tal de comprovar l'efectivitat d'aquesta tècnica, es decideix primer optimitzar-ne les condicions amb un compost tetraamínic ja sintetitzat anteriorment al grup, així també es disposa d'informació per prendre com a referència. Per aquest fi, es selecciona la tetraamina **3{3}** sintetitzada en la tesi de S. Pettersson<sup>[2]</sup> i que ha servit com a molècula de referència durant el present treball.

Es tenen diversos factors en consideració:

- Si els *scavengers* tenen més efectivitat utilitzats enfront a l'intermedi imina (entre el primer i el segon pas de síntesi) o enfront al producte amínic final segons metodologies com les de Kaldor i col·laboradors<sup>[26]</sup> o Abdel-Magid i col·laboradors<sup>[27]</sup> (Figures 3.43 i 3.44).

- Si és possible recuperar la resina per a la seva reutilització un cop ja s'ha utilitzat una primera vegada. El tipus d'unió amb l'amina en excés permet revertir el procés mitjançant un tractament amb HCl concentrat. Es comprovarà l'efectivitat de la recuperació mitjançant espectroscòpia d'infraroig.

- Si cal utilitzar un catalitzador. El distribuïdor (EMD Millipore) de la resina indica que en alguns casos cal utilitzar CH<sub>3</sub>COOH com a catàlisi àcida per aconseguir una unió completa entre la resina i el producte de partida en excés que es vol eliminar.



**Figura 3.51.** Primer pas de síntesi utilitzat per a comprovar l'efectivitat de la purificació per *scavengers*.

Es fa reaccionar el tereftaldialdehid **1** amb 4 equivalents de l'amina **2{3}** en THF i sulfat de sodi com a deshidratant (Figura 3.51). Es deixa agitant a temperatura de reflux durant 24h en atmosfera de nitrogen. En acabar, s'afegeixen 3 equivalents de la resina **95** i es deixa agitant 20h a 50°C. Finalment es filtra la resina unida a l'amina en excés i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda.

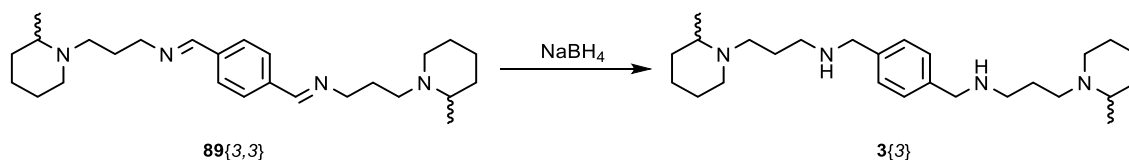
Per tal de veure si es pot recuperar, la resina es tracta amb una dissolució d'HCl 2M i es deixa agitant a temperatura ambient durant 12h, es filtra i es renta amb THF.

Es porta a terme una altra prova de la mateixa reacció amb les mateixes condicions, aquest cop afegint unes gotes d'àcid acètic concentrat en el moment d'incorporar la resina.

També es repeteix la reacció però aquest cop arribant fins a l'últim pas de reducció de la diimina **89{3,3}** a la tetraamina **3{3}** (Figura 3.52) aplicant dos exemples de metodologies trobades per reaccions equivalents a les treballades:

Segons el treball de Kaldor i col·laboradors<sup>[26]</sup> posteriorment a l'obtenció de l'intermedi diimina **89{3,3}**, s'afegeix  $\text{NaBH}_4$  i es continua agitant durant 24h. Passat aquest temps s'afegeixen els *scavengers* en clorur de metilè i es deixa agitant durant 20h. El contingut format es filtra i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda.

Per altra banda també es porta a terme la metodologia proposada per Abdel-Magid i col·laboradors<sup>[27]</sup> adaptada al nostre cas, consistent en portar a terme la formació de l'intermedi imina **89{3,3}** amb el  $\text{NaBH}_4$  ja present en el medi en les condicions establertes anteriorment. Posteriorment s'afegeixen els *scavengers* i es porta a reflux durant una hora i mitja. Es filtra i s'afegeix una dissolució de bicarbonat sòdic concentrat i es realitzen extraccions amb acetat d'etil. La fase orgànica s'asseca sobre sulfat de magnesi i després de filtrar el contingut, s'elimina el dissolvent a pressió reduïda.



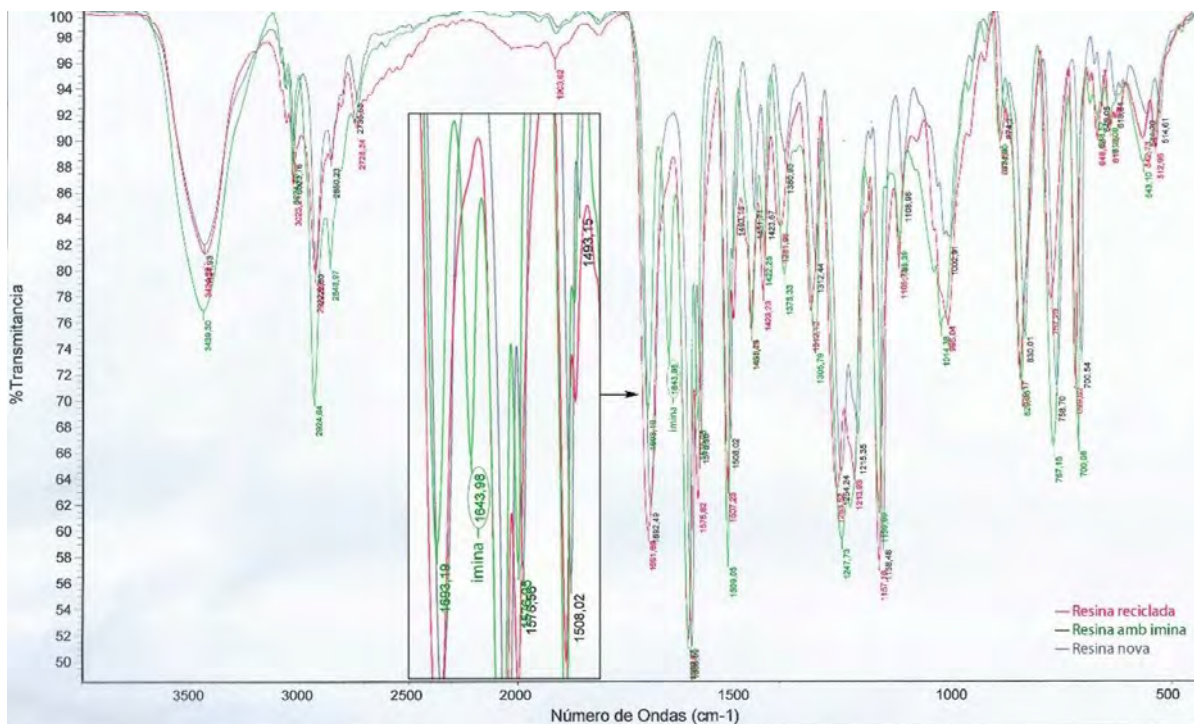
**Figura 3.52.** Segon pas de la síntesi utilitzada per comprovar l'efectivitat de la purificació per *scavengers* en amines.

Finalment es repeteix la reacció de formació de la imina **89{3,3}** (Figura 3.51) i es realitza la purificació, aquest cop amb la resina recuperada del tractament amb HCl.

Amb totes aquestes proves ja es poden treure conclusions i optimitzar el mètode de purificació amb *scavengers* del nostre tipus de reacció:

- La purificació utilitzant resines funciona correctament, es pot comprovar que producte la tetraamina final **3{3}** no presenta restes d'amina de partida en l'anàlisi del  $^1\text{H-RMN}$ .
- Analitzant amb espectroscòpia RMN de protó es conclou que la purificació té millors resultats quan s'utilitza enfront a l'intermedi diimina **89{3,3}** que quan s'utilitza en el pas final enfront a l'amina secundària **3{3}** en les diverses metodologies aplicades.

- Comparant els espectres d'IR de la resina sense utilitzar, la resina unida a l'amina primària en excés i la resina després del tractament amb HCl 2M es pot veure com és possible recuperar-la per poder reutilitzar-la altre cop (Figura 3.53).



**Figura 3.53.** Espectres d'IR superposats de la resina sense utilitzar (blau), la resina unida a l'amina primària (verd) i la resina tractada amb HCl 2M reciclada (vermell).

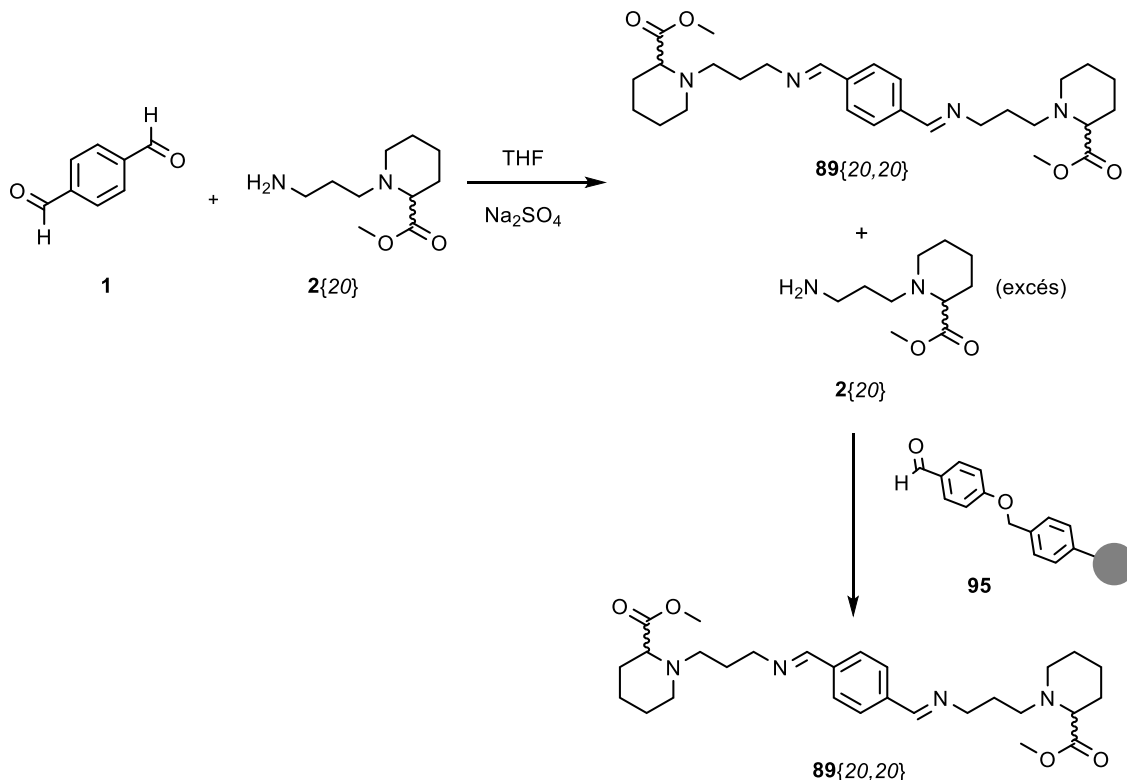
En l'espectre d'IR es pot veure clarament com l'espectre de la resina recuperada a partir del tractament amb HCl 2M concorda perfectament amb el de la resina abans de ser utilitzada. Contrastant amb l'espectre en verd de la resina unida a l'amina primària 2{3} en excés, a destacar la banda a 1644 cm<sup>-1</sup> corresponent a l'enllaç imina format no present ni en la resina abans de ser utilitzada ni en la resina recuperada. Tot i això, en comparar una mateixa reacció de purificació amb resina reutilitzada i amb resina nova es veu clarament com en el primer cas l'eficàcia baixa substancialment i no és capaç d'eliminar completament l'amina 2{3} en excés.

- Analitzant els crús de reacció s'aprecia que en la catàlisi àcida amb àcid acètic en el moment de la purificació es genera un cru complex amb diverses impureses minoritàries presents, per tant es conclou que en el nostre cas és millor realitzar l'addició de la resina sense cap tipus de catalitzador d'aquest tipus.

Per tant, es conclou que les millors condicions per portar a terme la purificació de tetraamines tenint un excés d'amina primària de partida són utilitzant els *scavengers* enfront a l'intermedi imina, sense catàlisi àcida i sense reutilitzar-los.

### 3.3.3.2- Aplicació de la purificació per *scavengers* optimitzada

Es porta a terme la reacció de formació de l'intermedi imina **89**{3,3} objectiu utilitzant un excés d'amina **2**{3} de partida i amb una purificació posterior amb *scavengers* tal com s'ha optimitzat en l'apartat anterior (Figura 3.54).



**Figura 3.54.** Ruta sintètica per obtenir l'intermedi imina **89**{20,20} mitjançant una purificació amb *scavengers* (**95**).

Es fa reaccionar el tereftaldialdehid **1** amb 4 equivalents de l'amina de partida **2**{20} en THF com a dissolvent i sulfat de sodi com a deshidratant a temperatura de reflux durant 24h. Al cru de reacció s'hi afegeixen 3 equivalents del *scavenger* **95** i es deixa a 50°C durant 20h. Es filtra la resina i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda.

En analitzar el cru de reacció obtingut mitjançant <sup>1</sup>H-RMN s'aprecia un cru complex amb la presència del producte desitjat **89**{20,20} però amb nombrosos senyals no corresponents a aquesta molècula. Es tracta d'un espectre molt semblant a l'obtingut amb la ruta sintètica tradicional, per tant, es dedueix que el problema rau en l'amina **2**{20} utilitzada en si mateixa, no en el sistema de purificació.

D'altra banda, una mostra de l'amina **2**{20} pura deixada a temperatura ambient canvia d'aspecte al llarg del temps, passant de textura oliosa a un estat més sòlid semblant a una cera. En realitzar un espectre <sup>1</sup>H-RMN es comprova que l'amina per si sola desproporciona o reacciona amb ella mateixa i que alguns dels senyals que apareixen es corresponen amb alguns dels senyals presents en el cru de reacció esmentat anteriorment en la síntesi de la imina **89**{20,20}.

Arribats a aquest punt es comença una cerca bibliogràfica que ens pugui explicar què està passant. Es troba en el treball de Guryn<sup>[28]</sup> una possible explicació: en ell es detalla una ciclació interna de l'amina **2{20}** que nosaltres utilitzem com a punt de partida.

### 3.3.4- Autociclació de l'amina **2{20}**

En el treball de Guryn es presenta l'autociclació de l'amina amb èster metílic **2{20}** la qual forma un bicicle (**96**) a partir de la reacció de l'amina amb el grup èster present en l'heterocicle tal com es mostra en la Figura 3.55.

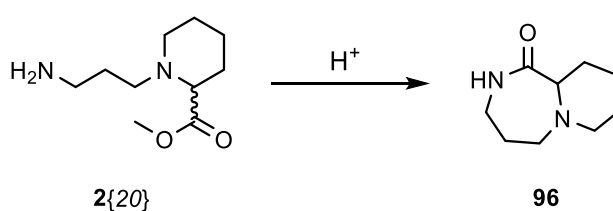


Figura 3.55. Reacció d'autociclació de l'amina **2{20}** segons R.Guryn.<sup>[28]</sup>

Guryn explica com, mitjançant catàlisi àcida, el grup amina és capaç d'atacar el carbonil activat i realitzar una autociclació a temperatura de reflux que acaba rendint el bicicle **96** tal com es mostra en el mecanisme de la Figura 3.56.

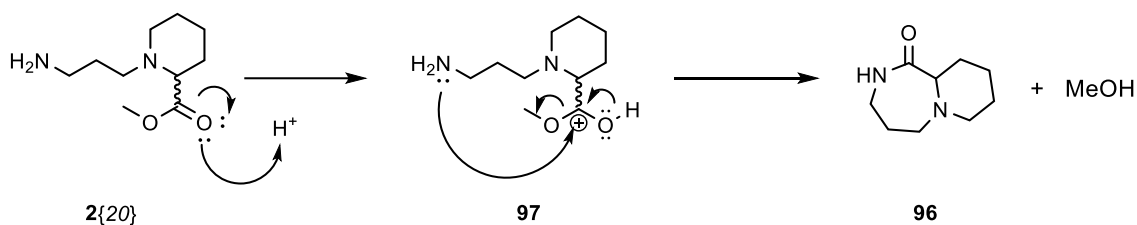


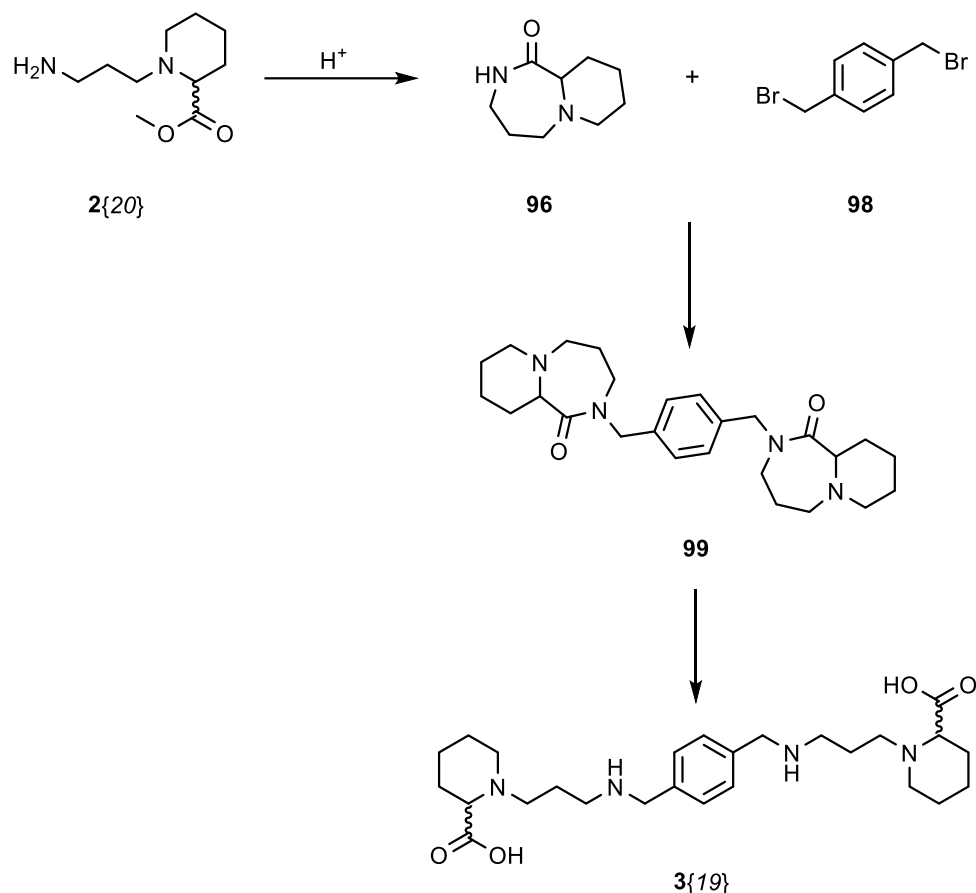
Figura 3.56. Mecanisme proposat per l'autociclació de l'amina **2{20}**.

Si bé Guryn postula que per aquesta ciclació és necessària la presència de catàlisi àcida, l'atac del grup amino al grup èster podria produir-se també en medi neutre. Aquesta explicació podria justificar la formació de **96** tant en les condicions d'aminació reductora com en la mostra de **2{20}**.

Per aquest motiu, es decideix aprofitar aquesta autociclació de l'amina de partida i refer la ruta sintètica d'obtenció del producte **3{19}** per adaptar-la a la nova situació.

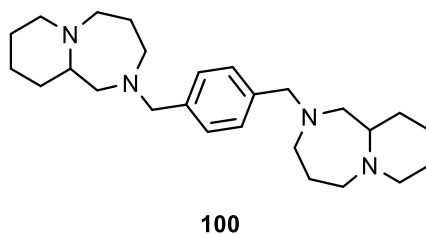
### 3.3.4.1- Plantejament de la nova ruta sintètica

S'incorpora el bicicle **96** com a reactiu en la nova ruta per poder realitzar una aminació i posterior hidròlisi per obtenir finalment la tetraamina objectiu **3{19}** (Figura 3.57).



**Figura 3.57.** Ruta sintètica proposada per obtenir la tetraamina objectiu **3{19}** a partir del bicicle **96**.

El bicicle **96** conté una amida que pot reaccionar directament per substitució amb l'espaiador **98** obtenint l'intermedi **99**. Aquest intermedi també pot ser assajat com a potencial inhibidor de CXCR4, però, a més a més, a partir d'ell es podria obtenir el producte **100** per reducció dels grups amida (Figura 3.58) també interessant en tractar-se d'una nova tetraamina.



**Figura 3.58.** Estructura de la tetraamina **100** fruit de la reducció de l'intermedi **99**.

Així doncs, si s'aconsegueix sintetitzar l'intermedi **99** es disposarà de tres nous compostos potencialment inhibidors de CXCR4. Cal començar, però, amb l'autociclació completa de l'amina **2{19}** per tenir el bicicle **96** pur.

### 3.3.4.2- Formació del bicicle **96**

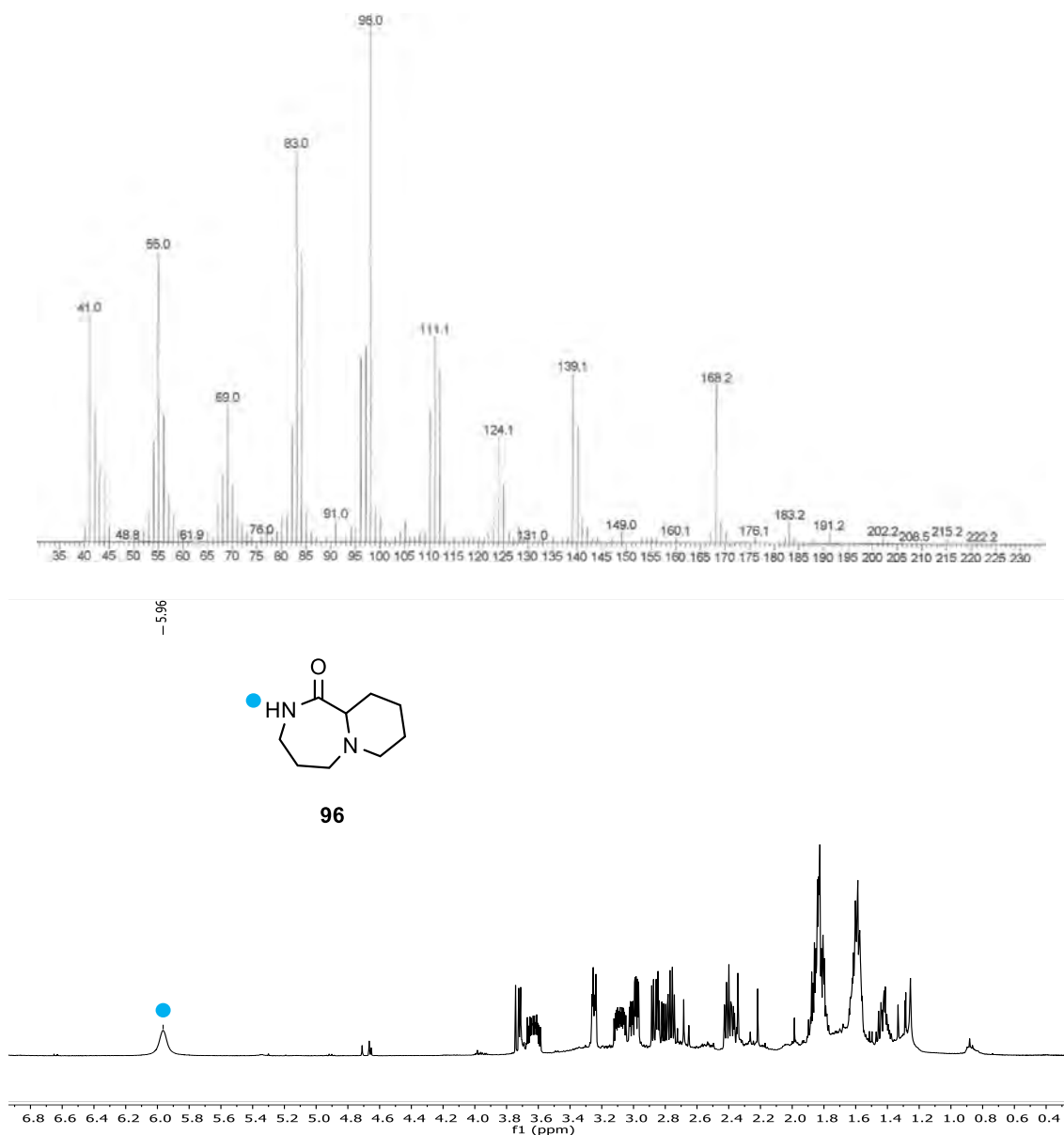
En el treball de Gurny<sup>[28]</sup> s'utilitza dietilenglicol dietilèter com a dissolvent però degut als problemes de purificació que ens pot donar un cop s'ha donat la ciclació es decideix substituir-lo per un altre dissolvent de propietats semblants però que doni menys problemes en l'etapa de purificació.

S'escull l'ús de toluè i xilè, de punts d'ebullició de 110°C i 144°C respectivament enfront als 190°C del dietilenglicol dietilèter. Aquesta disminució en la temperatura de reflux pot fer necessari aplicar més temps de reacció però per altra banda garanteix una millor eliminació un cop ha tingut lloc la ciclació.

La reacció es realitza mitjançant una destil·lació amb addició continua de dissolvent en comptes d'un muntatge de reflux ja que d'aquesta manera el metanol generat com a subproducte també es va eliminant. L'eliminació del metanol provoca un desplaçament de l'equilibri de la reacció a favor dels productes.

Es va fent el seguiment de la reacció amb CCF i revelat de iode fins a conversió completa. Es comprova que amb toluè com a dissolvent no s'arriba a completar l'autociclació, mentre que en xilè s'aconsegueix formar el bicicle completament. Analitzant l'espectre de <sup>1</sup>H-RMN de **96** s'observa que és molt més complex del que seria d'esperar malgrat que presenta el senyal característic de l'amida a 5.96 ppm. D'altra banda en l'espectre de masses de baixa resolució s'observa l'ió molecular a m/z = 168.2 prova evident de que efectivament s'obté el producte desitjat de forma majoritària (Figura 3.59).





**Figura 3.59.** Espectres de <sup>1</sup>H-RMN i masses de baixa resolució del bicicle **96**.

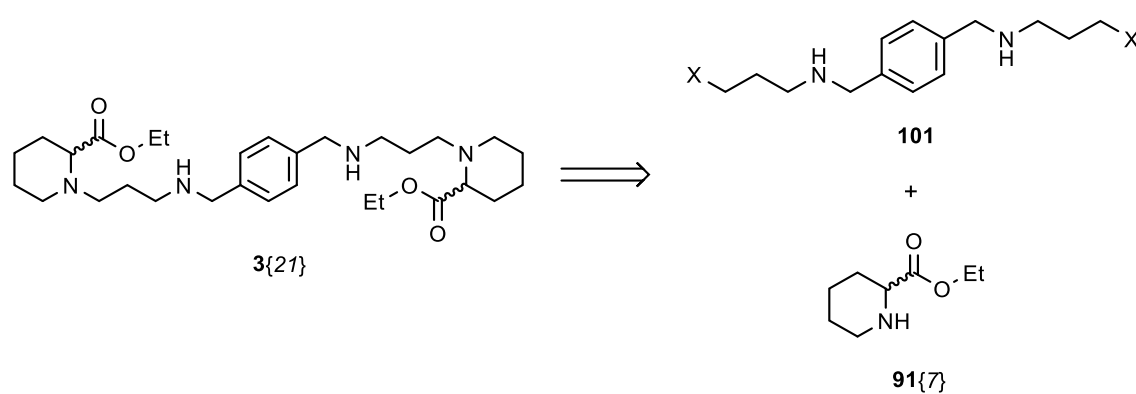
El problema, però, és que en realitzar noves repeticions de la metodologia es comprova que no és reproduïble ja que en la major part dels casos la conversió no és completa i en els casos en que l'autociclació s'acosta al 100% la puresa del producte no és la desitjada.

Com ja s'ha vist, la purificació mitjançant columna cromatogràfica no és una opció en aquests casos i en fer algunes proves de purificació mitjançant *scavengers* tampoc s'aconsegueixen els resultats esperats. Per això s'opta per dissenyar una nova ruta sintètica que eviti haver d'utilitzar l'amina **2{20}** o les seves variants com a producte de partida, ja que s'ha comprovat que és la font dels problemes.

### 3.3.5- Nova ruta sintètica per obtenir la tetraamina 3{19}

Es realitza una nova cerca bibliogràfica que ajudi a dissenyar una nova ruta sintètica per a la formació de tetraamines derivades de l'àcid pipercolínic (**91{1}**) però que eviti haver d'utilitzar l'amina **2{20}** (o altres èsters derivats) que provoca problemes degut a la seva inestabilitat i la seva capacitat d'autociclació.

Analitzant els precedents, la font de problemes és la presència del grup èster, per això es pensa en dissenyar una ruta sintètica que eviti tenir-lo des de l'inici, o sigui, una ruta del tipus *inside-out* que s'iniciï amb la formació de l'espaiador i que, en últim terme, uneixi els heterocicles que contenen l'esmentat grup èster (Figura 3.60).

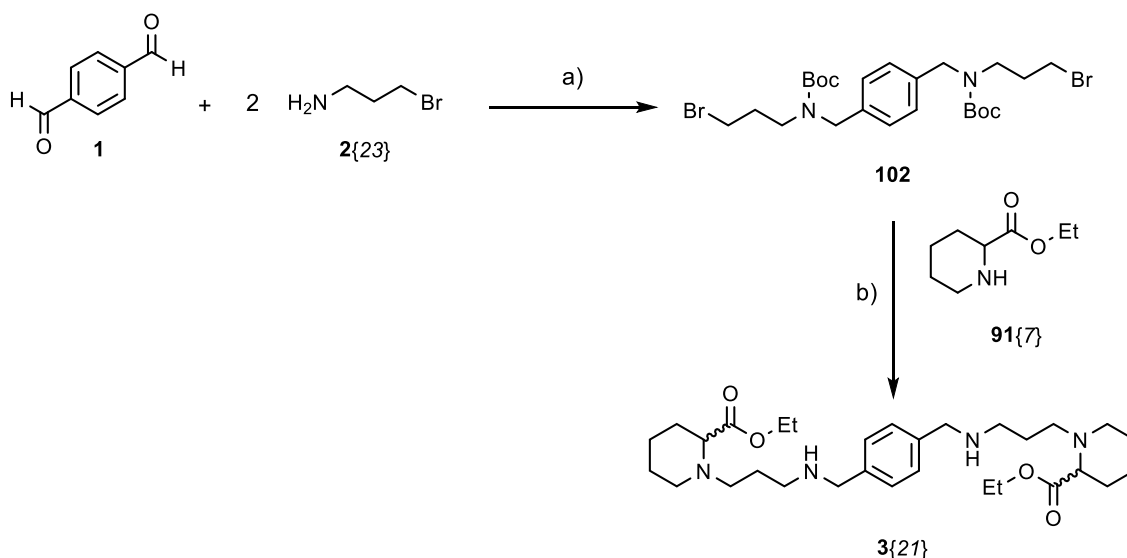


**Figura 3.60.** Anàlisi retrosintètica que mostra l'espaiador **101** que cal sintetitzar.

En la Figura 3.60 es mostra una possible estratègia sintètica que parteix de l'èster etílic **91{7}** que es podria combinar amb un espaiador tipus **101** que conté la cadena trimetilènica i a on X sigui un bon grup sortint. Es pensa en un derivat bromat o clorat.

En la bibliografia es troben exemples com el treball de Zhang i col·laboradors<sup>[29]</sup> o de Salvatore i col·laboradors<sup>[30]</sup> en els que es descriu la metodologia per l'acoblament entre una amina secundària tipus **91{7}** i un derivat bromat amb bons rendiments, per tant, es decideix seguir treballant amb derivats bromats per tal de focalitzar la cerca.

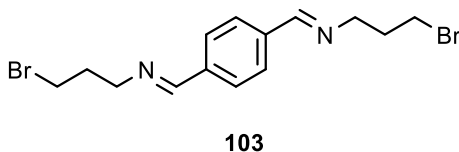
En la cerca es troba, també, el treball de Gahman i col·laboradors<sup>[34]</sup>, on presenta una possible metodologia que permetria l'obtenció de la tetraamina **3{21}** objectiu segons la ruta sintètica adaptada representada en la Figura 3.61.



**Figura 3.61.** Ruta sintètica per obtenir la tetraamina **3{21}** a partir de tereftaldialdehid **1** i 3-bromopropilamina (**2{23}**). Condicions: a)  $\text{CH}_3\text{COOH}$  cat, 3h,  $T^\circ\text{amb}$ ,  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  com a base, isopropanol.  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{MeOH}$ , 1h,  $T^\circ\text{amb}$ . b)  $\text{EtOH}$ , 14h,  $T^\circ\text{amb}$ .  $\text{HCl}$ ,  $70^\circ\text{C}$ , 1h.

En portar a terme la síntesi en aquest cas concret s'aprecia un cru de reacció complex en el pas d'obtenció de l'intermedi protegit **102** indicant que ha tingut lloc alguna reacció secundària que ha provocat l'aparició de subproductes. En tractar-se del primer pas de síntesi i tenint en compte que a la bibliografia hi ha més alternatives d'obtenció de l'intermedi **101** bromat, es decideix no procedir en la purificació i optimització d'aquesta ruta i buscar-ne una variant o alternativa.

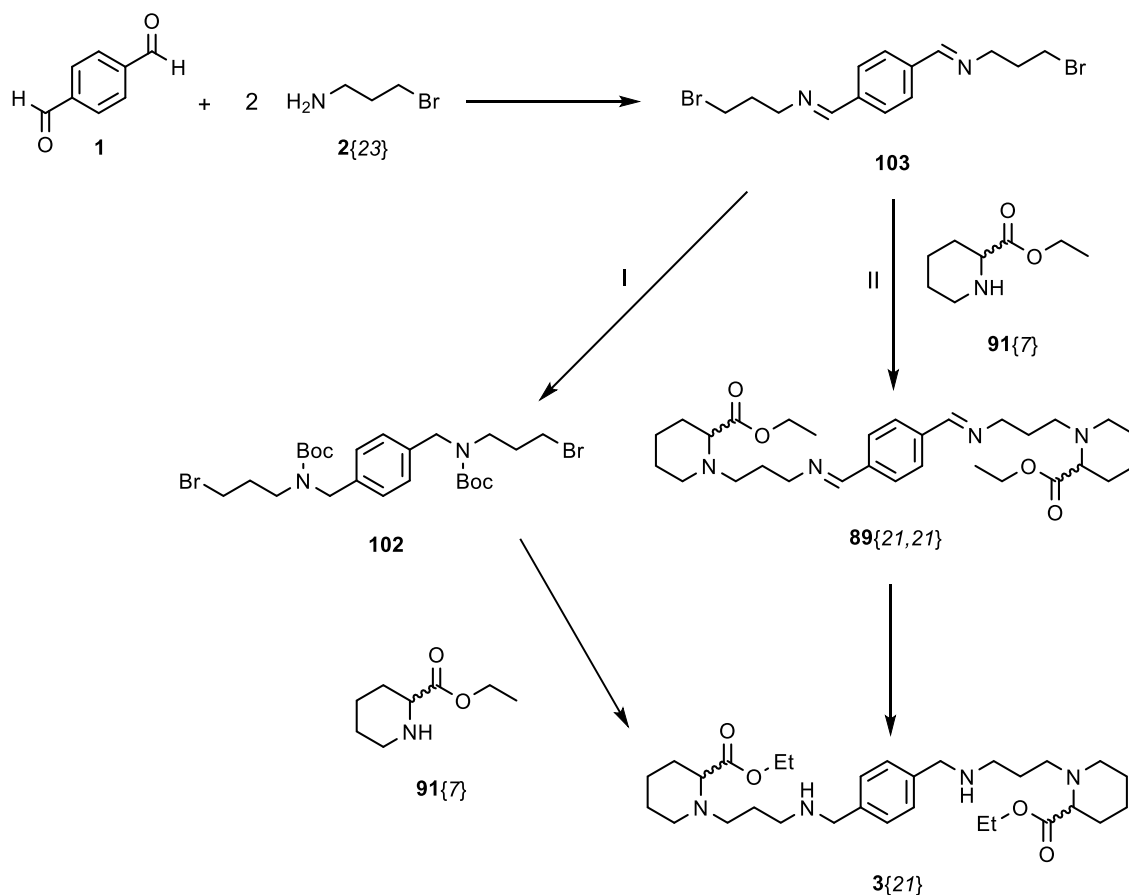
Es troben diverses fonts<sup>[31-33]</sup> on es descriu la formació de compostos imínics a partir d'una amina primària i un compost amb un grup aldehid. En el nostre cas concret, aquests procediments permetrien l'obtenció de l'intermedi diimina **103** representat en la Figura 3.62.



**Figura 3.62.** Estructura de l'intermedi imina proposat **103**.

Es dissenya una ruta sintètica que utilitzi aquest intermedi **103** per acabar rendint la tetraamina **3{21}** objectiu tal com es mostra en la Figura 3.63. En aquest cas hi ha dues alternatives possibles: reduir el grup imina a amina secundària i prosseguir amb la ruta sintètica proposada en la Figura 3.63 a partir del compost **102**, o utilitzar el grup imina com a grup protector i realitzar la reducció un cop l'heterocicle **91{7}** ja es trobi unit a la molècula.

Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}

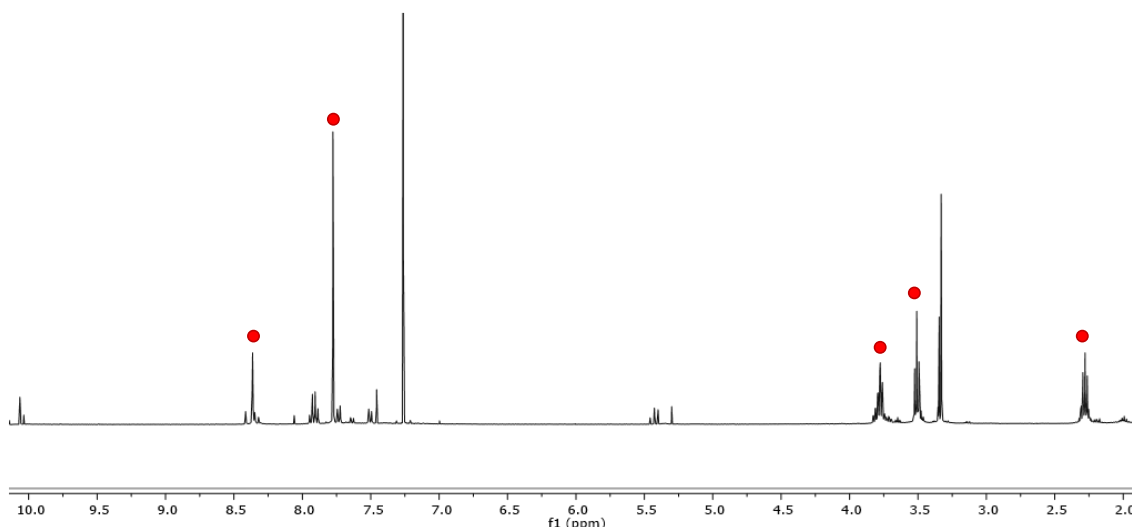


**Figura 3.63.** Representació de les dues rutes sintètiques alternatives (I i II) per a l'obtenció de la tetraamina **3{21}** passant per l'intermedi diimina **103** a partir de la reacció de tereftaldialdehid **1** i 3-bromopropilamina **2{23}**.

### 3.3.5.1-Obtenció de l'espaiador **103**

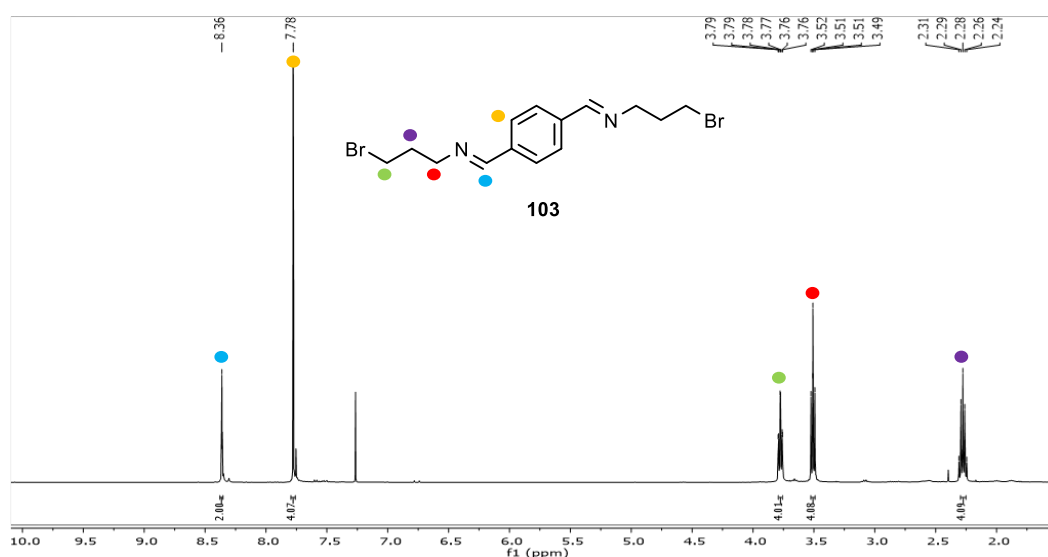
S'escullen dues metodologies basades en els treballs de Wolthnis i col·laboradors<sup>[31]</sup> i Trifunovic i col·laboradors<sup>[32]</sup>. En el segon es descriuen unes condicions de reacció més suaus. Per tant, es procedeix a posar en pràctica les dues i comparar-ne l'efectivitat.

En la metodologia proposada per Wolthnis, es dissolen els reactius en MeOH, amb K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> com a base i es deixa 24h a reflux. En posar-la en pràctica i analitzar el producte obtingut mitjançant espectroscòpia <sup>1</sup>H-RMN es veu que s'obté el producte **103** majoritàriament, tot i que hi ha nombrosos senyals provinents d'impureses (Figura 3.64).



**Figura 3.64.** Espectre  $^1\text{H-RMN}$  de l'intermedi **103** utilitzant la metodologia adaptada de Wolthnis i col·laboradors.<sup>[31]</sup> Es troben marcats els senyals corresponents al producte **103**.

Per tant, es decideix suavitzar les condicions de reacció acostant-la a la metodologia proposada per Trifunovic. Així, es substitueix el dissolvent per cloroform, la base utilitzada passa a ser trietilamina i la reacció es deixa agitant a temperatura ambient en comptes d'arribar a temperatura de reflux. En fer una prova al cap de les 24 hores es veu com encara queda força producte de partida sense reaccionar així que s'augmenta el temps de reacció fins a 48h. En acabar, i després d'eliminar la trimetilamina restant mitjançant extraccions líquid-líquid d'aigua i diclorometà, s'obté el producte **103** desitjat amb un rendiment quantitatiu i sense presència d'impureses tal com es pot veure en la Figura 3.65 corresponent al seu espectre  $^1\text{H-RMN}$ .



**Figura 3.65.** Espectre  $^1\text{H-RMN}$  de l'intermedi diimina **103** utilitzant la metodologia adaptada de Trifunovic i col·laboradors<sup>[32]</sup> amb els senyals característics identificats.

Un cop optimitzada l'obtenció de l'espaiador hi ha dues rutes possibles a seguir fins a l'obtenció de la tetraamina **3{21}** que servirà per aconseguir el producte **3{19}** objectiu: utilitzar el grup imina

com a grup protector del grup NH o reduir l'espaiador **103** i protegir-lo abans de realitzar la substitució de l'heterocicle lateral.

La primera alternativa és la ideal, ja que ens redueix el nombre de passos de síntesi, per això és l'alternativa que es prova en primer moment, però cal comprovar que el grup imina pot aguantar les condicions de reacció dels següents passos.

### 3.3.5.2- Obtenció de la imina **89{21,21}**

A la literatura hi ha nombrosos treballs que detallen i expliquen reaccions de substitució entre una amina secundària i un derivat halogenat<sup>[29,34-37]</sup>, fins i tot utilitzant un aparell de microones<sup>[38]</sup> fet que permetria disminuir considerablement el temps de reacció i el dissolvent a utilitzar. Cal recordar, però, que l'espaiador sintetitzat, i que es vol utilitzar com a producte de partida, conté un grup imina que pot no resistir algunes de les condicions de reacció descrites (Figura 3.66). A més, el grup èster present en l'heterocicle lateral també pot propiciar reaccions secundàries si no es controlen els reactius o les condicions a utilitzar. Per tant, es realitza una adaptació d'aquestes metodologies intentant trobar les condicions de reacció més suaus possibles que permetin que la substitució tingui lloc amb l'índex de conversió més elevat possible, ja que s'ha comprovat anteriorment que el tipus de productes que es volen aconseguir no suporten purificacions mitjançant columna cromatogràfica.

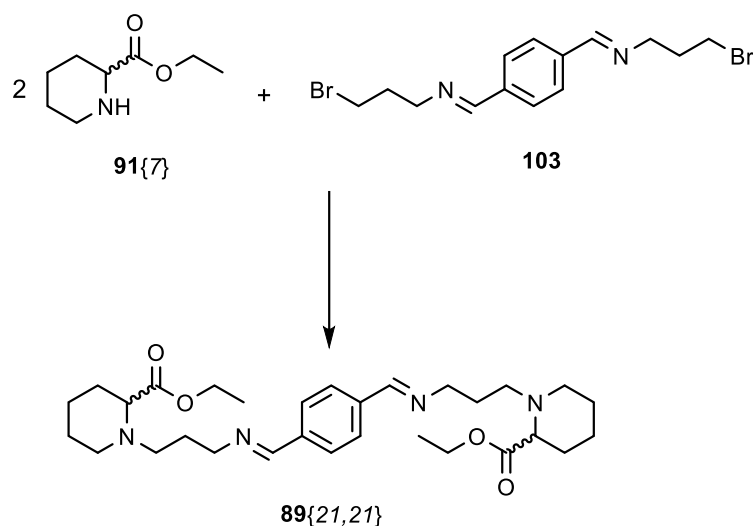


Figura 3.66. Reacció d'acoblament entre l'espaiador imínic **103** i l'heterocicle **91{7}**.

La prova utilitzant calefacció per microones provoca diverses reaccions secundàries o descomposició de productes degut al fet que el grup imina no suporta les condicions de reacció, obtenint un cru complex en el que no és possible identificar-hi la imina **89{21,21}** objectiu.

Utilitzant calefacció convencional, es realitza la reacció posant a prova diversos dissolvents i diverses bases, a més de diverses temperatures. A més, es realitza un estudi del temps de reacció necessari.

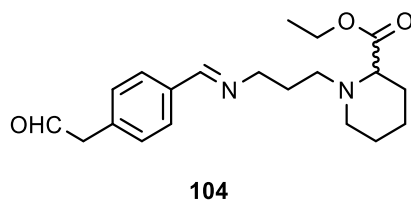
Els dissolvents utilitzats són ACN, EtOH i THF, en tots els casos anhidres. En els tres dissolvents es prova de realitzar la reacció a temperatura de reflux. En tots els casos, en observar els espectres  $^1\text{H-RMN}$  dels crus de reacció es veu que s'han generat impureses fruit de reaccions secundàries o descomposició d'algun dels productes així que es conclou que cal realitzar la reacció a temperatures més baixes.

En el cas del THF ( $T_{\text{eb}} = 66^\circ\text{C}$ ) el cru presenta menys impureses, per tant, es decideix provar la reacció a  $60^\circ\text{C}$ . En repetir les proves a  $60^\circ\text{C}$  es comprova l'evolució del sistema a les 2h, 8h, 16h i 24h mitjançant seguiment per cromatografia de capa fina. Es comprova que calen 16h de reacció per aconseguir la màxima conversió, i que passat aquest temps, a 24h la conversió no augmenta però sí que ho fan les impureses presents en el cru. Finalment, de les tres opcions, s'escull l'ACN com a dissolvent a  $60^\circ\text{C}$  durant 16h ja que són les condicions que generen menys impureses amb la màxima conversió.

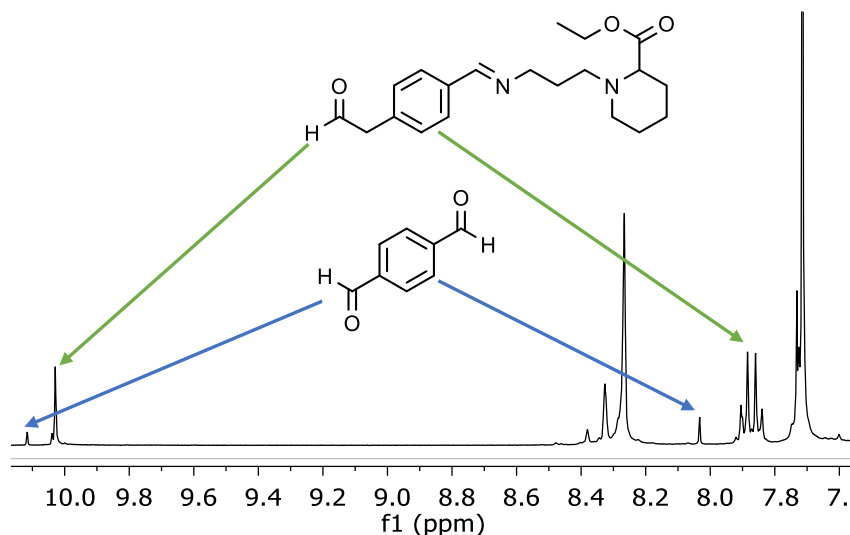
Es proven el  $\text{K}_2\text{CO}_3$  i la trietilamina com a bases. En els casos en els que s'utilitza la trietilamina cal purificar posteriorment mitjançant extraccions líquid-líquid, i en tots els casos es veu que en queden restes en forma d'impuresa. Així que es decideix utilitzar el carbonat de potassi, que ja s'ha comprovat que no comporta problemes i és capaç de capturar els protons que es desprenen fruit de la substitució.

En acabar la reacció, es pot identificar una petita impuresa en l'espectre  $^1\text{H-RMN}$ . En la Figura 3.68, en l'ampliació de la zona aromàtica de l'espectre  $^1\text{H-RMN}$  del compost **89**{21,21}, es poden veure els senyals corresponents a l'anell aromàtic central de la molècula així com els dos protons del grup imina a 8.25 ppm. A més, però, hi ha dos sèries de senyals provinents d'impureses.

En comparar l'espectre amb l'espectre  $^1\text{H-RMN}$  del tereftaldialdehid (**1**) s'identifica que un grup de senyals pertany a aquest producte de partida. L'altre grup de senyals es dedueix que pertanyen al producte monosubstituit **104** (Figura 3.67), ja que es poden identificar els senyals provinents del grup aldehid i dels protons d'un anell aromàtic substituït de forma no simètrica. Com que s'havia realitzat l'espectroscòpia de l'espaiador **103** així com el seu anàlisi elemental (AEO), es conclou que aquestes dues impureses provenen del trencament unilateral o bilateral del producte desitjat **89**{21,21}, no dels productes de partida.



**Figura 3.67.** Estructura de la impuresa **104** present en el medi fruit del trencament unilateral de la imina **89**{21,21}.



**Figura 3.68.** Espectre  $^1\text{H}$ -RMN de la zona dels protons aromàtics del cru de reacció amb els senyals identificats.

Tot i això, com que una purificació mitjançant columna cromatogràfica no és possible, es decideix continuar amb el següent pas de reacció i eliminar aquestes impureses en passos posteriors.

El rendiment aproximat (ja que conté petites impureses) d'aquest pas de la síntesi és del 95% així que es considera la reacció com a optimitzada i no es segueix treballant en purificacions específiques per a aquest pas.

### 3.3.5.3- Reducció de la imina **89**{21,21}

El següent pas necessari per a l'obtenció de la tetraamina **3**{21} objectiu és la reducció dels grups imina de l'intermedi **89**{21,21} obtingut en l'apartat anterior.

En el GEM s'han utilitzat anteriorment diverses metodologies per la reducció de imines, però en posar en pràctica la metodologia estreta del treball de S. Pettersson<sup>[2]</sup> es produeix un trencament del grup èster present en l'heterocicle lateral del compost, augmentant significativament els productes secundaris i donant lloc a un cru de reacció complex. Per aquest motiu, es realitza una cerca bibliogràfica per trobar noves metodologies alternatives per intentar adaptar-les i suavitzar les condicions de reducció.

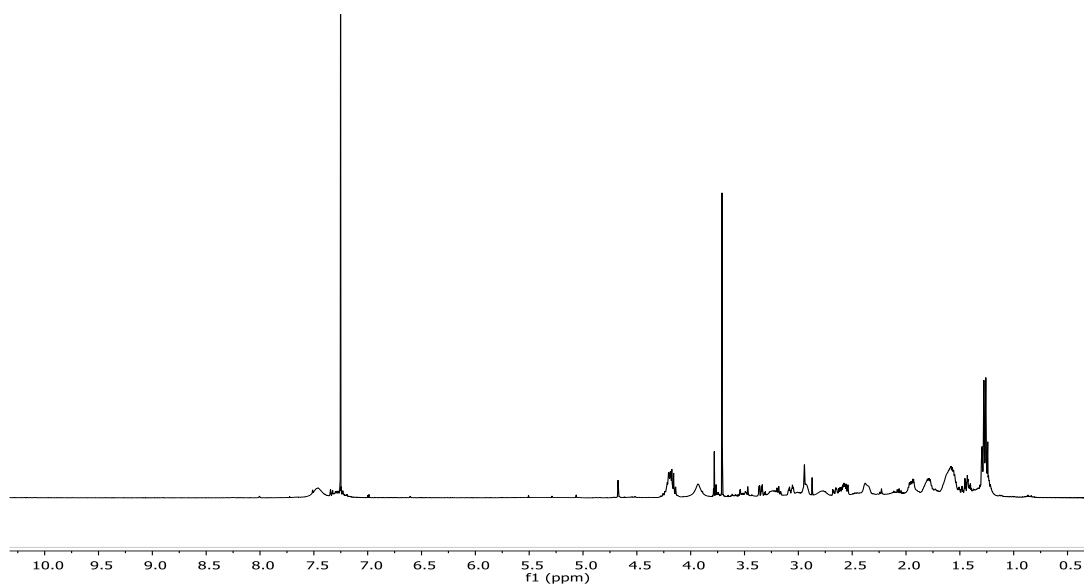


En no trobar una metodologia concreta que es distanciés molt de les aplicades fins al moment es va decidir suavitzar les condicions descrites en el treball de Gribble i col·laboradors.<sup>[39]</sup>

Es va reduir el temps de reacció; originalment es deixava 4h a temperatura ambient en agitació amb el borohidrur sòdic per assegurar-se que la conversió és completa. Es va veure, però, que passada una hora el sistema ja es trobava reduït a amina i que a partir de la segona hora de reacció començaven a aparèixer subproductes en el cru de reacció. Per tant, es decideix portar a terme la reducció amb borohidrur sòdic però afegit en petites porcions controlades a baixa temperatura, amb tan sols un equivalent respecte la imina de partida en comptes de l'excés de 3 equivalents utilitzats fins ara.

La reacció es dona en una hora en comptes de 4h i es substitueix la base complementària utilitzant ara carbonat potàssic en comptes de la trimetilamina usada fins al moment, ja que aquesta última és més difícil d'eliminar.

En analitzar l'espectre <sup>1</sup>H-RMN del cru de reacció (Figura 3.69) després de realitzar els rentats amb clorur de metilè i aigua, es pot comprovar que s'ha aconseguit eliminar tant les restes de tereftaldialdehid com del subproducte del trencament unilateral de la imina **104**.



**Figura 3.69.** Espectre <sup>1</sup>H-RMN del cru de reacció en el que s'aprecia la formació majoritària de la tetraamina **3{21}** així com la desaparició dels senyals del tereftaldialdehid (**1**) i del subproducte **104** que formaven part dels reactius de partida com a impureses.

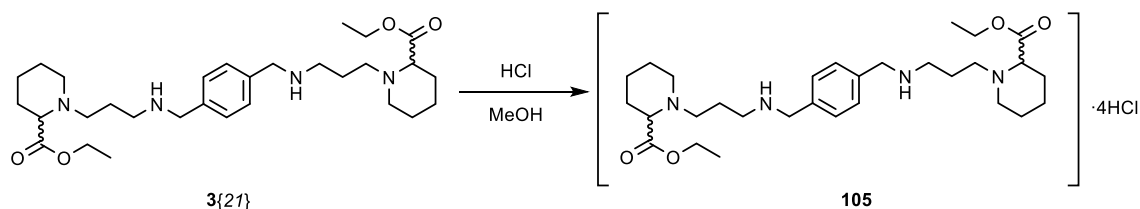
Tot i això, cal realitzar una purificació abans de la desprotecció de l'èster per obtenir la tetraamina **3{21}** de forma pura.

Per purificar el producte es plantegen dues alternatives, utilitzar cromatografia de columna o purificar mitjançant la formació del clorhidrat corresponent.

Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}

- En intentar una purificació per columna cromatogràfica automàtica d'alúmina com a fase estacionària i usant un gradient de fase mòbil que en 45 min passi d'un medi 100:0 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 90:10 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH amb traces d'amoniac per evitar la formació de cues d'elució, s'obté el producte 3{21} amb un rendiment de separació aproximat del 40% però encara es troba impurificat. Per aquest motiu es decideix implementar la tècnica de formació de clorhidrats com a mètode de purificació a realitzar a continuació de la columna cromatogràfica o com a mètode independent de purificació, depenent del resultat que s'obtingui.

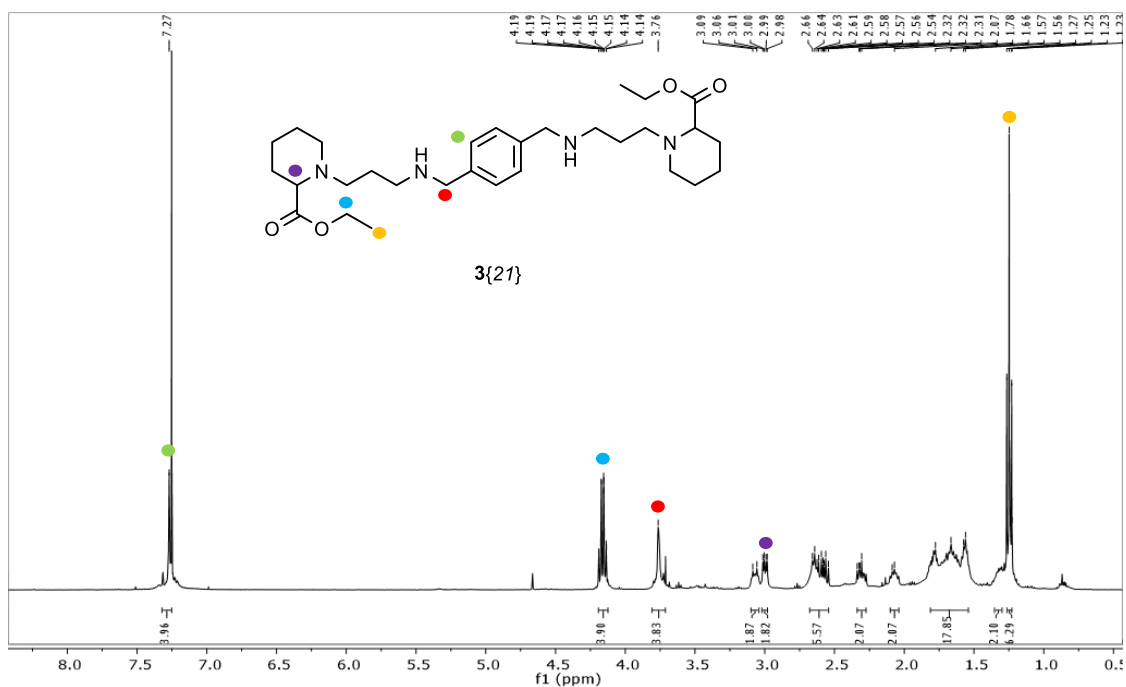
- Es realitza la purificació mitjançant la formació del clorhidrat 105 (Figura 3.70) directament del cru de reacció, per comprovar la seva capacitat de purificació com a tècnica independent d'altres mètodes de purificació. Com s'ha indicat, en el cas que no s'aconsegueixi la puresa desitjada en el producte final s'intentarien implementar les dues tècniques de purificació una seguida de l'altra.



**Figura 3.70.** Reacció d'obtenció del clorhidrat 105.

Es dissol el cru de reacció en metanol i s'afegeix un excés d'HCl/MeOH 1.25M. Es deixa agitant a temperatura ambient durant dues hores per assegurar-se que la formació de la sal 105 és completa. S'elimina el dissolvent i l'HCl sobrant a pressió reduïda. El sòlid obtingut es purifica amb rentats d'acetona i èter dietílic per, finalment, revertir el procés mitjançant extraccions amb una dissolució saturada de carbonat potàssic i tornar a obtenir la tetraamina 3{21}.

En estudiar l'espectre <sup>1</sup>H-RMN de nou i comparant-lo amb el mostrat en la Figura 3.69 es comprova que després de la purificació s'ha aconseguit obtenir el producte tetraamínic 3{21} amb èxit i lliure d'impureses (Figura 3.71).



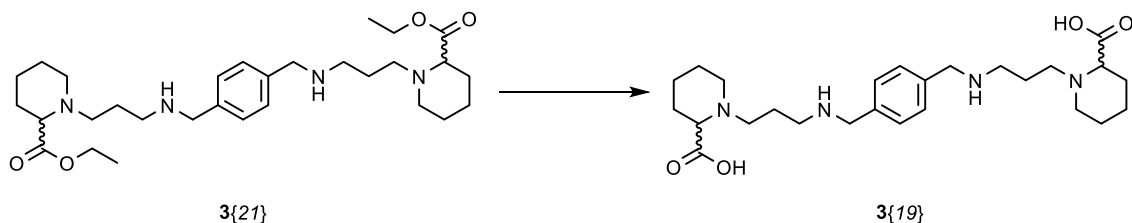
**Figura 3.71.** Espectre <sup>1</sup>H-RMN de la tetraamina 3{21} després de ser purificada mitjançant la formació del seu clorhidrat 105 amb els senyals característics identificats.

Com es pot apreciar en comparar les Figures 3.69 i 3.71, els senyals aromàtics s'han perfilat, han desaparegut senyals no corresponents a la molècula sobretot en la zona compresa entre els 2 als 4 ppm i s'han definit els senyals triplet i quadruplet corresponents al grup etil de l'èster.

Un cop obtingut el compost tetraamínic 3{21} amb un rendiment del 40%, tot i la purificació, tant sols resta realitzar l'últim pas de la síntesi corresponent a la desprotecció del grup èster per obtenir la tetraamina objectiu 3{19}.

### 3.3.5.4- Obtenció de la tetraamina 3{19}

L'últim pas de la ruta sintètica dissenyada per a l'obtenció de la tetraamina 3{19} consisteix en la hidròlisi dels grups èster del compost 3{21} de partida (Figura 3.72).



**Figura 3.72.** Pas de síntesi per obtenir la tetraamina objectiu 3{19} a partir del compost 3{21}.

La hidròlisi d'un èster pot tenir lloc tant en medi àcid com en medi bàsic.

Es comprova que utilitzant la metodologia trobada en diverses fonts bibliogràfiques<sup>[40,41]</sup> d'introduir una base forta i deixar la dissolució a reflux durant més de 12h no és efectiva en el cas concret de la tetraamina 3{21}. En intentar la reacció amb excés de NaOH i KOH i deixant la reacció a reflux durant un interval entre 10h i 18h s'obté un cru de reacció complex sense que es percebi un producte majoritari clar. Aquest fet pot portar a pensar que les condicions de reacció propicien el trencament de la molècula en algun punt o la proliferació de reaccions secundàries per rendir diversos subproductes.

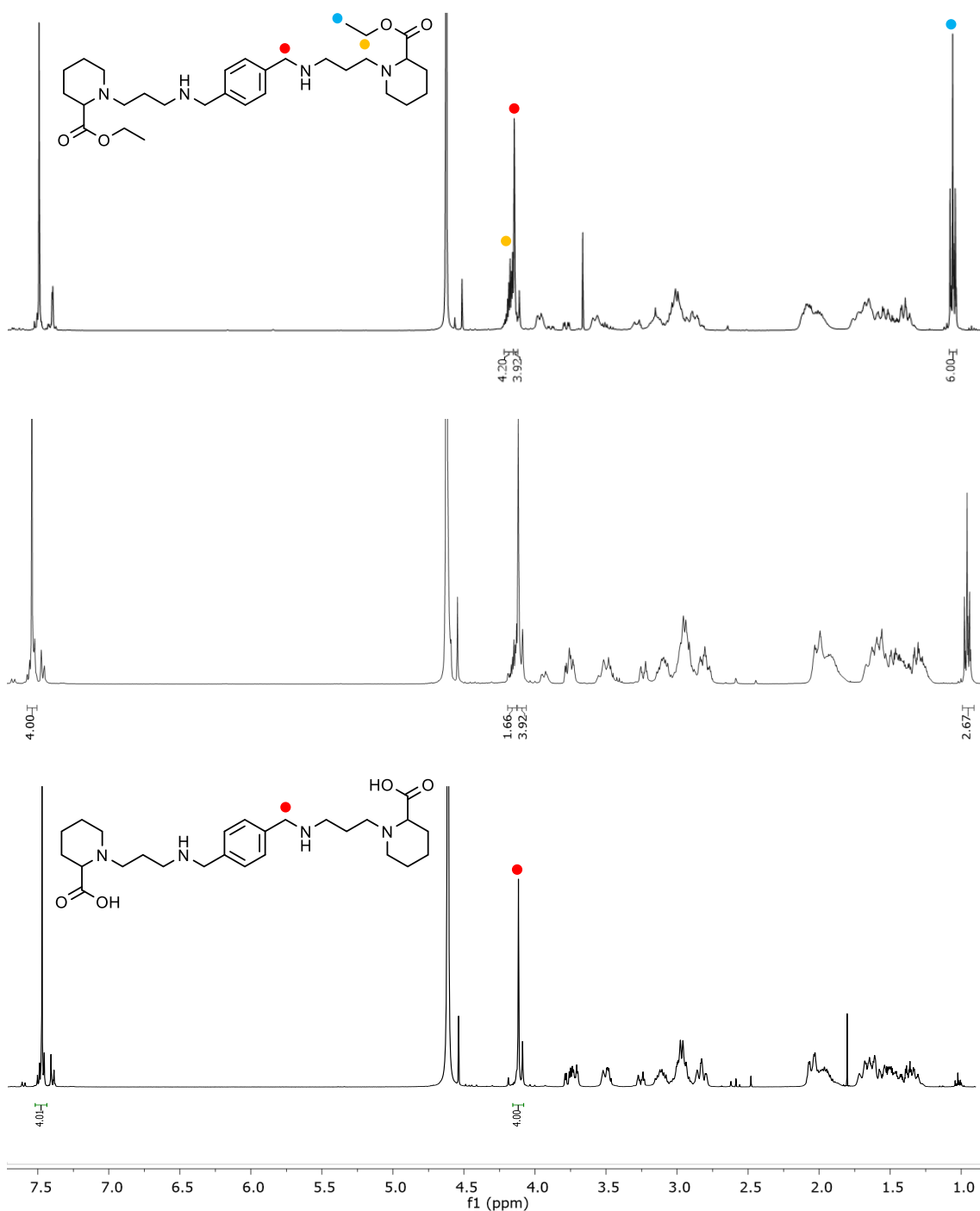
Es pensa, llavors, en generar el NaOH necessari *in situ* i evitar així la formació de productes secundaris no desitjats. Per a fer-ho, es dissol el producte de partida 3{21} en metanol i s'afegeixen 2 equivalents d'aigua i dos equivalents de metòxid sòdic. Es deixa en agitació a temperatura ambient durant 48h.

Tot i haver suavitzat les condicions de reacció i haver generat en el si de la reacció la quantitat exacta de NaOH necessària per portar a terme la reacció (per tant no presenta excés de base) en acabar la reacció es comprova que no ha tingut lloc la reacció desitjada d'hidròlisi del grup èster sinó que s'han generat una sèrie de subproductes fruit del trencament del producte de partida.

En vista dels resultats obtinguts i sabent que una base més dèbil com el carbonat de potassi no aconsegueix la hidròlisi desitjada, es decideix no portar a terme una hidròlisi bàsica sinó una hidròlisi àcida.

Per portar a terme la hidròlisi àcida del grup èster s'utilitza un àcid fort com l'HCl que es posa en contacte amb el producte a hidrolitzar.<sup>[42,43]</sup> En aquest cas es suspèn l'intermedi èster 3{21} en HCl concentrat en excés. En passar 6h a 75°C es comprova per <sup>1</sup>H-RMN que la reacció està tenint lloc; els senyals corresponents al grup etil han disminuït, mentre que la resta de l'espectre no mostra senyal d'impureses o que s'estigui produint cap reacció secundària no desitjada. Així doncs, es decideix escalfar amb microones la reacció per accelerar-la.

S'escalfa a 75°C mitjançant calefacció microones durant 8h i es comprova la total conversió de l'intermedi èster 3{21} en la tetraamina 3{19} objectiu en forma de clorhidrat amb un rendiment del 79% (Figura 3.73).



**Figura 3.73.** Espectre <sup>1</sup>H-RMN de les sals de l'intermedi 3{21} (espectre superior), del cru de reacció després de les 6h de calefacció convencional (espectre intermedi) i de la tetraamina 3{19} després de les 8h de calefacció per microones (espectre inferior).

Comparant l'espectre de protó amb el de l'intermedi 3{21} es comprova com, efectivament, disminueixen els senyals corresponents al grup etil de l'èster a mesura que transcorre el temps de reacció.

També es pot comprovar com no hi ha aparició d'impureses o subproductes durant el transcurs de la hidròlisi i els senyals corresponents a la resta de la molècula es mantenen inalterats.

Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}

Amb aquest últim pas d'hidròlisi resolt, la ruta sintètica proposada (Figura 3.74) per a l'obtenció de la tetraamina 3{19} queda completa amb un rendiment global del 30% tal com es veu en la Taula 3.12.

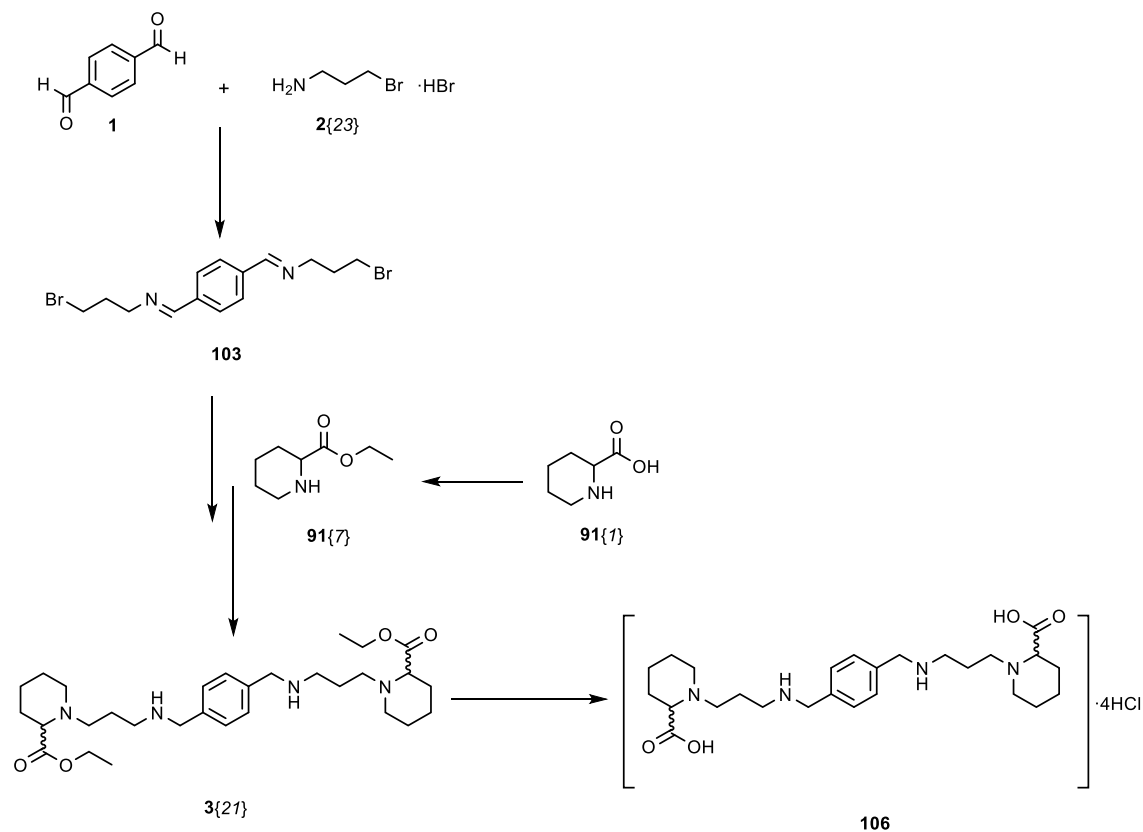
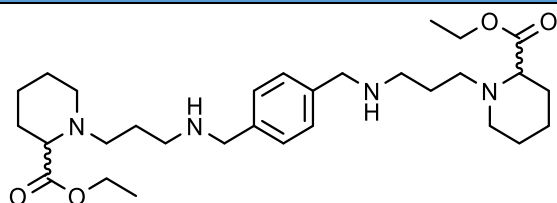
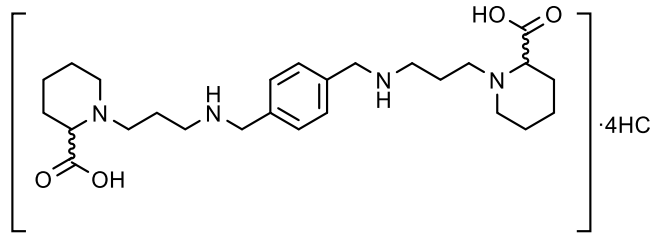


Figura 3.74. Ruta sintètica proposada per l'obtenció de la tetraamina objectiu 3{19} en forma de tetraclorhidrat (106).

Taula 3.12. Rendiments parcials i global de l'obtenció de la tetraamina 106.

Molècula	Nom	Rendiment	Rendiment global
	91{7}	>99%	-
	103	>99%	-

Molècula	Nom	Rendiment	Rendiment global
	<b>3{21}</b>	38%	-
	<b>106</b>	79%	30%

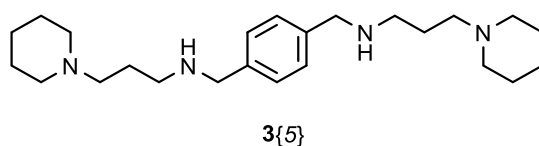
Un cop optimitzada es pensa en utilitzar aquesta nova ruta sintètica per obtenir noves tetraamines simètriques tipus 3{x} de formà ràpida i amb bon rendiment augmentant així la varietat de molècules a assajar enfront a CXCR4.

### 3.4- Obtenció de noves molècules 3{x}

El primer que cal fer és comprovar la viabilitat i efectivitat d'aquesta nova ruta sintètica (Figura 3.74) en altres casos que no sigui el del compost 3{21} en concret.

#### 3.4.1- Comprovació de la viabilitat de la ruta sintètica

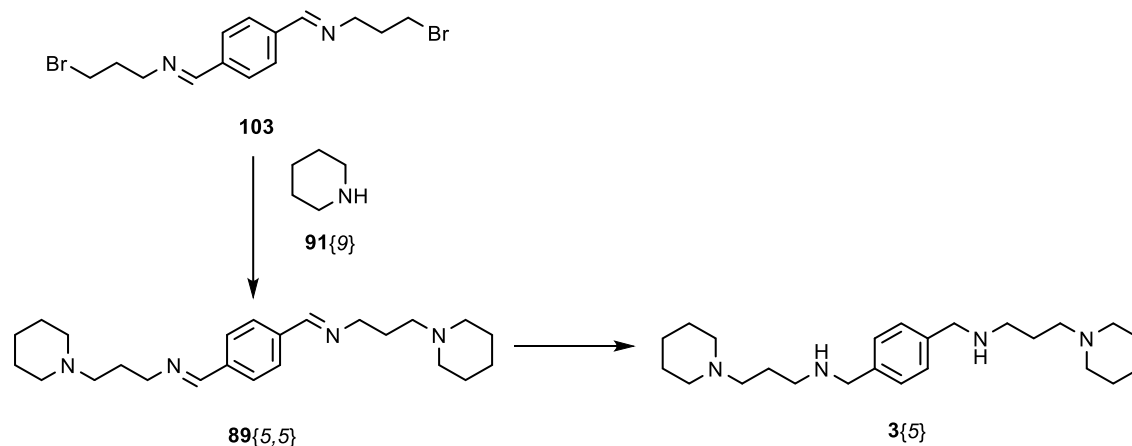
Per a fer aquesta comprovació s'escull un compost ja sintetitzat anteriorment al grup mitjançant la ruta sintètica convencional utilitzada fins a aquest moment. S'escull la tetraamina 3{5} que conté un grup piperidina com a heterocicle lateral (Figura 3.75) ja que és un grup representatiu del conjunt de tetraamines sintetitzades i que es volen sintetitzar però no conté centres quirals, fet que simplifica l'anàlisi i interpretació dels espectres d'RMN.



**Figura 3.75.** Estructura de la tetraamina 3{5} que s'utilitzarà per comprovar la viabilitat de la nova ruta sintètica en nous compostos.

Escollida la molècula, s'adapta la nova ruta sintètica trobada que permetrà obtenir-la.

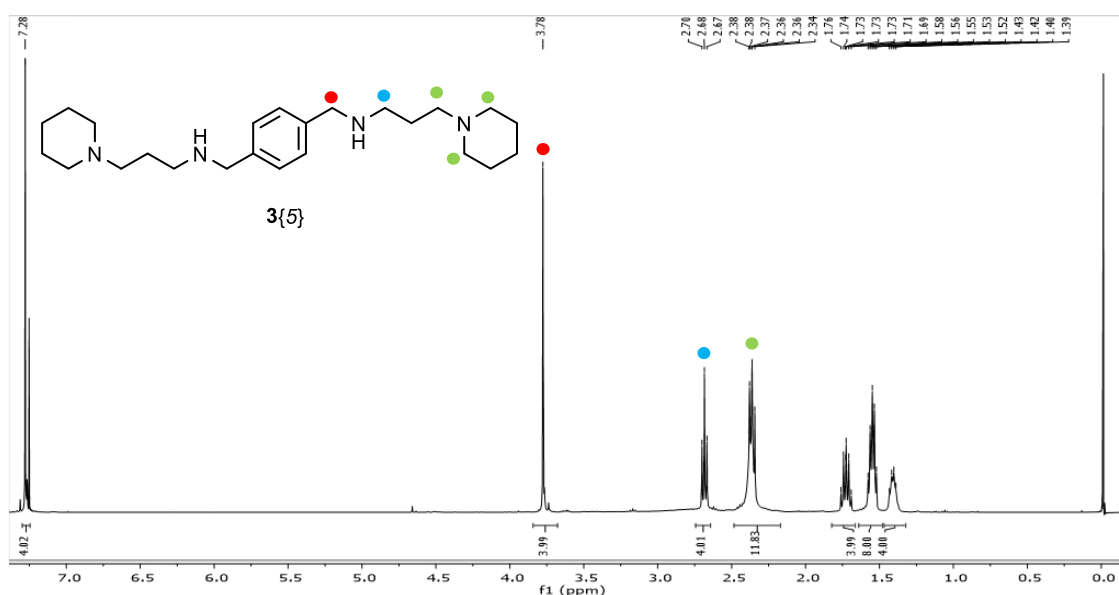
En arribar a l'intermedi espaiador **103** tal com està descrit en l'apartat 3.3.5.1, es fa reaccionar aquest amb dos equivalents de l'heterocicle piperidina (**91**{9}) per formar l'intermedi imina **89**{5,5} que es redueix directament per obtenir la tetraamina **3**{5} tal com es mostra en la Figura 3.76.



**Figura 3.76.** Ruta sintètica adaptada per obtenir la tetraamina **3**{5}.

Es comprova per espectroscòpia RMN que en obtenir l'intermedi imina **89**{5,5}, presenta les mateixes impureses de trencament unilateral i bilateral que en l'obtenció del compost **89**{21,21} (Figura 3.68) però que d'igual forma que en el cas anterior, en realitzar el pas de reducció i purificació final, aquestes son eliminades.

En l'espectre  $^1\text{H}$ -RMN del compost **3**{5} objectiu (Figura 3.77), es comprova que s'ha obtingut correctament i de forma pura amb la nova ruta sintètica proposada, i que aquest es correspon exactament a l'espectre obtingut per S. Pettersson a la seva tesi doctoral.<sup>[2]</sup>



**Figura 3.77.** Espectre  $^1\text{H}$ -RMN de la tetraamina **3**{5} obtinguda mitjançant la nova ruta sintètica dissenyada.



El rendiment és del 65%. En el cas anterior realitzat per S. Pettersson va ser del 91%.<sup>[2]</sup> La davallada de rendiment és notable amb la nova ruta sintètica, però demostra ser viable i efectiva per obtenir els compostos tetraamínics desitjats. Tot i això, i observant aquests valors, resultaria recomanable aplicar la ruta sintètica utilitzada anteriorment en el GEM (Figura 1.25) en els casos que fos possible i que aquesta no interaccionés amb els grups funcionals presents en el compost a sintetitzar; com en el cas que ha ocupat l'apartat 3.3.

### 3.4.2- Síntesi de les noves molècules 3{x} usant la nova ruta sintètica

Un cop demostrat que la nova ruta sintètica és compatible amb altres compostos a part de la tetraamina 3{19} per la que ha sigut dissenyada, es decideix utilitzar-la per obtenir de forma ràpida nous compostos tetraamínics.

Es realitza una cerca al laboratori i als principals distribuïdors comercials per fer una selecció d'heterocicles propensos a ser utilitzats per a la síntesi dels nous productes (Figura 3.78). No es realitza una cerca de diversitat, sinó que es busquen substituents disponibles similars als ja utilitzats i que han donat bons resultats d'inhibició.

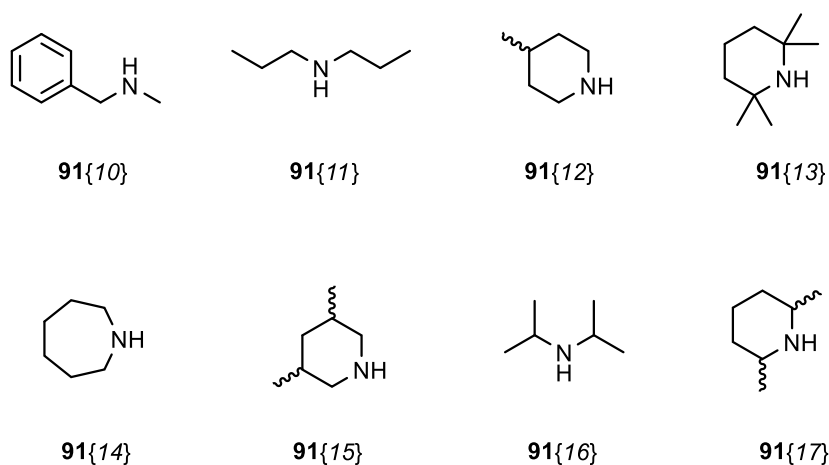
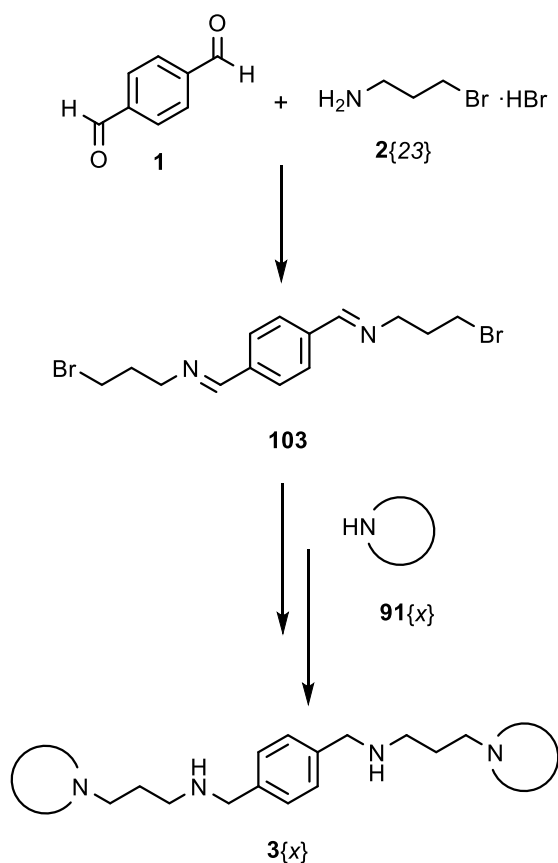


Figura 3.78. Selecció d'heterocicles 91{x} per la síntesi de nous compostos 3{x}.

Es procedeix a posar en pràctica la ruta sintètica optimitzada anteriorment però usant els nous heterocicles en el moment de realitzar la substitució de l'espaiador imínic 103 (Figura 3.79).

Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}



**Figura 3.79.** Ruta sintètica general per a l'obtenció dels nous compostos tetraamínics **3{x}**.

Tot seguit de sintetitzar l'espaiador imina **103** tal com es detalla en l'apartat 3.3.5.1 es fa reaccionar amb els diferents substituents representats en la Figura 3.80. Després de realitzar la reducció pertinent per obtenir els compostos en forma de tetraamina **3{x}**, s'analitzen espectroscòpicament i es comprova que, dels 8 productes a sintetitzar, 3 quasi no han reaccionat i en l'espectre  $^1\text{H-RMN}$  es poden veure majoritàriament els productes de partida **103** i **91{x}** (reduïts a causa del  $\text{NaBH}_4$ ) amb petites traces dels productes **3{27}**, **3{30}** i **3{31}** desitjats però que indiquen que principalment la reacció no ha tingut lloc.

En la Taula 3.13 es mostren els rendiments obtinguts per cada un dels casos concrets.

Taula 3.13. Rendiments globals d'obtenció de cada un dels compostos 3{x} objectiu.

Molècula	Nom	Rendiment global
	3{24}	50%
	3{25}	75%
	3{26}	28%
	3{27}	No reacciona
	3{28}	60%
	3{29}	46%
	3{30}	No reacciona
	3{31}	No reacciona

Posant atenció en els compostos que no han reaccionat, podem treure la conclusió que el fet que ha dificultat la reacció ha estat l'impediment estèric. Els tres compostos coincideixen en el fet de tenir grups voluminosos a banda i banda del grup NH el que pot haver evitat que la substitució tingui lloc.

Es pot pensar en augmentar la temperatura de reacció per intentar resoldre aquest problema, però, com s'ha vist anteriorment, un augment de temperatura provoca el trencament del grup imina de l'espaiador **103**. Per tant, si es tingués un interès especial en l'obtenció d'aquests

Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}

productes caldria buscar una ruta sintètica alternativa que permetés un augment de temperatura en el pas de substitució del grup NH.

Per tant, es pot concloure que la nova ruta sintètica dissenyada en l'apartat 3.3 ens permet la síntesi de tetraamines del tipus 3{x} sempre que no continguin grups voluminosos en posició  $\alpha$  de l'NH que ha de reaccionar amb l'espaiador 103.

#### 3.4.2.1- Síntesi de la tetraamina 3{20}

Es decideix, en últim terme, sintetitzar també la tetraamina 3{20} (Figura 3.80) que conté els dos grups èster metílic. Originalment, aquest heterocicle es trobava en algunes de les primeres posicions del treball computacional realitzat per J. Planesas i descrit en l'apartat 3.3.1 i cal recordar que fins al canvi a l'èster etílic es tractava de l'intermedi escollit per l'obtenció del compost 3{19}.

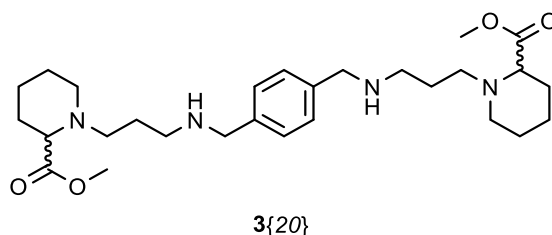


Figura 3.80. Estructura de la tetraamina 3{20}.

Per aconseguir el producte objectiu s'obté l'espaiador 103 tal com es descriu en l'apartat 3.3.5.1 i l'heterocicle 91{6} tal com es detalla en l'apartat 3.3.2.1. Com que els rendiments dels dos procediments són quantitius (o propers a ser-ho) no cal realitzar cap tipus d'optimització.

Es realitza doncs la substitució de l'espaiador amb l'heterocicle tal com s'ha comentat en el cas de l'èster etílic 91{7}. S'obté el producte 3{20} desitjat amb un rendiment global del 25%.

## 3.5- Assaig biològic i anàlisi de resultats

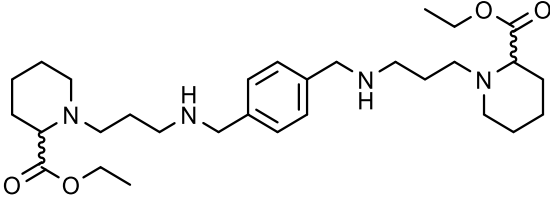
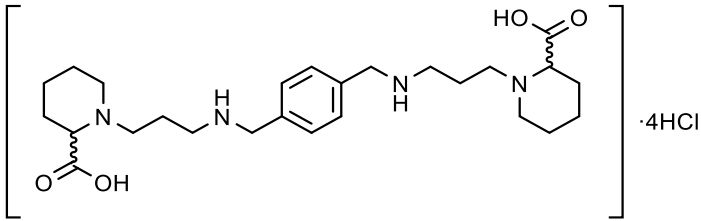
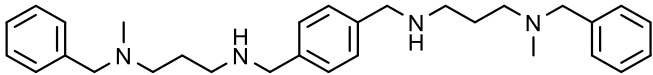
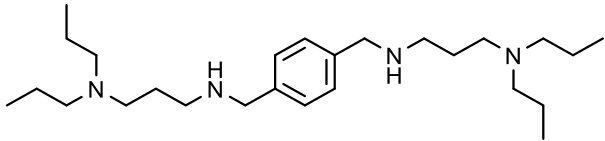
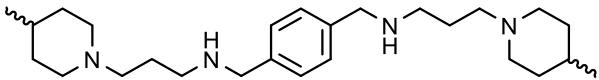
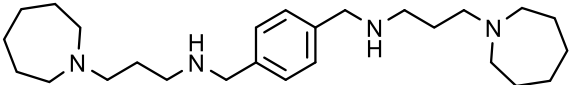
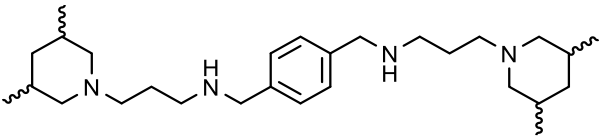
### 3.5.1- Assaig antiviral

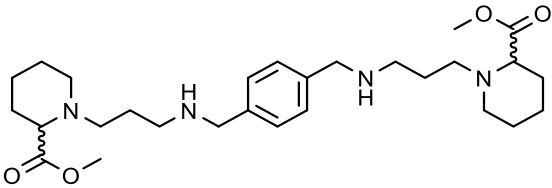
El primer assaig realitzat és el ja utilitzat per les quimioteques anteriors i en els treballs anteriors del grup per a poder comparar-los i completar les dades. Com s'ha indicat anteriorment es tracta d'un assaig enfront al virus del VIH portat a terme pel grup del Dr. Esté al Laboratori de Retrovirologia de la Fundació IrsiCaixa de l'Hospital Germans Trias i Pujol mitjançant un assaig

colorimètric de MTT.<sup>[8]</sup> Les cèl·lules usades en l'assaig són del tipus MT-4 (línia cel·lular de cèl·lules T humanes aïllades en pacients amb leucèmia de cèl·lules T) i s'infecten amb la soca NL4-3 *wild type* amb les que es comprova la viabilitat de les cèl·lules MT-4 infectades ( $EC_{50}$ ) i sense infectar ( $CC_{50}$ ) després d'haver estat incubant durant 5 dies el sistema.

En la Taula 3.14 es recullen els resultats obtinguts per les noves molècules sintetitzades.

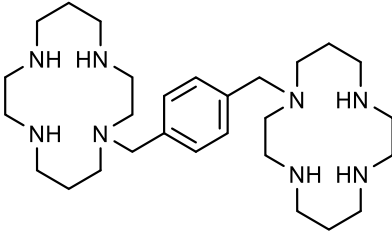
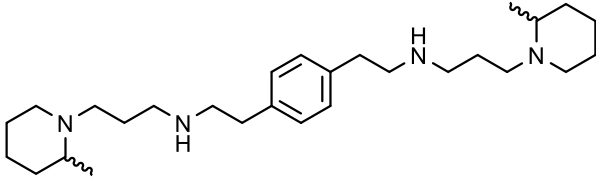
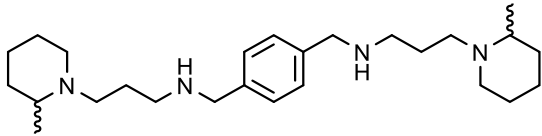
**Taula 3.14.** Resultats d'activitat anti-VIH dels nous compostos 3{x} sintetitzats. Les cèl·lules usades en l'assaig són del tipus MT-4 infectades amb la soca NL4-3 wt.

Molècula	Nom	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	$CC_{50}$ ( $\mu$ M)
	3{21}	6.500	33.556
	106	>40.291	>40.291
	3{24}	1.221	5.777
	3{25}	0.860	31.214
	3{26}	0.772	57.249
	3{28}	4.461	>60.287
	3{29}	0.203	26.584

Molècula	Nom	EC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
	3{20}	32.962	38.333

Per poder contrastar els resultats, en la Taula 3.15 es mostren els resultats obtinguts en el mateix assaig per els compostos de referència AMD3100, la tetraamina **14{3}**, ja que resulta el compost més actiu enfront el VIH obtingut al grup, i la tetraamina **3{3}**, que, tot i no superar el valor d'activitat anti-VIH de **14{3}**, s'utilitzarà com a referència ja que és la molècula del grup que es troba en un estat de recerca més avançat, ja que es disposa dels estereoisòmers aïllats i avaluats. A part, es tracta del compost de millor activitat antiviral amb estructura més semblant a les noves molècules, les quals, a més, es van dissenyar a partir d'ella.

**Taula 3.15.** Resultats d'activitat anti-VIH dels compostos de referència AMD3100, **3{3}** i **14{3}**. Les cèl·lules usades en l'assaig són del tipus MT-4 infectades amb la soca NL4-3 wt.

Molècula	Nom	EC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
	AMD3100	0.003	>1.989
	<b>14{3}</b>	0.072	117.450
	<b>3{3}</b>	0.121	>60.289

Es pot comprovar com cap dels nous compostos és capaç de millorar els valors d'activitat anti-VIH dels compostos de referència.

El compost **3{29}** és el compost amb millors resultats d'activitat antiviral dels avaluats en aquesta quimioteca, els seus dos grups metil tot i estar en la posició 3 de l'anell presenten similitud amb

el compost 3{3} de referència. Això pot portar a pensar que el compost 3{31} que no ha estat possible de sintetitzar amb la ruta sintètica desenvolupada en el present treball i que conté precisament dos grups metil com el compost 3{29} però en posició 2 de l'anell pot resultar un compost interessant d'aconseguir i estudiar en un futur.

Cal destacar els resultats obtinguts pels compostos 106, 3{20} i 3{21}. El compost àcid 106 era originalment el compost escollit a partir del treball computacional presentat en l'apartat 3.3.1; tot i això, els resultats d'activitat anti-VIH obtinguts són gairebé nuls. Es pot pensar en justificar aquest resultat pel fet que en tractar-se d'un compost tant carregat electrostàticament i, per tant, tant hidrofílic, no hagi sigut capaç d'accedir i unir-se al coreceptor. Tanmateix, els compostos 3{20} i 3{21} intermedis de reacció contenen heterocicles laterals semblants als utilitzats i, fins i tot, presents en algunes de les molècules millor posicionades en el *docking* esmentat tampoc presenten una activitat anti-VIH destacada, essent la tetraamina 3{20} un compost amb activitat antiviral quasi nul·la. En aquest cas l'absència d'activitat no es pot justificar per la càrrega dels compostos o la seva impossibilitat d'arribar al lloc d'unió, per tant, pot ser que el model de predicció generat no sigui acurat o que les aproximacions fetes posteriorment no es trobin ben encaminades.

Sobre els altres compostos, queda patent, tal com ja s'ha confirmat de forma experimental anteriorment al grup, que una major mobilitat dels heterocicles o grups laterals de les tetraamines aporten millors activitats antivirals que les estructures més rígides. Si ens centrem, però, en les estructures 3{25} i 3{29}, es tracta de la mateixa estructura tan sols que en el cas de 3{29} les posicions dels metils queden fixades i no permeten rotació en aquest punt. Tot i tractar-se doncs d'una estructura amb menys mobilitat estructural que 3{25} té un poder d'inhibició major, anant contra aquesta hipòtesi. Aquest fet pot indicar que, en aquest cas, la posició dels grups metil està limitada i es millora l'activitat si aquests es troben fixats.

### 3.5.2- Assaig enfront a limfoma

El receptor CXCR4 és essencial pel manteniment i permanència de les cèl·lules mare hematopoètiques en els diferents nínxols dins la medul·la òssia.<sup>[44]</sup> Tanmateix, les cèl·lules de limfoma també expressen CXCR4 i les indueix mitjançant quimiotaxi a migrar entre les cèl·lules mare de la medul·la òssia. S'ha comprovat que les cèl·lules leucèmiques utilitzen CXCR4 per garantir la seva permanència en la medul·la òssia i la seva inclusió als nínxols, normalment reservats a les cèl·lules progenitores, fet que afavoreix el seu creixement i la seva supervivència.<sup>[44,45]</sup> Es pensa en combinar els inhibidors de CXCR4 amb la quimioteràpia convencional així aquesta eliminaria les cèl·lules tumorals sense que puguin quedar protegides dins la medul·la òssia. A més, com ja s'ha explicat en el present treball, la unió CXCL12/CXCR4 afavoreix la vascularització dels nous tumors. L'expressió de CXCR4, doncs, va associada a una supervivència del pacient amb càncer significativament menor.<sup>[46]</sup>

Per tot això, el receptor CXCR4 s'ha convertit en una diana potencial en el tractament d'aquesta malaltia i actualment s'estan usant inhibidors d'aquest inicialment dissenyats com a inhibidors d'entrada del VIH per a tractar la malaltia.<sup>[44]</sup>

Per aquests motius es pensa en assajar la nova tetraamina **106** sintetitzada en el present treball així com l'intermedi **3{21}** enfront a limfoma, ja que, tot i no haver presentat activitat anti-VIH, han sigut dissenyades com a inhibidors potencials de CXCR4 i en la predicció del model computacional sortien molt ben classificats. Les proves es realitzen a la Divisió d'Hematologia i Oncologia del Centre Esther Koplowitz de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) a càrrec del Dr. Gaël Roué.<sup>[47]</sup>

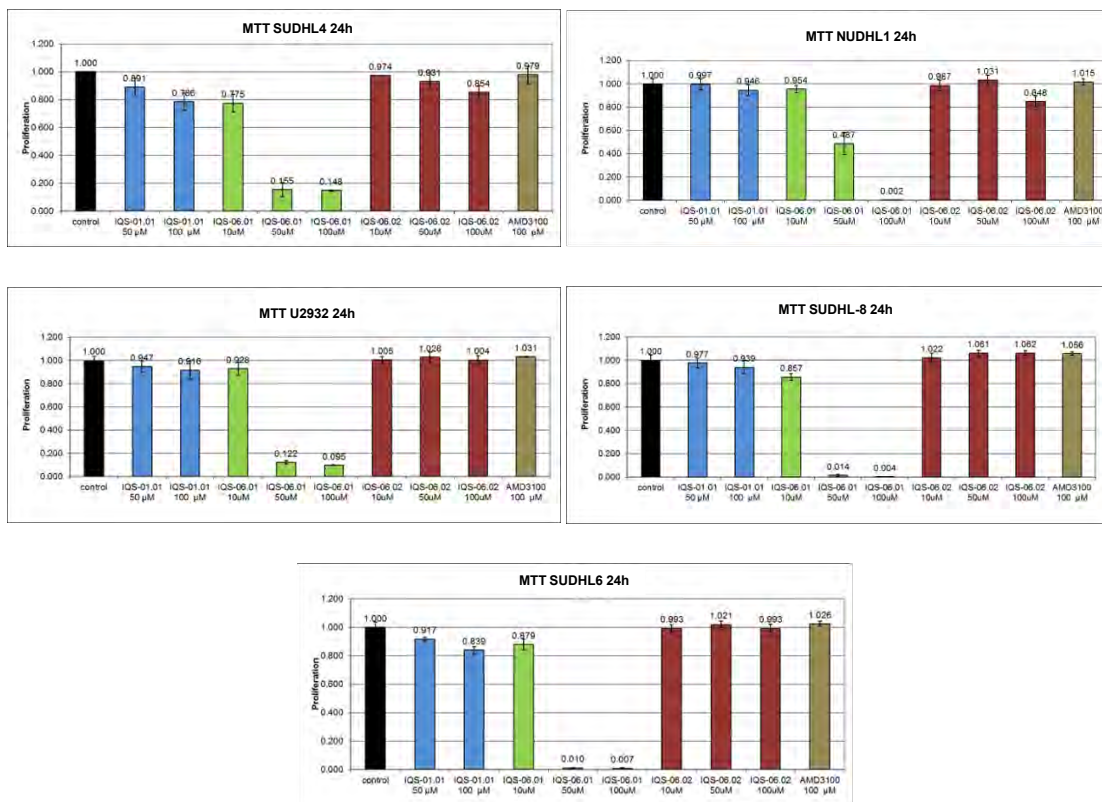
S'utilitzen cèl·lules DLBCL (*Diffuse large B-cell lymphoma*), les més comunes en limfomes no-Hodgkin adults, en tots els assaigs. Aquestes han estat cultivades en un medi RPMI 1640 de cultiu mig (Gibco), suplementat amb sèrum boví fetal (FBS) al 10% (les línies cel·lulars WSU-DLCL2, SUDHL4 i U2932) o al 20% (les línies cel·lulars SUDHL6, NUDHL1, Pfeiffer i SUDHL8), amb una dissolució 2mM de glutamina i 50 µg/ml de penicilina-streptomicina. A 37°C en una atmosfera humidificada amb un 5% de diòxid de carboni.

### 3.5.2.1- Assaig de proliferació cel·lular

Primerament es realitza un assaig de proliferació cel·lular, aquest consisteix en un assaig MTT<sup>[8]</sup> com en el cas dels assaigs anti-VIH realitzats en l'apartat 3.5.1 amb una concentració de  $5 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml i utilitzant AMD3100 com a compost inhibidor de CXCR4 de referència.

S'avaluen les tetraamines **106** (IQS-06-02) i **3{21}** (IQS-06-01) així com el compost de referència **3{3}** (IQS-01-01). En realitzar l'assaig biològic en cèl·lules de limfoma dels diferents compostos a diferents concentracions s'obtenen els resultats mostrats a la Figura 3.81.





**Figura 3.81.** Avaluació de l'activitat antitumoral dels compostos **106**, **3{21}** i **3{3}** així com de l'AMD3100 enfront a diverses línies cel·lulars de cèl·lules DLBCL. El compost IQS 06.01 (color verd) es correspon a l'intermedi **3{21}**, el compost IQS 06.02 (color vermell) es correspon a la tetraamina **106** i el compost IQS 01.01 (color blau) es correspon a la tetraamina de referència **3{3}**.

Tal com es pot observar, tot i no mostrar efectes anticancerosos a concentracions inferiors a 50 µM, el compost intermedi **3{21}** posseeix una gran activitat antitumoral a concentracions de 50 µM i 100 µM fins al punt d'aconseguir nivell zero de proliferació en les cèl·lules DLBCL de la mostra. Activitat que no mostren ni el producte final **106** ni els compostos de referència **3{3}** i AMD3100.

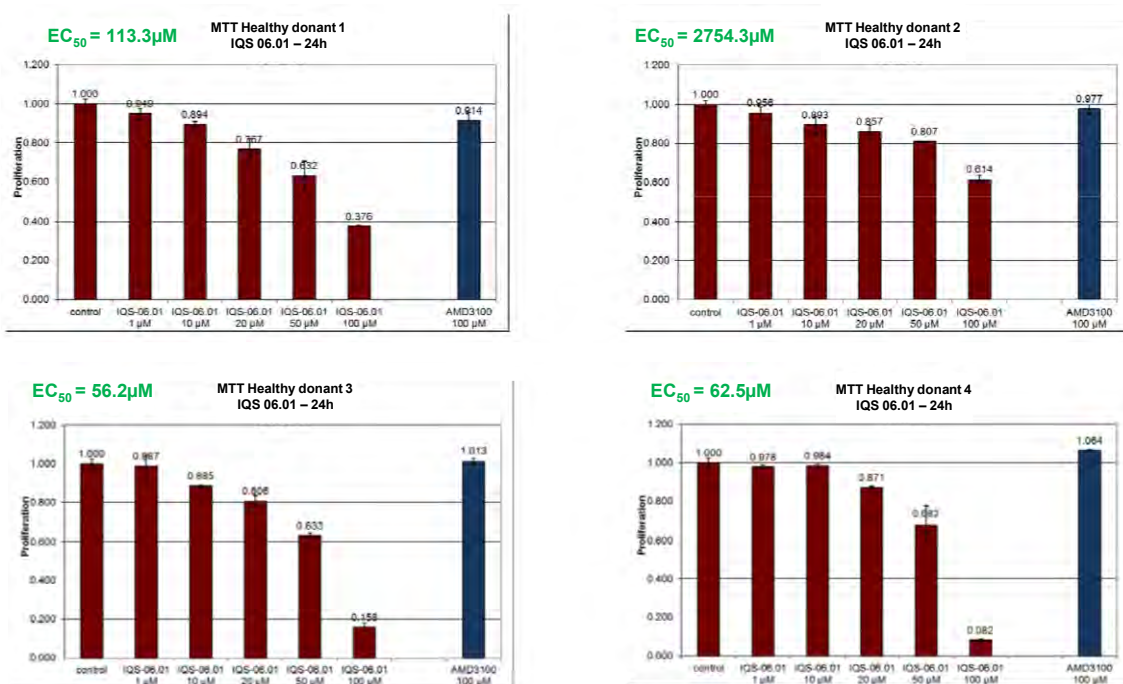
Aquests resultats poden indicar tant un gran poder anti-tumoral del compost en qüestió com una alta toxicitat, ja que no s'ha comprovat si aquest efecte concret el té tan sols en les cèl·lules canceroses o en qualsevol tipus de cèl·lula, fet que l'inhabilitaria com a possible fàrmac ja que en les proves anti-VIH de l'apartat anterior el valor de CC<sub>50</sub> estava al voltant d'aquests 50 µM.

### 3.5.2.2- Assaig de citotoxicitat

Per comprovar la selectivitat d'aquesta activitat antitumoral i la possible toxicitat de **3{21}**, es realitza la prova de l'efecte del compost en cèl·lules sanes (Figura 3.82).

Aquest assaig consisteix en aïllar cèl·lules mononuclears de 4 donants sans voluntaris de les capes leucocitàries per sedimentació i cultivades en un medi RPMI mig (10% FBS) amb una

concentració de  $2 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml. S'avalua la supervivència cel·lular mitjançant un assaig MTT.[8]



**Figura 3.82.** Assaig MTT<sup>[8]</sup> de toxicitat del compost 3{21} (IQS 06.01) en cèl·lules sanguínies mononuclears sanes.

Centrant l'atenció als resultats a 50 µM i 100 µM (ja que són les concentracions que havien resultat actives contra cèl·lules de limfoma), aquests resultats confirmen que el compost 3{21} presenta selectivitat per les cèl·lules canceroses enfront a cèl·lules sanes. Tot i això, cal matisar que el nombre de mort cel·lular de les cèl·lules sanes és bastant elevat, sobretot en el cas de 100 µM però centrant l'atenció en els valors a 50 µM, la mort cel·lular en cèl·lules sanes és del voltant del 30% mentre que en les cèl·lules tumorals DLBCL la supervivència és pràcticament nul·la en la major part de les línies cel·lulars testades (Figura 3.81).

Els resultats no poden ser vinculants, tan sols orientatius, i caldria un estudi més complet per a treure'n un veredict fiab, ja que existeixen diferències notables entre una mostra i una altra, aquesta variació es reflecteix clarament si s'observen els valors d'EC<sub>50</sub> obtingudes, diferenciades amb fins a dos ordres de magnitud.

### 3.5.2.3- Assaig de quantificació d'apoptosi

Es realitza també un assaig per saber si el nou compost provoca la mort cel·lular mitjançant apoptosi. Aquest assaig consisteix en avaluar per citometria de flux les cèl·lules apoptòtiques per una doble tinció amb Annexina V marcada amb isotiocianat de fluoresceïna (FITC) i iodur de propidi (PI).

En la Figura 3.83 es mostren els resultats obtinguts.

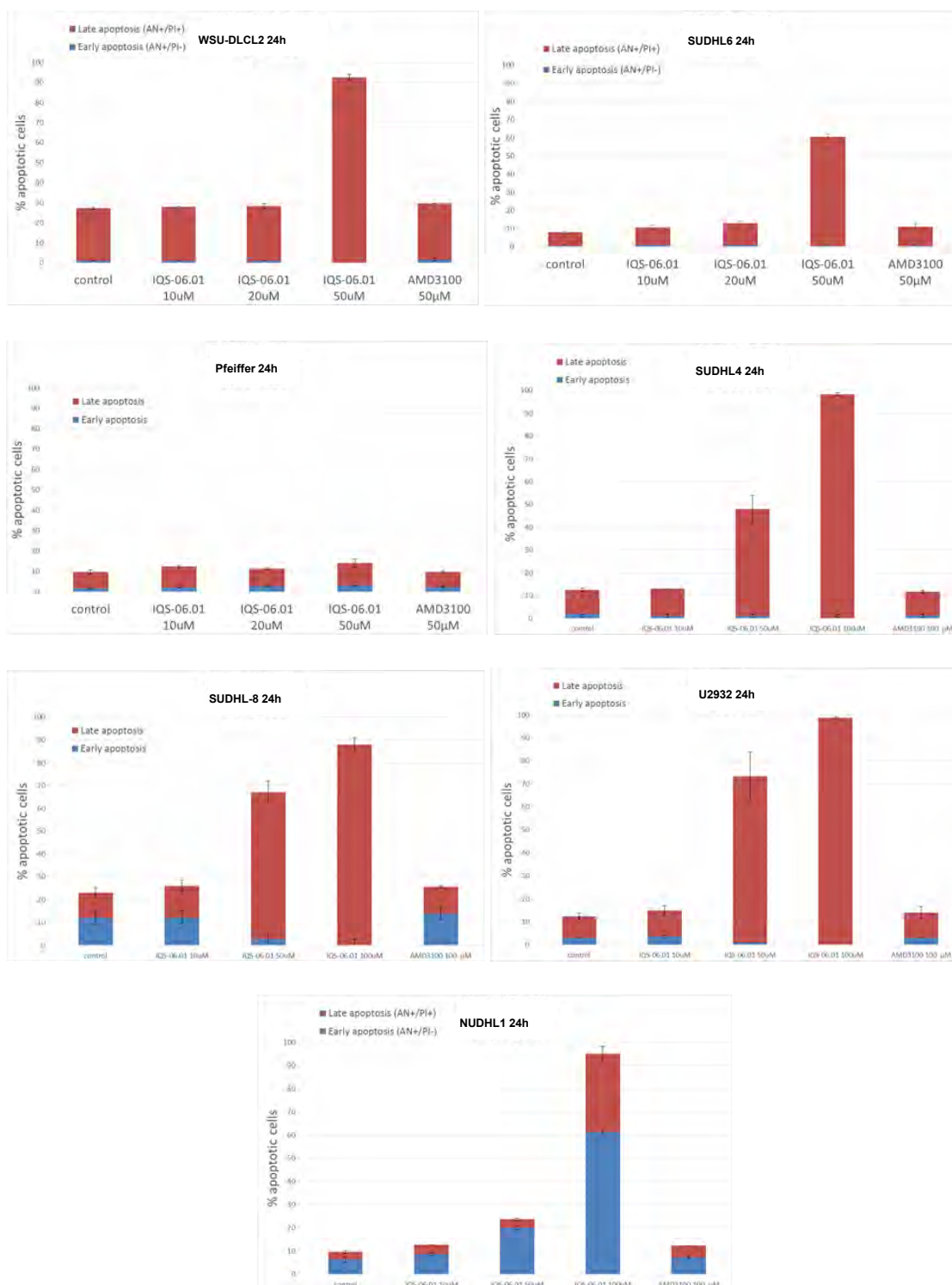


Figura 3.83. Resultats de l'estudi de l'apoptosi en cèl·lules canceroses provocada per el compost 3{21} estudiat.

Es pot comprovar com el compost 3{21} assajat provoca apoptosi a les cèl·lules a concentracions de 50 μM i 100 μM mentre que el compost de referència AMD3100 no. Tan sols en el cas de la

línia cel·lular Pfeiffer el producte no produeix apoptosi a la concentració màxima assajada (50  $\mu$ M).

En l'assaig, tal com es veu en la Figura 3.83, es realitza un doble marcatge de les cèl·lules: un amb AnnexinaV que s'uneix als residus de fosfatidilserina que transloquen a la membrana externa de la cèl·lula durant l'inici del procés d'apoptosi, i amb iodur de propidi, que penetra en les cèl·lules permeabilitzades per la presència de porus en la membrana, un tret terminal de la mort cel·lular per apoptosi. Així, les cèl·lules positives tan sols en el marcatge d'AnnexinaV es defineixen com en fase d'apoptosi primerenca (blau) mentre que les cèl·lules doble positives amb AnnexinaV i iodur de propidi es defineixen com en fase d'apoptosi tardana (vermell).

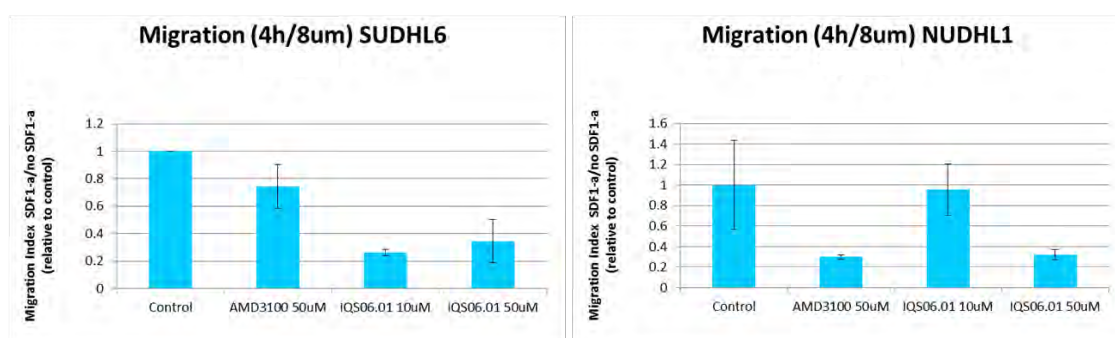
El cas de la línia cel·lular NUDHL1 és la única que presenta uns alts percentatges d'apoptosi primerenca, això ens indica que pot tenir una cinètica del procés d'apoptosi diferent a la resta de línies cel·lulars o bé que presenta una sensibilitat menor al compost 3{21}, el que explicaria que en un temps determinat l'apoptosi es trobi en un estat menys avançat que en la resta.

### 3.5.2.4- Assaig de migració cel·lular

Es fixa l'atenció en l'efecte que té el compost 3{21} en la migració cel·lular (característica que, com s'ha comentat, va lligada al receptor CXCR4).

La migració induïda de CXCL12 s'avalua usant unes cambres de quimiotaxi amb una mida de porus de 8 $\mu$ m. Llavors, 5 $\cdot$ 10<sup>5</sup> cèl·lules es suspensen en 100 $\mu$ l del medi de migració (RPMI 1640 + 0,5% BSA) pretractades o no una hora abans amb l'antagonista de CXCR4 i es col·loquen en la cambra superior. En la cambra inferior es col·loca CXCL12 (200 ng/ml) i en 4h es mesura per citometria el nombre de cèl·lules presents en la cambra inferior.

S'obtenen els resultats representats en la Figura 3.84.



**Figura 3.84.** Efecte del compost 3{21} sobre la migració cel·lular en comparativa amb el compost de referència AMD3100.

Es pot veure com la tetraamina 3{21} impedeix la migració cel·lular de les cèl·lules tumorals, igualant o disminuint el valor donat per l'AMD3100. Aquesta dada és destacable, ja que, com

s'ha indicat anteriorment, aquesta migració dirigida als òrgans on la producció de CXCL12 és més elevada és la que acaba generant metàstasi i el creixement de nous tumors.

Es conclou d'aquest seguit de proves que, de les noves molècules sintetitzades **3{21}** i **106**, l'intermedi **3{21}** presenta millor activitat enfront a CXCR4 que la molècula objectiu **106** en contra del pronòstic inicial del qual es partia. A més, tot i no presentar activitat a concentracions baixes, proporciona una alta mortalitat a les cèl·lules tumorals a partir de 50  $\mu\text{M}$  i, a més, les característiques conferides pel nou compost enfront a la migració cel·lular i la via de mort cel·lular són molt interessants de cara a seguir estudiant-les en un futur.

### 3.5.3- Assaig enfront a càncer de pulmó

La metàstasi i la migració de les cèl·lules tumorals és un dels principals problemes en el càncer de pulmó. Se sap que les cèl·lules de càncer de pulmó, com molts altres tipus de càncer, expressen CXCR4.<sup>[45,48]</sup> L'activació d'aquest receptor indueix a migrar a les cèl·lules canceroses i adherir-se a cèl·lules estromals, fet que els confereix resistència als fàrmacs. A més, s'ha comprovat que els primers punts en els que es desenvolupa la metàstasi (nòduls limfàtics, ossos, fetge, glàndules adrenals i cervell) són tots llocs d'alta expressió de CXCL12.<sup>[48]</sup> Degut als mals diagnòstics es necessiten nous tractaments i estratègies pels pacients amb càncer de pulmó, i utilitzar el receptor CXCR4 com a diana terapèutica és una nova estratègia prou atractiva.

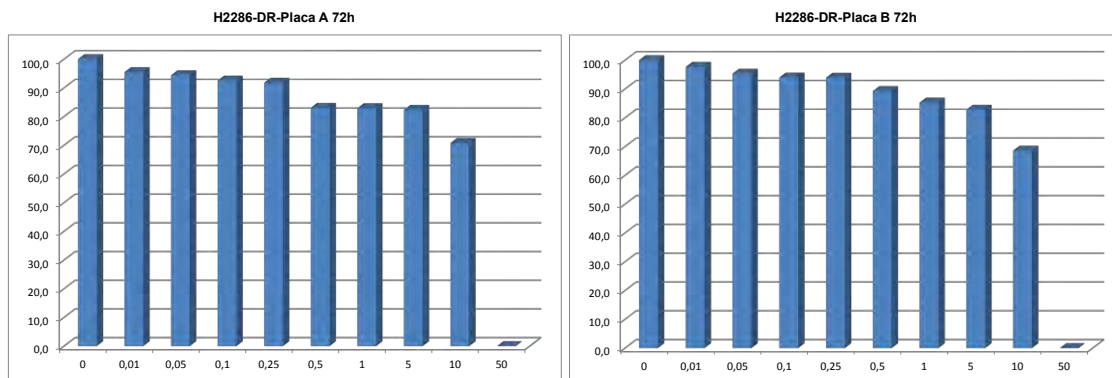
La major part dels subtipus de NSCLC (*non small cancer lung cells*) i SCLC (*small cancer lung cells*), més agressives, expressen el receptor CXCR4, i, per tant, com s'ha dit anteriorment, els pacients amb major expressió de CXCR4 seran més propicis a generar metàstasi i a tenir pitjor diagnòstic de la malaltia.<sup>[48]</sup>

Tot i la gran varietat de tipus de càncer de pulmó i les seves característiques concretes, es decideix realitzar un sol test orientatiu en una línia cel·lular concreta per poder treure'n conclusions juntament amb la resta d'assajos realitzats en aquest apartat. La línia cel·lular seleccionada és una línia d'adenocarcinoma de pulmó, un dels tipus de NSCLC, amb mutació en K-Ras.

Les proteïnes Ras són eixos reguladors de la proliferació cel·lular, diferenciació, motilitat i apoptosi. Però la mutació en aquest gen, l'anomenada mutació en K-Ras, considerada un proncogen, es troba en el 20-30% dels casos de càncer de pulmó. A més ha sigut històricament, des del seu descobriment, un marcador de pronòstic negatiu, ja que encara no existeix cap tractament efectiu contra aquests casos.<sup>[49]</sup>

L'assaig es realitza amb un sembrat de les cèl·lules en 96 plaques i incubades amb el compost **3{21}** a diferents concentracions (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10 i 50  $\mu\text{M}$ ). La viabilitat de les cèl·lules es controla amb un test MTT<sup>[8]</sup> com els que ja s'han comentat anteriorment en el

present treball. S'afegeix el medi que conté MTT (0.75 mg/ml durant 1-2h a 37°C, posteriorment es retira aquest medi i es mesura la viabilitat de les cèl·lules després de 72h d'incubació. En la Figura 3.85 es pot veure una gràfica representant la viabilitat cel·lular (%) respecte la concentració de compost 3{21} present en el medi ( $\mu\text{M}$ ).



**Figura 3.85.** Gràfiques de les dues mostres assajades representant la viabilitat cel·lular (%; eix de les y) respecte la concentració de compost 3{21} present en el medi ( $\mu\text{M}$ ; eix de les x).

En ambdós assaigs es pot veure com la tetraamina 3{21} testada no presenta activitat anti-tumoral a baixes concentracions, i, tal com ja s'ha vist en els assaigs realitzats en limfoma, a 50  $\mu\text{M}$  la supervivència de les cèl·lules és nul·la.

Les  $\text{EC}_{50}$  trobades en els dos experiments és de 12.01 $\mu\text{M}$  i 11.87 $\mu\text{M}$  respectivament, tot i que s'està avaluant a partir de dos sols punts, així que es tracta d'un valor orientatiu que caldria estudiar amb més dades entre 10 $\mu\text{M}$  i 50 $\mu\text{M}$ , però en tractar-se de valors per sobre de 10 $\mu\text{M}$  no es creu necessari.

### 3.5.4- Assaig enfront a càncer de pàncrees

Com ja s'ha explicat anteriorment, el receptor CXCR4 es troba present en cèl·lules de molts tipus de càncer, entre els quals es troba en càncer de pàncrees, on es troba en un 70-75% dels pacients i no es troba expressat en cèl·lules pancreàtiques sanes.<sup>[50]</sup> Com en el cas de les cèl·lules tumorals explicades anteriorment, el conjunt CXCR4/CXCL12 juga un rol vital per la mobilitat cel·lular (metàstasi) i en la vascularització dels nous tumors (angiogènesi)<sup>[44,45]</sup>, per tant és una diana terapèutica de vital importància en el procés de tractament d'aquests tumors.

Per realitzar l'assaig es fa un cultiu 2D de cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic humà (PANC-1) subministrat per l'*American Type Culture Collection* (ATTC, CRL-1469) i fibroblasts dèrmics primaris normals humans (hNDF) subministrats pel Dr. Jesús Otero de l'*Hospital Central de Asturias* (Espanya). L'assaig ha estat realitzat per J. Dulsat al laboratori d'Enginyeria de Teixits del departament de Bioenginyeria de l'Institut Químic de Sarrià (Universitat Ramon Llull).

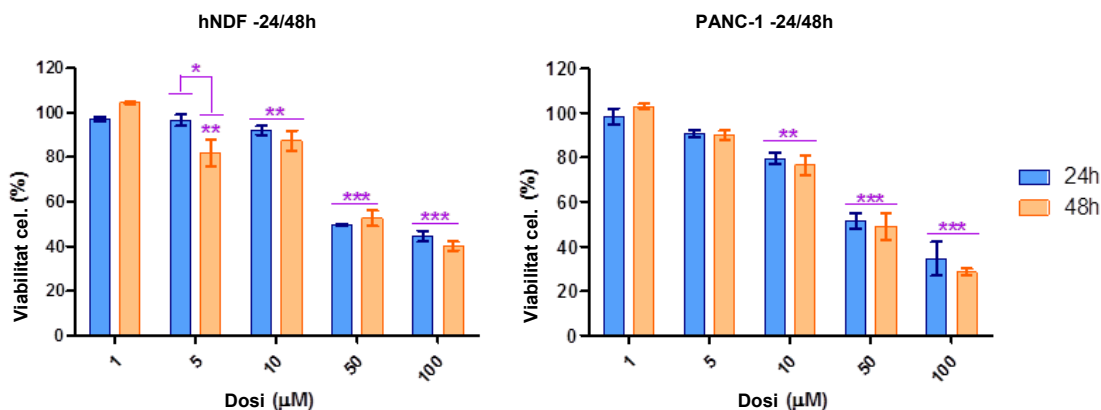


El medi de cultiu per ambdós línies cel·lulars consisteix en el medi Dulbecco's Modified Eagle, amb un nivell de glucosa (4.5g/L) (DMEM, E15-009; PAA Laboratories GmbH), suplementat amb un 10% (v/v) de FBS (DE14-801F; Lonza), un 1% (v/v) de L-glutamina (M11-044; PAA Laboratories GmbH) i un 1% (v/v) de penicil·lina-estreptomicina (L11-010; PAA Laboratories GmbH). Els cultius es mantenen a 37°C en un incubador humidificat equilibrat amb un 5% de CO<sub>2</sub>. Tots els experiments es porten a terme amb un 70-80% de confluència cel·lular en vials de plàstic de 75 cm<sup>2</sup> i les cèl·lules s'usen passats 5-20 cicles.

L'efecte quimioterapèutic del compost 3{21} es testeja en aquests cultius 2D amb cèl·lules de PANC-1 i hNDF a diferents concentracions (0, 1, 5, 10, 50 i 100 µM) i un placebo (DMSO al 0.1%), per quadruplicat. En portar a terme l'experiment, s'elimina el medi de cultiu i s'afegeix un nou medi amb l'inhibidor present, llavors es realitza l'assaig de MTT a 24 i 48h d'incubació.

L'assaig MTT és el mateix utilitzat anteriorment per altres assaigs; el MTT, de color groc en dissolució, es converteix en una sal violeta insoluble (formazan) per acció de l'enzim deshidrogenasa. Aquesta conversió tan sols té lloc en cèl·lules vives, per tant és un indicador del nombre de cèl·lules viables. Els cristalls de formazan es poden dissoldre en DMSO i mesurar-se espectrofotomètricament a 570 nm.<sup>[8]</sup>

Els resultats obtinguts es mostren en la Figura 3.86 segons la viabilitat cel·lular enfront la dosi de compost introduït.

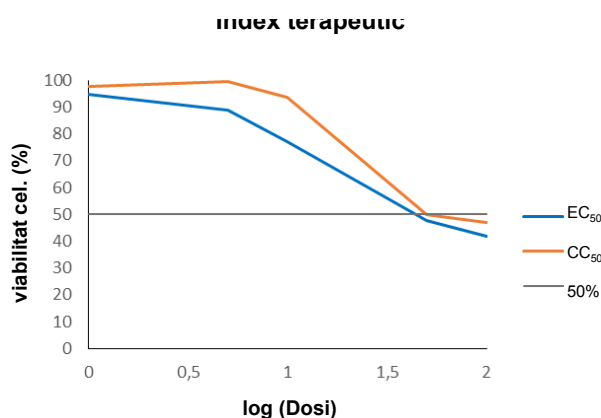


**Figura 3.86.** Assaig del compost 3{21} enfront a cèl·lules de càncer de pàncrees (PANC-1) i enfront a fibroblasts humans sans (hNDF) a 24h i 48h.

Es comprova com tan sols a concentració 5 µM en el cas de hNDF la diferència entre 24 i 48 hores resulta significativa, per tant, es conclou que no hi ha variació de resultats entre 24h i 48h.

Observant l'índex terapèutic fruit de la combinació de les dues gràfiques obtingudes en la Figura 3.87 es pot veure que l'EC<sub>50</sub> i la CC<sub>50</sub> coincideixen prop dels 50 µM, per tant, un índex terapèutic proper a 1, fet que el descarta com a possible fàrmac en aquestes concentracions. La dada més

interessant, però, es veu a 10  $\mu$ M on la viabilitat cel·lular en el cas dels fibroblasts sans és propera al 100% mentre que en el cas de les cèl·lules tumorals PANC-1 baixa fins al voltant del 75%.



**Figura 3.87.** Gràfica de l'EC<sub>50</sub> del compost 3{21} enfront a cèl·lules PANC-1 de càncer de pàncrees i CC<sub>50</sub> enfront fibroblasts sans humans hNDF.

Aquesta disminució no és suficient com per considerar-lo un possible fàrmac potencial, però sí que és prou interessant com per pensar en ell com un nou cap de sèrie del qual partir per trobar-ne nous derivats més actius.

### 3.5.5- Assaig enfront a CXCR4

Arribats a aquest punt i amb els resultats exposats anteriorment dels assaigs provats, es decideix testar els compostos directament enfront al receptor CXCR4. Històricament en el grup s'han dissenyat les molècules pensant en la inhibició del receptor CXCR4, però s'ha assajat sempre indirectament enfront al virus del VIH, pre-suposant que els resultats eren extrapolables directament. Veient els resultats dispars i la notable diferència d'activitat antiviral assolida pels compostos 106 i 3{21} entre la predicció computacional i el test anti-VIH de l'apartat 3.5.1, es decideix que la millor solució és realitzar aquest test directe per resoldre la situació.

L'assaig el porta a càrrec l'empresa DiscoverX. En el nostre cas, es decideix testar front a CXCR4, enfront a CCR5 i enfront a CXCR7. S'escull CCR5 ja que es tracta del correceptor utilitzat pel VIH en substitució de CXCR4, així veuríem si un compost actiu enfront a VIH ho és efectivament per inhibir CXCR4 o si ho és per inhibir-lo conjuntament amb CCR5 o tan sols aquest últim. També es decideix testar enfront a CXCR7 ja que s'ha descrit com un receptor alternatiu de CXCL12, que apareix com a segrestador del lligand.<sup>[51,52]</sup>

CXCR7 pot formar heterodímers amb CXCR4, fent que els processos d'activació i inhibició dels dos receptors estigui estretament lligada fet que propicia que el lligand CXCL12 sigui lligand natural amb ambdós receptors.<sup>[52]</sup>

S'ha demostrat recentment que la unió CXCR7/CXCL12 juga un paper molt important en la biologia del (entre altres) càncer de pròstata.<sup>[53,54]</sup> Les cèl·lules tumorals amb baixa expressió de CXCR4 ho compensen sobreexpressant CXCR7 i substituint-lo en les seves funcions. Tot i que



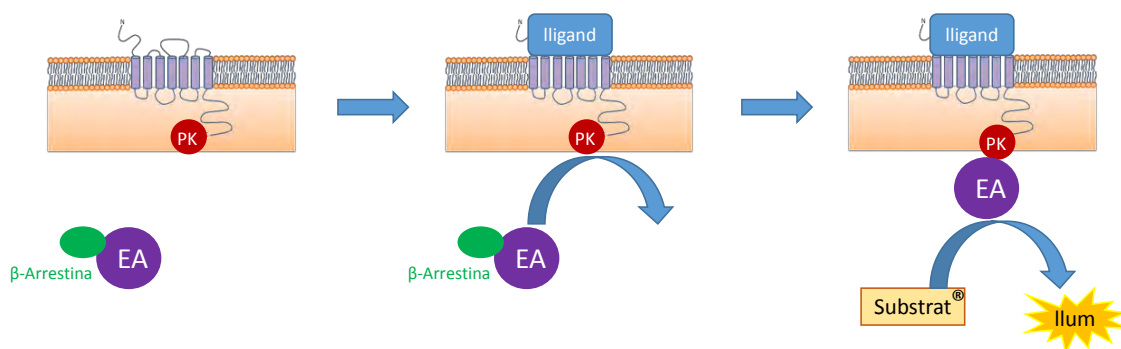
cal ser previnguts en aquests casos, ja que les dades obtingudes en experiments animals no poden ser directament extrapolables al mateix tipus de tumor en humans.<sup>[52]</sup>

L'AMD3100 ha resultat ser un agonista al·lostèric de CXCR7.<sup>[51]</sup> S'ha comprovat que en presència del fàrmac, s'incrementa la unió de CXCL12 amb el receptor; aquest fet seria incompatible si els dos competissin pel mateix lloc d'unió.

A part dels compostos **106** i **3{21}**, es decideix avaluar el conjunt de tetraamines derivades de **3{3}** sintetitzades en l'apartat 3.4.2 i una selecció de les molècules més representatives sintetitzades en el present treball i en treballs anteriors del grup.

S'utilitzen dues tècniques diferents per avaluar la inhibició dels tres receptors diferents; per CXCR7 i CCR5 s'utilitza l'assaig per Arrestina i per CXCR4 l'assaig de cAMP.

L'assaig per Arrestina consisteix en la divisió de l'enzim  $\beta$ -galactosidasa en un pèptid petit anomenat ProLink™ (PK) i una proteïna més gran anomenada *Enzim Acceptor* (EA). El pèptid PK s'uneix al receptor a assajar mentre que la proteïna EA s'uneix a la  $\beta$ -Arrestina. Tal com es veu en la Figura 3.88, quan el lligand natural del receptor s'uneix a aquest, s'activa i permet la unió de les dues parts de la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -Gal) restaurant la seva activitat que és mesurada usant quimioluminescència.



**Figura 3.88.** Assaig per Arrestina utilitzat per CXCR7 i CCR5.

L'assaig per cAMP resulta més complex, ja que el que s'uneix al receptor és una part d'una proteïna heterotrimèrica ( $\alpha$ ) unida també a una guanosina difosfat (GDP). Quan el lligand s'uneix al receptor, es permet la unió de la proteïna heterotrimèrica ( $\alpha\beta\gamma$ ) i l'intercanvi a guanosina trifosfat (GTP) que a la vegada activa l'Adenilat Ciclasa. Aquesta permetrà la ciclació d'ATP en cAMP.

Es realitza un assaig indirecte en el que, com en l'assaig d'Arrestina, es separa la  $\beta$ -Gal en dos subunitats, un pèptid petit (ED) i una proteïna gran (EA). El pèptid ED s'uneix a una unitat de cAMP i s'injecta a la mostra, si la cèl·lula no ha estat capaç de generar cAMP tota la mostra injectada és capturada pels anticossos de cAMP, si pel contrari el receptor s'ha activat i s'ha generat cAMP, part o la totalitat del ED-cAMP injectat s'unirà a la proteïna EA i es podrà llegir el senyal mitjançant quimioluminescència (Figura 3.89).

Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}

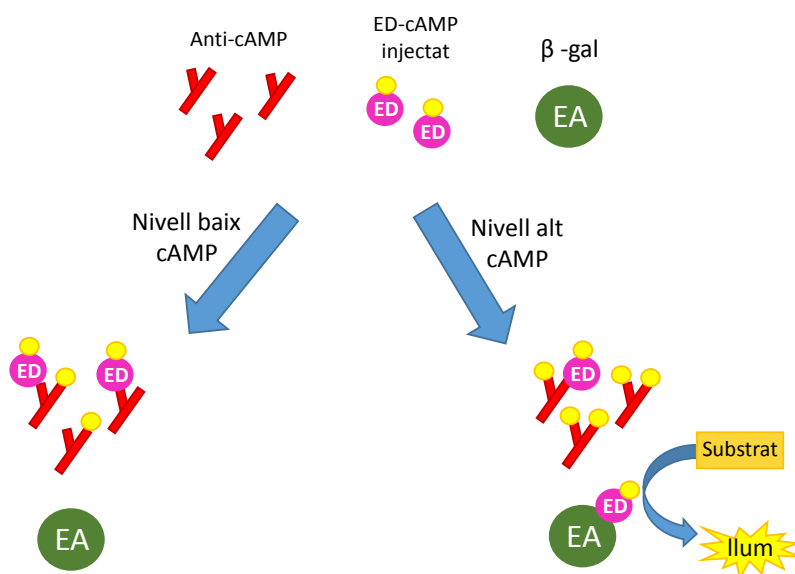
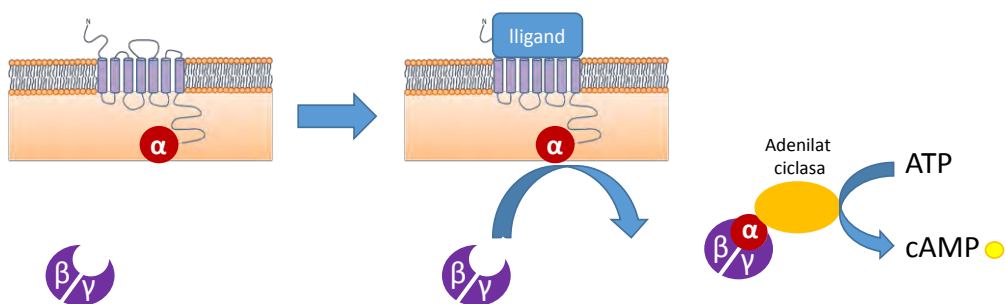


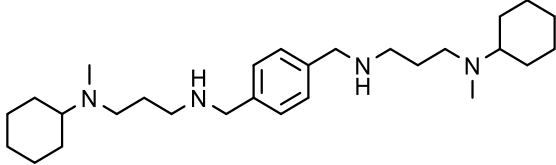
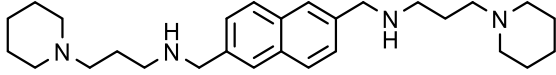
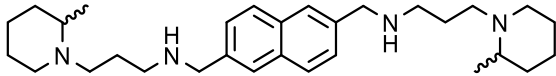
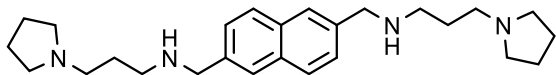
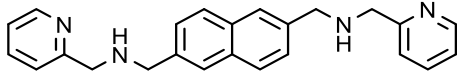
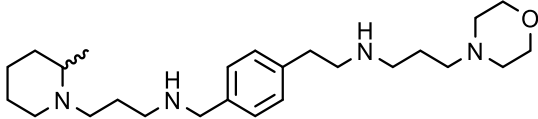
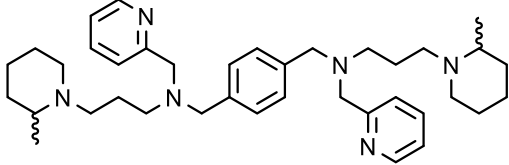
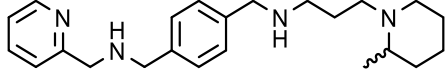
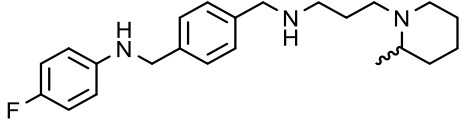
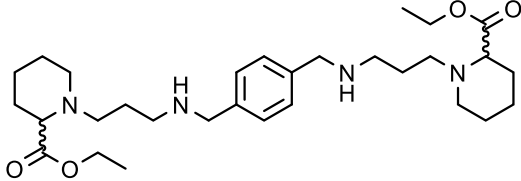
Figura 3.89. Assaig cAMP utilitzat per CXCR4.

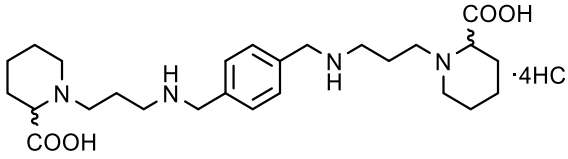
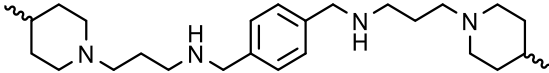
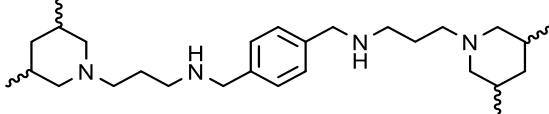
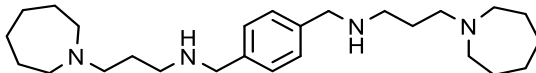
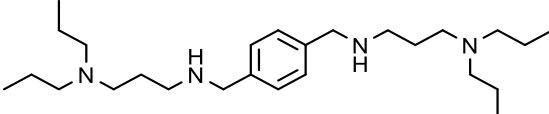
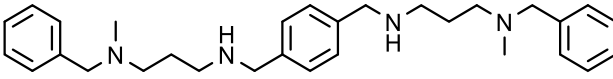
Els resultats dels assaigs es mostren en la Taula 3.16.

Taula 3.16. Resultats d'inhibició enfront a CXCR7, CCR5 i CXCR4 de les molècules seleccionades.

Molècula	Nom	Receptor	% Inhibició
	3{4}	CCR5	-3.4
		CXCR7	12.0
		CXCR4	9.3
	3{3}	CCR5	-4.2
		CXCR7	-1.8
		CXCR4	78.0
	3{5}	CCR5	-1.1
		CXCR7	6.6
		CXCR4	80.2

Molècula	Nom	Receptor	% Inhibició
	8{3}	CCR5	-1.9
		CXCR7	10.6
		CXCR4	66.7
	3{1}	CCR5	5.7
		CXCR7	-10.7
		CXCR4	-8.8
	14{3}	CCR5	5.5
		CXCR7	-6.6
		CXCR4	101.1
	14{5}	CCR5	-1.0
		CXCR7	-5.5
		CXCR4	43.1
	14{1}	CCR5	3.3
		CXCR7	8.0
		CXCR4	59.4
	3{32}	CCR5	-9.8
		CXCR7	4.8
		CXCR4	150.7
	3{33}	CCR5	-12.9
		CXCR7	1.1
		CXCR4	158.1
	6{33,32}	CCR5	-14.2
		CXCR7	-0.2
		CXCR4	181.3
	21{3,3}	CCR5	16.9
		CXCR7	-10.6
		CXCR4	117.4
	21{5,5}	CCR5	18.6
		CXCR7	-7.6
		CXCR4	65.6
	21{5,3}	CCR5	24.9
		CXCR7	-1.2
		CXCR4	78.6

Molècula	Nom	Receptor	% Inhibició
	<b>3{18,18}</b>	CCR5	15.1
		CXCR7	-6.4
		CXCR4	94.4
	<b>47{5}</b>	CCR5	18.0
		CXCR7	-18.9
		CXCR4	63.2
	<b>47{3}</b>	CCR5	21.5
		CXCR7	-10.7
		CXCR4	74.2
	<b>47{1}</b>	CCR5	14.8
		CXCR7	-2.8
		CXCR4	59.6
	<b>73</b>	CCR5	31.9
		CXCR7	-12.4
		CXCR4	-3.9
	<b>21{4,3}</b>	CCR5	10.5
		CXCR7	-2.6
		CXCR4	-6.9
	<b>65</b>	CCR5	36.4
		CXCR7	-18.7
		CXCR4	-9.4
	<b>70</b>	CCR5	8.5
		CXCR7	-3.8
		CXCR4	62.4
	<b>72</b>	CCR5	27.2
		CXCR7	-6.3
		CXCR4	11.6
	<b>3{21,21}</b>	CCR5	18.6
		CXCR7	-16.6
		CXCR4	-24.6

Molècula	Nom	Receptor	% Inhibició
	<b>106</b>	CCR5	-22.1
		CXCR7	10.4
		CXCR4	-11.7
	<b>3{26}</b>	CCR5	-8.0
		CXCR7	-11.7
		CXCR4	39.0
	<b>3{29}</b>	CCR5	17.8
		CXCR7	-10.9
		CXCR4	79.0
	<b>3{28}</b>	CCR5	12.8
		CXCR7	-2
		CXCR4	21.3
	<b>3{25}</b>	CCR5	-6.8
		CXCR7	1.7
		CXCR4	23.8
	<b>3{24}</b>	CCR5	82.5
		CXCR7	-10.6
		CXCR4	-2.7

Com a compostos de referència s'utilitzen l'AMD3100 pel receptor CXCR4 (104.6% d'inhibició) i el Maraviroc pel receptor CCR5 (100% d'inhibició).

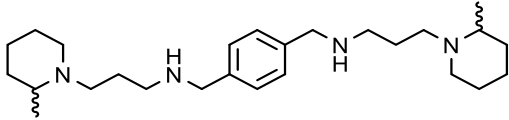
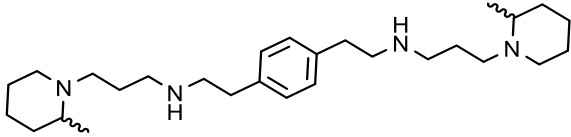
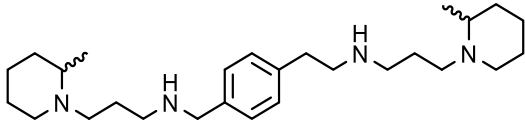
Pel que fa a les dades incloses en la taula cal fer un comentari tant sobre els valors d'inhibició negativa com els superiors al 100%. En els casos en els que es presenta un valor negatiu, es tracta de productes no actius o que produeixen inhibició nul·la enfront el receptor. Surten valors negatius i no zero perquè es troben dins el soroll del control negatiu.

En els casos d'inhibició superior al 100% , s'ha de tenir en compte que aquest 100% és equivalent a la inhibició d'EC<sub>80</sub> del control utilitzat respecte l'activitat basal del receptor. Això suggereix que un compost amb inhibició superior al 100% està actuant com un agonista invers, que pot modular (a la baixa) l'activitat constitutiva del receptor.

Observant els valors de la Taula 3.16 es treuen les següents conclusions:

En la Taula 3.17 es mostren els valors dels compostos **3{3}**, **14{3}** i **21{3,3}**, els tres compostos que contenen la pipercolina com a heterocicle lateral.

**Taula 3.17.** Activitat anti-VIH i % d'inhibició dels compostos 3{3}, 14{3} i 21{3,3} respecte els receptors CCR5, CXCR7 i CXCR4.

Molècula	Nom	Activitat anti-VIH (µM)	Receptor	% Inhibició
	3{3}	0.121	CCR5	-4.2
			CXCR7	-1.8
			CXCR4	78.0
	14{3}	0.072	CCR5	5.5
			CXCR7	-6.6
			CXCR4	101.1
	21{3,3}	0.114	CCR5	16.9
			CXCR7	-10.6
			CXCR4	117.4

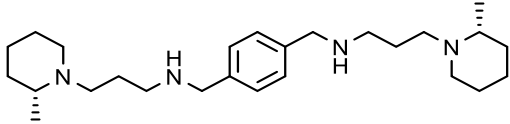
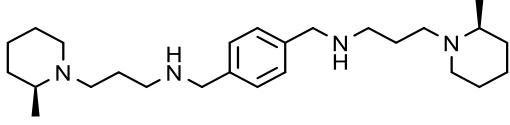
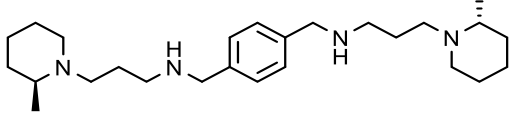
Comparant aquests resultats podem veure com l'activitat anti-VIH del compost 14{3} respecte els altres dos segueix la lògica esperada ja que el compost amb dues baules és més actiu que el d'una sola baula a banda i banda de l'anell, i el compost no simètric queda enmig dels dos valors. Però respecte el % d'inhibició de CXCR4, en agafar els valors dels compostos 3{3} i 21{3,3} esperaríem una activitat antiviral superior del compost no simètric 21{3,3} ja que conté un % d'inhibició major, la realitat no és així.

Tampoc pot ser influència de la inhibició de CCR5, receptor també utilitzat pel virus del VIH per entrar a la cèl·lula hoste, ja que també és superior en el cas de 21{3,3}.

Per tant, podem concloure que l'activitat anti-VIH d'un compost va estretament relacionada amb la capacitat d'inhibició dels coreceptors CCR5 i, sobretot, CXCR4, però que s'ha de veure influïda per altres factors que no han estat avaluats en aquest assaig.

Entre la selecció de molècules per testar anteriors del grup hi ha els diferents estereoisòmers de 3{3} (3{32}, 3{33} i 6{33,32}) que es van sintetitzar<sup>[9]</sup> per a poder estudiar-les per separat. Si es fixa l'atenció en elles (Taula 3.18) es pot veure com contenen un % d'inhibició de CXCR4 superior al 100%, fins i tot superior que el registrat pel compost de referència AMD3100.

**Taula 3.18.** Activitat anti-VIH i % d'inhibició dels compostos 3{32}, 3{33} i 6{33,32} respecte els receptors CCR5, CXCR7 i CXCR4.

Molècula	Nom	Activitat anti-VIH ( $\mu\text{M}$ )	Receptor	% Inhibició
	3{32}	0.186	CCR5	-9.8
			CXCR7	4.8
			CXCR4	150.7
	3{33}	0.169	CCR5	-12.9
			CXCR7	1.1
			CXCR4	158.1
	6{33,32}	0.188	CCR5	-14.2
			CXCR7	-0.2
			CXCR4	181.3

Aquest % d'inhibició superior al 100% sembla indicar que estan actuant com a agonistes inversos respecte al receptor CXCR4.

Un agonista invers s'uneix a un receptor de la mateixa manera que ho faria l'agonista endogen, però induint la resposta inversa d'aquest. Es caracteritza per disminuir el nivell d'activitat del receptor per sota del nivell basal, per aquest motiu en l'assaig realitzat la inhibició resulta superior al 100%.<sup>[55]</sup>

Si es comparen els seus resultats amb els obtinguts per el compost barreja dels tres estereoisòmers 3{3} present en la Taula 3.16, es pot comprovar com, tot i augmentar considerablement la capacitat d'inhibició del receptor CXCR4, l'activitat antiviral no augmenta en proporció. Aquest fet confirma l'esmentat anteriorment sobre el fet que l'activitat antiviral i la inhibició de CXCR4 estiguin estretament relacionats però no sigui l'únic factor a tenir en compte.

Tal com es preveu, en la Taula 3.16 es pot veure com la majoria dels compostos presenten una major inhibició de CXCR4 respecte CCR5 i CXCR7. Aquest fet és lògic tenint en compte que tots els productes han estat dissenyats amb aquest objectiu agafant com a punt de partida l'AMD3100.

Tot i això, és interessant veure els compostos que aconseguixen millor inhibició pels receptors CCR5 i CXCR7:

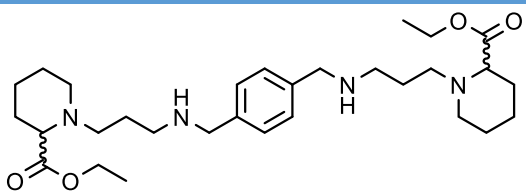
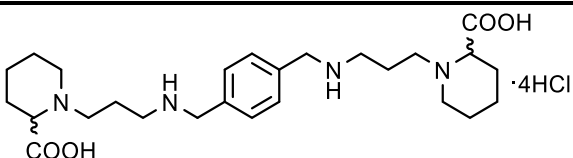
- El compost 3{24} és el que presenta una millor inhibició de CCR5 (82.5%). Curiosament presenta inhibició nul·la tant per CXCR7 com per CXCR4 (malgrat haver estat dissenyat per la

inhibició d'aquest receptor), aquest comportament podria ser degut al fet que posseeix una estructura força diferent de la resta, tenint dos anells aromàtics com a heterocicles laterals.

- Els compostos **106**, **8{3}** i **3{4}** són les que presenten millor inhibició de CXCR7 (10.4%, 10.6% i 12.0% respectivament). Es tracta de valors molt baixos, i la major part dels compostos avaluats presenten una inhibició nul·la respecte a aquest receptor. Això sorprèn, ja que s'esperaven uns valors semblants als de CXCR4 donat que el seu lligand natural, CXCL12, és compartit pels dos. Aquest fet ens podria estar indicant que el mode d'acció dels inhibidors sintetitzats és diferent que l'usat per CXCL12.

Finalment, centrant l'atenció en els dos nous compostos **106** i **3{21}** (Taula 3.19) sorprèn els baixos nivells d'inhibició que presenten per tots els receptors, però en especial per CXCR4, ja que el model de predicció realitzat els hi pronosticava força bons resultats i no concorda amb els resultats obtinguts en els assaigs contra càncer del compost **3{21}**.

**Taula 3.19.** Activitat anti-VIH i % d'inhibició dels compostos **3{21}** i **106** respecte els receptors CCR5, CXCR7 i CXCR4.

Molècula	Nom	Activitat anti-VIH (µM)	Receptor	% Inhibició
	<b>3{21}</b>	6.500	CCR5	18.6
			CXCR7	-16.6
			CXCR4	-24.6
	<b>106</b>	>40.290	CCR5	-22.1
			CXCR7	10.4
			CXCR4	-11.7

En ambdós casos la inhibició de CXCR4 és nul·la, i tan sols **3{21}** presenta una lleugera inhibició de CCR5 (el que podria justificar en part l'activitat anti-VIH, tot i ser baixa) i **106** és lleugerament inhibidor de CXCR7.

Segons aquest assaig, doncs, el nou compost **3{21}** no s'uniria a CXCR4. Aquesta observació porta a pensar que potser interacciona amb CXCR4 però no ho fa de la forma prevista en el lloc d'unió del lligand CXCL12 o almenys no impedeix que aquest s'uneixi. Si s'unís a CXCR4 però no impedís la unió de CXCL12 justificaria el resultat d'aquest assaig, ja que els valors donats es basen en aquesta unió.

Aquesta hipòtesi parteix del fet de que **3{21}**, com ja s'ha indicat, va ser dissenyat segons un model de predicció com a inhibidor específic d'aquest receptor i no és lògic que presenti un valor



d'inhibició igual a zero. És per això que es decideix realitzar un nou estudi computacional i noves proves que puguin proporcionar alguna llum de com està actuant i a on.

### 3.5.6- Predicció del mode d'acció del compost 3{21}

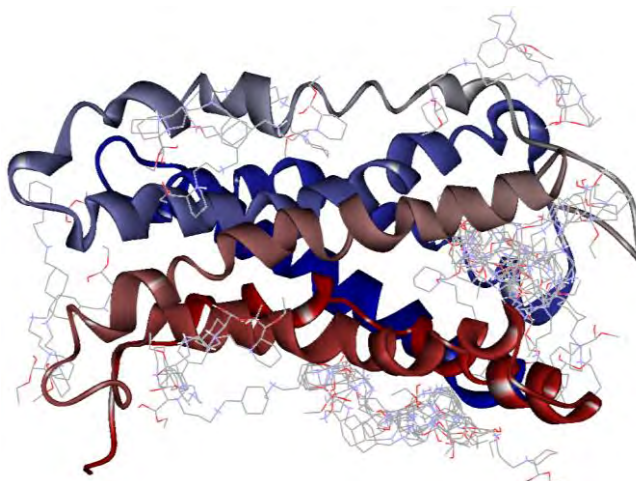
#### 3.5.6.1- Estudi computacional d'unió al receptor CXCR4

J. Planesas va estudiar abastament CXCR4 en la seva tesi doctoral i segueix col·laborant en el grup per analitzar qüestions estructurals. Recentment s'ha portat a terme un nou estudi computacional del compost 3{21} per veure si la tetraamina s'uneix al receptor CXCR4 i si aquesta unió és semblant a la de l'AMD3100 i la resta de compostos actius enfront a VIH.

Amb LigPrep de Schrödinger<sup>[56]</sup> (al qual es té accés gràcies a formar part del Servei de Disseny de Fàrmacs (SDF) del CSUC) es generen tots els possibles isòmers, tautòmers i protòmers de 3{21}. Com a resultat s'obtenen 32 estructures.

S'obté l'estructura de CXCR4 del *Protein Data Base* (PDB)<sup>[57]</sup>, PDBID: 3OE6, i utilitzant el programari AutoDock Tools<sup>[58]</sup> es genera un *grid* de màximes dimensions que englobi tota la proteïna per fer el *docking* cec (per comprovar tant el lloc d'unió definit de CXCL12 com la resta de punts del receptor). Amb l'ajuda del programari MOE<sup>[10]</sup> es genera una base de dades amb les 32 estructures i es realitza el *docking* manual de cada una d'elles.

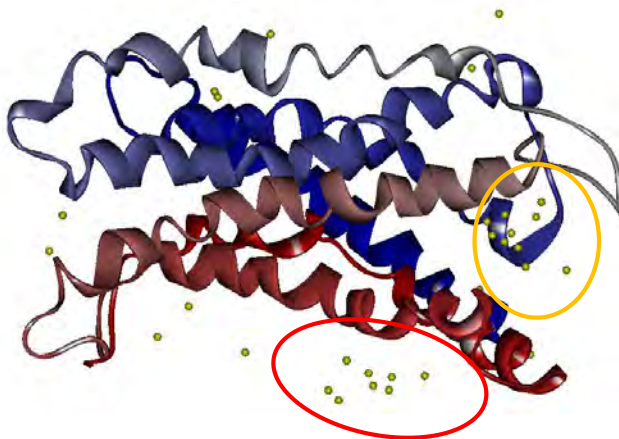
Un cop realitzat, es sobreposen les diferents estructures en l'estructura del receptor i s'obté la representació mostrada en la Figura 3.90.



**Figura 3.90.** Distribució de les 32 estructures envers el receptor CXCR4 després de realitzar el *docking*.

Per visualitzar millor aquesta distribució es substitueixen les diferents estructures per punts, i es poden distingir clarament dues zones d'interacció predominant (Figura 3.91). D'aquestes dues

zones es decideix seguir treballant amb la zona groga, on s'acumulen 12 de les 32 estructures. Es decideix descartar la zona vermella ja que dins la cèl·lula quedaria en mig de la membrana cel·lular.

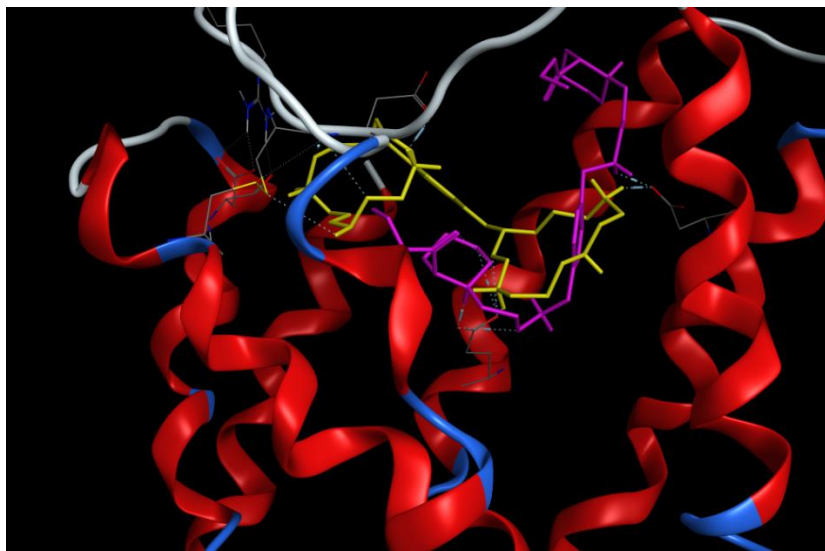


**Figura 3.91.** Distribució de les estructures envers CXCR4 en forma de punts amb les dues zones predominants marcades.

La zona groga es correspon amb el lloc d'unió del receptor amb el seu lligand natural CXCL12. Tenint en compte que aquest és també el lloc d'unió dels inhibidors anteriorment sintetitzats al grup i de l'AMD3100 i tenint en ment els resultats donats pels assaigs anti-VIH i d'inhibició de CXCR4, es pensa en la hipòtesi que el nou compost 3{21} no s'uneixi en el mateix lloc i que presenti interaccions diferents que AMD3100 o els altres compostos tetraamínics que sí que presenten, amb major o menor mesura, inhibició del receptor.

Per aquest motiu, i ja en el present treball, es realitza un estudi de *docking* preliminar usant AutoDock<sup>[58]</sup> per comprovar si el compost 3{21} i l'AMD3100 tenen preferència per unir-se al receptor CXCR4 en el mateix punt o si, per el contrari, tendeixen a unir-se en zones diferents dins del lloc d'unió principal del receptor.

Es limita el *grid* al lloc d'unió principal de CXCR4 i es calcula la posició en ell de les estructures de menor energia tant del compost 3{21} com de l'AMD3100 (Figura 3.92).



**Figura 3.92.** Estructures de menor energia del compost 3{21} (fúcsia) i d'AMD3100 (groc) en el receptor CXCR4 fruit del *docking* realitzat en el present treball.

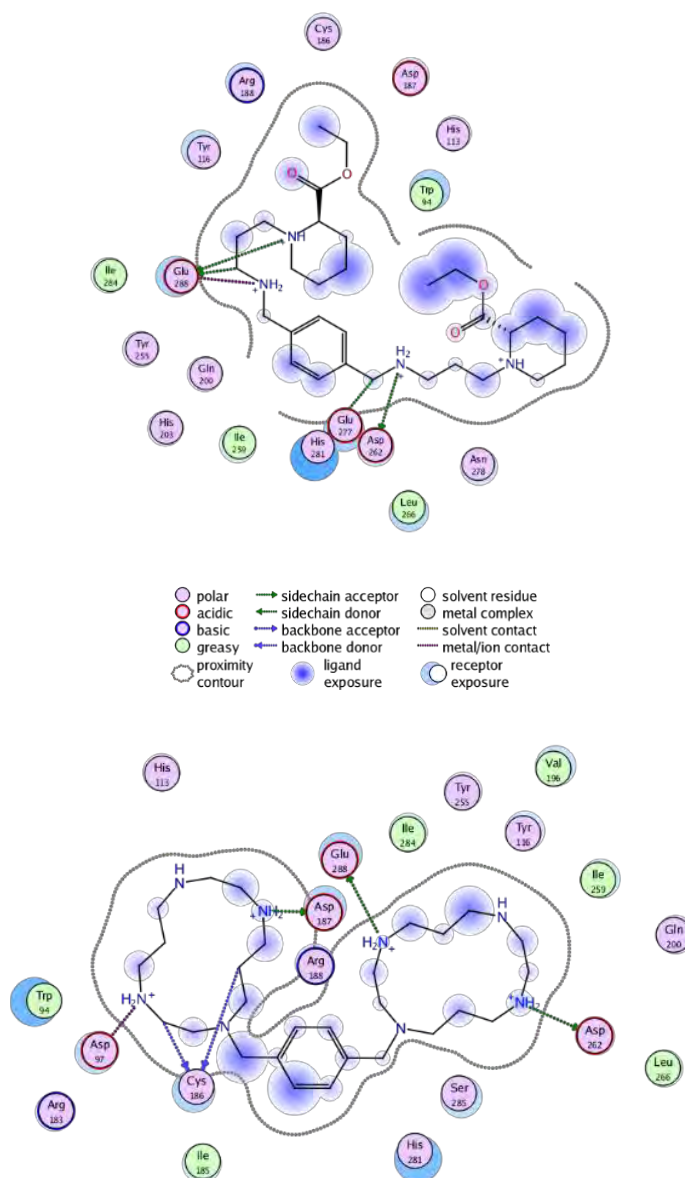
Com es pot veure en la Figura 3.92, les dues estructures no presenten diferències significatives en el lloc d'unió que puguin justificar la diferència de comportaments.

Fixant l'atenció en els mapes d'interacció proteïna-ligand de CXCR4 amb ambdós compostos comprovem que efectivament no hi ha diferències significatives en les principals interaccions (Taula 3.20 i més extensament en la Figura 3.93).

**Taula 3.20.** Principals interaccions (de càrrega i  $\pi$ ) del compost 3{21} i de l'AMD3100 amb el receptor CXCR4 segons el *docking* realitzat en el present treball.

	AMD3100	3{21}
<b>Asp 97</b>		
<b>Cys 186</b>		
<b>Asp 187</b>		
<b>His 281</b>		
<b>Asp 262</b>		
<b>Glu 288</b>		

Certament si es para atenció a les interaccions de càrrega principals es poden percebre diferències entre els dos, però en veure el mapa complet d'interaccions proteïna-ligand de la Figura 3.93 es veu com les interaccions de càrrega no detectades per 3{21} sí que es troben presents en forma d'interacció polar.



**Figura 3.93.** Mapa d'interaccions proteïna-ligand del receptor CXCR4 amb el compost 3{21} (a dalt) i amb l'AMD3100 (a baix).

També cal destacar d'aquest estudi que l'AMD3100 sembla interaccionar més fortament que el compost 3{21} amb CXCR4 en el lloc d'unió principal.

Aquest estudi computacional preliminar sembla indicar que si 3{21} s'uneix a CXCR4 en el lloc principal d'unió ho faria de la mateixa forma que AMD3100. La diferència a l'hora d'actuar de les dues no sembla deguda al mode d'unió amb el receptor CXCR4.

Aquesta resultat, però, no permet explicar les importants diferències d'activitat observades entre l'AMD3100 i 3{21} en el test anti-VIH ni en l'estudi de DiscoverX, per aquest motiu es decideix seguir estudiant la possible acció de la tetraamina 3{21} sobre CXCR4.

### 3.5.6.2- Estudi dels processos de senyalització derivats de CXCR4

Es realitza un assaig per Western Blot (WB) en el laboratori del Dr. Roué<sup>[47]</sup> per veure si el nou compost 3{21} aconseguix frenar les cascades de transducció de senyals dependents del receptor CXCR4. Això demostraria que la tetraamina sí que actua enfront a CXCR4.

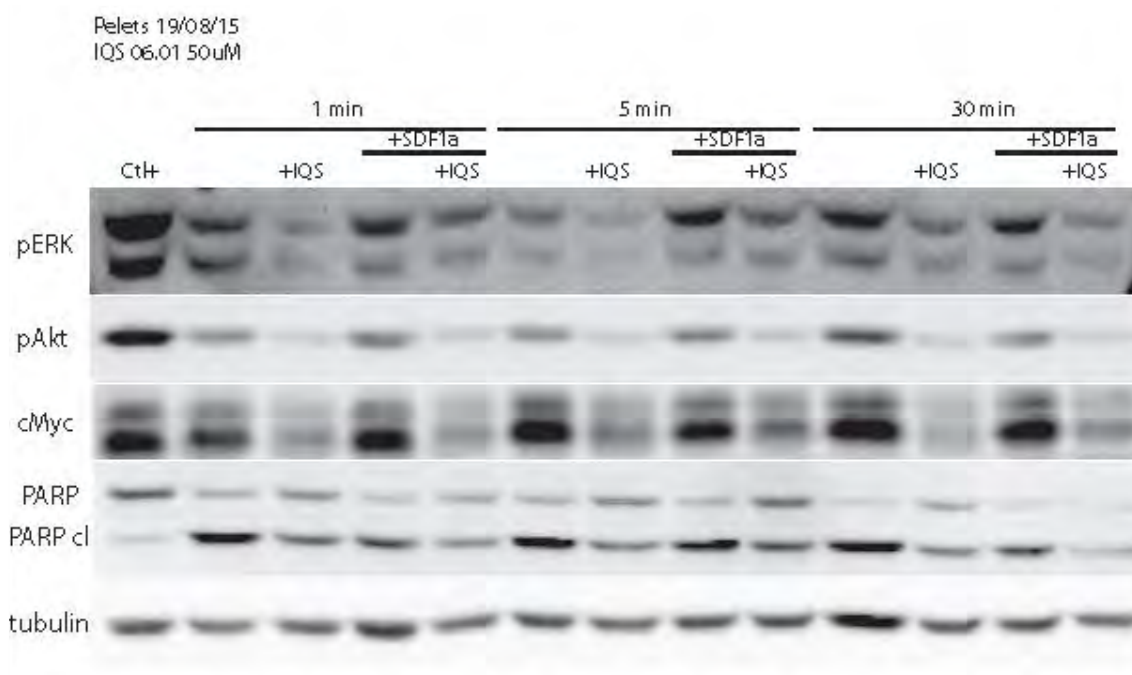
Les cèl·lules de la línia SUDHL6 s'incuben durant 2 hores en absència de FBS i seguidament una hora amb el compost 3{21} en el cas de les mostres que ho necessitin. Després de rentar les cèl·lules amb PBS (solució salina utilitzada per rentar les línies cel·lulars i eliminar cèl·lules mortes, factors apòptics...) s'incuben durant el temps indicat en un medi de cultiu complet, en presència o absència de la proteïna SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 recombinant.

Es recullen les cèl·lules i es fan extractes de proteïna total amb un tampó de lisi amb 1% Triton X-100 amb inhibidors de proteases i fosfatases. Amb els lisats cel·lulars es realitza la SDS-PAGE estàndard (electroforesi en gel de poliacrilamida de dodecil fosfat de sodi estàndard), es fa la transferència de proteïnes a membranes de PVDF (difluorur de polivinildè), que es bloqueja i incuba durant tota una nit amb els anticossos contra phospho(p)-Erk1/2 (Cell Signalling, dilució 1/1000), p-Akt (Cell Signalling, dilució 1/1000), c-Myc (Cell Signalling, dilució 1/1000), PARP (Roche, dilució 1/1000) i  $\alpha$ -tubulina (Sigma, dilució 1/5000).

Seguidament, aquestes proteïnes es marquen amb els anticossos secundaris en funció de l'espècie de procedència de l'anticòs primari. Es revelen les membranes utilitzant un reactiu potenciador de la quimioluminescència i el senyal és recollit per l'equip LAS4000 que utilitza el *software* d'Image Gauge (Fujifilm) per tractar les imatges obtingudes.

Es mira l'estat de fosforilació de dues quinases (Erk1/2 i Akt) l'activació de les quals depèn de la senyalització de CXCR4, l'oncogen c-Myc l'estabilitat del qual està regulada per la fosfo-Erk1/2. S'observa també l'expressió de PARP, un substrat de les caspases (la família de proteases executores de l'apoptosi), ja que l'aparició d'una banda a 85kDa, corresponent a la forma degradada de les caspases, es pot utilitzar com una marca del procés d'apoptosi confirmant l'assaig que s'ha mostrat anteriorment.

En la Figura 3.94 es mostra el resultat del Western Blot realitzat.



**Figura 3.94.** Western Blot del compost 3{21} enfront a CXCR4. Les mostres que contenen la tetraamina 3{21} en el medi apareixen com a +IQS.

En analitzar els resultats obtinguts es pot comprovar com efectivament el compost 3{21} atura els processos de senyalització *downstream* derivats del receptor CXCR4 ja que els senyals de pERK, pAkt i cMyc desapareixen en les mostres en les que s'ha afegit la tetraamina 3{21} en el medi. A més, es corrobora el fet que 3{21} provoca l'apoptosi de les cèl·lules, ja que en el cas de les mostres a les que ha estat afegit apareix ressaltat el senyal de PARP.

Aquest assaig, doncs, sembla confirmar que el compost 3{21} s'uneix a CXCR4 d'alguna forma i en suprimeix la funcionalitat, a més, confirma que provoca l'apoptosi de les cèl·lules afectades. No s'explica, però, com és que, tot i aquests resultats, els tests de DiscoverX (Apartat 3.5.5) i Irsicaixa (Apartat 3.5.1) donen negatius quan aquests es basen en la inhibició d'aquest receptor.

### 3.5.6.3- Estudi del lloc d'unió del compost 3{21} amb CXCR4

L'assaig es realitza novament en el laboratori del Dr. Roué. [47] Es pre-incuba amb el compost d'interès 3{21} una línia cel·lular que expressa CXCR4 en superfície (en aquest cas s'utilitza la línia SUDHL6). El control no es pre-incuba.

Es preparen 5 mostres:

- Control negatiu (no es preincuba)
- preincubació amb IQS 06.01 10µM
- preincubació amb IQS 06.01 50µM
- preincubació amb Ab bloquejant anti CXCR4 (Control positiu)

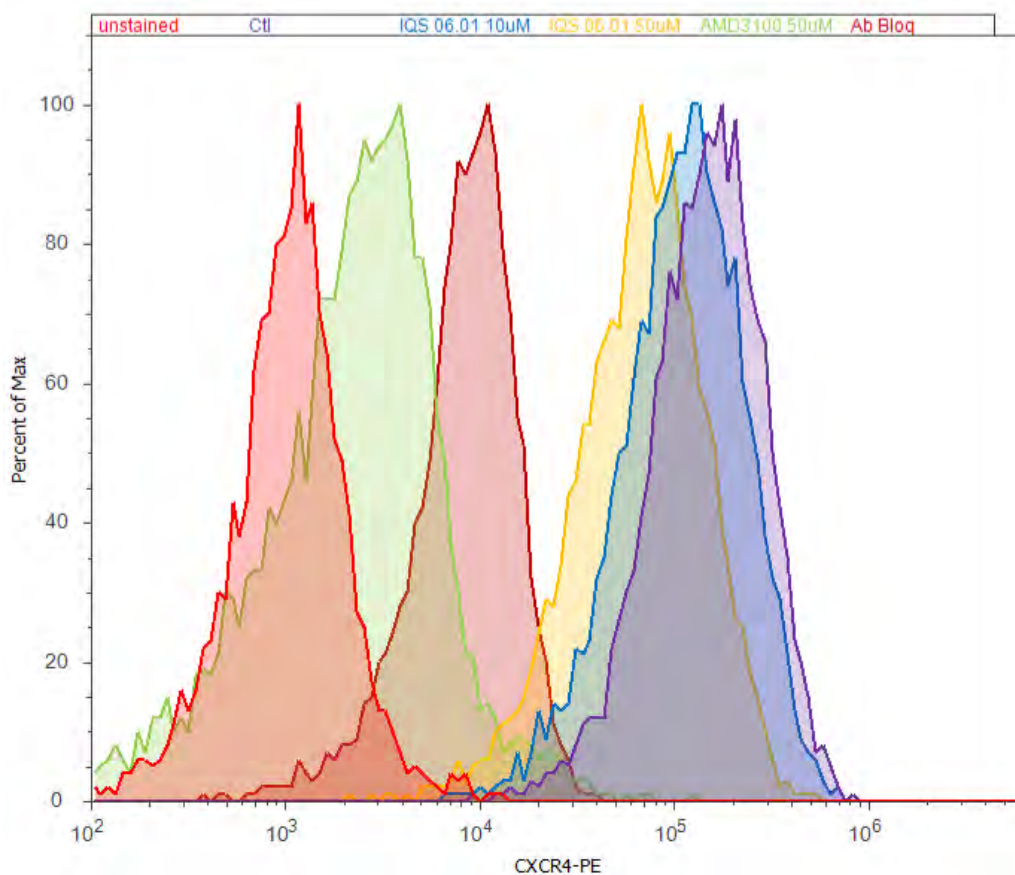
-preincubació amb AMD3100 50µM

Cal recordar que IQS 06.01 es correspon amb el compost 3{21}.

Posteriorment s'afegeix en cada cas un anticòs anti-CXCR4 marcat amb el fluorocrom ficoeritrina (PE), excepte en una mostra que servirà de referència de fluorescència 0. Com que les cèl·lules SUDHL6 expressen CXCR4, en analitzar la fluorescència en el cas del control negatiu, es veurà una alta expressió de CXCR4.

Si el fàrmac s'uneix a CXCR4 bloquejant la unió de l'anti-CXCR4-PE, impedirà el marcatge de les cèl·lules i no es veurà fluorescència. Per tant, segons el grau o tipus d'unió del fàrmac al receptor, l'anticòs s'unirà amb major o menor afinitat i emetrà menor o igual fluorescència respecte el control negatiu.

En la Figura 3.95 es poden veure els resultats, on la gràfica lila correspon al control negatiu, la granat al control positiu, i la vermella al control sense tinció.



**Figura 3.95.** Resultat de l'assaig d'ocupació de CXCR4 del compost 3{21}.

Aquest últim assaig indica que el compost 3{21} no s'uneix a CXCR4, almenys no ho fa en el mateix lloc d'unió de l'AMD3100 o de l'anticòs anti-CXCR4, ja que surt totalment desplaçat amb el senyal del control negatiu.



Però, com s'ha demostrat en el Western Blot realitzat en l'apartat anterior, el compost atura les cascades de transducció de senyals derivades de CXCR4, per tant es pensa en un tipus d'unió en un *site* diferent o una unió al·lostèrica al receptor.

Mirant amb perspectiva els assaigs fets fins al moment, tot apunta a que el compost 3{21} altera el funcionament de CXCR4, frenant així els processos de transducció de senyal derivats d'ell, però que no s'uneix en el mateix lloc que AMD3100 o el lligand natural CXCL12.

#### **3.5.6.4- Al·losterisme de 3{21} respecte a CXCR4**

L'existència de lligands al·lostèrics pels receptors de quimiocina està actualment ben documentat<sup>[59]</sup>, havent-n'hi més de 100 documentats tot i que la major part dels fàrmacs segueixen perseguint actuar com a lligands ortoestèrics ja que els llocs d'unió al·lostèric es troben estructuralment i evolutivament menys conservats que els ortoestèrics.<sup>[60]</sup>

Es descriu l'al·losterisme com la regulació de les funcions, l'estructura o la flexibilitat d'una proteïna induït per la unió d'un lligand anomenat modulador al·lostèric. Aquest modulador al·lostèric s'uneix en un punt de l'estructura (lloc al·lostèric) localitzat en una regió diferent que el lloc d'unió ortoestèric, però que pot modificar-ne l'activitat.<sup>[61]</sup>

Es realitza un nou test de proliferació cel·lular per tal de tractar de validar el caràcter al·lostèric de 3{21}, o almenys que aquest no s'uneix a CXCR4 en el mateix lloc que l'AMD3100. Aquest test consisteix en un assaig MTT tal com es detalla en l'apartat 3.5.2.1 amb les línies cel·lulars SUDHL6 i NUDHL1 en el laboratori del Dr. G. Roué.<sup>[47]</sup> En aquest cas es realitza un nou assaig incloent el compost AMD3100 en el medi amb una concentració de 50 µM juntament amb la tetraamina 3{21} (IQS-06.01) a diverses concentracions. Això permetrà veure si l'AMD3100 i el compost 3{21} competeixen pel mateix lloc d'unió amb el receptor CXCR4.

Els resultats obtinguts per les dues línies cel·lulars es mostren en la Figura 3.96.



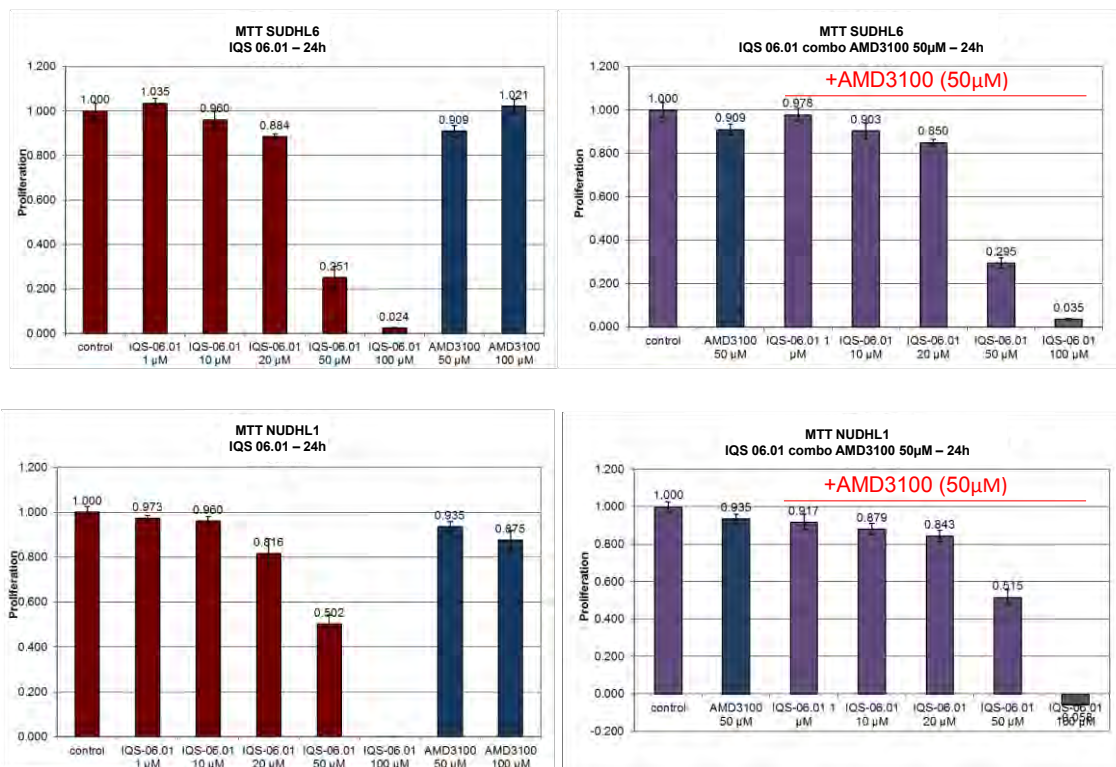


Figura 3.96. Assaig de la capacitat d'activitat del compost 3{21} en presència d'AMD3100 en el medi.

En els gràfics mostrats es demostra que la presència i unió de l'AMD3100 amb el receptor CXCR4 no impedeix la unió amb el compost 3{21} i la conseqüent apoptosi provocada per aquest. Els perfils de proliferació cel·lular d'ambdós assaigs, amb i sense AMD3100, mostren un perfil idèntic, així que la seva presència no afecta ni positiva ni negativament a l'acció de la tetraamina 3{21}, per tant no són competitiu entre ells pel mateix lloc d'unió.

Encara que els estudis computacionals preliminars realitzats semblen indicar que 3{21} podria unir-se al lloc d'unió principal, aquest últim assaig sembla ser un indicatiu més de que la tetraamina 3{21}, si s'uneix al receptor CXCR4, ho fa en un lloc completament diferent que l'AMD3100. Estaríem davant, doncs, d'una possible unió a CXCR4 en una posició al·lostèrica o un lloc d'unió a la cèl·lula diferent a CXCR4 però que influís directament en aquest receptor aturant les diferents cascades de transducció de senyal que se'n deriven, així com la mobilitat cel·lular i provocant l'apoptosi cel·lular.

La unió en un lloc al·lostèric diferent al lloc d'unió principal entraria en concordança amb els resultats obtinguts tant de l'assaig anti-VIH com de DiscoverX, ja que en cap cas impediria la unió del lligand natural CXCL12 o del virus del VIH mitjançant la proteïna gp120.

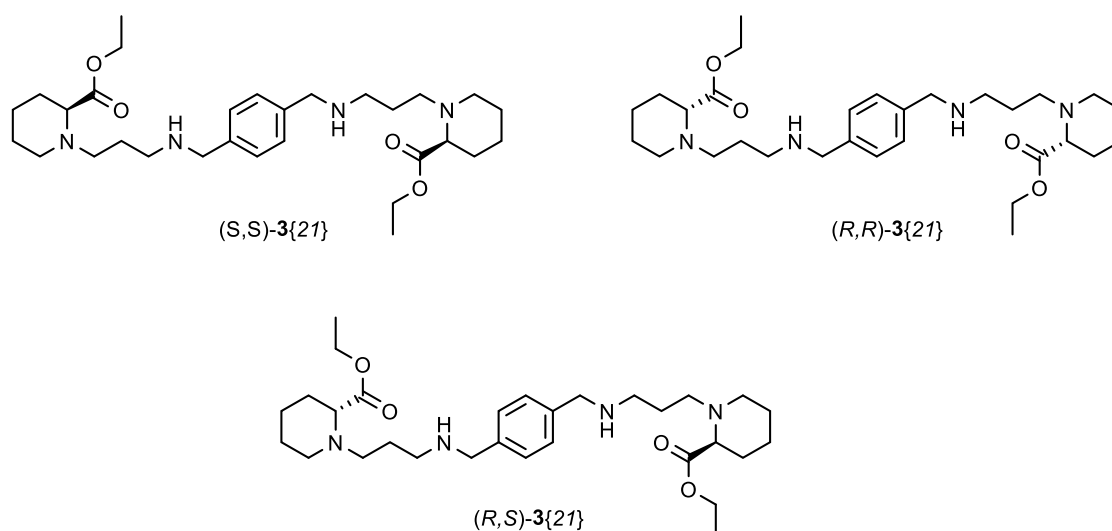
El compost 3{21} a concentracions majors de 10 μM provoca l'apoptosi de les cèl·lules afectades, conferint-li una activitat antitumoral destacable. Tot i això, per a poder considerar-lo un candidat a fàrmac caldria disminuir aquesta concentració a la que presenta activitat, ja que s'apropa a la concentració a la que comença a presentar toxicitat per les cèl·lules sanes. Per això es pensa en

Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}

aquest producte com un possible futur cap de sèrie amb el qual continuar treballant per augmentar aquesta activitat.

### 3.6- Síntesi dels estereoisòmers de 3{21}

Finalment es decideix sintetitzar els diferents estereoisòmers del compost 3{21} tal com ja s'havia fet anteriorment al grup en el cas de la molècula 3{3}, ja que són imprescindibles en la síntesi i avaluació de qualsevol fàrmac. El producte 3{21} presenta dos centres quirals que generen tres estereoisòmers: (*S,S*)-3{21}, la seva imatge especular (*R,R*)-3{21} i la forma meso, que conté un dels centres quirals *S* i l'altre *R*, (*R,S*)-3{21} (Figura 3.97).



**Figura 3.97.** Estructures dels estereoisòmers (*S,S*)-3{21}, (*R,R*)-3{21} i la forma meso (*R,S*)-3{21} del compost 3{21}.

E.J. Ariens va argumentar, l'any 1984, que l'estereoselectivitat implica que tan sols un dels compostos que componen una mescla racèmica seria actiu enfront a una determinada diana. En conseqüència, un 50% de la mescla es tractaria a la pràctica d'impureses, ja que un dels dos isòmers no seria actiu, i en el pitjor dels casos podria tenir activitat biològica oposada a la del seu enantiòmer.<sup>[62]</sup>

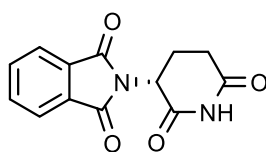
La relació eudísmica; la relació entre l'EC<sub>50</sub> de l'enantiòmer més actiu (eutòmer) respecte la del menys actiu (distòmer) indica l'estereoselectivitat d'un fàrmac respecte a un receptor específic.<sup>[63]</sup>

Si aquesta relació és igual a 1 ens indica que els dos enantiòmers tenen igual activitat, tot i que és difícil de presentar aquesta relació eudísmica i normalment es troba la presència d'un distòmer. Hi ha casos peculiars com el de l'ibuprofè en el que en l'organisme el distòmer automàticament es transforma en l'eutòmer. En aquest cas no cal resoldre la molècula.

Aquest fet va propiciar que les empreses farmacèutiques, seguint la directiva europea 75/318/EEC de l'Agència de Fàrmacs Europea i les següents revisions en les que insten a

justificar l'elecció d'un racemat enlloc d'un dels estereoisòmers en concret a l'hora d'aprovar un nou fàrmac<sup>[64]</sup> cada cop es centressin en la síntesi i patent d'estereoisòmers concrets en detriment de les mesclures estereoisomèriques des de finals del segle XX.

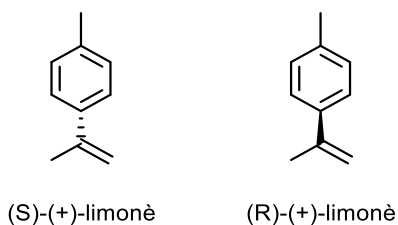
El cas concret de la talidomida és, malauradament, el més conegut. La talidomida, que conté un centre quiral (Figura 3.98), era utilitzada als anys 50 com a sedant. L'any 1961 va ser retirada del mercat en considerar-se la causant de milers de malformacions en l'etapa de gestació de les dones que l'havien consumit durant l'embaràs.<sup>[65]</sup>



107

Figura 3.98. Estructura de l'isòmer S de la talidomida (107).

Altres casos més inofensius com el del limonè, que els seus estereoisòmers tenen olors totalment diferents; mentre que l'enantiòmer S confereix la característica olor de llimona, l'enantiòmer R ho fa en el cas de la taronja (Figura 3.99).<sup>[63]</sup>



(S)-(+)-limonè

(R)-(+)-limonè

Figura 3.99. Estructura dels estereoisòmers del limonè.

Vista la importància de la diferenciació estereoisomèrica, es veu justificada la síntesi dels tres compostos per separat per comprovar si presenten activitats o propietats diferenciades.

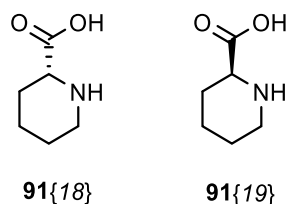
### 3.6.1- Síntesi dels estereoisòmers (R,R) i (S,S) de la tetraamina 3{21}

Es realitza la síntesi dels estereoisòmers (R,R)-3{21} i (S,S)-3{21} a partir dels seus precursors homoquirals per intentar aconseguir el màxim de puresa i, de la mateixa manera que en el cas del compost 3{21}, evitar la separació per columna cromatogràfica.

Com que es troben comercialment accessibles els heterocicles homoquirals 91{18} i 91{19} (Figura 3.100), es decideix utilitzar la mateixa ruta sintètica optimitzada pel cas de la tetraamina

Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}

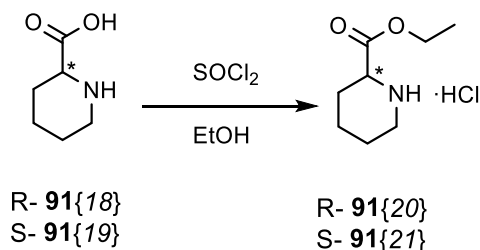
3{21} substituint l'èster pipecolínic 91{7} pels èsters derivats dels nous heterocicles 91{18} i 91{19}.



**Figura 3.100.** Estructura dels precursors homòquerals R-(+)-àcid pipecolínic (91{18}) i S-(-)-àcid pipecolínic (91{19}).

La rotació específica ( $[\alpha]_D$ ) del R-(+)-àcid pipecolínic (91{18}) resulta ser  $+27.9^\circ$  mentre que pel S-(-)-àcid pipecolínic (91{19}) dóna un valor de  $-27.1^\circ$  a una concentració de 10.23 mg/ml i 10.02 mg/mL en D<sub>2</sub>O.

S'obtenen els èsters etílics corresponents R i S de la mateixa forma que s'han obtingut els èsters en els casos anteriors, usant la metodologia de Lamb i col·laboradors<sup>[21]</sup> (Figura 3.101) en presència de clorur de tionil i etanol. Després de 2 hores a temperatura de reflux i eliminar el dissolvent a pressió reduïda, el sòlid obtingut es filtra i es renta amb diclorometà i acetona. Igual que en els casos anteriors en els que s'han sintetitzat èsters amb la mateixa metodologia, el rendiment és quantitatiu.



**Figura 3.101.** Reacció de formació dels èsters homòquerals 91{20} i 91{21}.

Un cop obtinguts els èsters 91{20} i 91{21}, la rotació específica dels quals resulta  $[\alpha]_D = +11.2^\circ$  i  $[\alpha]_D = -12.1^\circ$  respectivament a una concentració de 9.98 mg/ml i 10.78 mg/ml en D<sub>2</sub>O, s'uneixen dos equivalents a l'espaiador 103 segons la ruta sintètica posada a punt en aquest treball anteriorment fruit de l'adaptació de diverses metodologies trobades a la bibliografia<sup>[35-37]</sup> (Figura 3.102).

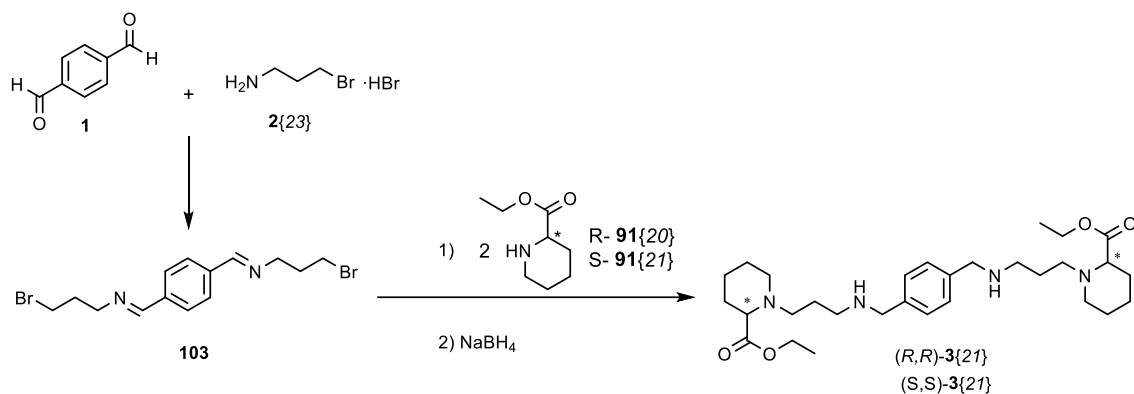


Figura 3.102. Ruta sintètica per l'obtenció dels estereoisòmers  $(R,R)$ -3{21} i  $(S,S)$ -3{21}.

S'obtenen els dos estereoisòmers  $(R,R)$ -3{21} i  $(S,S)$ -3{21} amb uns rendiments globals de 36% i 50% respectivament. En mesurar la seva rotació específica es troba que l'estereoisòmer  $(R,R)$ -3{21} resulta ser dextrogir amb  $[\alpha]_D = +36.8^\circ$  a una concentració de 9.96 mg/ml en  $\text{CDCl}_3$ , mentre que l'estereoisòmer  $(S,S)$ -3{21} és levogir amb  $[\alpha]_D = -31.7^\circ$  a una concentració de 10.00 mg/ml en  $\text{CDCl}_3$ . Els dos compostos segueixen la tendència dels seus precursors i a més presenten rotacions específiques pràcticament d'igual valor però de signe contrari, tal com s'esperava obtenir.

### 3.6.2- Síntesi de la forma *meso* $(R,S)$ -3{21}

La ruta sintètica presentada en la Figura 3.102 i amb la qual s'han obtingut els estereoisòmers  $(R,R)$ -3{21} i  $(S,S)$ -3{21} no permet una substitució no simètrica, per tant, es decideix adaptar-la afegint un sol substituent (**91{20}** o **91{21}**) a l'espaiador **103** en alta dilució i a baixa temperatura per intentar obtenir l'intermedi **108** monosubstituint que, sense passar per cap procés de purificació, es farà reaccionar amb un segon equivalent de l'altre heterocicle a substituir (Figura 3.103). En reduir el cru resultant s'espera obtenir el producte  $(R,S)$ -3{21} desitjat.

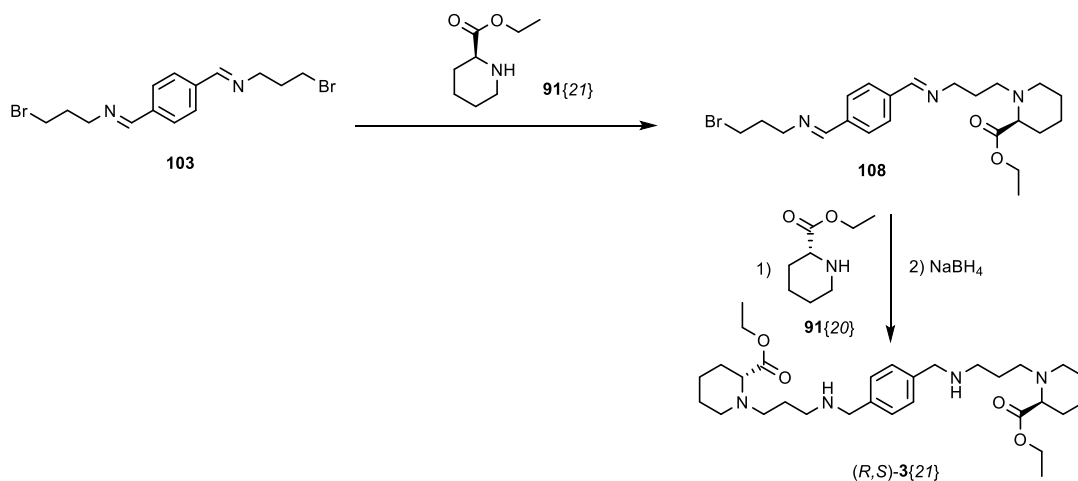


Figura 3.103. Ruta sintètica proposada per l'obtenció de la forma *meso* del compost  $(R,S)$ -3{21}.

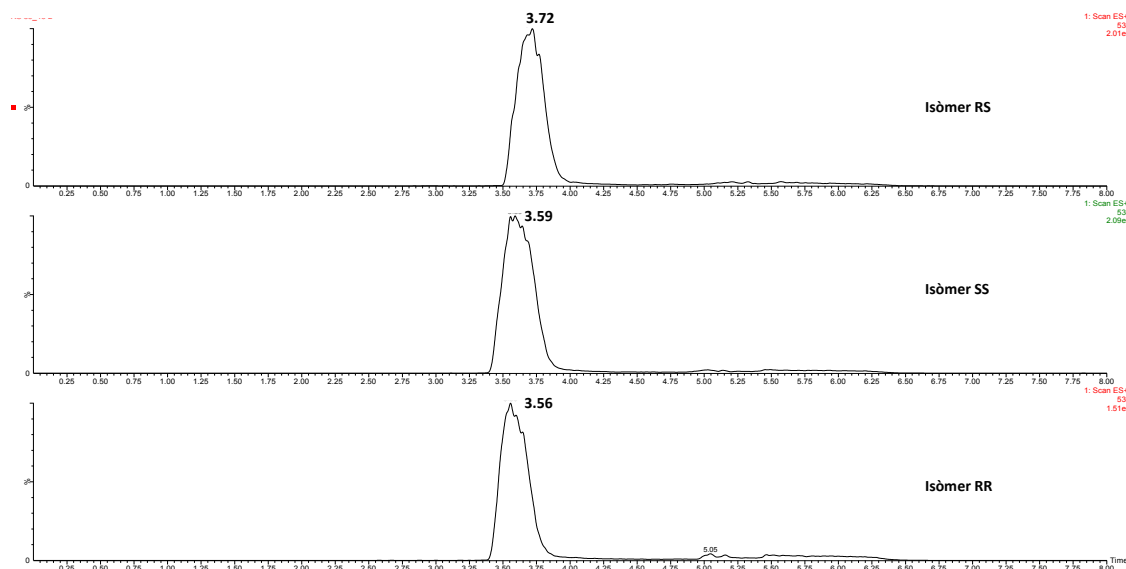
S'obté el producte desitjat (*R,S*)-**3**{21} amb un rendiment global del 54%. La rotació específica en aquest cas té un valor de  $[\alpha]_D = 0.6^\circ$ , per tant, aquesta dada seria pràcticament igual a zero, l'esperada en el cas de la forma *meso*. El problema és que si la formació de l'intermedi **108** no ha sigut completa o hi ha hagut doble substitució en alguns casos, l'efecte en la rotació específica quedaria amagada un cop s'afegeix l'equivalent de l'enantiòmer *S*, ja que el cru de reacció podria estar format per la forma *meso* (*R,S*)-**3**{21} i una barreja 50:50 dels dos enantiòmers (*R,R*)-**3**{21} i (*S,S*)-**3**{21}, amb la qual cosa la rotació global també seria nul·la.

Per comprovar si s'ha format el compost *meso* (*R,S*)-**3**{21} en la seva totalitat o almenys de forma majoritària es realitza una cromatografia líquida UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) acoblat amb espectròmetre de masses amb un aparell Acquity Waters H-Class usant una columna Acquity BEH Shield C18 2.1x100mm, 1.7  $\mu$ m a 45°C amb un gradient de solvents H<sub>2</sub>O:MeOH durant 8 min tal com es mostra en la Taula 3.21.

Taula 3.21. Gradient de solvents utilitzat per l'UPLC.

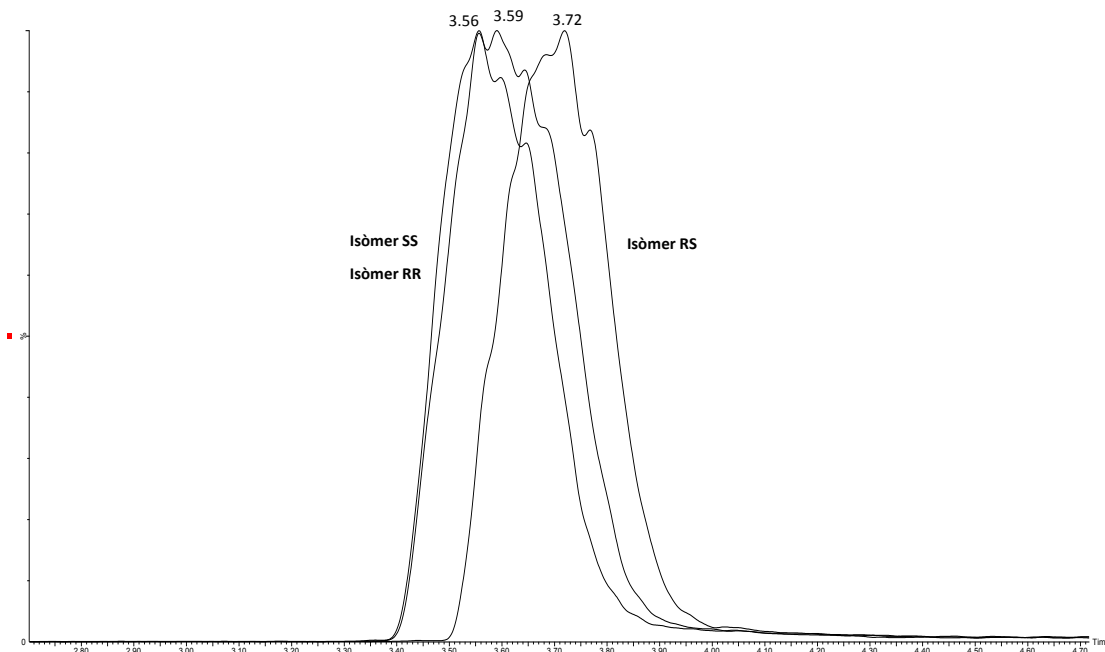
Temps (min)	Cabal (mL/min)	%H <sub>2</sub> O	%MeOH
Inicial	0.400	95	5
4.00	0.400	50	50
5.00	0.400	50	50
5.10	0.400	95	5
8.00	0.400	95	5

En centrar l'atenció en els pics cromatogràfics corresponents a una massa de 531 umas es comprova, tal com es veu en la Figura 3.104, com els estereoisòmers (*R,R*)-**3**{21} i (*S,S*)-**3**{21} tenen un temps de retenció igual mentre que la forma *meso* (*R,S*)-**3**{21} surt a un temps diferent.



**Figura 3.104.** Cromatogrames dels diferents estereoisòmers (*R,R*)-3{21} (inferior), (*S,S*)-3{21} (entremig) i (*R,S*)-3{21} superior) en les condicions d'elució indicades.

En el cromatograma de la Figura 3.105 es pot comprovar com solapant els tres cromatogrames es percep aquest temps de retenció diferent.



**Figura 3.105.** Cromatogrames dels tres estereoisòmers (*R,R*)-3{21}, (*S,S*)-3{21} i (*R,S*)-3{21} sobreposats.

Tot i que no es pot assegurar al 100% l'obtenció del producte *meso* (*R,S*)-3{21} amb aquesta prova, sí que és un indicatiu més de que ha estat així i que no es tracta d'una mescla dels diversos estereoisòmers. En sortir amb tant poca diferència de temps de retenció no és possible calcular quin percentatge aproximat de possibles impureses (*R,R*)-3{21} i (*S,S*)-3{21} fruit de la doble

Síntesi de nous compostos a partir del cap de sèrie 3{3}

substitució podríem tenir, però en tot cas sembla ser que si hi són presents ho fan de forma minoritària.

En confirmar la correcta obtenció del compost (*R,S*)-**3**{21} es conclou l'obtenció dels tres estereoisòmers de la tetraamina **3**{21} que serviran per a futurs estudis d'activitat o de caps de sèrie per a futures possibles quimioteques que prossegueixin la cerca d'inhibidors pel receptor CXCR4.



## Bibliografia

- [1] R. Puig de la Bellacasa; Disseny, síntesi i avaluació biològica d'inhibidors potencials de les etapes inicials del cicle de replicació de VIH. Tesi Doctoral, Escola Tècnica Superior IQS, Universitat Ramon Llull, Barcelona, 2010.
- [2] S. Pettersson; Diseño, selección y síntesis de nuevos inhibidores de entrada del VIH. Tesi doctoral. Escola Tècnica Superior IQS, Universitat Ramon Llull, Barcelona, 2009.
- [3] H.Shim, D.C. Liotta, J.P. Snyder, W. Zhan, Z. Liang; Cxcr4 antagonists for the treatment of hiv infection. World Patent WO 2006/074426-A2 (filling date 09-01-2006).
- [4] W.D. Thomas, M.R. Leleti, A.M.K. Pennell; Cxcr4 modulators. World Patent WO 2007/115231-A2 (filling date 30-03-2007).
- [5] A. Barge, L. Tei, D. Upadhyaya, F. Fedeli, L. Beltrami, R. Stefania, S. Aime, G. Cravotto; Bifunctional ligands based on the DOTA-monoamide cage. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 1176-1184.
- [6] T. Masuko, T. Kusama, H. Nagaoka, K. Metori, Y. Kizawa, M. Miyake; Synthesis of a novel water-soluble NMDA receptor agonist. *J. Heterocycl. Chem.* **2008**, 45 (2), 383-387.
- [7] L. Routaboul, N. Vanthuynne, S. Gastaldi, G. Gil, M. Bertrand; Highly efficient photochemically induced thiyl radical-mediated racemization of aliphatic amines at 30°C. *J. Org. Chem.* **2008**, 73 (2), 364-368.
- [8] F. Denizot, R. Lang; Rapid colorimètric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* **1986**, 89 (2), 271-277.
- [9] L. Ros; Disseny i síntesi de noves quimioteques de potencials inhibidors d'entrada del VIH. Tesi Doctoral, Escola Tècnica Superior IQS, Universitat Ramon Llull, Barcelona, 2011.
- [10] *Molecular Operating Environment (MOE)*, 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2016**.

- [11] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney; Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, 23 (1-3), 3-25.
- [12] J.M. Planesas, V.I. Pérez-Nueno, J.I. Borrell, J. Teixidó; Impact of the CXCR4 structure on docking-based virtual screening of HIV entry inhibitors. *J. Mol. Graph. Model.* **2012**, 38, 123–136.
- [13] M.S. Gibson, R.W. Bradshaw; The Gabriel synthesis of primary amines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, 7, 919-939.
- [14] N. Ljungdahl, L. Martikainen, N. Kann; Rapid microwave-assisted preparation of amino-functionalized polymers. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 6108-6110.
- [15] J. Apelt, X. Ligneau, H.H. Pertz, J. Arrang, C.R. Ganellin, J. Schwartz, W. Schunack, H. Stark; Development of a new class of nonimidazole histamine H<sub>3</sub> receptor ligands with combined inhibitory histamine N-methyltransferase activity. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 1128-1141.
- [16] A. Kamal, A.H. Babu, A.V. Ramana, R. Sinha, J.S. Yadav, S.K. Arora; Antitubercular agents. Part 1: Synthesis of phthalimido- and naphthalimido-linked phenazines as new prototype antitubercular agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 1923-1926.
- [17] M.N. Jo, H.J. Seo, Y. Kim, S.H. Seo, H. Rhim, Y.S. Koh, H. Choo, A.N. Pae; Novel T-type calcium channel blockers: dioxoquinazoline carboxamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 365-373.
- [18] J. M. Planesas; Estudio y cribado virtual de compuestos químicos antivirales (VIH). Estudio de la modulación alostérica de agonistas y antagonistas del receptor celular CXCR4. Tesis doctoral. Escola Tècnica Superior IQS, Universitat Ramon Llull, Barcelona, 2015.
- [19] *Discovery Studio*; Accelrys, Inc: San Diego, **2009**.
- [20] J. March, M.B. Smith; *Advanced Organic Chemistry*. 5<sup>a</sup> Edició. *Wiley-Interscience*. New York **2001**. ISBN: 978-0471720911.

- [21] J. P. Lamb, D.W. Engers, C.M. Niswender, A.L. Rodriguez, D.F. Venable, P.J. Conn, C.W. Lindsley; Discovery of molecular switches within the ADX-47273 mGlu5 PAM scaffold that modulate modes of pharmacology to afford potent mGlu5 NAMs, PAMs and partial antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, 21, 2711-2714.
- [22] S.T. Tong, D. Barker; A concise synthesis of ( $\pm$ ) and total synthesis of (+)-epiquinamide. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 5017-5020.
- [23] P. Hodge; Synthesis of organic compounds using polymer supported reagents, catalysts, and/or scavengers in benchtop flow systems. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, 44, 8542-8553.
- [24] I.R. Baxendale, S.V. Ley; Synthesis of the alkaloid natural products (+)-plicane and (-) obliquine, using polymer-supported reagents and scavengers. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, 44, 8588-8592.
- [25] J. Azuaje, A. Coelho, A.E. Maatougui, J.M. Blanco, E. Sotelo; Supported p-toluenesulfonic acid as a highly robust and eco-friendly isocyanide scavenger. *ACS Comb. Sci.* **2011**, 13, 89-95.
- [26] S.W. Kaldor, M.G. Siegel, J.E. Fritz, B.A. Dressman, P.J. Hahn; Use of solid supported nucleophiles and electrophiles for the purification of non-peptide small molecule libraries. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37 (40), 7193-7196.
- [27] A.F. Abdel-Magid, K.G. Carson, B.D. Harris, C.A. Maryanoff, R.D. Shah. Reductive amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride. Studies on direct and indirect reductive amination procedures. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 3849-3862.
- [28] R. Guryñ; Synthesis of 1,5-diazabicyclo[5.3.0]decane and 1,5-diazabicyclo[5.4.0]undecane. **1985**, 59 (10-12), 1243-1246.
- [29] J. Zhang, Y.Q. Wang, X.W. Wang, W.D.Z. Li; Transannular reductive rearrangement of  $\alpha$ -amino ketones: construction of aza-tricyclic frameworks of several alkaloids. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 6154-6162.
- [30] R.N. Salvatore, A.S. Nagle, K.W. Jung; Cesium effect: High chemoselectivity in direct N-alkylation of amines. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 674-683.
- [31] E. Wolthnis, W. Cady, R. Roon, B.J. Weidenaar; Preparation and properties of 1,4-dihydronaphthalen-1,4-imines. *J. Org. Chem.* **1966**, 31, 2009-2011.

- [32] S. Trifunovic, D. Dimitrijevic, G. Vasic, N. Radulovic, M. Vukicevic, F.W. Heinemann, R.D. Vukicevic; New simple synthesis of N-substituted 1,3-oxazinan-2-ones. *Synthesis* **2010**, 6, 943-946.
- [33] A. Morrell, M. Placzek, S. Parmley, S. Antony, T.S. Dexheimer, Y. Pommier, M. Cushman; Nitrated indenoisoquinolines as topoisomerase I inhibitors: A systematic study and optimization. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 4419-4430.
- [34] T.C. Gahman, M.R. Herbert, H. Lang, A. Thayer, K.T. Symons, P.M. Nguyen, M.E. Massari, S. Dozier, Y. Zhang, M. Sablad, T.S. Rao, S.A. Noble, A.K. Shiao, C.A. Hassig; Identification and SAR of selective inducible nitric oxide synthase (iNOS)dimerization inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 6888-6894.
- [35] A. Zhang, W. Xiong, J.M. Bidlack, J.E. Hilbert, B.I. Knapp, M.P. Wentland, J.L. Neumeyer; 10-ketomorphinan and 3-substituted-3-desoxymorphinan analogues as mixed  $\kappa$  and  $\mu$  opioids ligands: synthesis and biological evaluation of their binding affinity at opioid receptors. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 165-174.
- [36] A.W. Singer, S.M. McElvain; Relative Reactivities of Certain 2- and 2,6-Substituted Piperidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, 57 (6), 1135-1137.
- [37] S.T. Tong, D. Barker; A concise synthesis of ( $\pm$ ) and total synthesis of (+)-epiquinamide. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 5017-5020.
- [38] D. Bogdal; Fast Solvent-free alkylation of amides and lactams under microwave irradiation. *Molecules* **1999**, 4, 333-337.
- [39] G.W. Gribble, C.F. Nutaitis; Reactions of sodium borohydride in acidic media. XVI. N-Methylation of amines with paraformaldehyde/trifluoroacetic acid. *Synthesis* **1987**, 8, 709-711.
- [40] J.F. Liu; Pyrazinoisoquinoline compounds as Antiparasitic agents. World Patent WO 2012/122028 (filling date 13-09-2012).
- [41] T.W. McAninich; Cyclopentanone synthesis via the vinylcyclopropane rearrangement of enol ethers. Synthetic applications of the enolene rearrangement. *Diss. Abstr. Int. B* **1975**, 35 (8), 3838-3839.
- [42] H. Stetter, K. Marten; Reactions of cyanide ions with  $\alpha,\beta$ -unsaturated esters. IV. Reactions for synthesizing carbocycles. *Liebigs Annalen der Chemie* **1982**, 2, 240-249.

- [43] E. Forro, F. Fuelleop; Enzymatic resolution process for the preparation of cyclic  $\beta$ -amino acid and ester enantiomers. World Patent WO 2007/091110 (filling date 16-08-2007).
- [44] B.K. Patterson; Method of inhibition of HIV replication by leukemia inhibitory factor. World Patent WO 2001/US13273 (filling date: 24-04-2001).
- [45] J.A. Burger, A. Bürkle; The CXCR4 chemokine receptor in acute and chronic leukaemia: a marrow homing receptor and potential therapeutic target. *British Journal of Haematology* **2007**, 137, 288-296.
- [46] J. Chen, Z.Y. Xu-Monette, L. Deng, Q. Shen, L. Yin, L. Pham, K.H. Young, G.C. Manyam, L. Zhang, et al; Dysregulated CXCR4 expression promotes lymphoma cell survival and independently predicts disease progression in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* **2015**, 6 (8), 5597-5614.
- [47] Divisió d'Hematologia i Oncologia del Centre Esther Koplowitz de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS).
- [48] J.A. Burger, D.J. Stewart, O. Wald, A. Peled; Potential of CXCR4 antagonists for the treatment of metastatic lung càncer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2011**, 11 (4), 621-630.
- [49] M.A. Farias, L.E. Ruez; Factores Asociados a càncer de pulmón en mujeres. *Rev. Med. Hered.* **2008**, 19 (3), 108-116.
- [50] T. Koshiba, R. Hosatani, Y. Miyamoto, et al; Expression of Stromal Cell-derived Factor 1 and CXCR4 Ligand Receptor System in Pancreatic Cancer: A Possible Role for Tumor Progression. *Clin. Cancer Res.* **2000**, 6, 3530-3535.
- [51] I. Kalatskaya, Y.A. Berchiche, S. Gravel, B.J. Limberg, J.S. Rosenbaum, N. Heveker; AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol Pharmacol.* **2009**, 75, 1240-1247.
- [52] A. Levoye, K. Balabanian, F. Baleux, F. Bachelierie, B. Lagane; CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* **2009**, 113 (24), 6085-6093.
- [53] J.J. Hsiao, B.H. No, M.M. Smits, J. Wang, R.J. Jasavala, H.D. Martinez, J. Lee, J.J. Alston, H. Misonou, J.S. Trimmer, et al; Androgen receptor and chemokine receptors 4 and 7 form a signaling axis to regulate CXCL12-dependent cellular motility. *BMC Cancer* **2015**, 15, 1-43.

- [54] A. Salmaggi, E. Maderna, C. Calatuzzolo, P. Gaviani, A. Canazza, I. Milanesi, S. Antonio, F. DiMeco, A. Carbone, B. Pollo; CXCL12, CXCR4 and CXCR7 expression in brain metastasis. *Cancer Biology & Therapy* **2009**, 8 (17), 1608-1614.
- [55] T. Kenakin; Principles: Receptor theory in pharmacology. *TRENDS in Pharmacological Sciences* **2004**, 25 (4), 186-192.
- [56] LigPrep, version 3.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016.
- [57] Protein Data Bank; Crystal structure of the CXCR4 chemokine receptor in complex with a small molecule antagonist IT1t in I222 spacegroup  
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do/structureId=3OE6> Data de consulta: 17-12-2015.
- [58] G. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. Sanner, R. Belew, D. Goodsell, A. Olson; Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry* **2009**, 16, 2785-2791.
- [59] M. Allegretti, R. Bertini, C. Bizzarri, A. Beccari, A. Mantovani, M. Locati; Allosteric inhibitors of chemoattractant receptors: opportunities and pitfalls. *Trends Pharmacol.* **2008**, 29, 280-286.
- [60] P. Conn, A. Christopoulos, C. Lindsley. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat Rev Drug Discov.* **2009**, 8, 41-54.
- [61] K.A. Reynolds, R.N. McLaughlin, R. Ranganathan. Hot spots for allosteric regulation on protein surfaces. *Cell* **2011**, 147, 1564-1575.
- [62] E.J. Ariëns; Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1984**, 26, 663-668.
- [63] A.K. Peepliwal, S.B. Bagade, C.G. Bonde; Stereochemical consideration and eudismic ration in chiral drug development. *J. Biomed. Sci and Res.* **2010**, 2, 29-45.
- [64] EMEA; Investigation of chiral active substances. *Eur. J. Med. Res.* **1993**.
- [65] N. Vargesson; Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Research, Part C: Embryo Today--Reviews* **2015**, 105 (2), 140-156.

## 4- EXPERIMENTAL





## Experimental part index

	Pàg.
4.1 Instrumentation	235
4.2 Synthesis of 4-(2-hydroxyethyl)benzaldehyde (20)	237
4.3 Synthesis of 4-(bromomethyl)benzaldehyde (25)	238
4.4 Synthesis of 2- <i>p</i> -tolyl-1,3-dioxolane (28)	239
4.5 Synthesis of 2-bromoethyl-4-methylbenzoate (30)	240
4.6 Synthesis of <i>N</i> -(4-methylbenzylidene)-3-morpholinopropan-1-amine (31{4})	241
4.7 Synthesis of trimethylsilyl 2-(4-(bromomethyl)phenyl) acetate (39)	242
4.8 Synthesis of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetyl chloride (36)	243
4.9 Synthesis of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)- <i>N</i> -(3-morpholinopropyl)acetamide (38{4})	244
4.10 Synthesis of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)- <i>N</i> -(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide (38{5})	245
4.11 Synthesis of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)- <i>N</i> -(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl) acetamide (38{3})	246
4.12 Synthesis of 2-(4-((3-morpholinopropylamino)methyl)phenyl)- <i>N</i> -(3-morpholinopropyl) acetamide (37{4,4})	247
4.13 Synthesis of 2-(4-((3-(pyrrolidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)- <i>N</i> -(3-morpholino propyl)acetamide (37{4,1})	248
4.14 Synthesis of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)- <i>N</i> -(3-morpholinopropyl)acetamide (37{4,3})	249
4.15 Synthesis of 2-(4-((3-(piperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)- <i>N</i> -(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide (37{5,5})	250
4.16 Synthesis of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)- <i>N</i> -(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide (37{5,3})	251
4.17 Synthesis of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)- <i>N</i> -(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)acetamide (37{3,3})	252
4.18 Synthesis of <i>N</i> -(4-(2-(3-morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-morpholinopropan-1-amine (21{4,4})	253
4.19 Synthesis of <i>N</i> -(4-(2-(3-morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-(pyrrolidin-1-yl)propan-1-amine (21{4,1})	254
4.20 Synthesis of <i>N</i> -(4-(2-(3-morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine (21{4,3})	255
4.21 Synthesis of <i>N</i> -(4-(2-(3-(piperidin-1-yl)propylamino)ethyl)benzyl)-3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine (21{5,5})	256
4.22 Synthesis of <i>N</i> -(4-(2-(3-(piperidin-1-yl)propylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methyl piperidin-1-yl)propan-1-amine (21{5,3})	257
4.23 Synthesis of <i>N</i> -(4-(2-(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine (21{3,3})	258

4.24 Synthesis of bis(trimethylsilyl)naphthalene-2,6-dicarboxylate (51)	259
4.25 Synthesis of naphthalene-2,6-dicarbonyl dichloride (49)	260
4.26 Synthesis of <i>N</i> <sup>2</sup> , <i>N</i> <sup>6</sup> -bis(3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide (50{1})	261
4.27 Synthesis of <i>N</i> <sup>2</sup> , <i>N</i> <sup>6</sup> -bis(3-morpholinopropyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide (50{4})	262
4.28 Synthesis of <i>N</i> <sup>2</sup> , <i>N</i> <sup>6</sup> -bis(3-(piperidin-1-yl)propyl)naphthalene -2,6-dicarboxamide (50{5})	263
4.29 Synthesis of <i>N</i> <sup>2</sup> , <i>N</i> <sup>6</sup> -dihexylnaphthalene-2,6-dicarboxamide (50{12})	264
4.30 Synthesis of <i>N</i> <sup>2</sup> , <i>N</i> <sup>6</sup> -bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide (50{3})	265
4.31 Synthesis of <i>N,N'</i> -(naphthalene-2,6-diylbis(methylene))bis(hexan-1-amine) (47{12})	266
4.32 Synthesis of <i>N,N'</i> -(naphthalene-2,6-diylbis(methylene))bis(3-morpholinopropan-1-amine) (47{4})	267
4.33 Synthesis of <i>N,N'</i> -(naphthalene-2,6-diylbis(methylene))bis(3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine) (47{5})	268
4.34 Synthesis of <i>N,N'</i> -(naphthalene-2,6-diylbis(methylene))bis(3-(pyrrolidin-1-yl)propan-1-amine) (47{1})	269
4.35 Synthesis of <i>N,N'</i> -(naphthalene-2,6-diylbis(methylene))bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) (47{3})	270
4.36 Synthesis of <i>N,N'</i> -(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) (3{3})	271
4.37 Synthesis of <i>N,N'</i> -(1,4-phenylenebis(methylene))bis( <i>N</i> -(4-fluorobenzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) (66)	272
4.38 Synthesis of <i>N,N'</i> -(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)- <i>N</i> -(pyridin-2-ylmethyl)propan-1-amine) (65)	273
4.39 Synthesis of 4-(((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)amino)methyl)benzaldehyde (5{3})	274
4.40 Synthesis of <i>N</i> -(4-(((4-fluorobenzyl)amino)methyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine (71)	275
4.41 Synthesis of 3-(2-methylpiperidin-1-yl)- <i>N</i> -(4-(((pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)benzyl)propan-1-amine (70)	276
4.42 Synthesis of 4-fluoro- <i>N</i> -(4-(((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)amino)methyl)benzyl)aniline (72)	277
4.43 Synthesis of <i>N</i> <sup>2</sup> , <i>N</i> <sup>6</sup> -bis(pyridin-2-ylmethyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide (75)	278
4.44 Synthesis of 1,1'-(naphthalene-2,6-diyl)bis( <i>N</i> -(pyridin-2-ylmethyl)methanamine) (73)	279
4.45 Synthesis of 2-(3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propyl)isoindoline-1,3-dione (82)	280
4.46 Synthesis of 2-(3-(cyclohexyl(methyl)amino)propyl)isoindoline-1,3-dione (83)	281
4.47 Synthesis of 3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propan-1-amine (2{17})	282
4.48 Synthesis of <i>N</i> <sup>1</sup> -cyclohexyl- <i>N</i> <sup>1</sup> -methylpropane-1,3-diamine (2{18})	283
4.49 Synthesis of <i>N,N'</i> -(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propan-1-amine) (80{17,17})	284
4.50 Synthesis of <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>1'</sup> -(1,4-phenylenebis(methylene))bis( <i>N</i> <sup>3</sup> -cyclohexyl- <i>N</i> <sup>3</sup> -methylpropane-1,3-diamine) (80{18,18})	285

4.51 Synthesis of <i>N</i> <sup>1</sup> -cyclohexyl- <i>N</i> <sup>3</sup> -(4-(((3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propyl)amino)methyl)benzyl)- <i>N</i> <sup>1</sup> -methylpropane-1,3-diamine (80{18,17})	286
4.52 Synthesis of methyl piperidine-2-carboxylate hydrochloride (91{6})	288
4.53 Synthesis of ethyl piperidine-2-carboxylate (91{7})	289
4.54 Synthesis of isopropyl piperidine-2-carboxylate (91{8})	290
4.55 Synthesis of methyl 1-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)propyl)piperidine-2-carboxylate (92)	291
4.56 Synthesis of ethyl 1-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)propyl) piperidine-2-carboxylate (93)	292
4.57 Synthesis of isopropyl 1-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)propyl)piperidine-2-carboxylate (94)	293
4.58 Synthesis of methyl 1-(3-aminopropyl)piperidine-2-carboxylate (2{20})	294
4.59 Synthesis of ethyl 1-(3-aminopropyl)piperidine-2-carboxylate (2{21})	295
4.60 Synthesis of <i>N,N'</i> -(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) using scavengers (3{3})	296
4.61 Synthesis of 1,5-diazabicyclo[5.4.0]undecan-6-one (96)	297
4.62 Synthesis of (1 <i>E</i> ,1' <i>E</i> )-1,1'-(1,4-phenylene)bis( <i>N</i> -(3-bromopropyl)methanimine) (103)	298
4.63 Synthesis of diethyl 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene))bis(azanediyl))bis(propane-3,1-diyl))bis(piperidine-2-carboxylate) (3{21})	299
4.64 Synthesis of 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene))bis(azanediyl))bis(propane-3,1-diyl))bis(piperidine-2-carboxylic acid) (106)	301
4.65 Synthesis of <i>N,N'</i> -(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine) (3{5})	302
4.66 Synthesis of <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>1'</sup> -(1,4-phenylenebis(methylene))bis( <i>N</i> <sup>3</sup> , <i>N</i> <sup>3'</sup> -dipropylpropane-1,3-diamine) (3{25})	303
4.67 Synthesis of <i>N,N'</i> -(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(azepan-1-yl)propan-1-amine) (3{28})	304
4.68 Synthesis of <i>N</i> <sup>1</sup> , <i>N</i> <sup>1'</sup> -(1,4-phenylenebis(methylene))bis( <i>N</i> <sup>3</sup> -benzyl- <i>N</i> <sup>3</sup> -methylpropane-1,3-diamine) (3{24})	305
4.69 Synthesis of <i>N,N'</i> -(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(4-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) (3{26})	306
4.70 Synthesis of <i>N,N'</i> -(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) (3{29})	307
4.71 Synthesis of dimethyl 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene))bis(azanediyl))bis(propane-3,1-diyl))bis(piperidine-2-carboxylate) (3{20})	308
4.72 Synthesis of ethyl ( <i>R</i> )-piperidine-2-carboxylate hydrochloride (91{20})	309
4.73 Synthesis of ethyl ( <i>S</i> )-piperidine-2-carboxylate hydrochloride (91{21})	310
4.74 Synthesis of diethyl 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene))bis(azanediyl))bis(propane-3,1-diyl))(2 <i>R</i> ,2' <i>R</i> )-bis(piperidine-2-carboxylate) (( <i>R,R</i> )-3{21})	311
4.75 Synthesis of diethyl 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene))bis(azanediyl))bis(propane-3,1-diyl))(2 <i>S</i> ,2' <i>S</i> )-bis(piperidine-2-carboxylate) (( <i>S,S</i> )-3{21})	312
4.76 Synthesis of diethyl 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene))bis(azanediyl))bis(propane-3,1-diyl))(2 <i>R</i> ,2' <i>S</i> )-bis(piperidine-2-carboxylate) (( <i>R,S</i> )-3{21})	313



## 4.1- Instrumentation

**Infrared Spectra (IR)** were recorded in a Nicolet Magna 560 FTIR spectrophotometer of the Organic and Pharmaceutical Chemistry department at IQS, by Mrs. Núria Ruiz, under the leadership of Dr. Xavier Batllori. Values are reported in wave numbers ( $\text{cm}^{-1}$ ). The notation used is: KBr (potassium bromide plates), t (tension),  $\delta$  (deformation vibration), sim (symmetrical), as (antisymmetrical).

**Nuclear Magnetic Resonance spectra ( $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$ )** were either recorded on a Varian 400-MR spectrometer ( $^1\text{H-NMR}$  at 400 MHz and  $^{13}\text{C-NMR}$  at 100.6 MHz) by myself in the Organic and Pharmaceutical Chemistry department at IQS under the leadership of Dr. X. Batllori. Chemical shifts are reported in part per million (ppm) on the  $\delta$  scale, and are referenced to tetramethylsilane (TMS) in  $^1\text{H-NMR}$  spectra and to residual signal of the solvent  $\text{CDCl}_3$  (77.0),  $\text{D}_2\text{O}$  (49.5) or methanol- $\text{d}_4$  (49.0) in  $^{13}\text{C-RMN}$  spectra. Coupling constants are reported in Hertz (Hz). Spectral splitting patterns are designated as a: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), dd (doublet of doublets), m (complex multiplet),  $n^*$  signal assignment exchangeable.

**Mass Spectrometry (MS)** was conducted on a Hewlett-Packard-5988-A mass spectrometer operating in electron ionisation (EI) mode at 70 eV and at 4kV accelerating potential on a VG AutoSpec (Micromass Instruments) at *Unidade de Espectrometría de Masas* (Universidad de Santiago de Compostela) under the leadership of Dr. Esteban Gutiérrez and on an Agilent Technologies 5975 spectrometer at Organic and Pharmaceutical Chemistry department at IQS under the leadership of Dr. Xavier Batllori by Mrs. Núria Ruiz.

**High resolution mass spectra (HRMS)** were recorded at the Mass Spectrometry Service at *Unidade de Espectrometría de Masas* (Universidad de Santiago de Compostela) under the leadership of Dr. Esteban Gutiérrez, by using a VG AutoSpec (Micromass Instruments) Trisector EBE high resolution spectrometer (EI mode) or a Bruker Biotof II mass spectrometer (ESI-TOF mode).

**Organic elemental analyses (OEA)** were obtained on a Carlo Erba CHNS-O/EA 1108 analyzer at the Organic and Pharmaceutical Chemistry Department at IQS, by Mrs. Núria Ruiz.

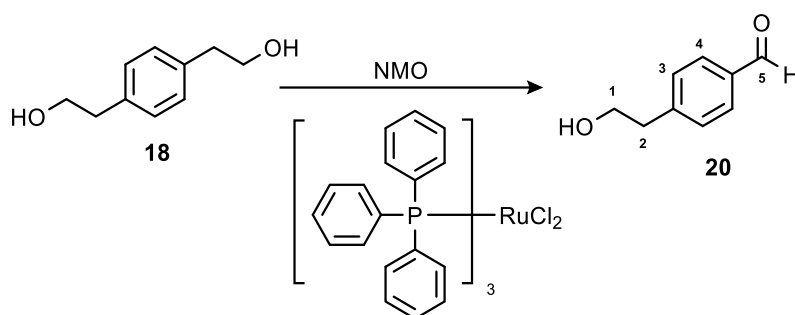
**Specific optical rotations ( $[\alpha]_D$ )** were measured with a Perkin Elmer 241 polarimeter at the Organic and Pharmaceutical Chemistry Department at IQS, by Mrs. Núria Ruiz. Sodium D line (589 nm) and a path length of 1dm were used for measuring at room temperature.

microwave irradiation experiments were carried out in a Initiator TM (Biotage) microwave apparatus, operating at a frequency of 2.45 GHz with continuous irradiation power from 0 to 400 W. Reactions were carried out in 20 ml glass tubes, sealed with aluminium/Teflon crimp tops, which can be exposed up to 250 °C and 20 bar internal pressure. Temperature was measured with an IR sensor on the outer surface of the process vial. After the irradiation period, the reaction vessel was cooled rapidly to 50 °C by air jet cooling.

Automatic flash chromatography was done in an Isco Combiflash medium pressure liquid chromatograph with RediSep ® silica gel columns (35-70 Pm) or basic alumina columns (50-200 Pm).

Docking **3**{21} and AMD3100 to CXCR4 were performed with Autodock 4.0. PDB 3OE6 was chosen as the model structure for CXCR4. **3**{21} and AMD3100 were constructed using MOE<sup>[6]</sup>. Then the grid map was set with the 62x64x62 points and the space of 0.375 angstrom. The other parameters were used with the default values.

## 4.2- Synthesis of 4-(2-hydroxyethyl)benzaldehyde (20)

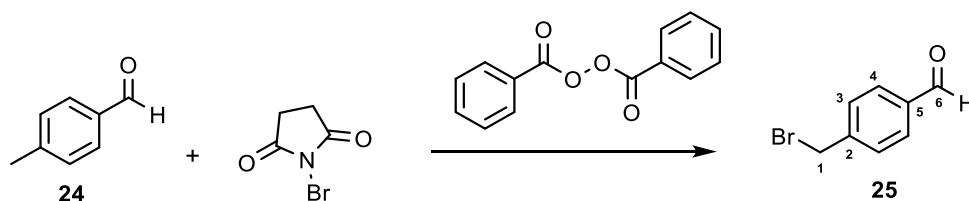


0.1838g (1.10 mmol) of 1,4-phenylenediethanol, 0.078g (0.08 mmol) and 0.9410g (8.00 mmol) of *N*-methylmorpholine-*N*-oxide was dissolved in 4 ml of dry acetone. The solution was stirred at room temperature for 24 hours in a  $\text{N}_2$  atmosphere. The mixture was filtered in Celite and eluted with acetone and ethyl acetate. The organic extract was extracted with a few amounts of water, washed with brine, dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvent was removed. Finally, the residue was separated by flash chromatography (silica, Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 90:10 in 25 minutes) to afford 11.7 mg (0.078 mmol, 7%) of 4-(2-hydroxyethyl)benzaldehyde as a yellow solid.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 9.98 (s, 1H, H-C5), 7.83 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, H-C4), 7.41 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, H-C3), 3.92 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, H-C1), 2.96 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, H-C2).

Spectroscopy data was identical with those reported in the literature.<sup>[1]</sup>

### 4.3- Synthesis of 4-(bromomethyl)benzaldehyde (25)



A solution of 0.1250g (0.63 mmol) of 4-methylbenzaldehyde and 0.0048g (0.02 mmol) of benzoyl peroxide in 2ml of  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was heated to reflux for an hour. A solution of 0.1783g (1.00 mmol) of *N*-Bromosuccinimide in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  was added drop wise and the mixture was heated under reflux for 2h. The residue was purified by flash chromatography (silica, Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 80:20 in 35 minutes) to afford 13.8 mg (0.07 mmol, 11%) of 4-(bromomethyl)benzaldehyde as an orange solid.

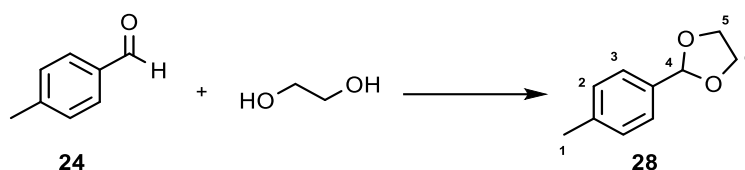
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 10.02 (s, 1H, H-C6), 7.87 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, H-C4), 7.56 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H-C3), 4.52 (s, 2H, H-C1).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 191.5 (C6), 144.2 (C2), 136.1 (C5), 130.1 (C3\*), 129.7 (C4), 31.9 (C1).

Spectroscopy data was identical with those reported in the literature.<sup>[2]</sup>



#### 4.4- Synthesis of 2-*p*-tolyl-1,3-dioxolane (28)

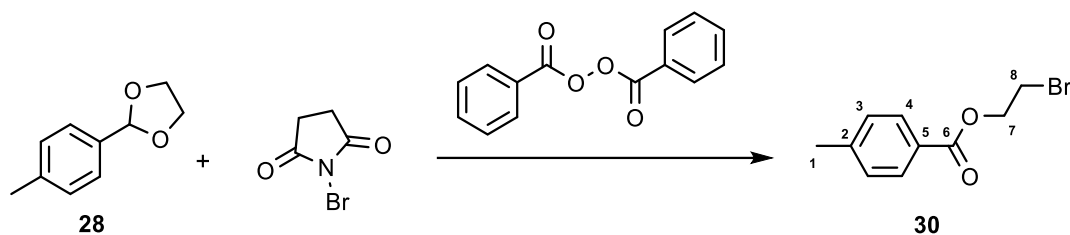


A solution of 0.560g (4.67 mmol) of 4-methylbenzaldehyde, 0.290g (0.26 ml, 4.68 mmol) of ethylene glycol and 0.002g (0.01 mmol) of *p*-toluenesulfonic acid in 2ml of toluene was heated to reflux for 45 minutes. The mixture was cooled to room temperature and 0.6 ml of a NaOH (10%) solution was added. The solution was extracted with various amounts of water, dried with  $K_2CO_3$ , filtered and the solvent was removed under reduced pressure to obtain 0.517g (3.15 mmol, 67%) of 2-*p*-tolyl-1,3-dioxolane as a white solid.

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.42 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, H-C3), 7.23 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, H-C2), 5.82 (s, 1H, H-C4), 4.00 – 4.17 (m, 4H, H-C5, H-C6), 2.40 (s, 3H, H-C1).

Spectroscopy data was identical with those reported in the literature.<sup>[3]</sup>

#### 4.5- Synthesis of 2-bromoethyl-4-methylbenzoate (30)



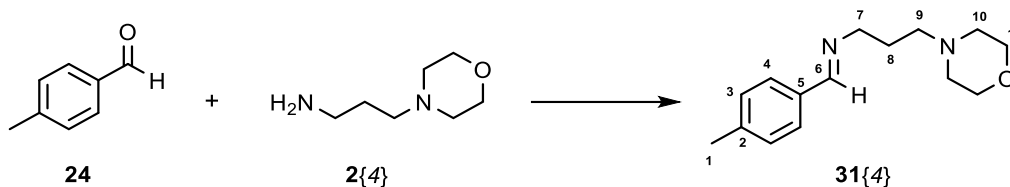
A solution of 0.3295g (2.01 mmol) of 2-p-tolyl-1,3-dioxolane and 0.0072g (0.03 mmol) of benzoyl peroxide in 2ml of carbon tetrachloride was heated to reflux for 2 hours. A solution of 0.366g (2.87 mmol) of *N*-methylmorpholine oxide in  $\text{CCl}_4$  was added drop wise. The mixture was heated to reflux for 2 hours. The crude was cooled to room temperature, filtered, the solvent was removed under reduced pressure and purified by flash chromatography (silica, Cyclohexane/AcOEt, 100:0 to 90:10 in 25 minutes) to afford 0.224 g (0.92 mmol, 46%) as a dark orange solid.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.95 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-C4), 7.23 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, H-C3), 4.59 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H, H-C7), 3.62 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H, H-C8), 2.40 (s, 3H, H-C1).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 166.1 (C6), 143.99 (C2), 129.8 (C3\*), 129.2 (C4\*), 126.9 (C5), 64.0 (C7), 28.9 (C8), 21.7 (C1).

Spectroscopy data was identical with those reported in the literature.<sup>[4]</sup>

#### 4.6- Synthesis of *N*-(4-methylbenzylidene)-3-morpholinopropan-1-amine (31{4})



A solution of 0.1229g (1.02 mmol) of 4-methylbenzaldehyde, 0.1507g (1.04 mmol) of *N*-aminopropylmorpholine and 0.230g of sodium sulfate in 6ml of anhydrous methanol was stirred at room temperature for 7 hours and then was filtered and the solvent was removed under reduced pressure to obtain 0.223g (0.91 mmol, 89%) of *N*-(4-methylbenzylidene)-3-morpholinopropan-1-amine as a yellow oil.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.24 (s, 1H, H-C6), 7.60 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-C4\*), 7.21 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-C3\*), 3.70 – 3.73 (m, 4H, H-C11), 3.63 (t, *J* = 6.9, 2H, H-C7), 2.40 – 2.47 (m, 6H, H-C9, H-C10), 2.37 (s, 3H, H-C1), 1.89 (dt, *J* = 14.2, 7.0 Hz, 2H, H-C8).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 161.1 (C6), 140.8 (C2\*), 133.6 (C5\*), 129.3 (C42\*), 128.0 (C32\*), 67.0 (C11), 59.5 (C7), 56.7 (C9<sup>3\*</sup>), 53.7 (C10<sup>3\*</sup>), 27.7 (C8), 21.5 (C1).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3024 (*t* Csp<sup>2</sup>-H), 2950, 2890, 2851 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1646 (*t* C=N), 1446 (δ CH<sub>2</sub>), 1118 (*t* as C-O-C), 814 (*t* sim C-O-C).

**MS (70 eV, EI): m/z (%):** 246.2 (4) [M]<sup>+</sup>, 159.1 (15) [M-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>NO]<sup>+</sup>, 146.1 (14) [M-C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO]<sup>+</sup>, 132.1 (100) [M-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NO]<sup>+</sup>, 118.1 (85) [M-C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>NO]<sup>+</sup>, 114.1 (89) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NO], 100.1 (64) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO]<sup>+</sup>, 91.1 (19) [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>].

#### 4.7- Synthesis of trimethylsilyl 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetate (39)



A solution of 0.237g (1.03 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetic acid, 0.165g (1.02 mmol) of hexamethyldisilazane (HMDS) and 3 drops of trimethylsilyl chloride (TMSCl) in 6ml of 1,2-dichloroethane was heated to reflux for 16 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure to obtain 0.301g (0.99 mmol, 97%) of trimethylsilyl 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetate as a brown solid.

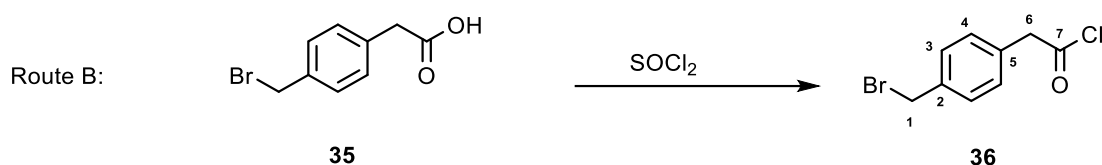
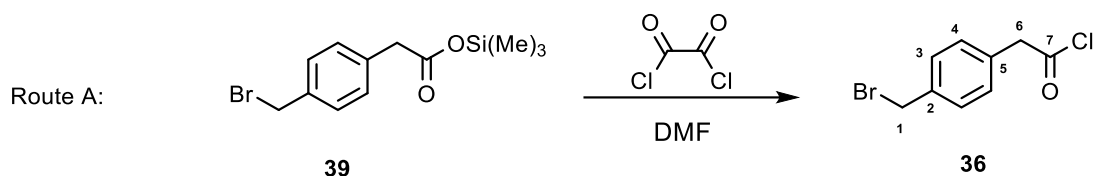
**$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.08 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, H-C4\*), 6.98 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H, H-C3\*), 4.22 (s, 2H, H-C1), 3.34 (s, 2H, H-C6), 0.27 (s, 9H, H-C8).

**$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 176.9 (C7), 136.9 (C2\*), 133.8 (C5\*), 130.1 (C32\*), 129.2 (C42\*), 40.9 (C6), 33.4 (C1), 0.1 (C8).

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 2967 ( $t$   $\text{Csp}^3\text{-H}$ ), 1700 ( $t$   $\text{C=O}$ ), 1407 ( $\delta$  as  $\text{Si-CH}_3$ ), 1245 ( $\delta$  sim  $\text{Si-CH}_3$ ), 839 ( $\gamma$   $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ), 682 ( $t$   $\text{C-Br}$ ).

**MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%):** 300.1 (1)  $[\text{M}]^+$ , 299.1 (4)  $[\text{M-H}]^+$ , 228.0 (9)  $[\text{M-C}_3\text{H}_9\text{Si}]^+$ , 221.1 (7)  $[\text{M-Br}]^+$ , 184.0 (20)  $[\text{C}_8\text{H}_8\text{Br}]^+$ , 131.1 (7)  $[\text{C}_5\text{H}_{11}\text{SiO}_2]^+$ , 104.1 (51)  $[\text{C}_8\text{H}_8]^+$ .

## 4.8- Synthesis of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetyl chloride (36)



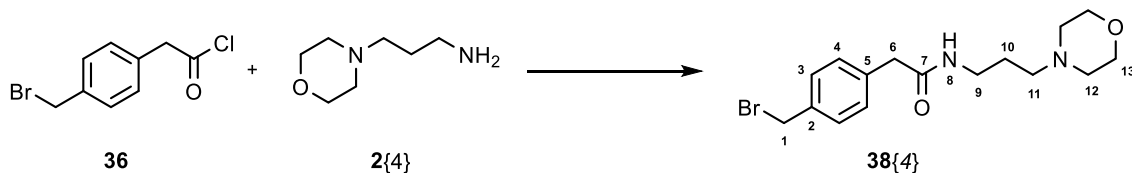
Route A: A solution of 0.272g (0.90 mmol) of trimethylsilyl 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetate and three drops of Dimethylformamide in 7 ml of dichloromethane was cooled in an ice bath and stirred for an hour. The mixture was stirred at room temperature for another hour and then the solvent was removed under reduced pressure to give 0.219g (0.88 mmol, 98%) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetyl chloride as a yellow solid.

Route B: To a solution of 0.235g (1 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetic acid in 10 ml of toluene were added 0.385g (3,2 mmol) of thionyl chloride. The mixture was heated to 90°C for 6 hours obtaining a yellow solution. The mixture was cooled to room temperature and the solvent was removed under reduced pressure to give 0.237g (0.96mmol, 96%) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetyl chloride as a yellow solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.38 – 7.44 (m, 2H, H-C3), 7.24 – 7.28 (m, 2H, H-C4), 4.48 (s, 2H, H-C1), 4.14 (s, 2H, H-C6).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 171.6 (C7), 137.8 (C2), 131.4 (C5), 129.9 (C3), 129.6 (C4), 52.6 (C6), 32.7 (C1).

#### 4.9- Synthesis of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-N-(3-morpholinopropyl)acetamide (38{4})

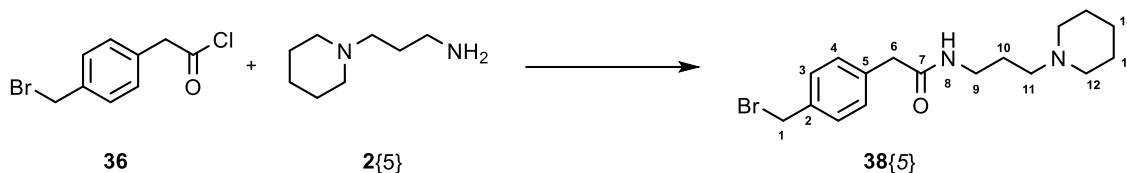


0.3884g (1.57 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetyl chloride was dissolved in 10 ml of acetonitrile and cooled at 0°C and it was added dropwise on a solution of 0.226g (1.57 mmol) of *N*-aminopropylmorpholine and 0.651g (4.71 mmol) of potassium carbonate in 10 ml of acetonitrile. The solution was heated under microwave irradiation at 100°C for 25 minutes. The mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The orange solid was dissolved in 10 ml of chloroform and the solution was filtered again. The chloroform was removed under reduced pressure to obtain 0.379g (1.07 mmol, 68%) of the desired product as an orange foamy solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.30 – 7.50 (m, 5H, H-C3, H-C4, H-N8), 4.57 (s, 2H, H-C1), 3.91 – 4.25 (m, 4H, H-C12, H-C13), 3.58 (s, 2H, H-C6), 3.37 (q, *J* = 6.12 Hz, 2H, H-C9), 2.92 (t, *J* = 7.04 Hz, 2H, H-C11), 2.14 – 2.04 (q, *J* = 6.80 Hz, 2H, H-C10).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 172.0 (C7), 136.4 (C2\*), 135.8 (C5\*), 129.8 (C32\*), 129.1 (C42\*), 63.5 (C13), 55.1 (C11), 52.1 (C12), 46.0 (C1), 43.3 (C6), 36.1 (C9), 23.2 (C10).

#### 4.10- Synthesis of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide (**38{5}**)

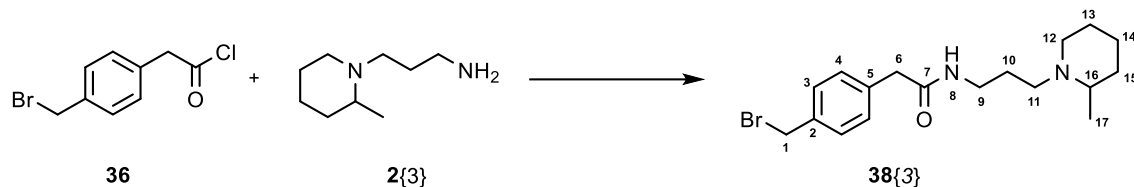


The procedure was the same as that stated above for **38{1}** but was carried out by using 0.529g (2.14 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetyl chloride, 20 ml of acetonitrile, 0.304g (2.14 mmol) of 3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine and 0.887g (6.42 mmol) of potassium carbonate. 0.2268g (0.64 mmol, 30%) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide was obtained as a dark orange foamy solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 7.25 – 7.47 (m, 5H, H-C3, H-C4, H-N8), 4.62 (s, 2H, H-C1), 3.54 (s, 2H, H-C6), 3.04 – 3.16 (m, 2H, H-C9), 1.65 – 2.15 (m, 14H, H-C10, H-C11, H-C12, H-C13, H-C14).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 170.4 (C7), 132.8 (C2\*), 129.9 (C5\*), 129.0 (C3<sup>2\*</sup>), 128.7 (C4<sup>2\*</sup>), 54.1 (C11<sup>3\*</sup>), 52.9 (C12<sup>3\*</sup>), 45.2 (C6), 42.1 (C9), 35.7 (C1), 24.0 (C10<sup>4\*</sup>), 22.9 (C13<sup>4\*</sup>), 21.2 (C14<sup>4\*</sup>).

#### 4.11- Synthesis of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl) acetamide (**38{3}**)



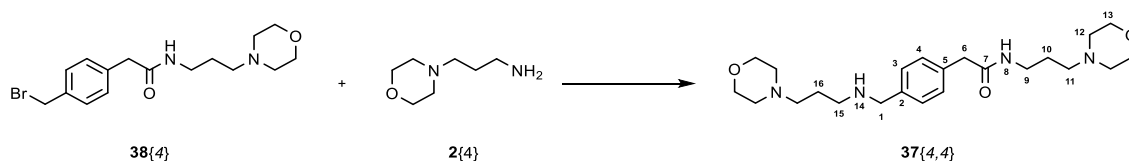
The procedure was the same as that stated above for **38{1}** but was carried out by using 0.4905g (1.98 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetyl chloride, 20 ml of acetonitrile, 0.310g (1.98 mmol) of 3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine and 0.821g (5.94 mmol) of potassium carbonate. 0.1455g (0.40 mmol, 20%) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)acetamide was obtained as a dark orange foamy solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.33 – 7.37 (m, 2H, H-C3\*), 7.25 – 7.30 (m, 2H, H-C4\*) 7.15 (br s, 1H, H-N8), 4.58 (s, 2H, H-C1), 3.53 (s, 2H, H-C6), 3.35 – 3.43 (m, 1H, H-C9), 3.18 – 3.27 (m, 1H, H-C9), 2.78 – 2.84 (m, 1H, H-C112\*), 2.71 – 2.78 (m, 1H, H-C122\*), 2.19 – 2.25 (m, 2H, H-C123\*, H-C16), 1.97 – 2.03 (m, 1H, H-C113\*), 1.51 – 1.66 (m, 5H, H-C13, H-C10, H-C14, H-C15), 1.37 – 1.43 (m, 1H, H-C10), 1.27 – 1.33 (m, 1H, H-C14), 1.15 – 1.21 (m, 1H, H-C15), 0.98 (d, *J*= 6.28 Hz, 3H, H-C17).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.3 (C7), 136.3 (C2\*), 135.7 (C5\*), 129.7 (C32\*), 129.0 (C42\*), 56.4 (C163\*), 52.8 (C123\*), 51.7 (C113\*), 45.9 (C1), 43.7 (C6), 39.9 (C9), 34.5 (C154\*), 26.0 (C104\*), 24.9 (C134\*), 23.5 (C144\*), 18.7 (C17).



#### 4.12- Synthesis of 2-(4-((3-morpholinopropylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl) acetamide (37{4,4})



0.1475g (0.42 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide was dissolved in 6 ml of acetonitrile and a few drops of methanol and cooled at 0°C and it was added dropwise on a solution of 0.0599g (0.42 mmol) of *N*-aminopropylmorpholine and 0.1741g (1.26 mmol) of potassium carbonate in 4 ml of acetonitrile. The solution was heated under microwave irradiation at 150°C for 25 minutes. The mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 95:5:0.5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 0.0598g (0.143 mmol, 34%) of the desired product as an orange oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.28 – 7.32 (m, 2H, H-C2\*), 7.20 – 7.25 (m, 2H, H-C3\*), 6.37 (br s, 1H, H-N8), 3.77 (s, 2H, H-C1), 3.56 – 3.72 (m, 8H, H-C13), 3.53 (s, 2H, H-C6), 3.31 (q, *J* = 6.40 Hz, 2H, H-C9), 2.70 (t, *J* = 6.88, 2H, H-C15), 2.32 – 2.45 (m, 13H, H-N14, H-C11, H-C12), 1.72 (q, *J* = 6.92 Hz, 2H, H-C10), 1.66 – 1.58 (q, *J* = 6.56 Hz, 2H, H-C16).

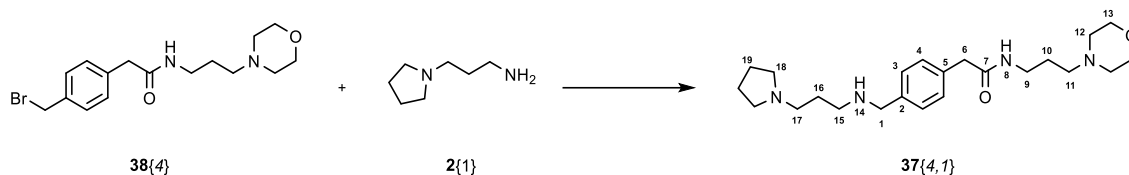
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.9 (C7), 139.3 (C2\*), 133.8 (C5\*), 129.4 (C32\*), 128.6 (C42\*), 66.9 (C13), 57.3 (C1), 53.4 (C11<sup>3\*</sup>), 53.9 (C12<sup>3\*</sup>), 48.1 (C15), 43.6 (C6), 39.0 (C9), 26.5 (C10), 25.2 (C16).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3292 (*t* N-H), 2927, 2854, 2813 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1649 (*t* C=O), 1552 (*δ* N-H), 1116 (*t* as C-O-C), 862 (*t* sim C-O-C).

**MS (70 eV, EI) *m/z* (%):** 418.4 (17) [M]<sup>+</sup>, 388.3 (12) [M-CH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 276.2 (29) [M-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 100.1 (100) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO]<sup>+</sup>

**HMS (EI) calculated for C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M]<sup>+</sup>:** 418.2944; found: 418.2940.

#### 4.13- Synthesis of 2-(4-((3-(pyrrolidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-morpholino propyl)acetamide (37{4,1})



The procedure was the same as that stated above for 37{4,4} but was carried out by using 0.8193g (2.31 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide, 20ml of acetonitrile, 0.2967g (2.31 mmol) of *N*-aminopropylpyrrolidine and 0.959g (6.94 mmol) of potassium carbonate. Upon removal the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98:2:0.5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 0.2790g (0.693 mmol, 30%) of 2-(4-((3-(pyrrolidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide as an orange oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.27 – 7.35 (m, 2H, H-C3\*), 7.17 – 7.25 (m, 2H, H-C4\*), 6.50 (br s, 1H, H-N8), 3.78 (s, 2H, H-C7), 3.55 – 3.63 (m, 4H, H-C13), 3.52 (s, 2H, H-C6), 3.29 (q, *J*=6.48 Hz, 2H, H-C9), 2.71 (t, *J*=7.0 Hz, 2H, H-C15), 2.39 – 2.60 (m, 7H, H-N14, H-C17, H-C18), 2.30 – 2.39 (m, 6H, H-C11, H-C12), 1.68 – 1.85 (m, 6H, H-C16, H-C19), 1.62 (q, *J*=6.60 Hz, 2H, H-C10).

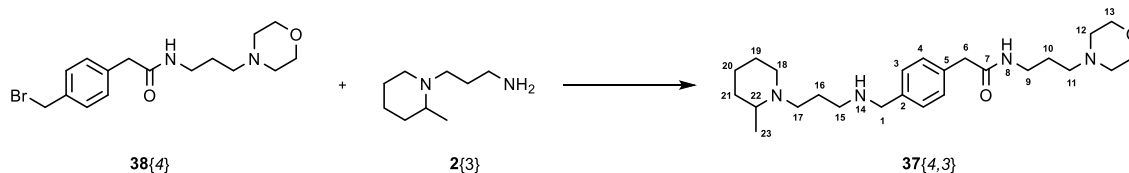
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.9 (C7), 139.2 (C2\*), 133.7 (C5\*), 129.3 (C3<sup>2\*</sup>), 128.6 (C4<sup>2\*</sup>), 66.8 (C13), 57.1 (C11), 54.7 (C17<sup>3\*</sup>), 54.2 (C18<sup>3\*</sup>), 53.6 (C12<sup>3\*</sup>), 53.4 (C1<sup>3\*</sup>), 48.1 (C15), 43.5 (C6), 38.8 (C9), 29.0 (C16<sup>4\*</sup>), 25.2 (C10), 23.4 (C19<sup>4\*</sup>).

**IR (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3284 (*t* N-H), 2951, 2854, 2806 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1647 (*t* C=O), 1550 ( $\delta$  N-H), 1116 (*t* as C-O-C), 862 (*t* sim C-O-C).

**MS (70 eV, EI): *m/z* (%):** 402.4 (1) [M]<sup>+</sup>, 372.3 (2) [M-CH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 276.2 (14) [M-C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 189.1 (10) [M-C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>, 171.1 (11) [C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 127.1 (38) [C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 100.1 (100) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO]<sup>+</sup>, 84.1 (100) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>, 70.1 (30) [C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>23</sub>H<sub>37</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M-H]<sup>+</sup>:** 401.2917; found: 401.2915.

#### 4.14- Synthesis of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide (37{4,3})



The procedure was the same as that stated above for **37{4,4}** but was carried out by using 0.7520g (2.12 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide, 20ml of acetonitrile, 0.331g (2.12 mmol) of *N*-aminopropylpiperidine and 0.879g (6.36 mmol) of potassium carbonate. Upon removal the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98:2:0.5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 0.1826g (0.424 mmol, 20%) of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide as a dark orange oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, cdcl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.30 – 7.32 (m, 2H, H-C<sup>3\*</sup>), 7.20 – 7.23 (m, 2H, H-C<sup>4\*</sup>), 6.39 (br s, 1H, H-N<sup>8</sup>), 3.77 (s, 2H, H-C<sup>1</sup>), 3.56 – 3.60 (m, 4H, H-C<sup>13</sup>), 3.53 (s, 2H, H-C<sup>6</sup>), 3.28 – 3.31 (m, 2H, H-C<sup>9</sup>), 2.80 – 2.91 (m, 1H, H-C<sup>17<sup>2\*</sup></sup>), 2.68 – 2.78 (m, 1H, H-C<sup>18<sup>2\*</sup></sup>), 2.65 (t, *J*= 6.92 Hz, 2H, H-C<sup>15</sup>), 2.19 – 2.46 (m, 9H, H-C<sup>11</sup>, H-C<sup>12</sup>, H-C<sup>18<sup>3\*</sup></sup>, H-C<sup>22</sup>, H-N<sup>14</sup>), 2.08 – 2.14 (m, 1H, H-C<sup>17<sup>3\*</sup></sup>), 1.21 – 1.77 (m, 10H, H-C<sup>10</sup>, H-C<sup>16</sup>, H-C<sup>19</sup>, H-C<sup>20</sup>, H-C<sup>21</sup>), 1.04 (d, *J*= 6.24 Hz, 3H, H-C<sup>23</sup>).

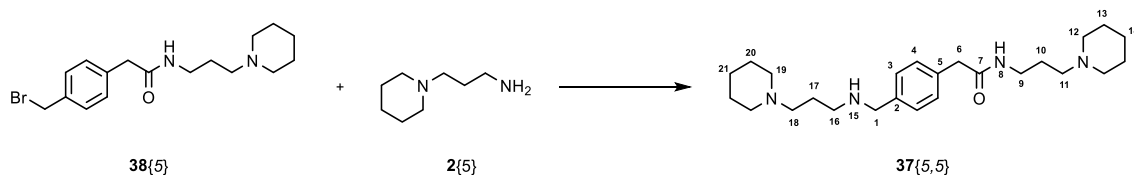
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, cdcl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.9 (C<sup>7</sup>), 139.6 (C<sup>2\*</sup>), 133.6 (C<sup>5\*</sup>), 129.3 (C<sup>3<sup>2\*</sup></sup>), 128.6 (C<sup>4<sup>2\*</sup></sup>), 66.8 (C<sup>13</sup>), 57.2 (C<sup>11</sup>), 55.9 (C<sup>22</sup>), 53.6 (C<sup>12<sup>3\*</sup></sup>), 53.6 (C<sup>1<sup>3\*</sup></sup>), 52.2 (C<sup>17<sup>4\*</sup></sup>), 52.0 (C<sup>18<sup>4\*</sup></sup>), 48.4 (C<sup>15</sup>), 43.6 (C<sup>6</sup>), 38.9 (C<sup>9</sup>), 34.6 (C<sup>21</sup>), 26.1 (C<sup>10<sup>5\*</sup></sup>), 25.8 (C<sup>16<sup>5\*</sup></sup>), 25.2 (C<sup>19<sup>5\*</sup></sup>), 23.9 (C<sup>20<sup>5\*</sup></sup>), 19.0 (C<sup>23</sup>).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3289 (*t* N-H), 3054 (*t* Csp<sup>2</sup>-H), 2930, 2853, 2807 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1647 (*t* C=O), 1551 (δ N-H), 1445 (δ CH<sub>2</sub>), 1118 (*t* as C-O-C), 863 (*t* sim C-O-C).

**MS (70 eV, EI): m/z (%):** 430.1 (15) [M]<sup>+</sup>, 429.1 (31) [M-H]<sup>+</sup>, 400.1 (2) [M-CH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 331.0 (3) [M-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N]<sup>+</sup>, 303.9 (4) [M-C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 275.9 (12) [M-C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 170.8 (13) [C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 154.8 (19) [C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 125.9 (28) [C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 111.9 (100) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 99.9 (40) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M]<sup>+</sup>:** 430.3308; found: 430.3303.

#### 4.15- Synthesis of 2-(4-((3-(piperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide (37{5,5})



The procedure was the same as that stated above for **37{4,4}** but was carried out by using 0.7192g (2.03 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-piperidin-1-ylpropyl)acetamide, 20ml of acetonitrile, 0.2895g (2.03 mmol) of *N*-aminopropylpiperidine and 0.8417g (6.09 mmol) of potassium carbonate. Upon removal the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98:2:0.5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 0.1515g (0.365 mmol, 18%) of 2-(4-((3-(piperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide as an orange oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.28 – 7.35 (m, 2H, H-C3\*), 7.20 – 7.24 (m, 2H, H-C4\*), 7.00 (br s, 1H, H-N8), 3.76 (s, 2H, H-C1), 3.50 (s, 2H, H-C6), 3.28 – 3.32 (m, 2H, H-C9), 2.69 (t, *J* = 6.8Hz, 2H, H-C16), 2.22 – 2.48 (m, 13H, H-N15, H-C11, H-C12, H-C18, H-C19), 1.38 – 1.78 (m, 16H, H-C10, H-C17, H-C13, H-C14, H-C20, H-C21).

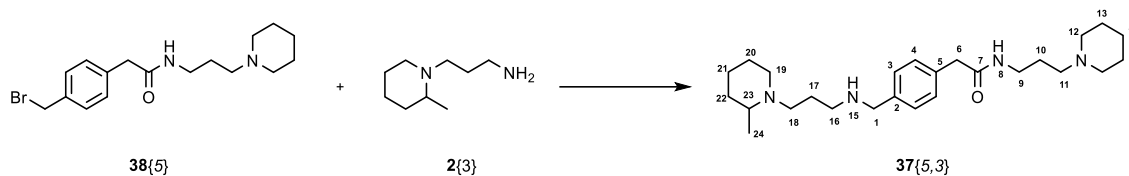
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.83 (C7), 138.59 (C2\*), 133.82 (C5\*), 129.29 (C3<sup>2\*</sup>), 129.04 (C4<sup>2\*</sup>), 57.9 (C11<sup>3\*</sup>), 57.7 (C18<sup>3\*</sup>), 54.62 (C12<sup>4\*</sup>), 54.54 (C19<sup>4\*</sup>), 53.40 (C1), 48.28 (C16), 43.69 (C6), 39.56 (C9), 26.01 (C17<sup>5\*</sup>), 26.00 (C10<sup>5\*</sup>), 25.08 (C14, C21<sup>5\*</sup>), 24.34 (C20<sup>5\*</sup>), 24.27 (C13<sup>5\*</sup>).

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3293 (*t* N-H), 3055 (*t* Csp<sup>2</sup>-H), 2931, 2852, 2768 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1644 (*t* C=O), 1548 ( $\delta$  N-H), 1441 ( $\delta$  CH<sub>2</sub>).

**MS (70eV, EI): *m/z* (%):** 414.4 (5) [M]<sup>+</sup>, 288.3 (22) [M-C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>]<sup>+</sup>, 274.3 (91) [M-C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 169.2 (27) [C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 141.1 (46) [C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 126.1 (11) [C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 112.1 (43) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 98.0 (100) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>, 84.0 (48) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O [M]<sup>+</sup>:** 414.3359; found: 414.3359.

#### 4.16- Synthesis of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-N-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide (37{5,3})



The procedure was the same as that stated above for **37{4,4}** but was carried out by using 1.0457g (2.96 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-N-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide, 20ml of acetonitrile, 0.4625g (2.96 mmol) of *N*-aminopropipecoline and 1.2273g (8.88 mmol) of potassium carbonate. Upon removal the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98:2:0.5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 0.3426g (0.799 mmol, 27%) of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-N-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide as a dark orange oil.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.27 – 7.33 (m, 2H, H-C3\*), 7.20 – 7.24 (m, 2H, H-C4\*), 7.02 (br s, 1H, H-N8), 3.72 (s, 2H, H-C1), 3.50 (s, 2H, H-C6), 3.30 (q, *J* = 5.86 Hz, 2H, H-C9), 2.75 – 2.92 (m, 2H, H-C18, H-C19), 2.62 – 2.72 (m, 2H, H-C16), 2.22 – 2.52 (m, 9H, H-C11, H-C12, H-N15, H-C23, H-C19<sup>2\*</sup>), 2.09 – 2.21 (m, 1H, H-C18<sup>2\*</sup>), 1.22 – 1.80 (m, 16H, H-C10, H-C13, H-C14, H-C17, H-C20, H-C21, H-C22), 1.06 (d, *J* = 6.24 Hz, 3H, H-C24).

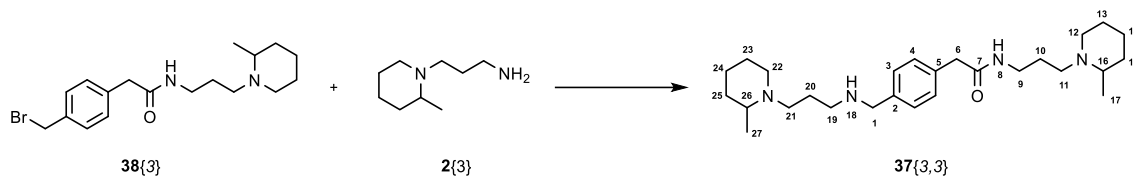
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.7 (C7), 138.7 (C2\*), 134.1 (C5\*), 129.3 (C3<sup>2\*</sup>), 128.6 (C4<sup>2\*</sup>), 57.9 (C19<sup>3\*</sup>), 56.1 (C22), 54.5 (C12), 53.5 (C1), 52.2 (C11<sup>3\*</sup>), 51.9 (C18<sup>3\*</sup>), 48.3 (C16), 43.7 (C6), 39.6 (C9), 34.3 (C22), 26.0 (C13, C14), 25.9 (C10<sup>4\*</sup>), 25.4 (C17<sup>4\*</sup>), 25.1 (C20<sup>3\*</sup>), 24.3 (C21<sup>3\*</sup>), 18.8 (C24).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3286 (*t* N-H), 3054 (*t* Csp<sup>2</sup>-H), 2931, 2852, 2800 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1647 (*t* C=O), 1552 (*δ* N-H).

**MS (70eV, EI): m/z (%):** 428.5 (5) [M]<sup>+</sup>, 288.3 (21) [M-C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N]<sup>+</sup>, 274.3 (60) [M-C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 169.2 (26) [C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>NO]<sup>+</sup>, 155.2 (59) [C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 126.1 (38) [C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 112.0 (75) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 98.2 (100) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>, 84.1 (34) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>.

**HMS (EI)** calculated for C<sub>26</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O [M]<sup>+</sup>: 428.3515; found: 428.3495.

#### 4.17- Synthesis of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)acetamide (37{3,3})



The procedure was the same as that stated above for **37{4,4}** but was carried out by using 0.6312g (1.72 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)acetamide, 20ml of acetonitrile, 0.2688g (1.72 mmol) of *N*-aminopropipecoline and 0.7132g (5.16 mmol) of potassium carbonate. Upon removal the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 99:1:0.5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 0.2437g (0.55 mmol, 32%) of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)acetamide as a dark orange oil.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.27 – 7.33 (m, 2H, H-C3\*), 7.18 – 7.24 (m, 2H, H-C4\*), 6.94 (br s, 1H, H-N8), 3.76 (s, 2H, H-C1), 3.51 (s, 2H, H-C6), 3.32 – 3.40 (m, 1H, H-C9), 3.17 – 3.24 (m, 1H, H-C9), 2.62 – 2.89 (m, 5H, H-C11, H-C12, H-C21, H-C22), 1.94 – 2.47 (m, 6H, H-C11, H-C12, H-C16, H-C21, H-C22, H-C26), 1.14 – 1.71 (m, 16H, H-C10, H-C13, H-C14, H-C15, H-C20, H-C23, H-C24, H-C25), 0.94 – 1.08 (m, 6H, H-C17, H-C27).

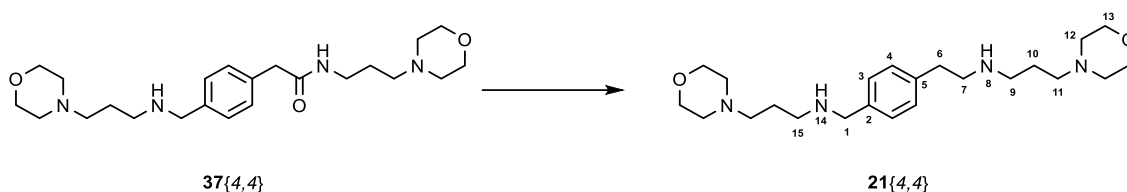
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.7 (C7), 138.9 (C2\*), 133.8 (C5\*), 129.3 (C32\*), 128.7 (C42\*), 56.3 (C163\*), 55.9 (C263\*), 53.7 (C1), 52.60 (C114\*), 52.25 (C124\*), 51.75 (C214\*), 48.35 (C224\*), 43.7 (C6), 39.6 (C9), 34.55 (C15, C25), 26.08 (C105\*), 25.79 (C205\*), 25.00 (C135\*), 23.75 (C145\*), 23.3 (C235\*), 22.47 (C245\*), 19.2 (C176\*), 18.89 (C276\*).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3286 (*t* N-H), 3054 (*t* Csp<sup>2</sup>-H), 2929, 2854, 2793 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1647 (*t* C=O), 1552 (*δ* N-H).

**MS (70eV, EI): m/z (%):** 442.8 (2) [M]<sup>+</sup>, 302.3 (10) [M-C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N]<sup>+</sup>, 288.1 (29) [M-C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 183.2 (9) [C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 155.2 (23) [C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N]<sup>+</sup>, 126.1 (19) [C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 112.1 (100) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 98.1 (66) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O [M]<sup>+</sup>:** 442.3672; found: 442.3673.

#### 4.18- Synthesis of *N*-(4-(2-(3-morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-morpholinopropan-1-amine (21{4,4})



Borane dimethylsulfide complex (0.450 ml, 5.93 mmol) was added dropwise at 0°C to a solution of 2-(4-((3-morpholinopropylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide (0.3315g, 0.792 mmol) in anhydrous THF (15 ml). The solution was refluxed for 6h under N<sub>2</sub>, cooled down to room temperature, diluted with 8 ml 1.25M HCl/MeOH solution and refluxed for 1h. The solvent was removed *in vacuo* and the crude material was diluted with 1M NaOH solution until pH=14. The aqueous solution was extracted five times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dried with MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. Purification of the residue by automatic flash chromatography (basic alumina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>, 98:2:0.5) afforded 0.1487g (0.368 mmol, 46%) of *N*-(4-(2-(3-morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-morpholinopropan-1-amine as a yellow oil.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.22 – 7.29 (m, 2H, H-C3\*), 7.13 – 7.18 (m, 2H, H-C4\*), 3.72 – 3.81 (m, 2H, H-C1), 3.62 – 3.72 (m, 8H, H-C13), 2.84 – 2.89 (m, 2H, H-C7), 2.78 – 2.81 (m, 2H, H-C8), 2.61 – 2.74 (m, 4H, H-C9, H-C15), 2.28 – 2.46 (m, 12H, H-C11, H-C12), 2.08 (br s, 2H, H-N8, H-N14), 1.61 – 1.75 (m, 4H, H-C10).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (major isomer):** 138.38 (C2\*), 137.63 (C5\*), 128.80 (C32\*), 128.44 (C42\*), 66.88 (C13), 57.3 (C11), 53.75 (C123\*), 53.72 (C13\*), 51.14 (C7), 51.09 (s), 48.36 (C94\*), 48.00 (C154\*) 35.86 (C6), 26.53 (C10).

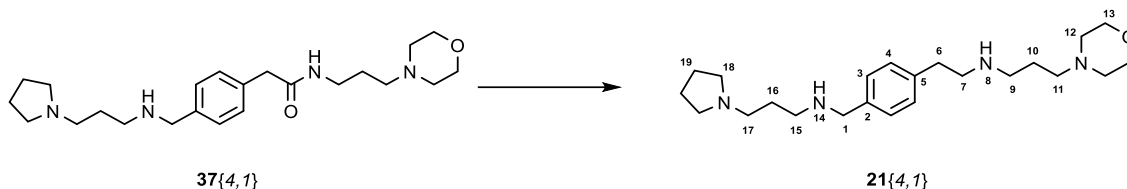
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (minor isomer):** 138.6 (C2\*), 138.2 (C5\*), 128.7 (C32\*), 128.2 (C42\*).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3297 (*t* N-H), 2936, 2852, 2807 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1669 ( $\delta$  N-H), 1456 ( $\delta$  CH<sub>2</sub>), 1117 (*t* as C-O-C), 862 (*t* sim (C-O-C)).

**MS (70 eV, EI): m/z (%):** 404.3 (6) [M]<sup>+</sup>, 374.3 (6) [M-CH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 157.1 (13) [C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 114.1 (15) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NO]<sup>+</sup>, 100.1 (100) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO]<sup>+</sup>, 86.1 (5) [C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>23</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M]<sup>+</sup>:** 404.3151; found: 404.3158.

#### 4.19- Synthesis of *N*-(4-(2-(3-morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-(pyrrolidin-1-yl)propan-1-amine (21{4,1})



The procedure was the same as that stated above for **21{4,4}** but was carried out by using 0.2374g (0.59 mmol) of 2-(4-((3-(pyrrolidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide, 0.335 ml (0.2689g, 3.54 mmol) of Borane dimethylsulfide complex, 15ml of THF and 7 ml of 1.25M HCl/MeOH. Upon removal the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98:2:0.5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 0.1100g (0.28 mmol, 48%) of *N*-(4-(2-(3-morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-(pyrrolidin-1-yl)propan-1-amine.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.21 – 7.28 (m, 2H, H-C3\*), 7.13 – 7.19 (m, 2H, H-C4\*), 3.72 – 3.79 (m, 2H, H-C1), 3.64 – 3.67 (m, 4H, H-C13), 2.84 – 2.90 (m, 2H, H-C7), 2.76 – 2.81 (m, 2H, H-C6), 2.66 – 2.72 (m, 4H, H-C9, H-C15), 2.33 – 2.53 (m, 12H, H-C11, H-C12, H-C17, H-C18), 2.01 (br s, 2H, H-N8, H-N14), 1.57 – 1.82 (m, 8H, H-C10, H-C16, H-C19).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (major isomer):** 138.59 (C2\*), 137.67 (C5\*), 128.69 (C32\*), 128.22 (C42\*), 66.91 (C13), 57.32 (C11, C17), 54.23 (C183\*), 53.74 (C123\*), 53.61 (C1), 51.15 (C7), 48.38 (C94\*), 48.08 (C154\*), 35.88 (C6), 26.59 (C10, C16), 23.39 (C19).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (minor isomer):** 138.35 (C2\*), 138.11 (C5\*), 128.80 (C32\*), 128.43 (C42\*).

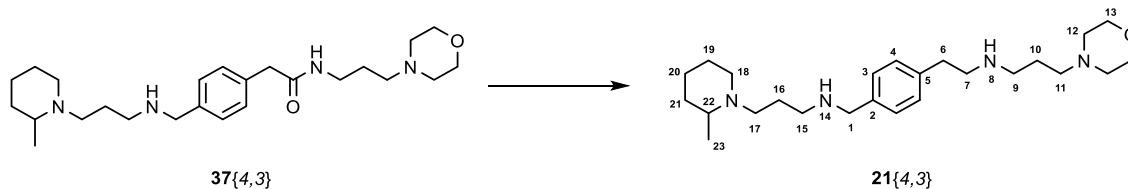
**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3288 (*t* N-H), 2930, 2852, 2804 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1663 ( $\delta$  N-H), 1457 ( $\delta$  CH<sub>2</sub>), 1118 (*t* as C-O-C), 862 (*t* sim C-O-C).

**MS (70 eV, EI): m/z (%):** 388.2 (32) [M]<sup>+</sup>, 387.2 (79) [M-H]<sup>+</sup>, 358.2 (3) [M-CH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 290.0 (9) [M-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>, 262.0 (17) [M-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 156.9 (36) [C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 99.9 (100) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO]<sup>+</sup>, 84.0 (100) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>, 70.1 (24) [C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>23</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>O [M-H]<sup>+</sup>:** 387.3124; found: 387.3123.



#### 4.20- Synthesis of *N*-(4-(2-(3-morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine (**21**{4,3})



The procedure was the same as that stated above for **21**{4,4} but was carried out by using 0.1678g (0.39 mmol) of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide, 0.222 ml (0.1778g, 2.34 mmol) of Borane dimethylsulfide complex, 10ml of THF and 5 ml of 1.25M HCl/MeOH,. Upon removal the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98:2:0.5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 0.0764g (0.18 mmol, 47%) of *N*-(4-(2-(3-morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.10 – 7.29 (m, 4H, H-C3, H-C4), 3.72 – 3.82 (m, 2H, H-C1), 3.61 – 3.71 (m, 4H, H-C13), 2.84 – 2.89 (m, 2H, H-C7), 2.78 – 2.81 (m, 2H, H-C6), 2.63 – 2.75 (m, 6H, H-C9, H-C15, H-C17, H-C18), 1.95 – 2.50 (m, 11H, H-C11, H-C12, H-C17, H-C18, H-C22, H-N8, H-N14), 1.25 – 1.71 (m, 10H, H-C10, H-C16, H-C19, H-C20, H-C21), 0.97 – 1.10 (m, 3H, H-C23).

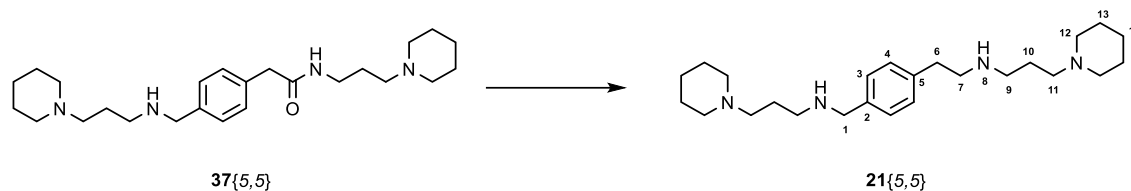
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 138.63 (C2\*), 137.99 (C5\*), 128.68 (C3<sup>2\*</sup>), 128.28 (C4<sup>2\*</sup>), 66.90 (C13), 57.33 (C11), 55.95 (C22), 53.73 (C12<sup>3\*</sup>), 53.63 (C1<sup>3\*</sup>), 52.26 (C17,C18), 51.14 (C7), 48.42 (C9<sup>4\*</sup>), 48.35 (C15<sup>4\*</sup>), 35.88 (C6), 34.53 (C21), 26.60 (C10<sup>5\*</sup>), 26.02 (C16<sup>5\*</sup>), 25.56 (C19<sup>5\*</sup>), 23.84 (C20<sup>5\*</sup>), 18.96 (C23).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3288 (*t* N-H), 2929, 2852, 2805 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1671 ( $\delta$  N-H), 1455 ( $\delta$  CH<sub>2</sub>), 1118 (*t* as C-O-C), 862 (*t* sim C-O-C).

**MS (70 eV, EI): m/z (%):** 416.1 (20) [M]<sup>+</sup>, 415.1 (38) [M-H]<sup>+</sup>, 386.1 (16) [M-CH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 259.9 (11) [M-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 156.8 (24) [C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 125.9 (32) [C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 111.9 (100) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 99.9 (61) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>25</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O [M-H]<sup>+</sup>:** 415.3437; found: 415.3438.

#### 4.21- Synthesis of *N*-(4-(2-(3-(piperidin-1-yl)propylamino)ethyl)benzyl)-3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine (21{5,5})



The procedure was the same as that stated above for **21{4,4}** but was carried out by using 0.1134g (0.27 mmol) of 2-(4-((3-(piperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide, 0.156 ml (0.1247g, 1.64 mmol) of Borane dimethylsulfide complex, 10ml of THF and 5 ml of 1.25M HCl/MeOH,. Upon removal the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98:2:0.5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 0.0403g (0.101 mmol, 37%) of *N*-(4-(2-(3-morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.22 – 7.27 (m, 2H, H-C3\*), 7.12 – 7.19 (m, 2H, H-C4\*), 3.76 (s, 2H, H-C1), 2.84 – 2.90 (m, 2H, H-C7), 2.77 – 2.82 (m, 2H, H-C6), 2.67 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H, H-C9), 2.21 – 2.47 (m, 12H, H-C11, H-C12), 2.05 (br s, 2H, H-N8), 1.68 – 1.71 (m, 4H, H-C10), 1.51 – 1.56 (m, 8H, H-C13), 1.39 – 1.42 (m, 4H, H-C14).

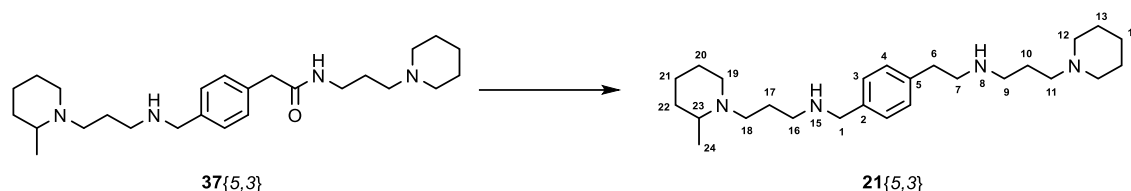
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 138.52 (C2\*), 137.72 (C5\*), 128.71 (C32\*), 128.24 (C42\*), 57.78 (C11), 54.61 (C12), 53.59 (C1), 51.08 (C7), 48.73 (C9), 35.78 (C6), 26.72 (C10), 25.91 (C13), 24.39 (C14).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3285 (*t* N-H), 2928, 2852, 2800 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1673 (*δ* N-H), 1455 (*δ* CH<sub>2</sub>).

**MS (70 eV, EI): m/z (%):** 400.4 (1) [M]<sup>+</sup>, 260.2 (3) [M-C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 155.1 (7) [C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 112.1 (8) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 98.1 (100) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>, 84.0 (8) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>:** 400.3566; found: 400.3577.

#### 4.22- Synthesis of *N*-(4-(2-(3-(piperidin-1-yl)propylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methyl piperidin-1-yl)propan-1-amine (21{5,3})



The procedure was the same as that stated above for **21{4,4}** but was carried out by using 0.1848g (0.43 mmol) of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide, 0.245 ml (0.1965g, 2.59 mmol) of Borane dimethylsulfide complex, 12ml of THF and 6 ml of 1.25M HCl/MeOH,. Upon removal the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98:2:0.5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 0.0642g (0.16 mmol, 36%) of *N*-(4-(2-(3-(piperidin-1-yl)propylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.20 – 7.27 (m, 2H, H-C3\*), 7.13 – 7.18 (m, 2H, H-C4\*), 3.74 (s, 2H, H-C1), 2.84 – 2.88 (m, 2H, H-C7), 2.77 – 2.82 (m, 2H, H-C6), 2.63 – 2.76 (m, 4H, H-C9, H-C16), 1.99 – 2.48 (m, 13H, H-C11, H-C12, H-C18, H-C19, H-C23, H-N8, H-N15), 1.63 – 1.71 (m, 4H, H-C10, H-C17), 1.24 – 1.62 (m, 12H, H-C13, H-C14, H-C20, H-C21, H-C22), 1.04 (d, *J* = 6.28 Hz, 3H, H-C24).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (major isomer):** 138.61 (C2\*), 137.64 (C5\*), 128.69 (C32\*), 128.24 (C42\*), 57.74 (C11, C18), 55.93 (C23), 54.63 (C12), 53.74 (C1), 52.3 (C19), 51.18 (C7), 48.71 (C93\*), 48.36 (C163\*), 35.91 (C6), 34.66 (C22), 26.94 (C104\*), 26.13 (C144\*), 25.95 (C134\*), 25.72 (C174\*), 24.43 (C214\*), 19.07 (C24).

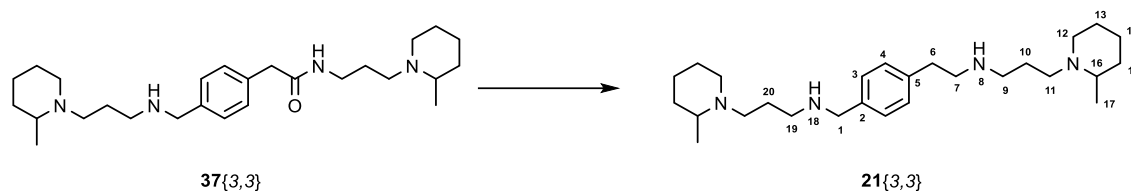
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (minor isomer):** 138.4 (C2\*), 138.2 (C5\*), 128.63 (C32\*), 128.24 (C42\*).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3283 (*t* N-H), 2931, 2852, 2800 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1671 ( $\delta$  N-H), 1443 ( $\delta$  CH<sub>2</sub>).

**MS (70 eV, EI): m/z (%):** 414.4 (8) [M]<sup>+</sup>, 260.2 (18) [M-C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 155.1 (33) [C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 126.1 (19) [C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 112.1 (87) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 98.2 (100) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>, 84.1 (16) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>26</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>:** 414.3722; found: 414.33732.

#### 4.23- Synthesis of *N*-(4-(2-(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine (21{3,3})



The procedure was the same as that stated above for **21{4,4}** but was carried out by using 0.2015g (0.46 mmol) of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)acetamide, 0.259 ml (0.2075g, 2.73 mmol) of Borane dimethylsulfide complex, 13ml of THF and 6 ml of 1.25M HCl/MeOH,. Upon removal the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98:2:0.5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 0.088g (0.205 mmol, 45%) of *N*-(4-(2-(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.22 – 7.27 (m, 2H, H-C3\*), 7.10 – 7.19 (m, 2H, H-C4\*), 3.76 (s, 2H, H-C1), 2.59 – 2.95 (m, 12H, H-C6, H-C7, H-C9, H-C19, H-C11, H-C12), 2.06 – 2.44 (m, 8H, H-C11, H-C12, H-C16), 1.22 – 1.73 (m, 16H, H-C10, H-C13, H-C14, H-C15, H-C20), 0.99 – 1.10 (m, 6H, H-C17).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (major isomer):** 138.52 (C2\*), 137.70 (C5\*), 128.72 (C32\*), 128.31 (C42\*), 55.91 (C16), 53.66 (C1), 52.25 (C11, C123\*), 51.10 (C73\*), 48.82 (C94\*), 48.34 (C194\*), 35.80 (C6), 34.56 (C15), 25.97 (C135\*), 25.50 (C10, C205\*), 23.84 (C145\*), 18.99 (C17).

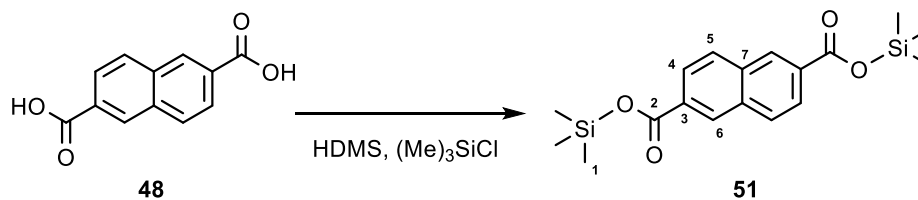
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) (minor isomer):** 138.2 (C2\*), 138.0 (C5\*), 128.83 (C32\*), 128.48 (C42\*).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3280 (*t* N-H), 2929, 2853, 2793 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1673 ( $\delta$  N-H), 1449 ( $\delta$  CH<sub>2</sub>).

**MS (70 eV, EI): m/z (%):** 428.6 (12) [M]<sup>+</sup>, 288.1 (10) [M-C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N]<sup>+</sup>, 274.1 (22) [M-C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 169.1 (36) [C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 126.1 (25) [C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 112.1 (100) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 98.1 (69) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>:** 428.3879; found: 428.3870.

#### 4.24- Synthesis of bis(trimethylsilyl) naphthalene-2,6-dicarboxylate (51)



Naphthalene-2,6-dicarboxylic acid (2.0115g, 9.3 mmol) was dissolved in 1,2-dichloroethane (95 ml). 2.8 ml of bis(trimethylsilyl)amine 98% (13.1 mmol) and 19 drops of chlorotrimethylsilane was added. The solution was refluxed for 15h under N<sub>2</sub>, after the reflux, the solution was cooled down to room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and 3.3540g of bis(trimethylsilyl) naphthalene-2,6-dicarboxylate (9.3 mmol, 100%) was obtained as a white solid.

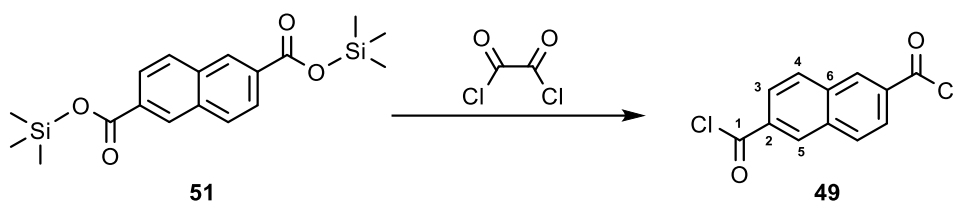
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.61 (s, 2H, H-C6), 8.11 (d, *J*= 8.00 Hz, 2H, H-C4), 8.00 (d, *J*= 8.00 Hz, 2H, H-C5), 0.45 (s, 18H, H-C1).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 166.6 (C2), 134.8 (C3), 131.3 (C6), 130.9 (C7), 129.6 (C5), 126.6 (C4), 0.0 (C1).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 2960, 2559 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1693 (*t* C=O), 1425 (*t* as Si-CH<sub>3</sub>), 1297 (*t* sim Si-CH<sub>3</sub>), 851 (*γ* Si-CH<sub>3</sub>).

**MS (70 eV, EI) m/z (%):** 360.1 (30) [M]<sup>+</sup>, 345.1 (100) [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 301.1 (30) [M-C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>]<sup>+</sup>, 271.1 (37) [M-C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>SiO]<sup>+</sup>, 228.0 (22) [M-C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>SiO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 154.0 (26) [M-C<sub>7</sub>H<sub>18</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 126.0 (24) [C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>]<sup>+</sup>.

#### 4.25- Synthesis of naphthalene-2,6-dicarbonyl dichloride (49)



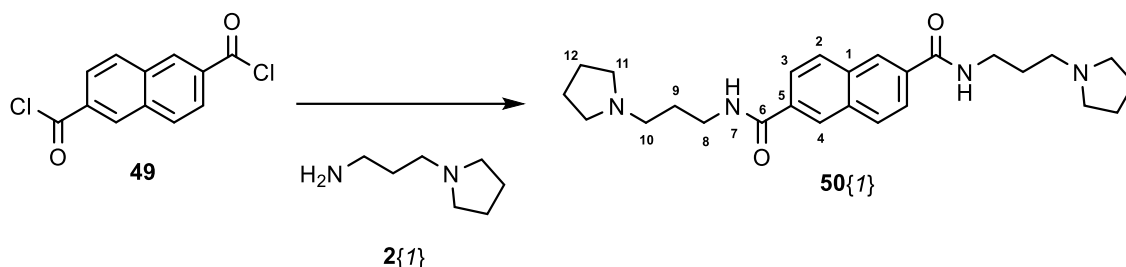
Oxalyl dichloride (1.8 ml, 20.9 mmol) and dimethylformamide (20 drops) was added dropwise at 0°C to a solution of bis(trimethylsilyl) naphthalene-2,6-dicarboxylate (3.3540g, 9.3 mmol) in anhydrous dichloromethane (90 ml). The solution was left 1h at 0°C and 1h at room temperature. The solvent was removed *in vacuo* and 2.3530g of naphthalene-2,6-dicarbonyl dichloride as a white solid (9.2 mmol, 99%) was obtained.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.80 (s, 2H, H-C5), 8.20 (d, *J* = 8.00 Hz, 2H, H-C3), 8.14 (d, *J* = 8.00 Hz, 2H, H-C4).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 168.0 (C1), 135.2 (C2), 133.7 (C5), 133.6 (C6), 130.8 (C4), 126.7 (C3).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3435 (*t* N-H), 2827, 2854, 2813 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1694 (*t* C=O), 1116 (*t* as C-O-C), 862 (*t* sim C-O-C).

#### 4.26- Synthesis of *N*<sup>2</sup>,*N*<sup>6</sup>-bis(3-(pyrrolidin-1-yl)propyl) naphthalene-2,6-dicarboxamide (50{1})



A solution of naphthalene-2,6-dicarbonyl dichloride (2.1201g, 8.4 mmol) in anhydrous dichloromethane (80 ml) was cooled at 0°C. 2.6 ml of triethylamine and 2.2150g of 3-(pyrrolidin-1-yl)propan-1-amine (17 mmol) was added dropwise. The solution was stirred at room temperature for 20h, a white solid appeared. This solid was filtered and it was washed with dichloromethane to afford 3.1511g (7.2 mmol, 86%) of *N*<sup>2</sup>,*N*<sup>6</sup>-bis(3-(pyrrolidin-1-yl)propyl) naphthalene-2,6-dicarboxamide as a yellow solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 9.10 (br s, 2H, H-N7), 8.29 (s, 2H, H-C3), 7.87 – 7.91 (m, 4H, H-C4, H-C2), 3.63 – 3.67 (m, 4H, H-C8), 2.75 (t, *J* = 4.00 Hz, 4H, H-C10), 2.61 (m, 8H, H-C11), 1.77 – 1.86 (m, 12H, H-C9, H-C12).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 166.7 (C6), 133.9 (C5), 133.7 (C1), 128.9 (C2\*), 126.8 (C3), 124.5 (C4\*), 56.3 (C10), 54.2 (C11), 41.4 (C8), 26.0 (C9), 23.6 (C12).

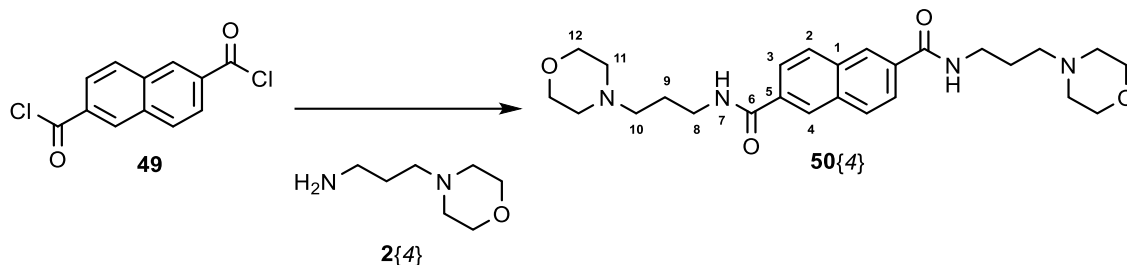
**IR (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3146 (*t* N-H), 2957, 2867, 2816 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1652 (*t* C=O), 1529 ( $\delta$  N-H).

**MS (70 eV, EI) *m/z* (%):** 436.3 (21) [M]<sup>+</sup>, 367.3 (6) [M-C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>N]<sup>+</sup>, 338.3 (8) [M-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>, 296.2 (28) [M-C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 153.7 (20) [C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>O]<sup>+</sup>, 125.7 (14) [C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>]<sup>+</sup>, 83.9 (100) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M]<sup>+</sup>:** 418.2944; found: 418.2940.

**OEA** Calculated for C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> C: 71.53% H: 8.31% N: 12.83% found C:71.48% H: 8.60% N: 12.86%.

#### 4.27- Synthesis of *N*<sup>2</sup>,*N*<sup>6</sup>-bis(3-morpholinopropyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide (50{4})



A solution of naphthalene-2,6-dicarbonyl dichloride (1.7281g, 6.8 mmol) in anhydrous dichloromethane (70 ml) was cooled at 0°C. 2.1 ml of triethylamine and 2.0491g of 3-morpholinopropan-1-amine (14.2 mmol) was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 20h. 50 ml of a solution of carbonate potassium 25% was added and the solution was extracted with dichloromethane (3x30 ml) and brine (1x30 ml). Upon removal the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98:2:0.5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 1.6092g (3.434 mmol, 50%) of *N*<sup>2</sup>,*N*<sup>6</sup>-bis(3-morpholinopropyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide as a pale brown solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.36 (s, 2H, H-C4), 8.19 (br s, 2H, H-N7), 7.92 – 7.99 (m, 4H, H-C3, H-C2), 3.73 (t, *J*= 8.00 Hz, 8H, H-C12), 3.61 – 3.66 (m, 4H, H-C8), 2.60 (t, *J*= 8.00 Hz, 4H, H-C10), 2.53 (s, 8H, H-C11), 1.82 – 1.86 (m, 4H, H-C9).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 167.0 (C6), 133.9 (C5), 133.7 (C1), 129.2 (C2\*), 127.1 (C4), 124.7 (C3\*), 67.0 (C12), 58.8 (C10), 53.9 (C11), 40.9 (C8), 24.1 (C9).

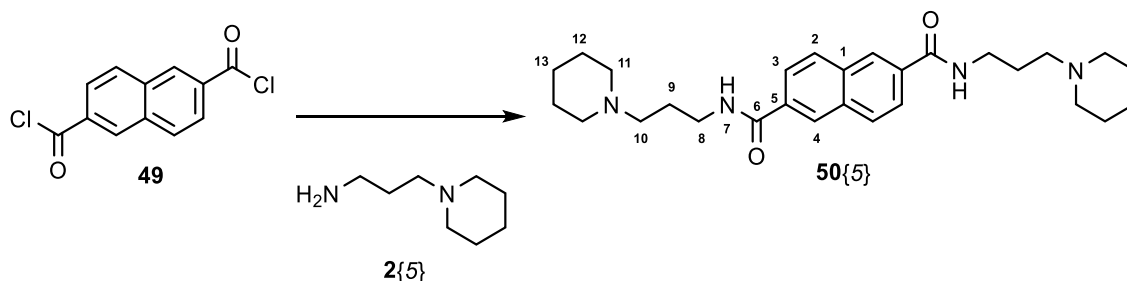
**IR (KBr) *v*<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3298 (*t* N-H), 2936, 2880, 2808, 2764 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1633 (*t* C=O), 1548 (*δ* N-H), 1113 (*t* as C-O-C), 958 (*t* sim C-O-C).

**MS (70 eV, EI) *m/z* (%):** 468.2 (5) [M]<sup>+</sup>, 438.3 (18) [M-CH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 425.3 (28) [M-C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>, 382.3 (13) [M-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO]<sup>+</sup>, 298.2 (19) [M-C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 126.8 (47) [C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 99.8 (100) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO]<sup>+</sup>.

**OEA** Calculated for C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> C: 66.64% H: 7.74% N: 11.96% found C: 66.58% H: 7.75% N: 11.91%.



#### 4.28- Synthesis of *N*<sup>2</sup>,*N*<sup>6</sup>-bis(3-(piperidin-1-yl)propyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide (**50**{5})



The procedure was the same as that stated above for **50**{4} but was carried out by using 2.2552g (8.91 mmol) of naphthalene-2,6-dicarbonyl dichloride, 2.6130g (18.37 mmol) of 3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine, 2.7 ml of triethylamine and 90 ml of dichloromethane. Upon removal the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98:2:0.5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 2.3184g (4.99 mmol, 56%) of *N*<sup>2</sup>,*N*<sup>6</sup>-bis(3-(piperidin-1-yl)propyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide as a pale yellow solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.96 (br s, 2H, H-N7), 8.37 (s, 2H, H-C4), 7.93 – 8.00 (m, 4H, H-C3, H-C2), 3.61 – 3.65 (m, 4H, H-C8), 2.78 (t, *J* = 4.00 Hz, 4H, H-C10), 2.44 – 2.50 (m, 8H, H-C11), 1.79 – 1.87 (m, 4H, H-C9), 1.58 – 1.64 (m, 8H, H-C12), 1.44 – 1.50 (m, 4H, H-C13).

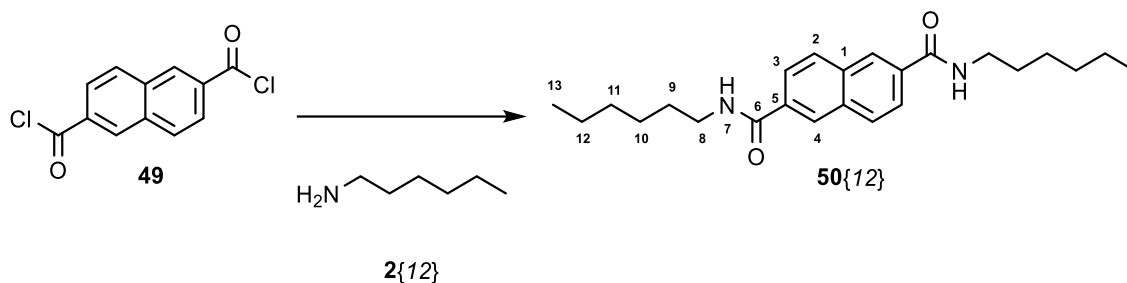
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 167.0 (C6), 133.9 (C5), 133.7 (C1), 128.9 (C3\*), 126.9 (C4), 124.9 (C2\*), 59.6 (C10), 54.9 (C11), 41.6 (C8), 26.1 (C12), 24.3 (C9), 23.9 (C13).

**IR (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3244 (*t* N-H), 2931, 2878, 2796, 2759 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1629 (*t* C=O), 1552 ( $\delta$  N-H).

**MS (70 eV, EI) *m/z* (%):** 464.5 (8) [M]<sup>+</sup>, 296.3 (5) [M-C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 111.9 (8) [C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>N]<sup>+</sup>, 97.9 (100) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>, 84.0 (9) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>.

**OEA** Calculated for C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> C: 72.38% H: 8.68% N: 12.06% found C: 72.32% H: 8.86% N: 11.95%.

#### 4.29- Synthesis of *N*<sup>2</sup>,*N*<sup>6</sup>-dihexylnaphthalene-2,6-dicarboxamide (50{12})



The procedure was the same as that stated above for **50{1}** but was carried out by using 1.5223g (6.01 mmol) of naphthalene-2,6-dicarbonyl dichloride, 1.2300g (12.15 mmol) of hexan-1-amine, 1.8 ml of triethylamine and 60 ml of dichloromethane. Upon filter the solid, 1.3670g (3.57 mmol, 60%) of *N*<sup>2</sup>,*N*<sup>6</sup>-dihexylnaphthalene-2,6-dicarboxamide as a white solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sup>6</sup>-DMSO) δ (ppm):** 8.65 (br s, 2H, H-N7), 8.40 (s, 2H, H-C4), 8.06 – 8.08 (m, 2H, H-C3\*), 7.95 – 7.98 (m, 2H, H-C2\*), 3.27 – 3.31 (m, 4H, H-C8), 1.54 – 1.58 (m, 4H, H-C9), 1.25 – 1.36 (m, 12H, H-C10, H-C11, H-C12), 0.85 – 0.90 (m, 6H, H-C13).

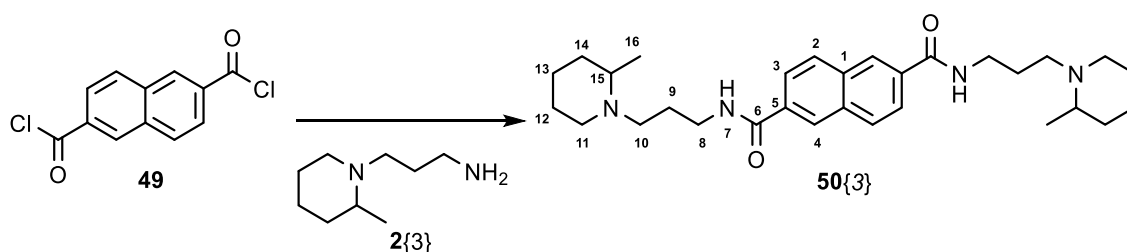
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, d<sup>6</sup>-DMSO) δ (ppm):** 165.8 (C6), 133.3 (C5\*), 133.1 (C1\*), 128.7 (C32\*), 126.8 (C4), 124.7 (C22\*), 40.1 (C8), 30.9 (C103\*), 28.9 (C9), 26.0 (C113\*), 21.9 (C123\*), 13.8 (C13).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3309 (*t* N-H), 3065 (*t* Csp<sup>2</sup>), 2955, 2937, 2868 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1630 (*t* C=O), 1535 (*δ* N-H).

**MS (70 eV, EI) m/z (%):** 382.2 (22) [M]<sup>+</sup>, 311.1 (56) [M-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>]<sup>+</sup>, 282.1 (100) [M-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 197.9 (40) [C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 153.9 (74) [C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O]<sup>+</sup>, 126.0 (39) [C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>]<sup>+</sup>.

**OEA** Calculated for C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> C:75.35% H: 8.96% N: 7.32% found C:75.33% H: 9.18% N: 7.41%.

#### 4.30- Synthesis of $N^2,N^6$ -bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide (**50{3}**)



The procedure was the same as that stated above for **50{4}** but was carried out by using 1.5091g (5.96 mmol) of naphthalene-2,6-dicarbonyl dichloride, 1.9424g (12.43 mmol) of 3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine, 1.8 ml of triethylamine and 60 ml of dichloromethane. Upon removal the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98:2:0.5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 1.4389g (2.92 mmol, 49%) of  $N^2,N^6$ -bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide as a pale yellow solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.95 (br s, 2H, H-N7), 8.36 (s, 2H, H-C4), 7.92 – 8.00 (m, 4H, H-C3, H-C2), 3.74 – 3.83 (m, 2H, H-C8), 3.42 – 3.50 (m, 2H, H-C8), 2.96 – 3.05 (m, 4H, H-C10, H-C11), 2.25 – 2.39 (m, 4H, H-C10, H-C15), 2.06 (dt, J<sub>1</sub>= 12.00 Hz, J<sub>2</sub>= 4.00 Hz, H-C11), 1.83 – 1.95 (m, 2H, H-C9), 1.61 – 1.78 (m, 8H, H-C9, H-C12, H-C13, H-C14), 1.43 – 1.55 (m, 2H, H-C12), 1.29 – 1.38 (m, 4H, H-C13, H-C14), 1.10 (d, J= 4.00 Hz, 6H, H-C16).

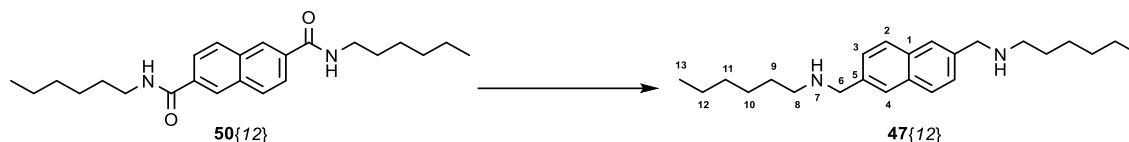
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 166.9 (C6), 133.9 (C5), 133.7 (C1), 128.9 (C3\*), 126.9 (C4), 124.8 (C2\*), 57.0 (C15), 54.4 (C10), 52.0 (C11), 41.6 (C8), 34.8 (C14\*), 26.1 (C12), 24.4 (C9), 23.5 (C13\*), 18.9 (C16).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3272 (t N-H), 3072 (t Csp<sup>2</sup>-H), 2930, 2879, 2805 (t Csp<sup>3</sup>-H), 1630 (t C=O), 1544 (δ N-H).

**MS (70 eV, EI) m/z (%):** 492.2 (13) [M]<sup>+</sup>, 477.1 (55) [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 395.2 (19) [M-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N]<sup>+</sup>, 367.2 (13) [M-C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N]<sup>+</sup>, 153.7 (21) [C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>O]<sup>+</sup>, 125.7 (14) [C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>]<sup>+</sup>, 111.8 (100) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 97.8 (34) [C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N]<sup>+</sup>.

**OEA** Calculated for C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> C: 73.13% H: 9.00% N: 11.37% found C: 73.12% H: 9.35% N: 11.38%.

### 4.31- Synthesis of *N,N'*-(naphthalene-2,6-diylbis(methylene)) bis(hexan-1-amine) (47{12})



A solution of *N*<sup>2</sup>,*N*<sup>6</sup>-dihexyl-naphthalene-2,6-dicarboxamide (0.9450g, 2.47 mmol) in anhydrous THF (38 ml) was cooled at 0°C. Borane dimethylsulfide complex (1.57 ml, 20.7 mmol) was added dropwise. The mixture was refluxed for 20h under N<sub>2</sub>, cooled down to room temperature and it was acidified with 6M HCl to pH acid. The solution was stirred at room temperature for 3h. The solvent was removed *in vacuo* and the crude material was diluted with 1M NaOH solution until pH=14. The aqueous solution was extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dried with MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. To purify the crude, it was solved in 1.25M HCl/MeOH and stirred for 2h at room temperature. The solid was filtered and washed with acetone and dichloromethane. The white solid was neutralized with 1M NaOH and extracted with dichloromethane. The solvent was removed *in vacuo* to afford 0.1270g (0.36 mmol, 15%) of *N,N'*-(naphthalene-2,6-diylbis(methylene)) bis(hexan-1-amine) as a white solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.77 (d, *J*= 8.33, 2H, H-C3), 7.73 (s, 2H, H-C4), 7.42 – 7.46 (m, 2H, H-C2), 3.94 (s, 4H, H-C6), 2.63 – 2.69 (m, 4H, H-C8), 1.52 – 1.58 (m, 4H, H-C9), 1.45 (s, 2H, H-N7), 1.26 – 1.34 (m, 12H, H-C10, H-C11, H-C12), 0.85 – 0.90 (m, 6H, H-C13).

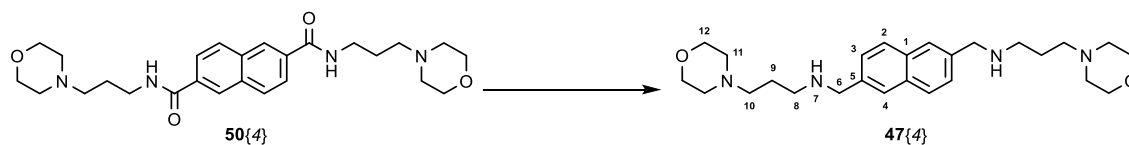
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 137.7 (C5), 132.7 (C1), 127.8 (C3), 126.7 (C2), 126.1 (C4), 54.1 (C6), 49.5 (C8), 31.8 (C10\*), 27.0 (C11\*), 22.6 (C12\*), 14.0 (C13).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3439 (*t* N-H), 3051 (*t* Csp<sup>2</sup>-H), 2951, 2927, 2858, 2820, 2793 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1109 (st C-N), 818 (δ N-H).

**MS (70 eV, EI) m/z (%):** 354.2 (22) [M]<sup>+</sup>, 283.1 (37) [M-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>]<sup>+</sup>, 269.1 (15) [M-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>]<sup>+</sup>, 255.1 (100) [M-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N]<sup>+</sup>, 184.1 (22) [C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 154.0 (81) [C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M]<sup>+</sup>:** 354.3035; found: 354.3032.

### 4.32- Synthesis of *N,N'*-(naphthalene-2,6-diylbis(methylene))bis(3-morpholinopropan-1-amine) (47{4})



The procedure was the same as that stated above for 47{12} but was carried out by using 1.4002g (2.99 mmol) of *N,N'*-bis(3-morpholinopropyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide, 2.0 ml of borane dimethylsulfide complex (26.3 mmol) and 70 ml of tetrahydrofuran. Upon removal the solvent it was obtained 0.6420g (1.46 mmol, 49%) of *N,N'*-(naphthalene-2,6-diylbis(methylene))bis(3-morpholinopropan-1-amine) as a white solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.77 (d, *J* = 8.33Hz, 2H, H-C3), 7.73 (s, 2H, H-C4), 7.42 – 7.46 (m, 2H, H-C2), 3.94 (s, 4H, H-C6), 3.54 – 3.80 (m, 8H, H-C12), 2.73 (t, *J* = 6.88Hz, 4H, H-C8), 2.37 – 2.46 (m, 12H, H-C10, H-C11), 1.71 – 1.76 (m, 6H, H-C9, H-N7).

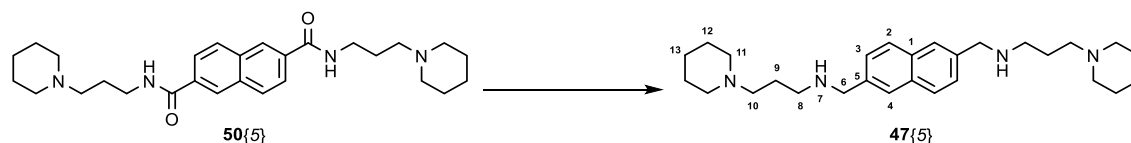
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 137.6 (C5), 132.6 (C1), 127.8 (C4), 126.7 (C2), 126.1 (C3), 67.0 (C12), 57.4 (C10\*), 54.1 (C6), 53.8 (C11\*), 48.0 (C8), 26.7 (C9).

**IR (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3297 (*t* N-H), 2948, 2864, 2819 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1114 (*t* as C-O-C).

**MS (70 eV, EI) *m/z* (%):** 440.2 (15) [M]<sup>+</sup>, 296.1 (63) [M-C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 154.0 (63) [C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N]<sup>+</sup>, 127.1 (36) [C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>, 100.1 (100) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M]<sup>+</sup>:** 440.3151; found: 440.3156.

### 4.33- Synthesis of *N,N'*-(naphthalene-2,6-diylbis(methylene)) bis(3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine) (47{5})



The procedure was the same as that stated above for **47{12}** but was carried out by using 1.8011g (3.88 mmol) of *N,N'*-bis(3-(piperidin-1-yl)propyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide, 2.6 ml of borane dimethylsulfide complex (34.2 mmol) and 70 ml of tetrahydrofuran. Upon removal the solvent it was obtained 0.9401g (2.13 mmol, 55%) of *N,N'*-(naphthalene-2,6-diylbis(methylene)) bis(3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine) as a white solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.76 (d, *J* = 8.33, 2H, H-C3), 7.73 (s, 2H, H-C4), 7.41 – 7.45 (m, 2H, H-C2), 3.94 (s, 4H, H-C6), 2.71 (t, *J* = 6.85Hz, 4H, H-C8), 2.32 – 2.41 (m, 12H, H-C10, H-C11), 1.92 (s, 2H, H-N7), 1.73 (p, *J* = 6.92Hz, 4H, H-C9), 1.54 – 1.59 (m, 8H, H-C12), 1.40 – 1.44 (m, 2H, H-C13).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 137.7 (C5), 132.6 (C1), 127.7 (C3), 126.7 (C2), 126.1 (C4), 57.9 (C10), 54.7 (C11), 54.1 (C6), 48.4 (C8), 27.1 (C9), 26.0 (C12), 24.5 (C13).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3281 (*t* N-H), 2932, 2851, 2801 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1125 (st C-N), 817 (δ N-H).

**MS (70 eV, EI) m/z (%):** 434.3 (3) [M]<sup>+</sup>, 310.1 (13) [M-C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 294.1 (100) [M-C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 211.1 (23) [C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 154.0 (60) [C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>]<sup>+</sup>, 112.1 (72) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 98.1 (87) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>:** 434.3637; found: 434.3639.

#### 4.34- Synthesis of *N,N'*-(naphthalene-2,6-diylbis(methylene)) bis(3-(pyrrolidin-1-yl)propan-1-amine) (47{1})



The procedure was the same as that stated above for 47{12} but was carried out by using 2.0073g (4.60 mmol) of *N,N'*-bis(3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide, 3.1 ml of borane dimethylsulfide complex (40.8 mmol) and 80 ml of tetrahydrofuran. Upon removal the solvent it was obtained 0.8410g (2.07 mmol, 45%) of *N,N'*-(naphthalene-2,6-diylbis(methylene)) bis(3-(pyrrolidin-1-yl)propan-1-amine) as a white solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sup>6</sup>-DMSO) δ (ppm):** 7.77 (d, *J* = 8.33, 2H, H-C3), 7.72 (s, 2H, H-C4), 7.41 – 7.45 (m, 2H, H-C2), 3.94 (s, 4H, H-C6), 2.73 (t, *J* = 7.00 Hz, 4H, H-C8), 2.48 – 2.52 (m, 12H, H-C10, H-C11), 1.75 – 1.78 (m, 14H, H-C9, H-C12, H-N7).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, d<sup>6</sup>-DMSO) δ (ppm):** 137.5 (C5), 132.5 (C1), 127.8 (C3), 126.7 (C2), 126.1 (C4), 54.8 (C10), 54.3 (C11), 54.0 (C6), 48.1 (C8), 29.2 (C9), 23.4 (C12).

**IR (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3298 (t N-H), 3045 (t Csp<sup>2</sup>), 2944, 2869, 2749 (t Csp<sup>3</sup>-H), 1111 (st C-N), 817 (δ N-H).

**MS (70 eV, EI) *m/z* (%):** 408.2 (1) [M]<sup>+</sup>, 296.1 (8) [M-C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 280.1 (78) [M-C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 154.0 (56) [C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>]<sup>+</sup>, 98.1 (65) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>, 84.1 (100) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>.

**HMS (ESI-TOF) calculated for C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub> [M+1]<sup>+</sup>:** 409.3317; found: 409.3326.

#### 4.35- Synthesis of *N,N'*-(naphthalene-2,6-diylbis(methylene)) bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) (47{3})



The procedure was the same as that stated above for 47{12} but was carried out by using 1.8018g (3.66 mmol) of *N,N'*-bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide, 2.4 ml of borane dimethylsulfide complex (31.6 mmol) and 70 ml of tetrahydrofuran. Upon removal the solvent it was obtained 0.6074g (1.32 mmol, 36%) of *N,N'*-(naphthalene-2,6-diylbis(methylene)) bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) as a white solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sup>6</sup>-DMSO) δ (ppm):** 7.77 (d, *J* = 8.33, 2H, H-C3), 7.73 (s, 2H, H-C4), 7.43-7.45 (m, 2H, H-C2), 3.94 (s, 4H, H-C6), 2.84 – 2.89 (m, 2H, H-C8), 2.71 – 2.78 (m, 2H, H-C8), 2.66 – 2.69 (m, 4H, H-C10, H-C11), 2.33 – 2.40 (m, 2H, H-C10), 2.24 – 2.28 (m, 2H, H-C15), 2.08 – 2.14 (m, 2H, H-C11), 1.46 – 1.75 (m, 14H, H-C9, H-C12, H-C13, H-C14, H-N7), 1.24 – 1.30 (m, 4H, H-C13, H-C14), 1.04 (d, *J* = 4.00 Hz, 6H, H-C16).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, d<sup>6</sup>-DMSO) δ (ppm):** 137.6 (C5), 132.6 (C1), 127.8 (C4), 126.7 (C2), 126.2 (C3), 55.9 (C15), 54.1 (C6), 52.3 (C8), 52.1 (C11), 48.4 (C10), 34.7 (C14), 26.1 (C9), 25.8 (C12), 23.9 (C13), 19.1 (C16).

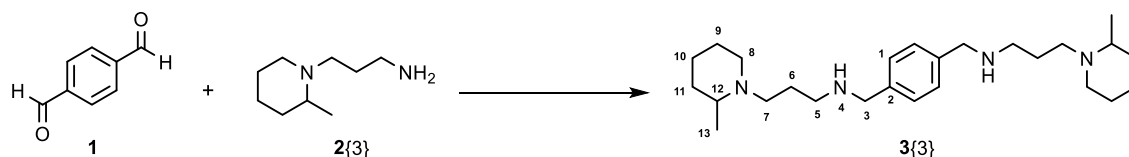
**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3280 (*t* N-H), 3050 (*t* Csp<sup>2</sup>), 2929, 2853, 2793 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1129 (*st* C-N), 816 (*δ* N-H).

**MS (70 eV, EI) *m/z* (%):** 464.4 (4) [M]<sup>+</sup>, 323.9 (9) [M-C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N]<sup>+</sup>, 210.9 (40) [C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 168.9 (13) [C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N]<sup>+</sup>, 155.0 (45) [C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>]<sup>+</sup>, 126.0 (70) [C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>]<sup>+</sup>, 112.0 (100) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 98.0 (93) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>.

**HMS (ESI-TOF)** calculated for C<sub>30</sub>H<sub>49</sub>N<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>: 465.3948; found: 465.3952.



#### 4.36- Synthesis of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) (3{3})

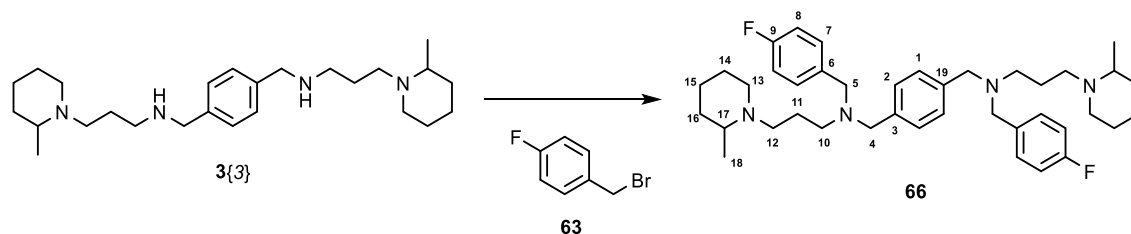


0.0379 g (0.28 mmol) of terephthalaldehyde and 0.0647 g (0.56 mmol) of 3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine are dissolved in 5 mL of MeOH. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added and the mixture was heated under reflux for 24 h. Afterwards the solution was filtered and MeOH was evaporated under reduced pressure. A yellow oil is obtained. Sodium borohydride (0.0215 g, 0.57 mmol) was added in small portions and the mixture was stirred at room temperature for 16 h. The crude was extracted with H<sub>2</sub>O and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, the organic layer was dried with MgSO<sub>4</sub> and the solvent was eliminated *in vacuo* to afford 0.1135 g (0.28 mmol) of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) as a yellow oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sup>6</sup>-DMSO) δ (ppm):** 7.27 (s, 4H, H-C1), 3.77 (s, 4H, H-C3), 2.84 – 2.88 (m, 2H, H-C8), 2.70– 2.74 (m, 2H, H-C7), 2.63 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H, H-C6), 2.34 – 2.38 (m, 2H, H-C7), 2.24 – 2.28 (m, 2H, H-C12), 2.14 (br s, 2H, H-N4), 2.10 – 2.13 (m, 2H, H-C8), 1.68 (quint, *J* = 6.9 Hz, 4H, H-C6), 1.59 – 1.62 (m, 2H, H-C9), 1.55 – 1.58 (m, 2H, H-C11\*), 1.50 – 1.53 (m, 2H, H-C10\*), 1.42 – 1.45 (m, 2H, H-C9), 1.24 – 1.29 (m, 4H, H-C10, H-C11), 1.05 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H, H-C13).

Spectroscopic data was identical with those reported in the literature.<sup>[5]</sup>

#### 4.37- Synthesis of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(*N*-(4-fluorobenzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) (66)



A cold solution of 1-(bromomethyl)-4-fluorobenzene (0.2645g, 1.41 mmol) in ACN (10 ml) is added dropwise to a solution of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) (0.2792g, 0.70 mmol) and potassium carbonate (0.3g) in ACN (10 ml). The mixture was heated under reflux for 18h. The crude is filtered and it was purified by automatic flash chromatography (basic alumina; 95:5:0.5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 0.2206g (0.35 mmol, 50%) of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(*N*-(4-fluorobenzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) as a brown oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.26 – 7.32 (m, 8H, H-C6, H-C7), 6.92 – 6.96 (m, 4H, H-C1, H-C2), 3.51 (s, 4H, H-C4), 3.48 (s, 4H, H-C5), 2.75 – 2.80 (m, 2H, H-C10), 2.60 – 2.67 (m, 2H, H-C12), 2.35 – 2.40 (m, 4H, H-C10, H-C13), 2.26 – 2.33 (m, 2H, H-C12), 2.19 – 2.22 (m, 2H, H-C17), 2.08 (td, *J*<sub>1</sub> = 11.1Hz, *J*<sub>2</sub> = 3.1Hz, 2H, H-C13), 1.47 – 1.69 (m, 12H, H-C15, H-C16, H-C14, H-C11), 1.23 – 1.28 (m, 4H, H-C15, H-C16).

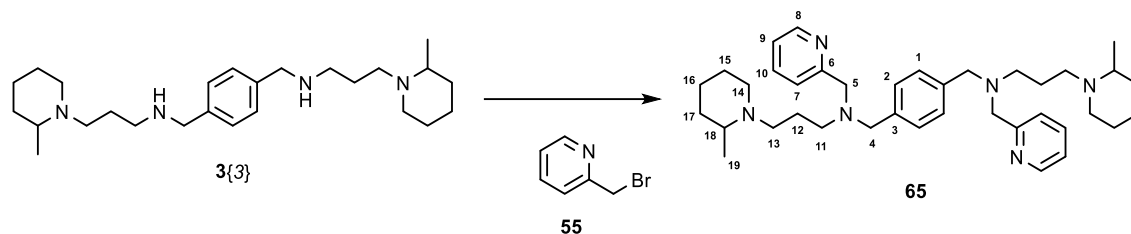
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 163.0 (C3\*), 160.6 (C19\*), 138.2 (C9), 135.5 (C6), 130.1 (C8), 128.5 (C7), 114.9 (C12\*), 114.7 (C22\*), 58.0 (C5), 57.5 (C4), 55.8 (C17), 52.2 (C13), 52.1 (C10), 51.7 (C12), 34.7 (C16), 26.2 (C14), 24.1 (C15), 22.5 (C11), 19.2 (C18).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 2930, 2853, 2796 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1603 1508 (Fluor) 1221 (*t* C-F), 1370 (*t* C-N), 822 (*δ* C-F).

**MS (70 eV, EI) m/z (%):** 630.8 (12) [M]<sup>+</sup>, 520.8 (84) [M-C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>F]<sup>+</sup>, 365.9 (81) [M-C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>F]<sup>+</sup>, 262.9 (90) [C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 163.9 (43) [C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NF]<sup>+</sup>, 126.0 (88) [C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N]<sup>+</sup>, 108.9 (100) [C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>F]<sup>+</sup>.

**OEA** Calculated for C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>F<sub>2</sub> C: 76.15% H: 8.95% N: 8.88% found C: 76.36% H: 8.81% N: 8.89%

#### 4.38- Synthesis of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)-*N*-(pyridin-2-ylmethyl)propan-1-amine) (**65**)



The procedure was the same as that stated above for **66** but was carried out by using 0.2834g (0.71 mmol) of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine), 0.4g of potassium carbonate and 0.3530g of 2-(bromomethyl)pyridine (2.05 mmol). Upon removal the solvent it needs a second purification consisting on the addition of 3.3 ml of 1.25M HCl/MeOH, it was stirred for 3h and the solid was solved in H<sub>2</sub>O, neutralized with NaOH 1M and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The solvent was removed *in vacuo* and it was obtained 0.0835g (0.14 mmol, 20%) of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)-*N*-(pyridin-2-ylmethyl)propan-1-amine) as a brown oil.

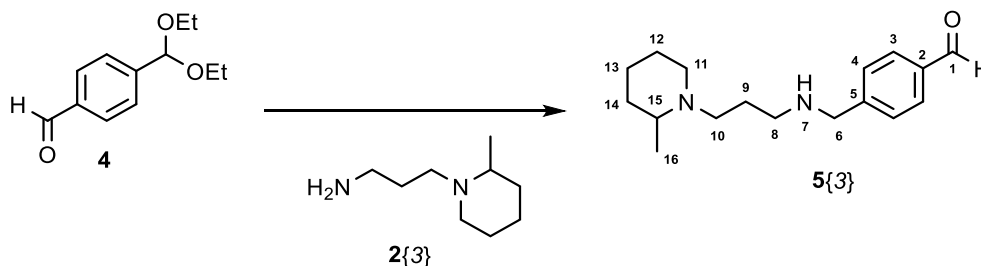
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.47 – 8.49 (m, 2H, H-C8), 7.61 – 7.64 (m, 2H, H-C10), 7.51 – 7.53 (m, 2H, H-C7), 7.29 (s, 4H, H-C1, H-C2), 7.10 – 7.13 (m, 2H, H-C9), 3.71 (s, 4H, H-C5), 3.59 (s, 4H, H-C4), 2.78 – 2.83 (m, 2H, H-C14), 2.64 – 2.71 (m, 2H, H-C17), 2.44 – 2.48 (m, 4H, H-C13), 2.34 – 2.41 (m, 2H, H-C17), 2.26 – 2.31 (m, 2H, H-C18), 2.13 (td, *J*<sub>1</sub> = 11.0Hz, *J*<sub>2</sub> = 3.4Hz, 2H, H-C14), 1.54 – 1.71 (m, 8H, H-C12, H-C11), 1.25 – 1.32 (m, 8H, H-C16, H-C15), 1.03 (d, *J* = 6.2Hz, 6H, H-C19).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 160.4 (C6), 148.2 (C8), 138.0 (C3), 136.3 (C10), 128.7 (C1,C2), 122.7 (C7), 121.8 (C9), 60.2 (C5), 58.4 (C4), 55.8 (C18), 52.2 (C13), 52.0 (C10), 51.9 (C11), 34.3 (C17), 27.2 (C12), 25.9 (C15), 22.6 (C16), 18.9 (C19).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3050, 3000 (*t* Csp<sup>2</sup>), 2928, 2853, 2801 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1741 (*t* C=N).

**MS (70 eV, EI) m/z (%):** 596.9 (6) [M]<sup>+</sup>, 503.8 (63) [M-C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N]<sup>+</sup>, 350.9 (74) [M-C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 246.0 (89) [C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 126.0 (69) [C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 112.0 (100) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 93.0 (99) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>.

### 4.39- Synthesis of 4-(((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)amino) methyl)benzaldehyde (5{3})



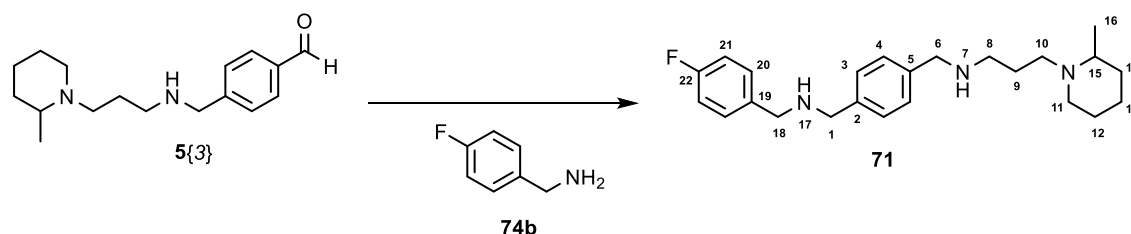
4-(diethoxymethyl)benzaldehyde (0.5599g, 2.69 mmol) and 3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine (0.5697g, 3.64 mmol) were dissolved in MeOH (20 ml). Sodium sulfate was added and the mixture was carried to reflux temperature under N<sub>2</sub> for 40h. The solution was filtered and 0.1403g of sodium borohydride (3.71 mmol) was added. The solution was stirred at room temperature for 6h and a little portion of water was added, it was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and 2M HCl solution was added (10 ml). The mixture was stirred at room temperature for 2h and it was neutralized with 1M NaOH and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. After the solvent was evaporated under reduced pressure, 0.7307g of 4-(((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)amino) methyl)benzaldehyde (2.66 mmol, 99%) as a yellow oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 10.01 (s, 1H, H-C1), 7.83 – 7.85 (m, 2H, H-C3), 7.49 – 7.51 (m, 2H, H-C4), 3.87 (s, 2H, H-C6), 2.86 – 2.90 (m, 1H, H-C11), 2.65 (t, *J*= 6.8Hz, 2H, H-C8), 2.33 – 2.40 (m, 1H, H-C10), 2.28 (s, 1H, H-C15), 2.11 (td, *J*<sub>1</sub>= 11.1Hz, *J*<sub>2</sub>= 3.0Hz, 1H, H-C11), 1.58 – 1.83 (m, 8H, H-C9, H-C12, H-C13, H-C14), 1.28 – 1.32 (m, 2H, H-C13, H-C14), 1.06 (d, *J*= 6.3Hz, 3H, H-C16).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 192.0 (C1), 147.8 (C5), 135.3 (C2), 129.9 (C3), 128.5 (C4), 56.1 (C15), 53.7 (C6), 52.3 (C10), 52.0 (C11), 48.5 (C8), 34.5 (C14), 26.0 (C12\*), 25.8 (C9\*), 23.8 (C13), 18.9 (C16).

Spectroscopy data was identical with those reported in the literature.<sup>[5]</sup>

#### 4.40- Synthesis of *N*-(4-(((4-fluorobenzyl)amino)methyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine (71)



4-(((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)amino) methyl)benzaldehyde (0.2903g, 0.76 mmol) was dissolved in methanol (15 ml) with sodium sulfate. (4-fluorophenyl)methanamine (0.1374g, 1.10 mmol) was added dropwise and the mixture was carried to reflux for 40h under N<sub>2</sub> atmosphere. The solution was filtered and sodium borohydride (0.052g, 1.37 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature for 6h, after this a little portion of water was added and the solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The solvent was evaporated under reduced pressure to afford 0.2570g (0.67 mmol, 88%) of *N*-(4-(((4-fluorobenzyl)amino)methyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine as a yellow oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.27 – 7.31 (m, 6H, H-C3, H-C4, H-C20), 6.98 – 7.02 (m, 2H, H-C21), 3.76 – 3.77 (m, 6H, H-C1, H-C6, H-C18), 2.83 – 2.89 (m, 1H, H-C11), 2.70 – 2.77 (m, 1H, H-C10), 2.64 (t, *J* = 6.9Hz, 2H, H-C8), 2.32 – 2.39 (m, 1H, H-C10), 2.23 – 2.26 (m, 1H, H-C15), 2.11 (td, *J*<sub>1</sub> = 11.2Hz, *J*<sub>2</sub> = 3.1Hz, 1H, H-C11), 1.57 – 1.74 (m, 8H, H-N7, H-N17, H-C9, H-C12, H-C13, H-C14), 1.25 – 1.30 (m, 2H, H-C13, H-C14), 1.04 (d, *J* = 6.2Hz, 3H, H-C16).

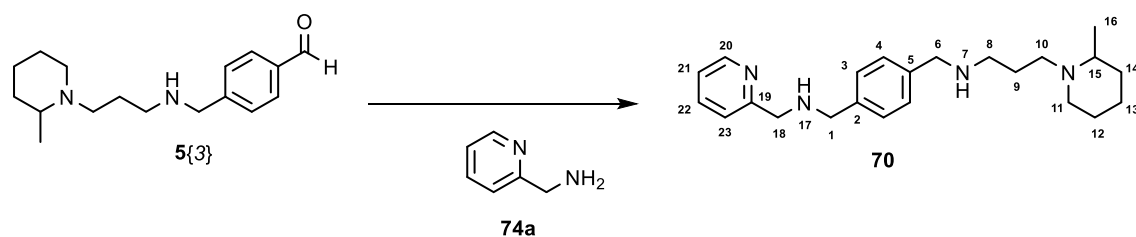
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 160.0-163.0 (C22), 139.1 (C2), 129.7-129.6 (C20), 128.2 (C3, C4), 115.0-115.2 (C21), 55.9 (C15), 53.7 (C1\*), 52.8 (C6\*), 52.4 (C18\*), 52.3 (C11<sup>2\*</sup>), 52.1 (C10<sup>2\*</sup>), 48.3 (C8), 34.6 (C14), 26.1 (C9<sup>3\*</sup>), 25.7 (C12<sup>3\*</sup>), 23.9 (C13), 19.1 (C16).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3276 (*t* N-H), 2929, 2853, 2808 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1603 1508 (Fluor) 1221 (*t* C-F), 1372 (*t* C-N), 824 (δ C-F).

**MS (70 eV, EI) m/z (%):** 382.9 (18) [M]<sup>+</sup>, 258.0 (30) [M-C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>NF]<sup>+</sup>, 227.9 (48) [M-C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 155.0 (58) [C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 139.0 (22) [C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NF]<sup>+</sup>, 126.0 (75) [C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 98.0 (100) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>F [M]<sup>+</sup>:** 383.2737; found: 383.2742.

#### 4.41- Synthesis of 3-(2-methylpiperidin-1-yl)-*N*-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)benzyl)propan-1-amine (70)



The procedure was the same as that stated above for **71** but was carried out by using 0.2888g (1.05 mmol) of 4-(((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)amino)methyl)benzaldehyde, 0.1148g of (4-fluorophenyl)methanamine (1.06 mmol) and 17 ml of methanol. Upon removal the solvent it was obtained 0.0896g (0.24 mmol, 23%) of 3-(2-methylpiperidin-1-yl)-*N*-(4-(((pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)benzyl)propan-1-amine as a yellow oil.

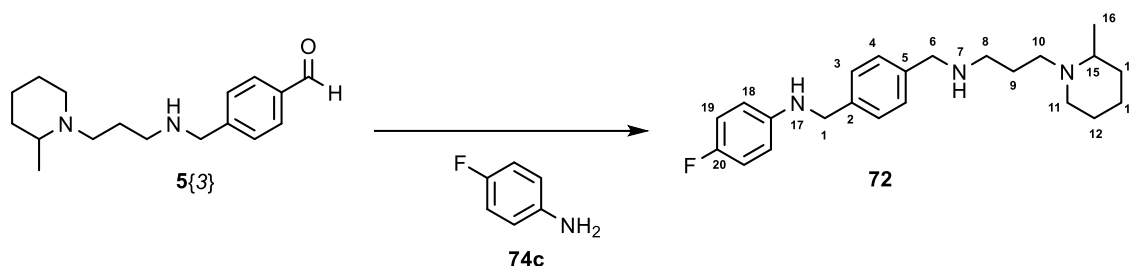
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.55 – 8.59 (m, 1H, H-C20), 7.64 (td, 1H, *J*<sub>1</sub>= 7.7Hz, *J*<sub>2</sub>= 1.8Hz, H-C22), 7.29 – 7.35 (m, 5H, H-C3, H-C4, H-C23), 7.14 – 7.18 (m, 1H, H-C21), 3.92 (s, 2H, H-C18), 3.84 (s, 2H, H-C1\*), 3.80 (s, 2H, H-C6\*), 2.90 – 2.95 (m, 1H, H-C11), 2.77 – 2.84 (m, 1H, H-C10), 2.64 – 2.74 (m, 2H, H-C8), 2.39 – 2.46 (m, 1H, H-C10), 2.35 (s, 1H, H-C15), 2.14 – 2.21 (m, 1H, H-C11), 1.52 – 1.80 (m, 6H, H-C9, H-C12, H-C13, H-C14), 1.26 – 1.33 (m, 2H, H-C13, H-C14), 1.07 (d, *J*= 6.3Hz, 3H, H-C16).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 159.7 (C19), 149.3 (C20), 136.4 (C22), 128.4 (C3\*) 128.3 (C4\*), 122.3 (C22\*), 121.9 (C52\*), 56.2 (C15), 54.5 (C18), 53.4 (C13\*), 53.2 (C63\*), 52.3 (C10), 51.8 (C11), 48.2 (C8), 34.1 (C14), 25.7 (C94\*), 24.9 (C124\*), 23.5 (C13), 18.6 (C16).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3300 (*t* N-H), 3065 (*t* Csp<sup>2</sup>), 2929, 2853, 2802 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1590 (δ N-H), 758 (δ C-H).

**MS (70 eV, EI) m/z (%):** 366.9 (6) [M]<sup>+</sup>, 258.0 (84) [M-C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 126.0 (73) [C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 112.0 (88) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 93.0 (100) [C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N]<sup>+</sup>, 158.9.

#### 4.42- Synthesis of 4-fluoro-*N*-(4-(((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)amino)methyl)benzyl)aniline (72)



The procedure was the same as that stated above for **71** but was carried out by using 0.2889g (1.05 mmol) of 4-(((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)amino) methyl)benzaldehyde, 0.1182g of (4-fluorophenyl)methanamine (1.06 mmol) and 17 ml of methanol. Upon removal the solvent it was obtained 0.0369g (0.10 mmol, 10%) of 4-fluoro-*N*-(4-(((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)amino)methyl)benzyl)aniline as a yellow oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.30 – 7.31 (m, 4H, H-C3, H-C4), 6.84 – 6.90 (m, 2H, H-C18), 6.54 – 6.57 (m, 2H, H-C19), 4.27 (s, 2H, H-C1), 3.91 (br s, 1H, H-N17), 3.77 (s, 2H, H-C6), 2.84 – 2.89 (m, 1H, H-C11), 2.71 – 2.79 (m, 1H, H-C10), 2.64 (t, *J* = 6.9Hz, 2H, H-C8), 2.33 – 2.39 (m, 1H, H-C10), 2.24 – 2.28 (m, 1H, H-C15), 2.08 – 2.14 (m, 1H, H-C11), 1.93 (br s, 1H, H-N7), 1.48 – 1.73 (m, 6H, H-C9, H-C12, H-C13, H-C14), 1.25 – 1.30 (m, 2H, H-C13, H-C14), 1.05 (d, *J* = 6.3Hz, 3H, H-C16).

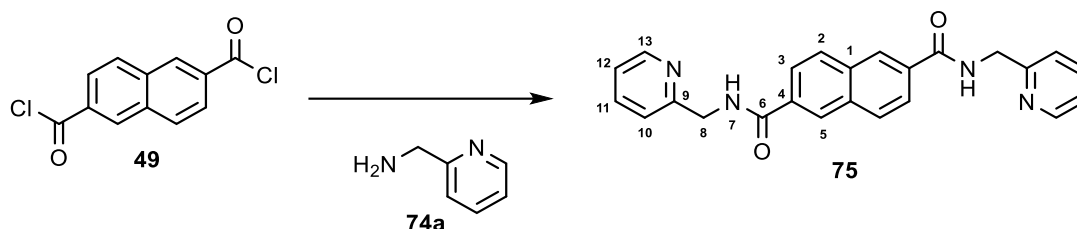
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 157.0, 154.6 (C20), 144.4 (C17), 139.5 (C5), 137.8 (C2), 128.4 (C3\*), 127.5 (C4\*), 115.7, 115.5 (C19), 113.6 (C18), 55.9 (C15), 53.7 (C6), 52.2 (C10), 52.0 (C11), 48.7 (C1), 48.3 (C8), 34.6 (C14), 26.1 (C9<sup>2\*</sup>), 25.7 (C12<sup>2\*</sup>), 23.9 (C13), 19.0 (C16).

**IR (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>):** 3300 (*t* N-H), 2930, 2853, 2806 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1511 ( $\delta$  N-H), 1221 (*t* C-F), 819 ( $\delta$  C-F).

**MS (70 eV, EI) *m/z* (%):** 369.4 (15) [M]<sup>+</sup>, 214.2 (17) [M-C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 155.2 (15) [C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 126.2 (18) [C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 112.2 (100) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 98.2 (40) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>F [M]<sup>+</sup>:** 369.2580; found: 369.2585.

#### 4.43- Synthesis of *N*<sup>2</sup>,*N*<sup>6</sup>-bis(pyridin-2-ylmethyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide (75)



In a cold solution of naphthalene-2,6-dicarbonyl dichloride (1.1601g, 4.58 mmol) in dichloromethane (45 ml) was added 1.4 ml of triethylamine and 1.0082g of pyridin-2-ylmethanamine (9.32 mmol) dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 18h and a white solid appeared, it was filtered and washed with dichloromethane to obtain 1.2131g (3.09 mmol, 67%) of *N*<sup>2</sup>,*N*<sup>6</sup>-bis(pyridin-2-ylmethyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide as a pale brown solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 8.69 (d, *J* = 5.1Hz, 2H, H-C13), 8.56 (d, *J* = 1.5Hz, 2H, H-C5), 8.32 (td, *J*<sub>1</sub> = 7.9Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.5Hz, 2H, H-C11), 8.13 (d, *J* = 8.6Hz, 2H, H-C2), 8.05 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8.5Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.5Hz, 2H, H-C3), 7.89 (d, *J* = 8.0Hz, 2H, H-C10), 7.79 – 7.70 (m, 2H, H-C12), 4.90 (s, 4H, H-C8).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 168.7 (C6), 155.7 (C9), 143.8 (C13), 143.3 (C11), 134.1 (C1), 132.4 (C4), 129.3 (C2), 127.6 (C5), 124.5 (C3), 124.4 (C12), 124.2 (C10), 42.6 (C8).

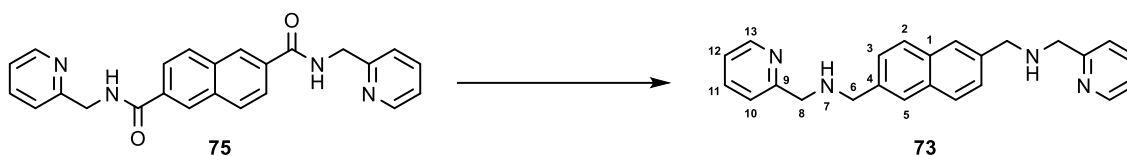
**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3285 (*t* N<sup>+</sup>-H), 3052 (*t* Csp<sup>2</sup>), 2912 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1635 (*t* C=O), 1596 (δ N<sup>+</sup>-H), 1538 (δ N-H), 766 (δ C-H oop).

**MS (ESI-TOF) *m/z* (%):** 397.2 (23) [M+1]<sup>+</sup>, 289.1 (100) [M-C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 198.1 (5) [C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 180.1 (59) [C<sub>12</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>.

**HMS (ESI-TOF) calculated for C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+1]<sup>+</sup>:** 397.1659; found: 397.1665.



#### 4.44- Synthesis of 1,1'-(naphthalene-2,6-diyl)bis(*N*-(pyridin-2-ylmethyl)methanamine) (73)



A solution of *N,N'*-bis(pyridin-2-ylmethyl)naphthalene-2,6-dicarboxamide (1.0053g, 2.53 mmol) in anhydrous THF (40 ml) was cooled at 0°C. Borane dimethylsulfide complex (1.7 ml, 22.41 mmol) was added dropwise. The mixture was refluxed for 20h under N<sub>2</sub>, cooled down to room temperature and it was acidified with 6M HCl to pH acid. The solution was stirred at room temperature for 3h. The solvent was removed *in vacuo* and the crude material was diluted with 1M NaOH solution until pH=14. The aqueous solution was extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dried with MgSO<sub>4</sub>, and concentrated. To purify the crude, it was solved in 1.25M HCl/MeOH and stirred for 2h at room temperature. The solid was filtered and washed with acetone and dichloromethane. The white solid was neutralized with 1M NaOH and extracted with dichloromethane. The solvent was removed *in vacuo* to afford 0.3829g (1.04 mmol, 41%) of *N,N'*-(naphthalene-2,6-diylbis(methylene)) bis(hexan-1-amine) as a brown oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.56 – 8.58 (m, 2H, H-C13), 7.79 (s, 2H, H-C5), 7.77 (d, *J*= 2.1Hz, 2H, H-C2), 7.64 (td, *J*<sub>1</sub>= 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub>= 1.8Hz, 2H, H-C11), 7.44 – 7.52 (m, 2H, H-C3), 7.32 (dt, *J*<sub>1</sub>= 7.8Hz, *J*<sub>2</sub>= 1.2Hz, 2H, H-C10), 7.16 (ddd, *J*<sub>1</sub>= 7.6Hz, *J*<sub>2</sub>= 4.9Hz, *J*<sub>3</sub>= 1.2Hz, 2H, H-C12), 4.00 (s, 2H, H-C8), 3.96 (s, 2H, H-C6), 2.40 (br s, 2H, H-N7).

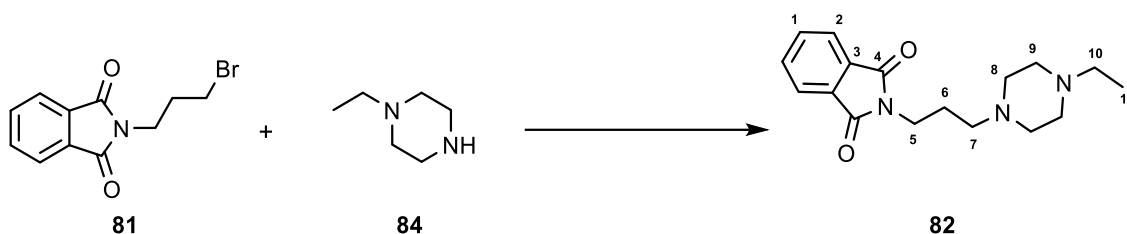
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 159.7 (C9), 149.3 (C13), 137.3 (C1), 136.4 (C11), 132.7 (C4), 127.9 (C5), 126.8 (C3), 126.4 (C2), 122.4 (C10), 121.9 (C12), 54.5 (C6), 53.6 (C8).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3308 (*t* N-H), 3051, 3010 (*t* Csp<sup>2</sup>), 2917, 2834 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1592, 1569 (*δ* N-H), 1433 (*t* C-N), 759 (*δ* C-H oop).

**MS (ESI-TOF) *m/z* (%):** 369.2 (23) [M+1]<sup>+</sup>, 261.1 (47) [M-C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 169.1 (100) [C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N]<sup>+</sup>, 154.1 (21) [C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>]<sup>+</sup>, 141.1 (40) [C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>]<sup>+</sup>.

**HMS (ESI-TOF) calculated for C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub> [M+1]<sup>+</sup>:** 369.2074; found: 369.2073.

#### 4.45- Synthesis of 2-(3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propyl)isoindoline-1,3-dione (82)



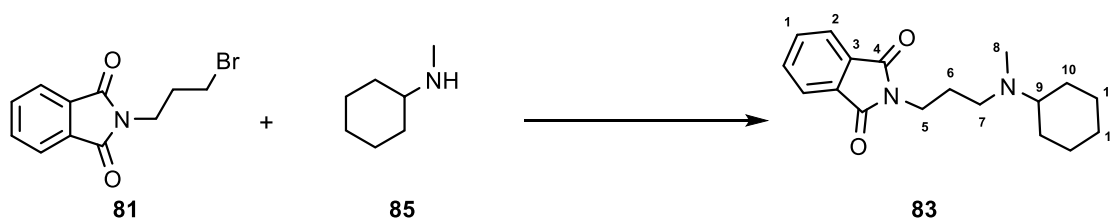
0.3414g of *N*-(4-bromoethyl)phthalimide (1.27 mmol), 0.1505g of 4-ethyl-1-piperazine (1.32 mmol) and 1.0g of anhydrous potassium carbonate were dissolved in 20 ml of anhydrous acetonitrile. The mixture was carried to reflux for 8h and the solvent was removed under reduced pressure. The crude was diluted with 30 ml of dichloromethane and extracted with water. The organic layers were dried with  $\text{MgSO}_4$  and the solvent was removed under reduced pressure to afford 0.3255g (1.08 mmol, 85%) of 2-(3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propyl)isoindoline-1,3-dione.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.81 – 7.85 (m, 2H, H-C2), 7.70 – 7.74 (m, 2H, H-C1), 3.76 (t,  $J = 6.9\text{Hz}$ , 2H, H-C5), 2.07 – 2.72 (m, 12H, H-C7, H-C8, H-C9, H-C10), 1.86 (p,  $J = 6.9\text{Hz}$ , 2H, H-C6), 1.02 (t,  $J = 7.2\text{Hz}$ , 3H, H-C11).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 168.1 (C4), 133.7 (C1), 131.9 (C3), 123.2 (C2), 56.0 (C5), 53.4 (C7), 53.0 (C8), 52.6 (C9), 52.2 (C10), 25.2 (C6), 11.8 (C11).

Spectroscopic data was identical with those reported in the literature.

#### 4.46- Synthesis of 2-(3-(cyclohexyl(methyl)amino)propyl)isoindoline-1,3-dione (**83**)



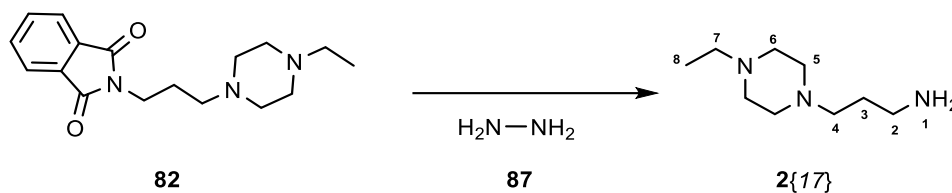
The procedure was the same as that stated above for **82** but was carried out by using 0.6834g (6.0 mmol) of *N*-(4-bromoethyl)phthalimide, 0.9423g of *N*-methylcyclohexanamine and 1.1g of anhydrous  $K_2CO_3$  in 10 ml of acetonitrile to give 1.3520g of 2-(3-(cyclohexyl(methyl)amino)propyl)isoindoline-1,3-dione (4.5 mmol, 75%).

**$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.81 – 7.85 (m, 2H, H-C2), 7.68 – 7.71 (m, 2H, H-C1), 3.72 (t,  $J= 6.9$ Hz, 2H, H-C5), 2.50 – 2.53 (m, 2H, H-C7), 2.31 – 2.34 (m, 1H, H-C9), 2.22 (s, 3H, H-C8), 1.78 – 1.83 (m, 3H, H-C6, H-C10), 1.72 – 1.75 (m, 1H, H-C11), 1.58 – 1.61 (m, 1H, H-C12), 1.15 – 1.20 (m, 2H, H-C11, H-C12), 1.06 – 1.10 (m, 1H, H-C10).

**$^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 168.4 (C4), 133.8 (C1), 132.2 (C3), 123.1 (C2), 62.6 (C9), 51.2 (C7), 37.3 (C8), 36.5 (C5), 28.5 (C10), 26.9 (C6), 26.4 (C12), 26.0 (C11).

Spectroscopic data was identical with those reported in the literature.

#### 4.47- Synthesis of 3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propan-1-amine (2{17})



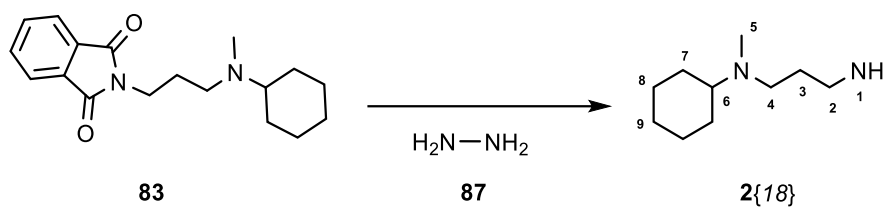
2-(3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propyl)isoindoline-1,3-dione (0.1102g, 0.366 mmol) was dissolved in 5 ml of tetrahydrofuran. The solution was treated with 2ml of hydrazine under reflux for 16h. A white solid corresponding to the phthalhydrazide was filtered and the solution was concentrated. After a second filtration, the solvent was removed under reduced pressure to afford 0.0591g of 3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propan-1-amine (0.35 mmol, 94%) as a yellow liquid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 2.70 – 2.81 (m, 2H, H-C2), 2.38 – 2.65 (m, 12H, H-C4, H-C5, H-C6, H-C7), 2.32 (br s, 2H, H-N1), 1.62 – 1.69 (m, 2H, H-C3), 1.08 (d, *J* = 6.9Hz, H-C8).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 56.5 (C4), 53.2 (C5\*), 52.8 (C6\*), 52.3 (C7\*), 40.7 (C2), 30.1 (C3), 11.9 (C8).

Spectroscopic data was identical with those reported in the literature.

#### 4.48- Synthesis of *N*<sup>1</sup>-cyclohexyl-*N*<sup>1</sup>-methylpropane-1,3-diamine (2{18})



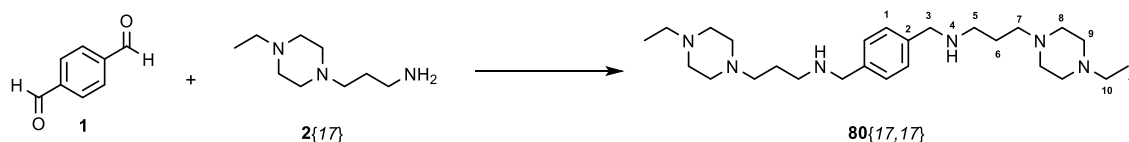
The procedure was the same as that stated above for 2{17} but was carried out by using 0.4176g (1.39 mmol) of 2-(3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propyl)isoindoline-1,3-dione, 2.0 ml of hydrazine and 10 ml of tetrahydrofuran to give 0.1095g of *N*<sup>1</sup>-cyclohexyl-*N*<sup>1</sup>-methylpropane-1,3-diamine (0.64 mmol, 46%).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 2.74 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-C2), 2.47 – 2.49 (m, 2H, H-C4), 2.34 – 2.38 (br m, 2H, H-N1), 2.22 – 2.26 (m, 1H, H-C6), 2.15 – 2.18 (m, 3H, H-C5), 1.75 – 1.80 (m, 2H, H-C7, H-C8), 1.54 – 1.63 (m, 3H, H-C3, H-C9), 1.17 – 1.23 (m, 2H, H-C8, H-C9), 1.05 – 1.11 (m, 1H, H-C7).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 62.7 (C6), 51.4 (C4), 40.8 (C2), 37.6 (C5), 31.2 (C3), 28.4 (C7), 26.3 (C9), 26.0 (C8).

Spectroscopic data was identical with those reported in the literature.

#### 4.49- Synthesis of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propan-1-amine) (80{17,17})



0.1659g (0.96 mmol) of 3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propan-1-amine, 0.0655g (0.48 mmol) of terephthalaldehyde and sodium sulphate were dissolved in 10ml of anhydrous methanol. The mixture was subjected to microwave irradiation for 2h at 100°C. It appeared a white solid that was filtered and it was added 0.1002g (3.00 mmol) of NaBH<sub>4</sub>. The solution was stirred at room temperature for 24h and a little portion of water was added. The solution was extracted with dichloromethane. The organic layers were dried with MgSO<sub>4</sub> and after the solvent was eliminated under reduced pressure, 0.1112g (0.25 mmol, 51%) of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propan-1-amine) was obtained as a brown oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.27 (s, 4H, H-C1), 3.77 (s, 4H, H-C3), 2.65 – 2.70 (m, 4H, H-C5), 2.38 – 2.64 (m, 24H, H-C7, H-C8, H-C9, H-C10), 2.08 (br s, 2H, H-N4), 1.70 – 1.75 (m, 4H, H-C6), 1.05 – 1.09 (m, 6H, H-C11).

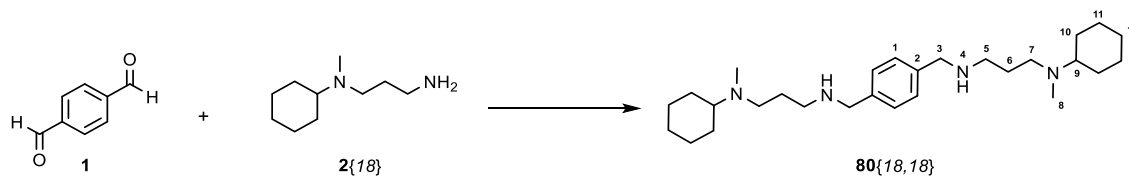
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 138.9 (C2), 128.2 (C1), 57.1 (C3), 53.7 (C8), 53.3 (C7), 52.8 (C9), 52.3 (C10), 48.2 (C5), 26.9 (C6), 12.0 (C11).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3420 (*t* N-H), 2942, 2806 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1544 (δ N-H), 1402 (δ Csp<sup>3</sup>-H).

**MS (EI) m/z (%):** 444.1 (25) [M]<sup>+</sup>, 387.1 (6) [M-C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>]<sup>+</sup>, 273.0 (27) [C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 141.1 (33) [C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 127.1 (96) [C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 84.0 (100) [C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>.

**HMS (EI) calculated for C<sub>26</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub> [M]<sup>+</sup>:** 444.3940; found: 444.3940.

#### 4.50- Synthesis of $N^1, N^1$ -(1,4-phenylenebis(methylene))bis( $N^3$ -cyclohexyl- $N^3$ -methylpropane-1,3-diamine) (**80**{18,18})



The procedure was the same as that stated above for **80**{17,17} but was carried out by using 0.2906g (1.70 mmol) of  $N^1$ -cyclohexyl- $N^1$ -methylpropane-1,3-diamine, 0.1118g of terephthalaldehyde (0.83 mmol) and 1.0g of sodium borohydride in 10 ml of tetrahydrofuran to give 0.3143g of  $N^1, N^1$ -(1,4-phenylenebis(methylene))bis( $N^3$ -cyclohexyl- $N^3$ -methylpropane-1,3-diamine) (0.71 mmol, 85%) as a brown oil.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.27 (s, 4H, H-C1), 3.77 (s, 4H, H-C3), 2.65 – 2.70 (m, 4H, H-C5), 2.48 – 2.52 (m, 4H, H-C7), 2.35 – 2.39 (m, 2H, H-C9), 2.25 (s, 6H, H-C8), 2.08 (br s, 2H, H-N4), 1.73 – 1.77 (m, 2H, H-C10, H-C11), 1.65 – 1.71 (m, 3H, H-C6, H-C12), 1.20 – 1.25 (m, 2H, H-C11, H-C12), 1.07 – 1.11 (m, 1H, H-C10).

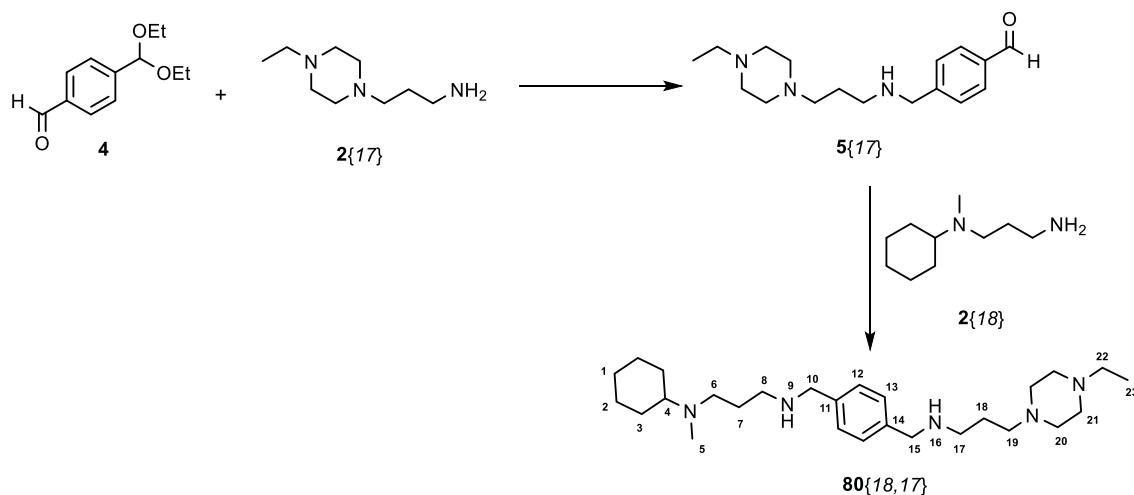
**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 138.8 (C2), 128.3 (C1), 65.8 (C3), 62.7 (C5), 52.1 (C9), 48.2 (C7), 37.6 (C8), 28.5 (C10), 27.7 (C6), 26.3 (C12), 26.0 (C11).

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3423 ( $\nu$  N-H), 2928, 2853 ( $\nu$   $\text{Csp}^3$ -H), 1539 ( $\delta$  N-H), 1450, 1391 ( $\delta$   $\text{Csp}^3$ -H).

**MS (ESI-TOF)  $m/z$  (%):** 443.4 (1)  $[\text{M}+1]^+$ , 271.8 (62)  $[\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_3]^+$ , 139.9 (35)  $[\text{C}_9\text{H}_8\text{N}]^+$ , 125.9 (100)  $[\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}]^+$ , 111.9 (32)  $[\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}]^+$ , 84.0 (27)  $[\text{C}_6\text{H}_{12}]^+$ .

**HMS (ESI -TOF) calculated for  $\text{C}_{28}\text{H}_{51}\text{N}_4$   $[\text{M}+1]^+$ :** 443.4114; found: 443.4109.

#### 4.51- Synthesis of *N*<sup>1</sup>-cyclohexyl-*N*<sup>3</sup>-(4-(((3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propyl)amino)methyl)benzyl)-*N*<sup>1</sup>-methylpropane-1,3-diamine (**80**{18,17})



##### First step:

4-(diethoxymethyl)benzaldehyde (0.3421g, 1.64 mmol) and 3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propan-1-amine (0.4620g, 1.60 mmol) were dissolved in 10 ml of anhydrous methanol with the presence of sodium sulfate. The mixture was carried to reflux for 24h under N<sub>2</sub> atmosphere. After the reflux, the solution was filtered and 0.050g of sodium borohydride (1.32 mmol) was added, the solution was stirred at room temperature for 8h, then a little portion of water was added and the product was extracted with dichloromethane. The organic layers were dried with MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure. The intermediate obtained was treated with 5 ml of 2M HCl and the solution was stirred at room temperature for 2h. The resulting mixture was neutralized with 1M NaOH and it was extracted with dichloromethane. The organic layers were dried with MgSO<sub>4</sub> and the solvent was extracted under reduced pressure.

##### Last step:

The intermediate obtained **5**{17} (0.2921g, 1.01 mmol) was treated with the same procedure described in the First step but using 0.1769g (1.04 mmol) of *N*<sup>1</sup>-cyclohexyl-*N*<sup>1</sup>-methylpropane-1,3-diamine as the amine to make the reaction.

When the solvent was evaporated under reduced pressure, it was obtained 0.4132g (0.93 mmol, 57%) of *N*<sup>1</sup>-cyclohexyl-*N*<sup>3</sup>-(4-(((3-(4-ethylpiperazin-1-yl)propyl)amino)methyl)benzyl)-*N*<sup>1</sup>-methylpropane-1,3-diamine.



**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.26 (s, 4H, H-C12, H-C13), 3.80 (s, 4H, H-C10, H-C15), 2.69 – 2.88 (m, 4H, H-C8, H-C17), 2.36 – 2.56 (m, 15H, H-C4, H-C6, H-C19, H-C20, H-C21, H-C22), 2.28 – 2.33 (m, 3H, H-C5), 1.61 – 1.82 (m, 10H, H-C1, H-C2, H-C7, H-C18, H-N9, H-N16), 1.22 – 1.28 (m, 2H, H-C3), 1.08 (s, 3H, H-C23).

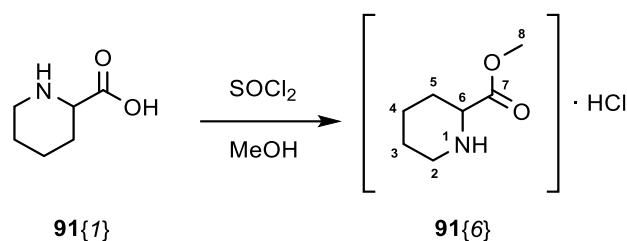
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 128.5 (C13\*), 128.4 (C14\*), 62.9 (C4), 57.2 (C10<sup>2\*</sup>), 53.4 (C15<sup>2\*</sup>), 53.2 (C21<sup>3\*</sup>), 52.8 (C20<sup>3\*</sup>), 52.7 (C22<sup>3\*</sup>), 52.3 (C6<sup>3\*</sup>), 48.5 (C19<sup>3\*</sup>), 48.1 (C5), 37.1 (C8, C17), 29.7 (C3), 28.1 (C7<sup>4\*</sup>), 26.4 (C18<sup>4\*</sup>), 26.1 (C1<sup>5\*</sup>), 25.8 (C2<sup>5\*</sup>), 11.9 (C23).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3375 (f N-H), 2924, 2852, 2802 (f Csp<sup>3</sup>-H), 1586 (δ N-H), 1464 (δ Csp<sup>3</sup>-H).

**MS (ESI-TOF) m/z (%):** 444.2 (3) [M+1]<sup>+</sup>, 385.2 (10) [M-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N]<sup>+</sup>, 359.2 (19) [M-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>]<sup>+</sup>, 272.2 (37) [C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 161.0 (15) [C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 139.9 (27) [C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N]<sup>+</sup>, 125.8 (100) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 103.5 (25) [C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>.

**HMS (ESI -TOF) calculated for C<sub>28</sub>H<sub>51</sub>N<sub>4</sub> [M+1]<sup>+</sup>:** 444.4066; found: 444.4066.

#### 4.52- Synthesis of methyl piperidine-2-carboxylate hydrochloride (91{6})



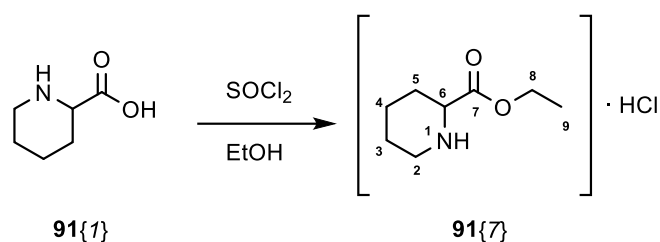
A solution of piperidine-2-carboxylic acid (1.0063g, 7.79 mmol) in anhydrous methanol (16 ml) was cooled to 0°C. 1.6 ml of thionyl chloride (2.6208g, 22.02 mmol) was added dropwise, the solution was stirred at 0°C for 30 min and then was carried to room temperature and it was stirred for 24h. The solvent was evaporated under reduced pressure and a brown solid was obtained. Then the solid was filtered and washed with diethyl ether and dichloromethane to obtain 1.3976g of methyl piperidine-2-carboxylate hydrochloride (7.78 mmol, 100%) as a white crystalline solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 3.72 (s, 3H, H-C8), 3.37 (dd,  $J_1=9.9\text{Hz}$ ,  $J_2=3.2\text{Hz}$ , 1H, H-C6), 2.98 – 3.15 (m, 1H, H-C2), 2.57 – 2.77 (m, 1H, H-C2), 2.04 (br s, 1H, H-N1), 1.91 – 2.01 (m, 1H, H-C5), 1.72 – 1.78 (m, 1H, H-C4), 1.34 – 1.67 (m, 4H, H-C4, H-C5, H-C3).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 173.9 (C7), 58.6 (C6), 51.8 (C8), 45.7 (C2), 29.2 (C5), 25.8 (C4), 24.0 (C3).

Spectroscopic data was identical with those reported in the literature.

### 4.53- Synthesis of ethyl piperidine-2-carboxylate (91{7})



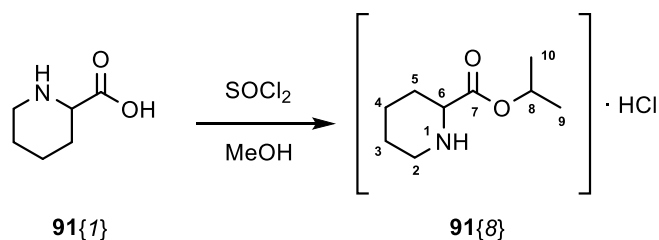
The procedure was the same as that stated above for **91{6}** but was carried out by using 1.3442g (10.41 mmol) of piperidine-2-carboxylic acid, 2.0 ml of thionyl chloride (3.2760g, 27.52 mmol) and 30 ml of ethanol to give 2.0121g of ethyl piperidine-2-carboxylate (10.39 mmol, 100%) as a white crystalline solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 4.30 (q,  $J = 7.1\text{Hz}$ , 2H, H-C8), 4.01 (dd,  $J_1 = 11.3\text{Hz}$ ,  $J_2 = 3.5\text{Hz}$ , 1H, H-C6), 3.36 – 3.48 (m, 1H, H-C2), 2.96 – 3.08 (m, 1H, H-C2), 2.22 – 2.34 (m, 1H, H-C5), 1.83 – 1.96 (m, 3H, H-C3, H-C4, H-N1), 1.57 – 1.79 (m, 3H, H-C3, H-C4, H-C5), 1.32 (t,  $J = 7.1\text{Hz}$ , 3H, H-C9).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 168.4 (C7), 62.3 (C8), 56.5 (C6), 43.7 (C2), 25.8 (C5), 21.4 (C3\*), 21.3 (C4\*), 12.9 (C9).

Spectroscopic data was identical with those reported in the literature.

#### 4.54- Synthesis of isopropyl piperidine-2-carboxylate (91{8})



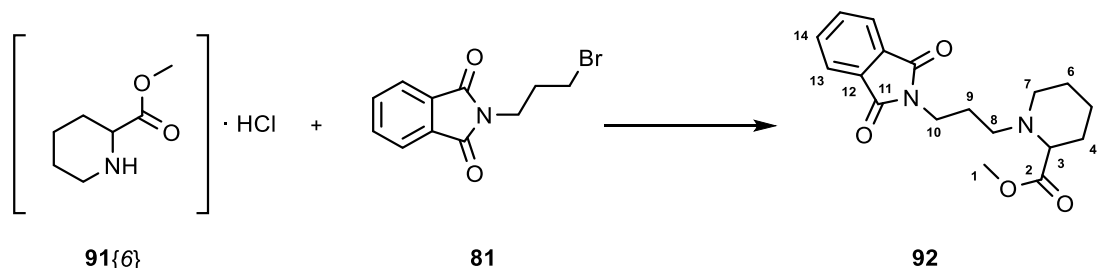
The procedure was the same as that stated above for **91{6}** but was carried out by using 1.2718g (9.85 mmol) of piperidine-2-carboxylic acid, 2.0 ml of thionyl chloride (3.2760g, 27.52 mmol) and 30 ml of isopropanol to give 2.0043g of isopropyl piperidine-2-carboxylate (9.65 mmol, 98%) as a white crystalline solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 5.13 (hept, *J* = 6.3Hz, 1H, H-C8), 3.95 – 3.98 (m, 1H, H-C6), 3.34 – 3.51 (m, 1H, H-C2), 2.97 – 3.05 (m, 1H, H-C2), 2.22 – 2.31 (m, 1H, H-C5), 1.81 – 2.02 (m, 3H, H-C3, H-C4, H-N1), 1.57 – 1.78 (m, 3H, H-C3, H-C4, H-C5), 1.32 (d, *J* = 4.3Hz, 3H, H-C9\*) 1.30 (d, *J* = 4.3Hz, 3H, H-C10\*).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm):** 168.1 (C7), 70.6 (C8), 56.6 (C6), 43.7 (C2), 25.8 (C5), 21.5 (C3\*), 21.4 (C4\*), 20.4 (C9, C10).

Spectroscopic data was identical with those reported in the literature.

#### 4.55- Synthesis of methyl 1-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)propyl)piperidine-2-carboxylate (92)



A solution of methyl piperidine-2-carboxylate hydrochloride (1.4688g, 8.18 mmol), 2-(3-bromopropyl)isoindoline-1,3-dione (2.4255g, 3g.73 mmol) and triethylamine (1.0032g, 9.91 mmol) in acetonitrile (30 ml) was carried to reflux for 48h. The mixture was cooled down to room temperature and filtered. A little portion of water was added and the solution was extracted with dichloromethane. The organic layers were dried with  $\text{MgSO}_4$  and when the solvent was eliminated under reduced pressure it was obtained 2.1342g of methyl 1-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)propyl)piperidine-2-carboxylate (6.46 mmol, 79%) as a brown oil.

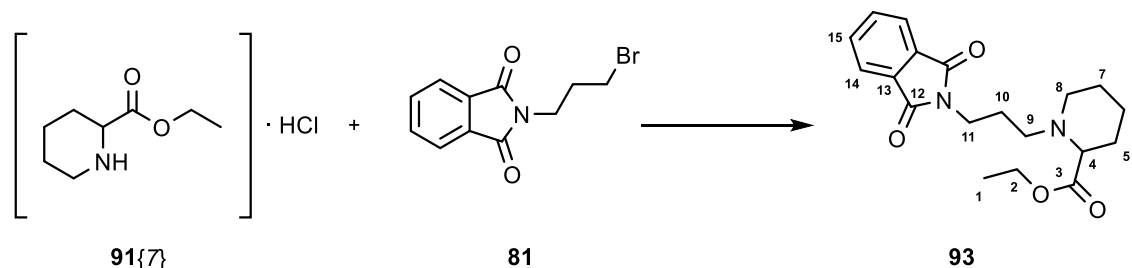
**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.84 (dd,  $J_1= 5.5\text{Hz}$ ,  $J_2= 3.0\text{Hz}$ , 2H, H-C13), 7.71 (dd,  $J_1= 5.5\text{Hz}$ ,  $J_2= 3.0\text{Hz}$ , 2H, H-C14), 3.69 – 3.84 (m, 2H, H-C10), 3.67 (s, 3H, H-C1), 3.16 (dd,  $J_1= 6.7\text{Hz}$ ,  $J_2= 5.0\text{Hz}$ , 1H, H-C3), 2.97 – 3.03 (m, 1H, H-C6), 2.64 (ddd,  $J_1= 12.7\text{Hz}$ ,  $J_2= 7.8\text{Hz}$ ,  $J_3= 6.8\text{Hz}$ , 1H, H-C8), 2.40 (ddd,  $J_1= 12.7\text{Hz}$ ,  $J_2= 7.8\text{Hz}$ ,  $J_3= 6.8\text{Hz}$ , 1H, H-C8), 2.20 – 2.26 (m, 1H, H-C6), 1.79 – 1.94 (m, 2H, H-C9), 1.71 – 1.77 (m, 2H, H-C4), 1.45 – 1.64 (m, 3H, H-C5, H-C7), 1.28 – 1.42 (m, 1H, H-C5).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 174.0 (C2), 168.3 (C11), 133.8 (C14), 132.2 (C12), 123.1 (C13), 64.4 (C3), 54.7 (C8), 51.4 (C1), 49.6 (C6), 36.4 (C10), 29.3 (C4), 25.6 (C9), 25.3 (C7), 22.2 (C5).

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 2938, 2854 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1771, 1712 (*t* C=O), 1395 (*t* C-N), 720.

**OEA** Calculated for  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$  C: 65.44% H: 6.71% N: 8.48% found C: 65.14% H: 6.66% N: 8.32%

#### 4.56- Synthesis of ethyl 1-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)propyl)piperidine-2-carboxylate (93)



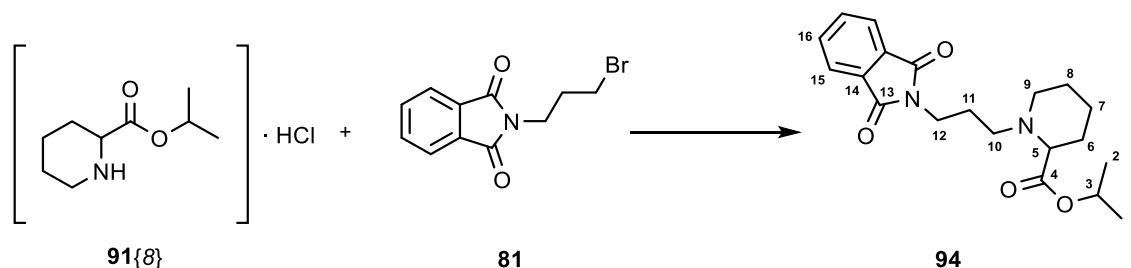
The procedure was the same as that stated above for **92** but was carried out by using 1.8853g (9.73 mmol) of ethyl piperidine-2-carboxylate hydrochloride, 2.9282g (10.92 mmol) of 2-(3-bromopropyl)isoindolin-1,3-dione and 1.5246g of triethylamine in 30 ml of acetonitrile to give 1.8770g of ethyl 1-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)propyl)piperidine-2-carboxylate (5.45 mmol, 56%) as a brown oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.79 – 7.94 (m, 2H, H-C14), 7.63 – 7.77 (m, 2H, H-C15), 4.14 (q, *J* = 7.1Hz, 2H, H-C2), 3.57 – 3.94 (m, 2H, H-C11), 3.12 (dd, *J*<sub>1</sub> = 6.7Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.1Hz, 1H, H-C4), 2.99 – 3.04 (m, 1H, H-C7), 2.65 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 12.8Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.9Hz, *J*<sub>3</sub> = 6.9Hz, 1H, H-C9), 2.39 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 12.8Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.9Hz, *J*<sub>3</sub> = 6.9Hz, 1H, H-C9), 2.19 – 2.25 (m, 1H, H-C7), 1.81 – 1.98 (m, 2H, H-C10), 1.70 – 1.81 (m, 2H, H-C5), 1.46 – 1.63 (m, 3H, H-C6, H-C8), 1.31 – 1.42 (m, 1H, H-C6), 1.25 (t, *J* = 7.1Hz, 3H, H-C1).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 173.6 (C3), 168.3 (C12), 133.8 (C15), 132.2 (C13), 123.1 (C14), 64.5 (C4), 60.2 (C2), 53.6 (C9), 49.7 (C7), 36.4 (C11), 29.4 (C5), 25.6 (C10), 25.3 (C8), 22.2 (C6), 14.3 (C1).

Spectroscopic data was identical with those reported in the literature.

#### 4.57- Synthesis of isopropyl 1-(3-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propyl)piperidine-2-carboxylate (94)



The procedure was the same as that stated above for **92** but was carried out by using 1.9288g (9.31 mmol) of isopropyl piperidine-2-carboxylate hydrochloride, 2.7521g (10.26 mmol) of 2-(3-bromopropyl)isoindoline-1,3-dione and 1.1326g of triethylamine in 40 ml of acetonitrile. It needs a second purification step, it consist in an automatic flash chromatography (basic alumina; 95:5:0.5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 0.2962g of isopropyl 1-(3-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propyl)piperidine-2-carboxylate (0.83 mmol, 9%) as a brown oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.81 – 7.86 (m, 2H, H-C15), 7.67 – 7.73 (m, 2H, H-C16), 5.02 (h, *J* = 6.3Hz, 1H, H-C3), 3.57 – 3.86 (m, 2H, H-C12), 3.07 – 3.10 (m, 1H, H-C5), 2.98 – 3.04 (m, 1H, H-C8), 2.58 – 2.73 (m, 1H, H-C10), 2.37 – 2.43 (m, 1H, H-C10), 2.19 – 2.26 (m, 1H, H-C8), 1.83 – 1.91 (m, 2H, H-C11), 1.68 – 1.75 (m, 2H, H-C6), 1.45 – 1.65 (m, 2H, H-C7, H-C9), 1.33 – 1.38 (m, 1H, H-C7), 1.24 (d, *J* = 6.2Hz, 3H, H-C1\*), 1.22 (d, *J* = 6.3Hz, 3H, H-C2\*).

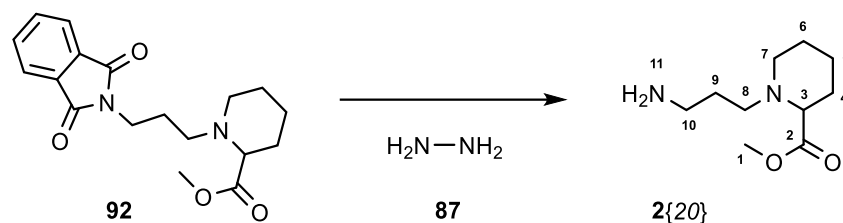
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 173.1 (C4), 168.3 (C13), 133.8 (C16), 132.2 (C14), 123.1 (C15), 67.6 (C3), 64.6 (C5), 53.6 (C10), 49.7 (C8), 36.4 (C12), 29.3 (C6), 25.6 (C11), 25.3 (C9), 22.2 (C7), 21.8 (C1, C2).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 2978, 2936, 2855 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1772, 1712 (*t* C=O), 1395 (*t* C-O), 720.

**MS (70 eV, EI) m/z (%):** 358.2 (1) [M]<sup>+</sup>, 271.1 (100) [M-C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 188.1 (64) [M-C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 160.0 (57) [C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>,

**OEA** Calculated for C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> C: 67.02% H: 7.31% N: 7.82% found C: 67.02% H: 7.13% N: 7.72%

#### 4.58- Synthesis of methyl 1-(3-aminopropyl)piperidine-2-carboxylate (2{20})



Methyl 1-(3-(1,3-dioxisoindolin-2-yl)propyl)piperidine-2-carboxylate (0.9225g, 2.79 mmol) was dissolved in ethanol (20 ml) and hydrazine (0.55 ml, 17.5 mmol) was added. The solution was carried to reflux for 1h. A white solid appeared and it was filtered. The solution was concentrated *in vacuo* and a little portion of ethyl acetate was added; the solution was filtered again. The solvent was eliminated in reduced pressure to afford 0.4802g of methyl 1-(3-aminopropyl)piperidine-2-carboxylate (2.40 mmol, 84%)

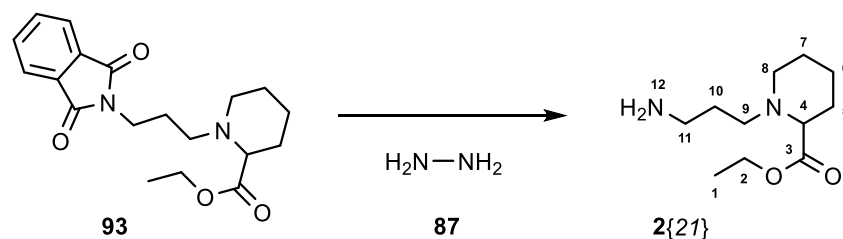
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 3.72 (s, 3H, H-C1), 2.95 – 3.22 (m, 2H, H-C3, H-C7), 2.73 (td,  $J_1= 6.7\text{Hz}$ ,  $J_2= 2.5\text{Hz}$ , 2H, H-C10), 2.57 (ddd,  $J_1= 12.5\text{Hz}$ ,  $J_2= 8.5\text{Hz}$ ,  $J_3= 7.0\text{Hz}$ , 1H, H-C8), 2.29 (ddd,  $J_1= 12.5\text{Hz}$ ,  $J_2= 8.5\text{Hz}$ ,  $J_3= 7.0\text{Hz}$ , 1H, H-C8), 2.10 (ddd,  $J_1= 11.5\text{Hz}$ ,  $J_2= 7.1\text{Hz}$ ,  $J_3= 5.6\text{Hz}$ , 1H, H-C7), 1.51 – 1.92 (m, 9H, H-C4, H-C5, H-C6, H-C9, H-N11), 1.28 – 1.47 (m, 1H, H-C5).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 174.4 (C7), 65.7 (C3), 54.2 (C8), 51.6 (C1), 50.6 (C7), 40.5 (C10), 30.1 (C4\*), 29.7 (C9), 25.2 (C6), 22.8 (C5).

Spectroscopic data was identical with those reported in the literature.



#### 4.59- Synthesis of ethyl 1-(3-aminopropyl)piperidine-2-carboxylate (2{21})



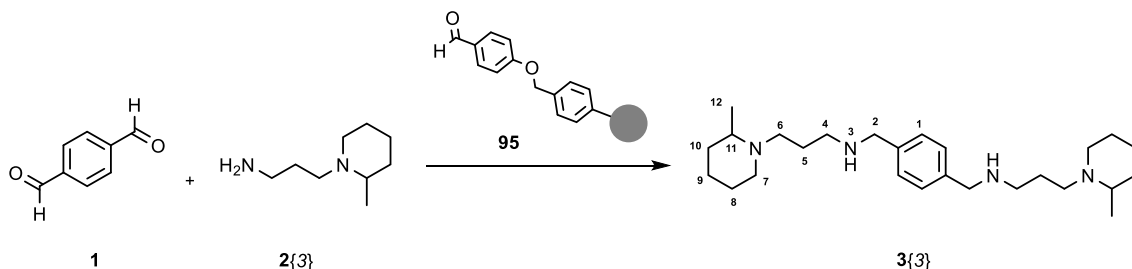
The procedure was the same as that stated above for 2{20} but was carried out by using 1.8740g (5.44 mmol) of ethyl 1-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)propyl)piperidine-2-carboxylate and 1.10 ml of hydrazine (35.02 mmol) in 40 ml of ethanol to afford 1.0259g of ethyl 1-(3-aminopropyl)piperidine-2-carboxylate (4.79 mmol, 88%) as a yellow liquid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 4.19 (q, *J* = 7.1Hz, 2H, H-C2), 3.10 (dt, *J*<sub>1</sub> = 11.5Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.4Hz, 1H, H-C9), 3.00 (dd, *J*<sub>1</sub> = 9.0Hz, *J*<sub>2</sub> = 3.7Hz, 1H, H-C4), 2.80 (br s, 2H, H-N12), 2.70 – 2.86 (m, 2H, H-C11), 2.55 – 2.62 (m, 1H, H-C8), 2.22 – 2.38 (m, 1H, H-C8), 2.01 – 2.18 (m, 1H, H-C9), 1.52 – 1.87 (m, 7H, H-C10, H-C5, H-C6, H-C7), 1.30 – 1.38 (m, 1H, H-C6), 1.27 (t, *J* = 7.1Hz, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 174.1 (C3), 65.8 (C4), 60.5 (C2), 54.3 (C8), 50.7 (C9), 40.4 (C11), 29.8 (C5\*), 29.2 (C7\*), 25.2 (C10), 22.9 (C6), 14.2 (C1).

Spectroscopic data was identical with those reported in the literature.

#### 4.60- Synthesis of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) using scavengers (3{3})

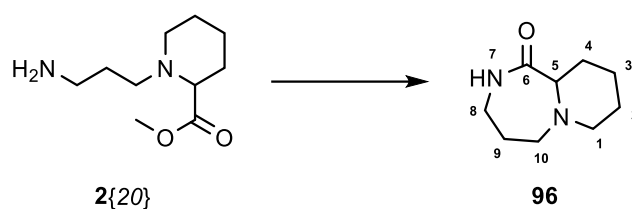


0.0370g (0.276 mmol) of terephthalaldehyde and 0.1772g (1.133 mmol) of 3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine are dissolved in 5 ml of MeOH. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added and the mixture was heated under reflux for 24h. Afterwards, the solution was filtered and MeOH evaporated under reduced pressure. A yellow oil is obtained. Then the obtained product was dissolved in 5 ml of THF and 0.4640g (mmol) of scavenger **95** were added. The mixture was heated under reflux for 21h. The solid was filtered and washed with THF. The solvent was evaporated under reduced pressure to afford 0.1135g (0.276 mmol) of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) as a yellow oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.27 (s, 4H, H-C1), 3.77 (s, 4H, H-C2), 2.81 – 2.88 (m, 2H, H-C7), 2.67 – 2.74 (m, 2H, H-C9), 2.63 (t, *J*= 6.9Hz, 4H, H-C4), 2.31 – 2.40 (m, 2H, H-C6), 2.24 – 2.27 (m, 2H, H-C11), 2.14 (br s, 2H, H-N3), 2.07 – 2.16 (m, 2H, H-C7), 1.68 (quint, *J*= 6.9Hz, 4H, H-C5), 1.56 – 1.63 (m, 2H, H-C8), 1.52 – 1.59 (m, 2H, H-C9\*), 1.47 – 1.52 (m, 2H, H-C10\*), 1.32 – 1.46 (m, 2H, H-C8), 1.19 – 1.28 (m, 4H, H-C9, H-C10), 1.05 (d, *J*= 6.3Hz, 6H, H-C12).

Spectroscopic data was identical with those reported in the literature.<sup>[5]</sup>

#### 4.61- Synthesis of 1,5-diazabicyclo[5.4.0]undecan-6-one (96)



0.5380g (2.68 mmol) of methyl 1-(3-aminopropyl)piperidine-2-carboxylate was dissolved in 50 ml of xylene and 0.01g of *p*-toluenesulfonic acid. The mixture was heated under reflux for 24h in a  $\text{N}_2$  atmosphere. Then the solvent was removed under reduced pressure to afford 0.1780g (mmol, %) of 1,5-diazabicyclo[5.4.0]undecan-6-one as a brown solid.

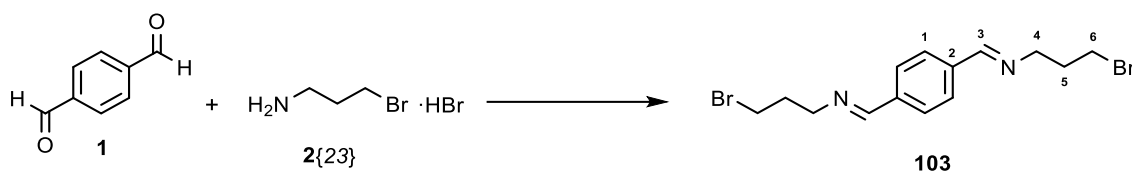
**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 5.96 (s, 1H, H-N7), 2.97 – 3.74 (m, 4H, H-C1, H-C10), 2.19 – 2.92 (m, 3H, H-C5, H-C8), 1.76 – 1.90 (m, 4H, H-C4\*, H-C9\*), 1.56 – 1.72 (m, 4H, H-C2\*, H-C3\*).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 177.4 (C6), 66.8 (C5), 55.9 (C1\*), 52.3 (C10\*), 40.4 (C8), 29.16 (C32\*), 27.5 (C92\*), 26.3 (C42\*), 22.4 (C22\*).

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3280, 3194 (*t* N-H), 2936, 2856 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1653 (*t* C=O).

**MS (70 eV, EI)  $m/z$  (%):** 168.2 (30)  $[\text{M}]^+$ , 139.1 (32)  $[\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}]^+$ , 111.1 (39)  $[\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2\text{O}]^+$ , 98.0 (100)  $[\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2]^+$ , 83.0 (74)  $[\text{C}_5\text{H}_9\text{N}]^+$ , 55.0 (55)  $[\text{C}_3\text{H}_7\text{N}]^+$ .

#### 4.62- Synthesis of (1*E*,1'*E*)-1,1'-(1,4-phenylene)bis(*N*-(3-bromopropyl)methanimine) (103)



3-bromopropan-1-amine hydrobromide (1.3301g, 6.08 mmol) and triethylamine (1.0 ml, 7.17 mmol) were dissolved in chloroform (25 ml) and got stirred for 5 minutes. Terephthalaldehyde (0.3104g, 2.31 mmol) was added and the solution was stirred at room temperature for 48h in presence of  $\text{MgSO}_4$ . The mixture was filtered and extracted with water. After eliminate the solvent under reduced pressure, it was obtained 0.8605g of (1*E*,1'*E*)-1,1'-(1,4-phenylene)bis(*N*-(3-bromopropyl)methanimine) (2.30 mmol, 100%) as a yellow oil.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 8.36 (t,  $J = 1.4\text{Hz}$ , 2H, H-C3), 7.78 (s, 4H, H-C1), 3.78 (td,  $J_1 = 6.4\text{Hz}$ ,  $J_2 = 1.4\text{Hz}$ , 4H, H-C4), 3.51 (t,  $J = 6.4\text{Hz}$ , 4H, H-C6), 2.28 (p,  $J = 6.4\text{Hz}$ , 4H, H-C5).

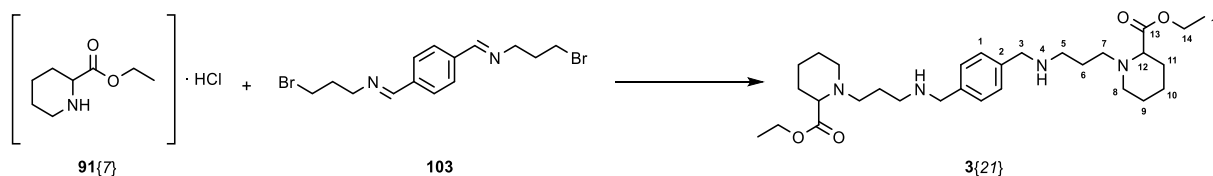
**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 161.5 (C3), 138.0 (C2), 128.3 (C1), 58.9 (C4), 33.2 (C5), 31.6 (C6).

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 2936, 2842 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1642 (*t* C=N), 1041 (*t* C-Br).

**MS (70 eV, EI)  $m/z$  (%):** 374.1 (3)  $[\text{M}]^+$ , 294.2 (3)  $[\text{M}-\text{Br}]^+$ , 266.2 (46)  $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{Br}]^+$ , 147.1 (100)  $[\text{C}_4\text{H}_7\text{NBr}]^+$ , 130.1 (17)  $[\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2]^+$ .

**OEA** Calculated for  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{Br}_2\text{N}_2$  C: 44.95% H: 4.85% N: 7.49% found C: 45.16% H: 5.07% N: 7.30%

#### 4.63- Synthesis of diethyl 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene))bis(azanediyl))bis(propane-3,1-diyl))bis(piperidine-2-carboxylate) (3{21})



0.3951g (2.04 mmol) of ethyl piperidine-2-carboxylate hydrochloride was dissolved with a concentrated solution of sodium bicarbonate, the ethylpipercolinate was extracted with chloroform (3x25 ml). The organic layers were dried with  $\text{MgSO}_4$  and the solvent was removed under reduced pressure. After this, 0.3779g (1.01 mmol) of (1E,1'E)-1,1'-(1,4-phenylene)bis(N-(3-bromopropyl)methanimine), 0.3175g (2.02 mmol) of ethylpipercolinate and 0.1396 g (1.01 mmol) of potassium carbonate were dissolved in acetonitrile (25 ml). The mixture was stirred at 60 °C for 12 hours in a  $\text{N}_2$  atmosphere.

The mixture was allowed to cool down to room temperature and it was extracted with water (3x25 ml), the organic layers were dried with  $\text{MgSO}_4$  and the solvent was removed by rotary vacuum distillation to afford a brown sticky oil. Then, it was dissolved in anhydrous ethanol (20 ml) and potassium carbonate was added. The solution was cooled in an ice bath and, to the stirred solution, 0.0322 g (0.85 mmol) of sodium borohydride was added in little portions. After the addition, the mixture was carried to room temperature and it was stirred for 1h. 30 ml of dichloromethane was added and the solution was extracted with water. The organic layers were dried with  $\text{MgSO}_4$  and the solvent was removed under reduced pressure.

The crude was dissolved in 10 ml of 1.25 M HCl/MeOH and it was stirred at room temperature for 2h. The white solid was filtered and washed with diethyl ether and dichloromethane, then it was dissolved in a little portion of water and neutralized with 1M NaOH. The mixture was extracted with dichloromethane and the organic layers were dried with  $\text{MgSO}_4$  and the solvent was removed under reduced pressure to afford 0.2122g (0.40 mmol, 40%) of diethyl 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene))bis(azanediyl))bis(propane-3,1-diyl))bis(piperidine-2-carboxylate) as a yellow oil.

Experimental

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.27 (s, 4H, H-C1), 4.16 (q, *J*= 7.1Hz, 4H, H-C14), 3.76 (s, 4H, H-C3), 3.02 – 3.12 (m, 2H, H-C8), 2.98 – 3.01 (m, 2H, H-C12), 2.52 – 2.70 (m, 6H, H-C5, H-C7), 2.25 – 2.36 (m, 2H, H-C7), 2.02 – 2.13 (m, 2H, H-C8), 1.52 – 1.85 (m, 16H, H-C6, H-C9, H-C10, H-C11, H-N4), 1.28 – 1.37 (m, 2H, H-C10), 1.25 (t, *J*= 7.1Hz, 6H, H-C15).

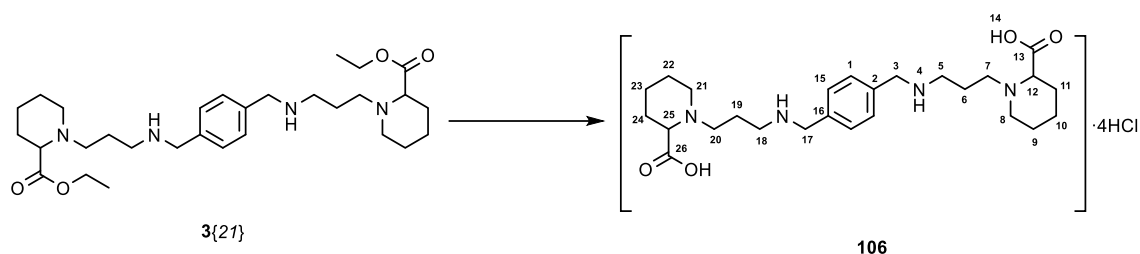
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 173.9 (C13), 128.2 (C1), 65.7 (C12), 60.4 (C14), 54.7 (C7), 53.6 (C3), 50.6 (C8), 47.9 (C5), 29.8 (C9\*, C11\*), 25.2 (C6\*), 22.8 (C10), 14.3 (C15).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3319 (*t* N-H), 2934, 2854, 2809 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1730 (*t* C=O), 1179, 1115 (st as. C-O).

**MS (70 eV, EI) m/z (%):** 530.4 (1) [M]<sup>+</sup>, 318.3 (13) [M-C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 170.1 (34) [C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 98.1 (100) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>.

**HMS (ESI-TOF) calculated for C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M+1]<sup>+</sup>:** 531.3905; found: 531.3900.

#### 4.64- Synthesis of 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene))bis(azanediyl))bis(propane-3,1-diyl))bis(piperidine-2-carboxylic acid) (106)



A solution of diethyl 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene))bis(azanediyl))bis(propane-3,1-diyl))bis(piperidine-2-carboxylate) (0.6742g, 1.27 mmol) in concentrated HCl 37% (20 ml) was stirred at 75°C for 6h. After this, the mixture was heated under microwave irradiation at 75°C for 8h. The solvent was removed under reduced pressure and 0.4746g (1.00 mmol, 79%) of 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene))bis(azanediyl))bis(propane-3,1-diyl))bis(piperidine-2-carboxylic acid) was obtained as a white solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm):** 7.57 (s, 4H, H-C1, H-C15), 4.31 (s, 4H, H-C3, H-C17), 3.90 – 3.99 (m, 2H, H-C12, H-C25), 3.67 – 3.73 (m, 2H, H-C8, H-C21), 3.45 – 3.49 (m, 2H, H-C5, H-C18), 3.30 – 3.36 (m, 2H, H-C7, H-C20), 3.14 – 3.24 (m, 4H, H-C5, H-C18, H-C7, H-C20), 3.02 – 3.09 (m, 2H, H-C8, H-C21), 2.20 – 2.32 (m, 6H, H-C9, H-C22, H-C11, H-C24, H-N4), 1.83 – 1.95 (m, 4H, H-C9, H-C22, H-C11, H-C24), 1.57 – 1.82 (m, 8H, H-C6, H-C19, H-C10, H-C23).

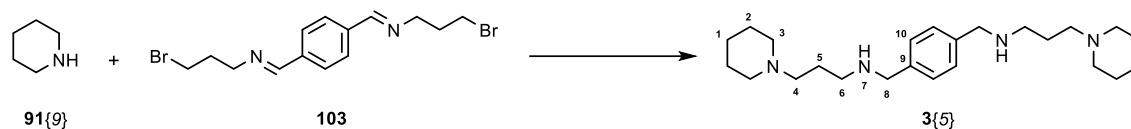
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 172.0 (C13\*), 171.6 (C26\*), 131.8 (C2), 130.5 (C12\*), 130.2 (C152\*), 129.4 (C16), 66.0 (C123\*), 56.7 (C253\*), 53.1 (C7, C20), 52.2 (C8, C21), 50.7 (C3, C17), 43.9 (C5, C18), 27.6 (C11, C24), 25.6 (C9, C22), 21.9 (C64\*), 21.2 (C194\*), 20.8 (C105\*), 20.6 (C235\*).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3378 (*t* COO-H), 2953, 2801 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1734 (*t* C=O), 1453 (*t* OC-OH).

**MS (ESI-TOF) *m/z* (%):** 475.3 (100) [M+1]<sup>+</sup>, 170.1 (42) [C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>+1]<sup>+</sup>.

**HMS (ESI-TOF) calculated for C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M+1]<sup>+</sup>:** 475.3279; found: 475.3281.

#### 4.65- Synthesis of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine) (3{5})



The procedure was the same as that stated above for **3{21}** (without the breaking of the hydrochloride step) but was carried out by using 0.8036g (2.15 mmol) of (1*E*,1'*E*)-1,1'-(1,4-phenylene)bis(*N*-(3-bromopropyl)methanimine), 0.3658g (4.30 mmol) of piperidine, 0.2973g (2.16 mmol) of potassium carbonate, 40 ml of acetonitrile and 0.0653g (1.73 mmol) of sodium borohydride. It was obtained 0.5413g (1.40 mmol, 65%) of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine) as a yellow oil.

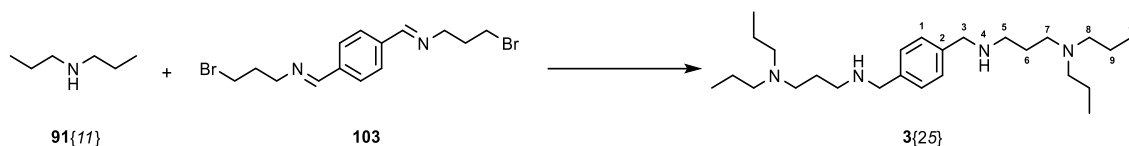
**<sup>1</sup>H-NMR (amina) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.28 (s, 4H, H-C10), 3.78 (s, 4H, H-C8), 2.68 (t, *J*= 6.7Hz, 4H, H-C6), 2.28 – 2.54 (m, 12H, H-C3, H-C4), 1.66 – 1.85 (m, 4H, H-C5), 1.55 (p, *J*= 5.6Hz, 8H, H-C2), 1.39 – 1.43 (m, 4H, H-C1).

**<sup>13</sup>C-NMR (amina) (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 128.2 (C10), 57.9 (C6), 54.6 (C3), 53.4 (C8), 48.3 (C4), 26.4 (C5), 25.9 (C2), 24.3 (C1).

Spectroscopic data was identical with those reported in the literature.<sup>[5]</sup>



#### 4.66- Synthesis of $N^1,N^1$ -(1,4-phenylenebis(methylene))bis( $N^3,N^3$ -dipropylpropane-1,3-diamine) (3{25})



The procedure was the same as that stated above for 3{21} (without the breaking of the hydrochloride step) but was carried out by using 0.3876g (1.04 mmol) of (1*E*,1'*E*)-1,1'-(1,4-phenylene)bis(*N*-(3-bromopropyl)methanimine), 0.3260g (2.08 mmol) of dipropylamine, 0.1513g (1.09 mmol) of potassium carbonate, 30 ml of acetonitrile and 0.0397g (1.05 mmol) of sodium borohydride. It was obtained 0.3226g (0.78 mmol, 75%) of  $N^1,N^1$ -(1,4-phenylenebis(methylene))bis( $N^3,N^3$ -dipropylpropane-1,3-diamine) as a yellow oil.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.25 (s, 4H, H-C1), 3.75 (s, 4H, H-C3), 2.65 (t,  $J = 7.0\text{Hz}$ , 4H, H-C5), 2.45 (t,  $J = 7.0\text{Hz}$ , 2H, H-C7), 2.29 – 2.37 (m, 8H, H-C8), 1.79 (br s, 2H, H-N4), 1.65 (p,  $J = 7.0\text{Hz}$ , 4H, H-C6), 1.35 – 1.51 (m, 8H, HC9), 0.84 (t,  $J = 7.3\text{Hz}$ , 12H H-C10).

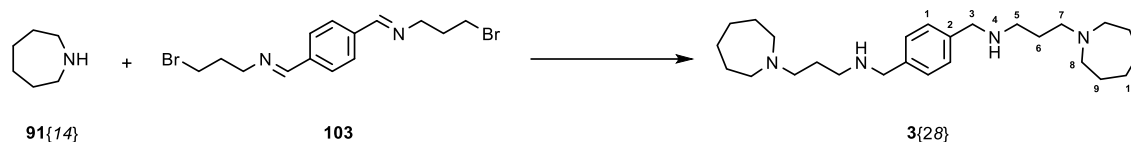
**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 128.14 (C1), 127.07 (C2), 56.16 (C7), 53.83 (C3), 52.59 (C8), 48.28 (C5), 27.25 (C6), 20.14 (C9), 11.94 (C10).

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3288 (*t* N-H), 2956, 2871, 2801 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1695 ( $\delta$  N-H), 1459 ( $\delta$  N-H), 1116, 1078.4 (*t* C-N).

**MS (ESI-TOF)  $m/z$  (%):** 419.4 (100)  $[\text{M}+1]^+$ , 318.3 (14)  $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}+1]^+$ , 261.2 (22)  $[\text{M}-\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{N}+1]^+$ , 204.1 (26)  $[\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2+1]^+$ , 160.1 (28)  $[\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2+1]^+$ , 142.1 (19)  $[\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2+1]^+$ .

**HMS (ESI-TOF)** calculated for  $\text{C}_{26}\text{H}_{51}\text{N}_4$   $[\text{M}+1]^+$ : 419.4108; found: 419.4108.

#### 4.67- Synthesis of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(azepan-1-yl)propan-1-amine) (3{28})



The procedure was the same as that stated above for 3{21} (without the breaking of the hydrochloride step) but was carried out by using 0.7800g (2.08 mmol) of (1*E*,1'*E*)-1,1'-(1,4-phenylene)bis(*N*-(3-bromopropyl)methanimine), 0.47 ml (4.18 mmol) of azepane, 0.2875g (2.11 mmol) of potassium carbonate, 40 ml of acetonitrile and 0.0624g (1.65 mmol) of sodium borohydride. It was obtained 0.5184g (1.25 mmol, 60%) of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(azepan-1-yl)propan-1-amine) as a yellow sticky solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.24 (s, 4H, H-C1), 3.74 (s, 4H, H-C3), 2.48 – 2.66 (m, 18H, H-C5, H-C7, H-C8, H-N4), 1.12 - 1.99 (m, 20H, H-C6, H-C9, H-C10).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 138.56 (C2), 128.24 (C1), 56.7 (C7\*), 55.54 (C8\*), 53.51 (C3), 48.11 (C5), 27.61 (C6<sup>2\*</sup>), 27.08 (C9<sup>2\*</sup>), 26.87 (C10\*).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3282 (*t* N-H), 2924, 2852, 2806 (*t* Csp<sub>3</sub>-H), 1645 ( $\delta$  N-H), ( $\delta$  N-H), 1123 (*t* C-N).

**MS (ESI-TOF) m/z (%):** 415.4 (100) [M+1]<sup>+</sup>, 316.3 (8) [M-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N+1]<sup>+</sup>, 259.2 (15) [M-C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>+1]<sup>+</sup>, 160.1 (12) [C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N+1]<sup>+</sup>, 140.1 (17) [C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N+1]<sup>+</sup>.

**HMS (ESI-TOF) calculated for C<sub>26</sub>H<sub>47</sub>N<sub>4</sub> [M+1]<sup>+</sup>:** 415.3795; found: 415.3793.

#### 4.68- Synthesis of $N^1, N^{1'}$ -(1,4-phenylenebis(methylene))bis( $N^3$ -benzyl- $N^3$ -methylpropane-1,3-diamine) (**3{24}**)



The procedure was the same as that stated above for **3{21}** (without the breaking of the hydrochloride step) but was carried out by using 0.7941g (2.12 mmol) of (1*E*,1'*E*)-1,1'-(1,4-phenylene)bis(*N*-(3-bromopropyl)methanimine), 0.56 ml (4.24 mmol) of benzylmethylamine, 0.3023g (2.17 mmol) of potassium carbonate, 40 ml of acetonitrile and 0.0624g (1.65 mmol) of sodium borohydride. It was obtained 0.3109g (1.06 mmol, 50%) of  $N^1, N^{1'}$ -(1,4-phenylenebis(methylene))bis( $N^3$ -benzyl- $N^3$ -methylpropane-1,3-diamine) as a pale yellow oil.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.18 – 7.46 (m, 14H, H-C1, H-C11, H-C12, H-C13), 3.75 (s, 4H, H-C3), 3.46 (s, 4H, H-C9), 2.74 (br s, 2H, H-N4), 2.67 (t,  $J = 6.9\text{Hz}$ , 4H, H-C5), 2.36 – 2.52 (m, 4H, H-C7), 2.18 (s, 6H, H-C8), 1.62 – 1.79 (m, 4H, H-C6).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 139.0 (C2, C10), 128.9 (C11), 128.2 (C1\*), 128.2 (C12\*), 126.9 (C13), 62.5 (C9), 55.7 (C7), 53.7 (C3), 48.0 (C5), 42.2 (C8), 27.3 (C6).

**IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3290 (*t* N-H), 3060, 3026 (*t*  $\text{Csp}^2\text{-H}$ ), 2940, 2938, 2790 (*t*  $\text{Csp}^3\text{-H}$ ), 1452 (*t* C-N), 736, 699 ( $\delta$   $\text{Csp}^2\text{-H}$  oop bending).

**MS (ESI-TOF)  $m/z$  (%):** 459.3 (100)  $[\text{M}+1]^+$ , 338.2 (10)  $[\text{M}-\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}+1]^+$ , 281.2 (26)  $[\text{M}-\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_2+1]^+$ , 162.1 (96)  $[\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}+1]^+$ , 148.1 (37)  $[\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}+1]^+$ , 134.1 (43)  $[\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}+1]^+$ .

**HMS (ESI-TOF)** calculated for  $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_4$   $[\text{M}+1]^+$ : 459.3482; found: 459.3482.

#### 4.69- Synthesis of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(4-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) (3{26})



The procedure was the same as that stated above for 3{21} (without the breaking of the hydrochloride step) but was carried out by using 1.0407g (2.43 mmol) of (1*E*,1'*E*)-1,1'-(1,4-phenylene)bis(*N*-(3-bromopropyl)methanimine), 0.5568g (5.61 mmol) of 4-methylpiperidine, 0.5012g of potassium carbonate, 40 ml of acetonitrile and 0.1941g (5.13 mmol) of sodium borohydride. It was obtained 0.2860g (0.69 mmol, 28%) of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(4-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) as a yellow oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.24 (s, 4H, H-C1), 3.74 (s, 4H, H-C3), 2.77 – 2.98 (m, 4H, H-C8), 2.64 (t, *J*= 6.9Hz, 4H, H-C5), 2.28 – 2.42 (m, 4H, H-C7), 2.15 (br s, 2H, H-N4), 1.85 (td, *J*<sub>1</sub>= 11.6Hz, *J*<sub>2</sub>= 2.5Hz, 4H, H-C8), 1.63 – 1.74 (m, 4H, H-C6), 1.50 – 1.63 (m, 4H, H-C9), 1.28 – 1.38 (m, 2H, H-C10), 1.10 – 1.26 (m, 4H, H-C9), 0.88 (d, *J*= 6.4Hz, 6H, H-C11).

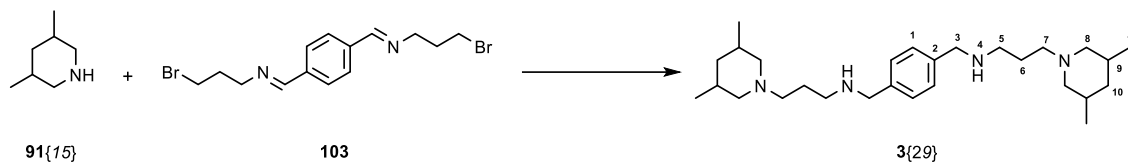
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 138.9 (C2), 128.1 (C1), 57.4 (C7), 54.1 (C8), 53.6 (C3), 48.2 (C5), 34.3 (C9), 30.8 (C10), 27.0 (C6), 21.9 (C11).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3281 (*t* N-H), 2947, 2921, 2869, 2804 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1511 ( $\delta$  N-H), 1455 (*t* C-N).

**MS (ESI-TOF) *m/z* (%):** 415.4 (100) [M+1]<sup>+</sup>, 316.3 (6) [M-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N+1]<sup>+</sup>, 259.2 (14) [M-C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>+1]<sup>+</sup>, 140.1 (19) [C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N+1]<sup>+</sup>.

**HMS (ESI-TOF) calculated for C<sub>26</sub>H<sub>47</sub>N<sub>4</sub> [M+1]<sup>+</sup>:** 415.3795; found: 415.3792.

#### 4.70- Synthesis of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) (3{29})



The procedure was the same as that stated above for 3{21} (without the breaking of the hydrochloride step) but was carried out by using 1.5450g (3.09 mmol) of (1*E*,1'*E*)-1,1'-(1,4-phenylene)bis(*N*-(3-bromopropyl)methanimine), 0.7279g (6.43 mmol) of 3,5-dimethylpiperidine, 0.4118g of potassium carbonate, 40 ml of acetonitrile and 0.1024g (2.71 mmol) of sodium borohydride. It was obtained 0.6293g (1.42 mmol, 46%) of *N,N'*-(1,4-phenylenebis(methylene))bis(3-(3,5-dimethylpiperidin-1-yl)propan-1-amine) as a yellow oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.38 (s, 4H, H-C1), 3.89 (s, 4H, H-C3), 2.93 – 3.02 (m, 4H, H-C8), 2.70 – 2.84 (m, 4H, H-C5), 2.41 – 2.56 (m, 4H, H-C7), 2.15 (br s, 2H, H-N4), 1.94 – 2.03 (m, 2H, H-C9), 1.69 – 1.91 (m, 10H, H-C6, H-C9, H-C10), 1.50 (t, *J* = 11.0Hz, 4H, H-C8), 1.04 (d, *J* = 6.8Hz, 3H, H-C11), 0.96 (d, *J* = 6.8Hz, 9H, H-C11).

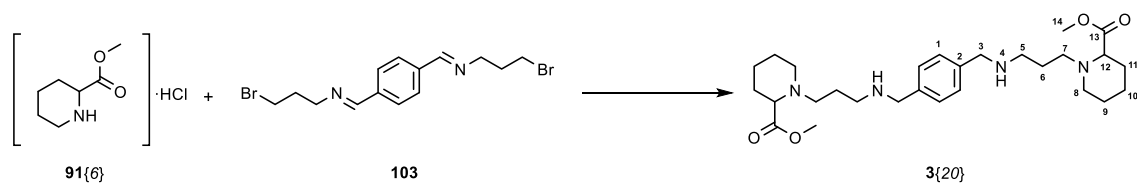
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 139.0 (C2), 128.0 (C1), 61.7 (C8), 57.3 (C7), 53.6 (C3), 48.2 (C5), 42.2 (C10), 31.1 (C9), 26.9 (C6), 19.6 (C11).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3283 (*t* N-H), 2949, 2925, 2870 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1512 (*δ* N-H), 1457 (*t* C-N).

**MS (ESI-TOF) *m/z* (%):** 443.4 (100) [M+1]<sup>+</sup>, 386.3 (10) [M-C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>+1]<sup>+</sup>, 330.3 (5) [M-C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N+1]<sup>+</sup>, 273.2 (13) [M-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>+1]<sup>+</sup>, 216.2 (10) [C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>+1]<sup>+</sup>, 154.1 (40) [C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>N+1]<sup>+</sup>.

**HMS (ESI-TOF)** calculated for C<sub>28</sub>H<sub>51</sub>N<sub>4</sub> [M+1]<sup>+</sup>: 443.4108; found: 443.4108.

#### 4.71- Synthesis of dimethyl 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene)))bis(azanediy))bis(propane-3,1-diyl))bis(piperidine-2-carboxylate) (3{20})



The procedure was the same as that stated above for 3{21} but was carried out by using 1.0769g (2.89 mmol) of (1*E*,1'*E*)-1,1'-(1,4-phenylene)bis(*N*-(3-bromopropyl)methanimine), 1.0347g (5.76 mmol) of methyl piperidine-2-carboxylate hydrochloride, 0.5125g of potassium carbonate, 40 ml of acetonitrile and 0.2060g (5.44 mmol) of sodium borohydride. It was obtained 0.3619g (0.72 mmol, 25%) of 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene)))bis(azanediy))bis(propane-3,1-diyl))bis(piperidine-2-carboxylate) as a yellow oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.27 – 7.45 (m, 4H, H-C1), 3.81 (s, 4H, H-C3), 3.69 (s, 6H, H-C14), 3.05 – 3.18 (m, 2H, H-C8), 3.00 (dd, *J*<sub>1</sub> = 9.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 3.6 Hz, 2H, H-C12), 2.72 – 2.82 (m, 2H, H-C5), 2.63 – 2.71 (m, 2H, H-C5), 2.51 – 2.58 (m, 2H, H-C7), 2.25 – 2.39 (m, 2H, H-C7), 1.98 – 2.09 (m, 2H, H-C8), 1.75 – 1.88 (m, 4H, H-C11), 1.44 – 1.71 (m, 12H, H-C9, H-C6, H-C10, H-N4), 1.22 – 1.36 (m, 2H, H-C10).

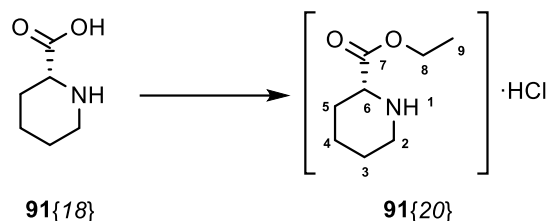
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 174.6 (C13), 128.5 (C2), 127.1 (C1), 65.7 (C12), 55.0 (C7), 53.3 (C3), 51.7 (C14), 50.6 (C8), 48.1 (C5), 29.8 (C11), 25.3 (C9\*), 25.1 (C6\*), 22.8 (C10).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3301 (*t* N-H), 2936, 2854 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1736 (*t* C=O), 1194, 1165 (*st as.* C-O), 1060 (*st sim* C-O).

**MS (ESI-TOF) *m/z* (%):** 502.4 (1) [M]<sup>+</sup>, 320.2 (14) [M-C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>+1]<sup>+</sup>, 261.2 (14) [C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>+1]<sup>+</sup>, 156.1 (49) [C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub>+1]<sup>+</sup>, 142.1 (21) [C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>2</sub>+1]<sup>+</sup>, 98.1 (100) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N+1]<sup>+</sup>.

**HMS (ESI-TOF) calculated for C<sub>28</sub>H<sub>47</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M+1]<sup>+</sup>:** 503.3592; found: 503.3592.

#### 4.72- Synthesis of ethyl (*R*)-piperidine-2-carboxylate hydrochloride (91{20})



A solution of (*R*)-piperidine-2-carboxylic acid (1.0172g, 7.60 mmol) in anhydrous ethanol (20 ml) was cooled at 0°C. 1.2 ml of thionyl chloride (1.9680g, 16.54 mmol) was added dropwise and the mixture was carried to reflux for 2h. The solvent was removed under reduced pressure and the solid was washed with dichloromethane and diethyl ether. It was obtained 1.4699g (7.59 mmol, 100%) of ethyl (*R*)-piperidine-2-carboxylate hydrochloride as a white solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 4.18 (q, *J* = 7.1Hz, H-C8), 3.90 (dd, *J*<sub>1</sub> = 11.7Hz, *J*<sub>2</sub> = 3.6Hz, 1H, H-C6), 3.33 – 3.38 (m, 1H, H-C2), 2.90 – 2.97 (m, 1H, H-C2), 2.14 – 2.22 (m, 1H, H-C5), 1.73 – 1.83 (m, 3H, H-N1, H-C3, H-C4), 1.48 – 1.67 (m, 3H, H-C3, H-C4, H-C5), 1.16 (t, *J* = 7.1Hz, 3H, H-C9)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 169.6 (C7), 63.4 (C8), 56.7 (C6), 44.0 (C2), 25.5 (C5), 21.3 (C3\*), 21.1 (C4\*), 13.1 (C9).

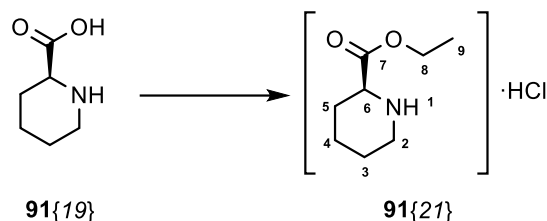
**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3348 (*t* N-H), 2935, 2855 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1737 (*t* C=O), 1189 (st as. C-O), 1047 (st sim C-O).

**MS (ESI-TOF) m/z (%):** 158.1 (100) [M+1]<sup>+</sup>, 84.1 (7) [M-C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>+1]<sup>+</sup>.

**HMS (ESI-TOF) calculated for C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub> [M+1]<sup>+</sup>:** 158.1176; found: 158.1176.

**[α]<sub>D</sub>:** +11.2° (concentration 9.98 mg/ml, H<sub>2</sub>O).

#### 4.73- Synthesis of ethyl (S)-piperidine-2-carboxylate hydrochloride (91{21})



A solution of (S)-piperidine-2-carboxylic acid (1.0347g, 7.74 mmol) in anhydrous ethanol (20 ml) was cooled at 0°C. 1.2 ml of thionyl chloride (1.9680g, 16.54 mmol) was added dropwise and the mixture was carried to reflux for 3h. The solvent was removed under reduced pressure and the solid was washed with dichloromethane twice and diethyl ether. It was obtained 1.4990g (7.74 mmol, 100%) of ethyl (S)-piperidine-2-carboxylate hydrochloride as a white solid.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 4.17 (q, *J* = 7.2Hz, H-C8), 3.90 (dd, *J*<sub>1</sub> = 11.7Hz, *J*<sub>2</sub> = 3.6Hz, 1H, H-C6), 3.32 – 3.39 (m, 1H, H-C2), 2.89 – 2.97 (m, 1H, H-C2), 2.14 – 2.21 (m, 1H, H-C5), 1.74 – 1.81 (m, 3H, H-N1, H-C3, H-C4), 1.48 – 1.67 (m, 3H, H-C3, H-C4, H-C5), 1.16 (t, *J* = 7.2Hz, 3H, H-C9)

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 169.6 (C7), 63.4 (C8), 56.7 (C6), 44.0 (C2), 25.5 (C5), 21.3 (C3\*), 21.1 (C4\*), 13.1 (C9).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3471 (*t* N-H), 2923, 2770, 2722 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1750 (*t* C=O), 1235 (st as. C-O), 1044 (st sim C-O).

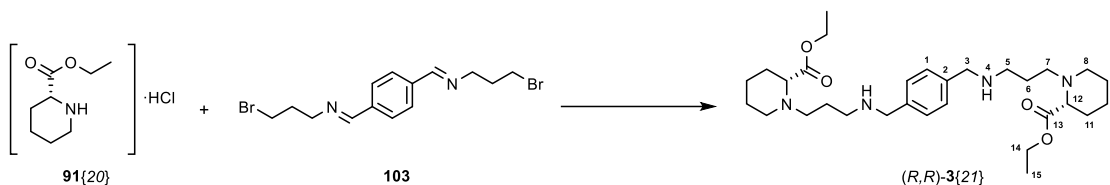
**MS (ESI-TOF) m/z (%):** 158.1 (100) [M+1]<sup>+</sup>, 84.1 (10) [M-C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>+1]<sup>+</sup>.

**HMS (ESI-TOF) calculated for C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub> [M+1]<sup>+</sup>:** 158.1175; found: 158.1176.

**[α]<sub>D</sub>:** -12.1° (concentration 10.78 mg/ml, H<sub>2</sub>O).



#### 4.74- Synthesis of diethyl 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene))bis(azanediyl))bis(propane-3,1-diyl))(2*R*,2'*R*)-bis(piperidine-2-carboxylate) ((*R,R*)-3{21})



The procedure was the same as that stated above for 3{21} but was carried out by using 0.6230g (2.67 mmol) of (1*E*,1'*E*)-1,1'-((1,4-phenylene)bis(*N*-(3-bromopropyl)methanimine)), 1.0353g (5.36 mmol) of ethyl (*R*)-piperidine-2-carboxylate hydrochloride, 0.5400g of potassium carbonate, 25 ml of acetonitrile and 0.1647g (4.35 mmol) of sodium borohydride. It was obtained 0.5095g (0.96 mmol, 36%) of diethyl 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene))bis(azanediyl))bis(propane-3,1-diyl))(2*R*,2'*R*)-bis(piperidine-2-carboxylate) as a brown oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.27 (s, 4H, H-C1), 4.16 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, H-C14), 3.76 (s, 4H, H-C3), 3.03 – 3.10 (m, 2H, H-C8), 2.97 – 3.01 (m, 2H, H-C12), 2.61 – 2.72 (m, 4H, H-C5), 2.54 – 2.60 (m, 2H, H-C7), 2.27 – 2.34 (m, 2H, H-C7), 2.04 – 2.11 (m, 2H, H-C8), 1.50 – 1.84 (m, 16H, H-C6, H-C9, H-C10, H-C11, H-N4), 1.29 – 1.35 (m, 2H, H-C10), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, H-C15).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 173.9 (C13), 160.9 (C2), 128.2 (C1), 65.7 (C12), 60.4 (C14), 54.7 (C7), 53.6 (C3), 50.6 (C8), 48.0 (C5), 29.8 (C9\*, C11\*), 25.2 (C6\*), 22.8 (C10), 14.3 (C15).

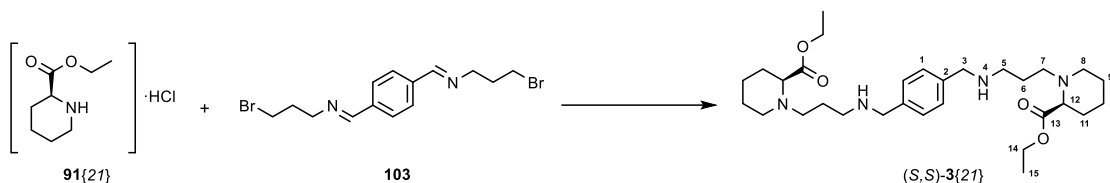
**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3293 (*t* N-H), 2936, 2855 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1732 (*t* C=O), 1180, 1135 (st as. C-O), 1059, 1028 (st sim C-O), 753 (*δ* Csp<sup>2</sup>-H oop bending).

**MS (ESI-TOF) *m/z* (%):** 531.4 (9) [M+1]<sup>+</sup>, 335.2 (28) [C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>+1]<sup>+</sup>, 266.2 (34) [C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>+2]<sup>+</sup>.

**HMS (ESI-TOF) calculated for C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M+1]<sup>+</sup>:** 531.3905; found: 531.3900.

**[α]<sub>D</sub>:** +36.8° (concentration 9.96 mg/ml, CHCl<sub>3</sub>).

#### 4.75- Synthesis of diethyl 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene)) bis(azanediy))bis(propane-3,1-diyl))(2*S*,2'*S*)-bis(piperidine-2-carboxylate) ((*S,S*)-3{21})



The procedure was the same as that stated above for **3{21}** but was carried out by using 0.5861g (1.57 mmol) of (1*E*,1'*E*)-1,1'-(1,4-phenylene)bis(*N*-(3-bromopropyl)methanimine), 0.6120g (3.16 mmol) of ethyl (*S*)-piperidine-2-carboxylate hydrochloride, 0.4300g of potassium carbonate, 25 ml of acetonitrile and 0.144g (3.81 mmol) of sodium borohydride. It was obtained 0.4140g (0.78 mmol, 50%) of diethyl 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene)) bis(azanediy))bis(propane-3,1-diyl))(2*S*,2'*S*)-bis(piperidine-2-carboxylate) as a brown oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.43 (s, 4H, H-C1), 4.14 – 4.23 (m, 4H, H-C14), 3.90 (s, 4H, H-C3), 3.13 – 3.28 (m, 2H, H-C8), 2.93 – 2.97 (m, 2H, H-C12), 2.71 – 2.82 (m, 4H, H-C5), 2.54 – 2.61 (m, 2H, H-C7), 2.32 – 2.38 (m, 2H, H-C7), 2.06 (s, 2H, H-N4), 1.93 – 2.00 (m, 2H, H-C8), 1.40 – 1.87 (m, 14H, H-C6, H-C9, H-C10, H-C11), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-C15), 1.20 – 1.25 (m, 2H, H-C10).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 174.5 (C13), 129.1 (C2), 127.1 (C1), 65.9 (C12), 60.8 (C14), 53.3 (C7), 50.7 (C3), 48.4 (C8), 30.0 (C6\*), 25.0 (C9\*, C11\*), 22.9 (C10), 14.2 (C15).

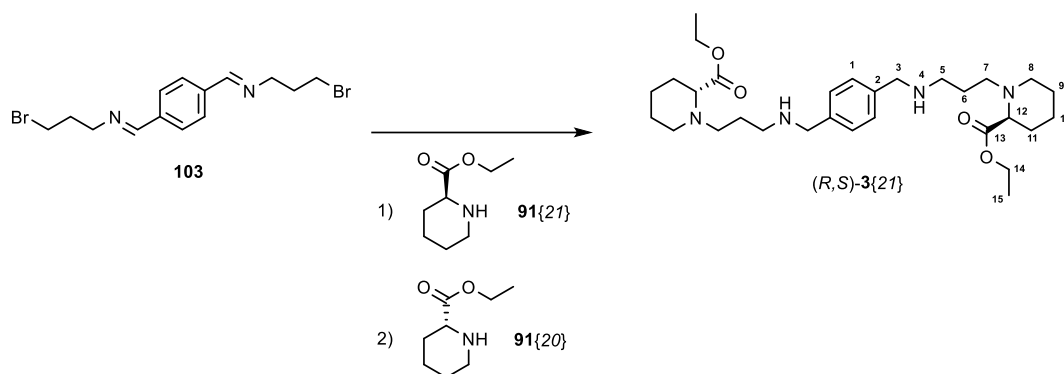
**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3304 (*t* N-H), 2935, 2855 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1730 (*t* C=O), 1179, 1157 (st as. C-O), 1055, 1024 (st sim C-O).

**MS (ESI-TOF) *m/z* (%):** 531.4 (12) [M+1]<sup>+</sup>, 320.7 (13) [C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+2]<sup>+</sup>, 266.2 (100) [C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>+2]<sup>+</sup>.

**HMS (ESI-TOF) calculated for C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M+1]<sup>+</sup>:** 531.3905; found: 531.3901.

**[α]<sub>D</sub>:** -31.7° (concentration 10.00 mg/ml, CHCl<sub>3</sub>).

#### 4.76- Synthesis of diethyl 1,1'-(((1,4-phenylenebis(methylene))bis(azanediy))bis(propane-3,1-diyl))(2*R*,2'*S*)-bis(piperidine-2-carboxylate) ((*R,S*)-3{21})



0.2886g (1.49 mmol) of ethyl (*S*)-piperidine-2-carboxylate hydrochloride was dissolved with a concentrated solution of sodium bicarbonate, the organic layer was extracted with chloroform (3x25 ml) and it was dried with MgSO<sub>4</sub>. The solvent was removed under reduced pressure. After this, it was added dropwise in a solution of 0.5577g (1.49 mmol) of (1*E*,1'*E*)-1,1'-((1,4-phenylene)bis(*N*-(3-bromopropyl)methanimine) and 0.500 g of potassium carbonate in 80 ml of acetonitrile. The mixture was stirred at 60 °C for 16 hours in a N<sub>2</sub> atmosphere. 0.2350g (1.49 mmol) of ethyl (*R*)-piperidine-2-carboxylate was added dropwise and the mixture was stirred at 60°C for 18h.

The mixture was allowed to cool down to room temperature and it was extracted with water (3x25 ml), the organic layers were dried with MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed by rotary vacuum distillation to afford a brown sticky oil. Then, it was dissolved in anhydrous ethanol (20 ml) and potassium carbonate was added. The solution was cooled in an ice bath and, to the stirred solution, 0.0923 g (2.44 mmol) of sodium borohydride was added in little portions. After the addition, the mixture was carried to room temperature and it was stirred for 1h. 30 ml of dichloromethane was added and the solution was extracted with water. The organic layers were dried with MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure.

The crude was dissolved in 10 ml of 1.25 M HCl/MeOH and it was stirred at room temperature for 2h. The white solid was filtered and washed with diethyl ether and dichloromethane, then it was dissolved in a little portion of water and neutralized with 1M NaOH. The mixture was extracted with dichloromethane and the organic layers were dried with MgSO<sub>4</sub> and the solvent was removed under reduced pressure to afford 0.4270g (0.80 mmol, 54%) of diethyl 1,1'-(((1,4-

Experimental

phenylenebis(methylene) bis(azanediyl)bis(propane-3,1-diyl)(2*R*,2'*S*)-bis(piperidine-2-carboxylate) as a yellow oil.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.27 – 7.24 (m, 4H, H-C1), 4.17 (q, *J*= 7.1Hz, 4H, H-C14), 3.79 (s, 4H, H-C3), 3.06 – 3.13 (m, 2H, H-C8), 2.96 – 3.01 (m, 2H, H-C12), 2.61 – 2.75 (m, 4H, H-C5), 2.55 – 2.61 (m, 2H, H-C7), 2.29 – 2.34 (m, 2H, H-C7), 2.02 – 2.09 (m, 2H, H-C8), 1.53 – 1.84 (m, 16H, H-C6, H-C9, H-C10, H-C11, H-N4), 1.29 – 1.36 (m, 2H, H-C10), 1.25 (t, *J*= 7.1Hz, 6H, H-C15).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 174.0 (C13), 128.4, 128.3 (C1), 65.7, 65.1 (C12), 60.4 (C14), 54.8 (C7), 53.5 (C3), 50.6 (C8), 48.0 (C5), 29.8 (C9\*, C11\*), 25.2 (C6\*), 22.8 (C10), 14.3 (C15).

**IR (KBr) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>):** 3296 (*t* N-H), 2935, 2855, 2814 (*t* Csp<sup>3</sup>-H), 1731 (*t* C=O), 1180, 1115 (st as. C-O), 1058, (st sim C-O).

**MS (ESI-TOF) m/z (%):** 531.4 (8) [M+1]<sup>+</sup>, 335.3 (100) [C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>+1]<sup>+</sup>, 266.2 (94) [C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>+2]<sup>+</sup>.

**HMS (ESI-TOF) calculated for C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M+1]<sup>+</sup>:** 531.3905; found: 531.3901.

## Bibliografia

- [1] R. Puig de la Bellacasa; Disseny, síntesi i avaluació biològica d'inhibidors potencials de les etapes inicials del cicle de replicació de VIH. Tesi Doctoral, Escola Tècnica Superior IQS, Universitat Ramon Llull, Barcelona, 2010.
- [2] R.E. Gawley, H. Mao, M.M. Haque, J.B. Thorne, J.S. Pharr; Visible fluorescence chemosensor for saxitoxin. *J. Org. Chem.* **2007**, 72 (6), 2187-2191.
- [3] M. Barbasiewicz, M. Makosza; Intermolecular reactions of chlorohydrine anions: acetalization of carbonil compounds under basic conditions. *Org. Lett.* **2006**, 8 (17), 3745-3748.
- [4] W. Bao, Z Wang. An effective synthesis of bromoesters from aromatic aldehydes using tribromide iònic líquid based on L-prolinol as reagent and reaction medium under mild conditions. *Green Chem.* **2006**, 8, p. 1028-1033.
- [5] S. Pettersson; Diseño, selección y síntesis de Nuevos inhibidores de entrada del VIH. Tesi Doctoral, Escola Tècnica Superior IQS, Universitat Ramon Llull, Barcelona, 2009.
- [6] Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2016**.



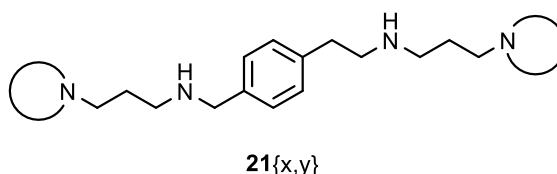
## **5- CONCLUSIONS**



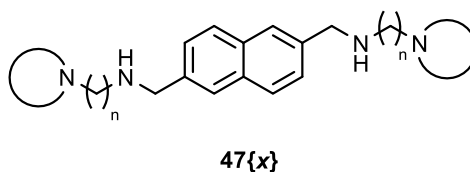


## Conclusions

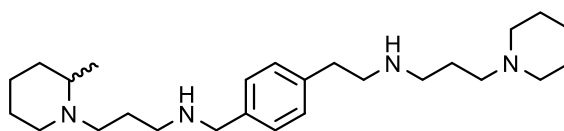
1. S'ha desenvolupat una ruta sintètica per a la síntesi de les tetraamines no simètriques **21**{x,y}. El tractament de l'àcid 2-((4-bromometil)fenil)acètic (**35**) amb clorur de tionil rendeix el corresponent clorur d'àcid que es fa reaccionar amb una primera amina **2**{x} per formar les corresponents amides **38**{x}. Posteriorment en els compostos **38**{x} es fa la substitució de l'àtom de brom per una segona amina **2**{y}, igual o diferent de la primera, per rendir les corresponents amina-amides **37**{x,y} que per reducció condueixen a les tetraamines **21**{x,y}.



2. L'anàlisi dels resultats d'activitat anti-VIH de les amina-amides **37**{x,y} indica que són més actives que les diamides referibles obtingudes en treballs previs però menys actives que els compostos **21**{x,y} i d'altres tetraamines referibles. Això confirma que la funcionalitat amida no és adequada per aconseguir una bona eficàcia inhibidora de l'entrada del VIH.
3. Els valors d'activitat antiviral dels compostos **21**{x,y} amb l'espaiador no simètric i dels compostos **47**{x} amb l'espaiador naftalènic, desenvolupades en el present treball, comparats amb els d'altres molècules anàlogues obtingudes en treballs previs permet concloure que el millor espaiador per a la síntesi de compostos tetraamínics simètrics és el *p*-fenilbisetilènic.

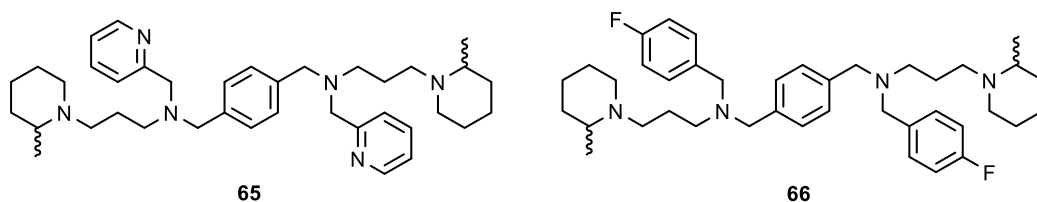


4. El valor d'activitat anti-VIH de les tetraamines no simètriques **21**{x,y} es troba a mig camí entre els valors proporcionats pels seus anàlegs **21**{x,x} i **21**{y,y}, excepte en el cas particular del compost **21**{5,3} ( $EC_{50} = 0.087 \mu\text{M}$ ), que resulta ser la molècula amb millors resultats d'activitat anti-VIH de les famílies sintetitzades en el present treball.



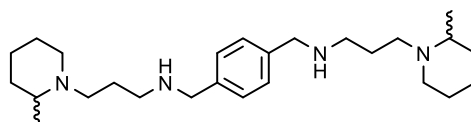
21{5,3}

5. Les molècules tetrasubstituïdes **65** i **66** no aconsegueixen millorar els valors d'activitat antiviral del compost de referència **3{3}**. Aquest fet suggereix que els grups NH donadors de pont d'hidrogen semblen ser importants de cara a la interacció amb el receptor CXCR4.



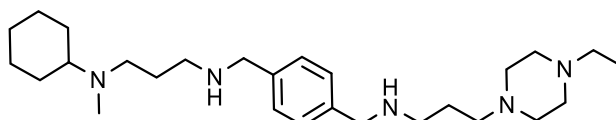
65

66



3{3}

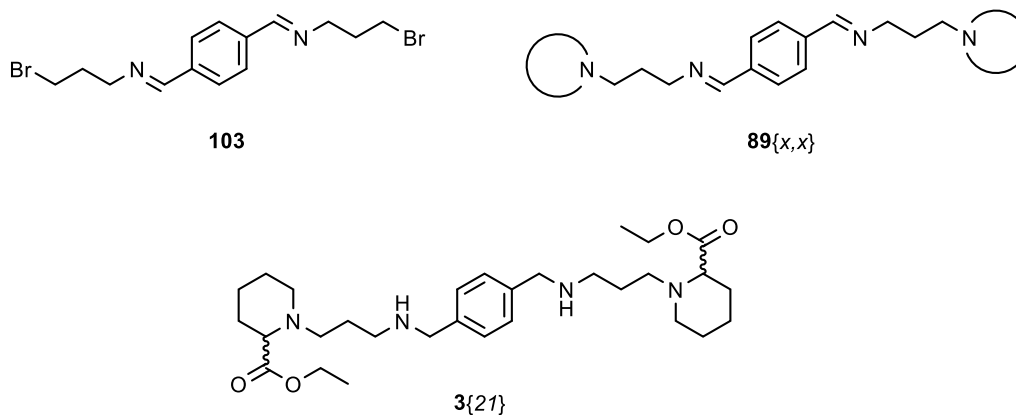
6. S'ha dissenyat un procediment per estudiar la diversitat estructural al voltant del compost **3{3}** i la selecció de nous candidats a ser sintetitzats com a inhibidors del receptor de quimiocina CXCR4. Si bé els compostos sintetitzats a través d'aquesta aproximació presenten valors d'activitat anti-VIH notables, cap d'ells millora la del compost **3{3}**. Amb tot, **80{18,17}** és el primer sistema tetraamínic no simètric amb l'espaiador *p*-fenilbismetilènic sintetitzat pel nostre equip que presenta un valor d'activitat similar a **3{3}**.



80{18,17}

7. S'ha desenvolupat una nova ruta sintètica per l'obtenció de tetraamines del tipus **3{x}** en la que es fa reaccionar tereftaldialdehid amb dos equivalents de 3-bromopropilamina per obtenir l'intermedi diimínic **103** que es fa reaccionar directament amb dos equivalents de la corresponent amina secundària per rendir els compostos diimínics **89{x,x}**. La subsegüent reducció amb borohidruir sòdic rendeix les tetraamines **3{x}** desitjades.

Aquesta metodologia ha permès l'obtenció del compost **3{21}**, no accessible mitjançant la metodologia habitual de l'equip, que introdueix la funcionalitat èster en els grups metils dels anells pipercolínics de **3{3}**.



8. S'ha determinat l'activitat inhibidora de CXCR4, CCR5, CXCR7 i anti-VIH de una mostra representativa de tots compostos sintetitzats en aquesta àrea de recerca del nostre equip en comparació amb l'AMD3100. En general s'ha observat una correlació entre l'activitat inhibidora de CXCR4 (o CCR5) i l'activitat anti-VIH. Ara bé, sorprenentment, el compost **3{21}** no presenta activitat inhibidora rellevant de CXCR4 ni anti-VIH però causa la mort de cèl·lules leucèmiques per apoptosi i atura els processos de senyalització *downstream* derivats del receptor CXCR4.
9. El fet que el compost **3{21}** freni alguns dels processos de senyalització *downstream* que es deriven del receptor CXCR4, però que no impedeixi la unió del VIH o de CXCL12 sumat al fet que no tingui una relació competitiva amb el compost AMD3100 pel lloc d'unió principal porta a pensar que està actuant com a inhibidor al·lostèric enfront a CXCR4. A més, provoca l'apoptosi cel·lular, aquest efecte s'observa tant en cèl·lules leucèmiques com en d'altres tumors sòlids que expressen CXCR4 (pàncrees i pulmó) si bé a concentracions superiors a 10  $\mu$ M.



**6- ANNEX**



Parts d'aquesta tesi s'han comunicat en articles i congressos:

-13th YoungChem. International Congress of Young Chemists. 07th-11th October 2015. Cracow, Poland. *Poster communication*.

-R. Puig de la Bellacasa, A. Gibert, J.M. Planesas, L. Ros-Blanco, X. Batllori, R. Badia, B. Clotet, J. Este, J. Teixidó, J.I. Borrell; Nitrogen positional scanning in tetramines active against HIV-1 as potential CXCR4 inhibitors. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, 14 (4), 1455-1472.

DOI: 10.1039/C5OB02419F





## Nitrogen Positional Scanning in Tetraamines Active as CXCR4 Inhibitors

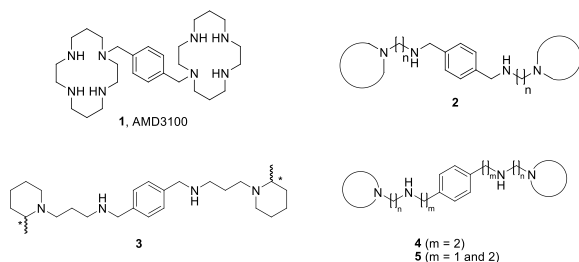
**Albert Gibert**, Raimon Puig de la Bellacasa, Laia Ros-Blanco, Jesús M. Planesas, Xavier Batllori, Jordi Teixidó and José I. Borrell

Grup d'Enginyeria Molecular, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, Via Augusta, 390, E-08017 Barcelona, Spain

Since the discovery of bicyclam AMD3100 (**1**, Plerixafor,  $EC_{50}=0.002 \mu\text{M}$ ),<sup>[1,2]</sup> the first small molecule CXCR4 inhibitor, a lot of efforts have been devoted to the development of more potent, selective and less toxic inhibitors. The reason for such interest was, initially, the use by the human immunodeficiency virus (HIV) of the chemokine receptor CXCR4 as coreceptor during the HIV cell fusion and entry, which starts by the interaction of the virus envelop glycoprotein gp120 with the primary receptor CD4.<sup>[3]</sup> However, more recently, CXCR4 has been connected with the regulation of the trafficking and homing of various cell types including stem cells and cancer stem cells.

In this context, our work in the field of anti-HIV entry/fusion inhibitors<sup>[4]</sup> led to the identification of novel potent CXCR4 coreceptor inhibitors of general structure **2**. Among these tetraamines, compound **3** was selected as a lead compound because it presents nearly the same level of activity (**3**,  $EC_{50}=0.019 \mu\text{M}$ ) as the reference compound **1** and shows no cell toxicity at concentrations up to  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ .<sup>[4]</sup>

In order to explore the impact on the biological activity of the distance between the phenyl ring and the first nitrogen atom of the side chains, we designed and synthesized two families of compounds: the symmetrical compounds **4** (in which  $m = 2$  in both sides) and the non-symmetrical compounds **5** (in which  $m = 1$ , in one side, and  $m=2$ , on the other side). The resulting compounds were tested for anti-HIV activity ( $EC_{50}$ ) and cytotoxicity ( $CC_{50}$ ) and the results obtained clearly pointed out that in this case, contrary to AMD3100, the higher activity is achieved with the symmetrical compound **4** ( $m=2$ ) bearing the same side chain as **3**.



1. E. De Clercq, N. Yamamoto, R. Pauwels, J. Balzarini, M. Witvrouw, K. De Vreese, Z. Debyser, B. Rosenwirth, P. Peichl, R. Datema, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38* (4), 668–674.
2. G. M. Keating, *Drugs* **2011**, *71*(12), 1623–1647.
3. J. A. Este, A. Telenti, *Lancet* **2007**, *370*, 81–88.
4. S. Petterson, V. I. Pérez-Nueno, L. Ros-Blanco, R. Puig de La Bellacasa, M. O. Rabal, X. Batllori, B. Clotet, I. Clotet-Codina, M. Armand-Ugón, J. A. Esté, J. I. Borrell, J. Teixidó, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1549–1557.



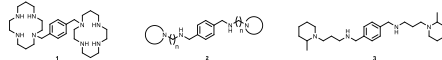
## Nitrogen Positional Scanning in Tetramines Active as CXCR4 Inhibitors

**Albert Gibert**, Raimon Puig de la Bellacasa, Laia Ros-Blanco, Xavier Batllori,  
Jordi Teixidó and José I. Borrell

\* Grup d'Enginyeria Molecular (GEM), IQS, Universitat Ramon Llull, Via Augusta 390, 08017 Barcelona (Spain).  
E-mail: agibertb@gmail.com, jose.borrell@iqs.url.edu

### Introduction

The human immunodeficiency virus (HIV) uses the chemokine receptor CXCR4 as coreceptor during the HIV cell fusion and entry. More recently, CXCR4 has been connected with the regulation of the trafficking and homing of various cell types including stem cells and cancer stem cells.<sup>1</sup> In this context, our work in the field of anti-HIV entry/fusion inhibitors<sup>2,3,4</sup> led to the identification of novel potent CXCR4 coreceptor inhibitors of general structure **2**. Compound **3** was selected as a lead compound because it presents nearly the same level of activity ( $3$ ,  $EC_{50}$  = 0.019  $\mu$ M) as the reference compound **1** (AMD3100) and shows no cell toxicity at concentrations up to 25  $\mu$ g/mL.<sup>2</sup> A paradigm has been widely accepted: to use the *p*-phenylene moiety as a central core for the connection of nitrogen heterocycles linked to two nitrogen atoms on both sides of such core. Our conviction that such paradigm could not be necessarily valid for structures less hindered than AMD3100, led us to carry out a positional scanning of the nitrogen atoms present in each side of the central phenyl ring of structures **2**.

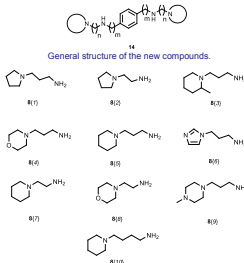


### Synthesis

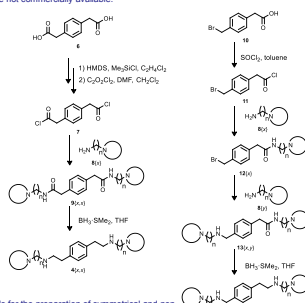
Two new families of compounds were designed and synthesized: the symmetrical compounds **4** (in which  $m = 2$  in both sides) and the non-symmetrical compounds **5** (in which  $m = 1$ , in one side, and  $m = 2$ , on the other side).

Compounds **2** containing the *p*-phenylene moiety as a central core were synthesized using a reductive amination starting from terephthalaldehyde.<sup>4</sup> However, in the case of these new compounds **4** and **5** it was not possible to use the same synthetic strategy because the corresponding required dialdehydes were not commercially available.

The amines **8(x)** used in the synthetic protocol are constituted by a nitrogen-containing heterocyclic system linked to a  $-(CH_2)_m$  spacer which ends in an  $NH_2$  group. Some of them have been synthesized specially for this work.



Amines **8(x)** used for the synthesis of compounds **4(x,x)** and **5(x,y)**.



Synthetic protocols for the preparation of symmetrical and non-symmetrical diamines **4(x,x)** and **5(x,y)**, respectively.

### Biological evaluation

To obtain the antiviral activity of the compounds, these were evaluated with the MTT method in MT-4 cells.

The reference compound is AMD3100  $EC_{50}$  = 0.004  $\mu$ M  $CC_{50}$  > 10  $\mu$ M.

Compound	m	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	SI
<b>2(3,3)</b>	1,1	0.120	>60.3	>500
<b>5(3,3)</b>	2,1	0.114	>58.3	>510
<b>4(3,3)</b>	2,2	0.072	117.4	1625
<b>2(5,5)</b>	1,1	0.362	>64.6	>179
<b>5(5,5)</b>	2,1	0.325	>62.4	>192
<b>4(5,5)</b>	2,2	0.101	113.3	1119

The presence of two methylene units on each side of the central ring increases the biological activity contrary to what is observed in the case of AMD3100.

Compound	n	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	SI
<b>2(7,7)</b>	2	>32.6	32.6	---
<b>2(5,5)</b>	3	0.362	>64.6	>179
<b>2(10,10)</b>	4	0.720	>60.3	>84
<b>2(2,2)</b>	2	30.90	>75.6	>2.5
<b>2(1,1)</b>	3	2.910	90.4	36
<b>4(7,7)</b>	2	0.260	129.3	500
<b>4(5,5)</b>	3	0.101	113.3	1119

The spacer  $-(CH_2)_n$  connecting the heterocyclic ring and the nitrogen atom closer to the phenyl ring gives better anti-HIV activity number results.

Compound	group	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	SI
<b>8(5,5)</b>	amide	>282.7	>282.7	---
<b>4(5,5)</b>	amine	0.101	113.3	1119
<b>13(5,5)</b>	amide	2.539	>60.3	>24
<b>5(5,5)</b>	amine	0.325	>62.4	>192

The presence of amide groups dramatically reduces the activity of the compounds.

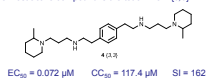
### Conclusion

With the end of improving the anti-HIV activity and reducing the cytotoxicity of our tetramines, two new synthetic pathways were developed to obtain new analogues of compounds **2** including a different number of methylene substituents in both sides of the central phenyl core.

The new tetramines **4(x,x)** and **5(x,y)** covered a huge range of biological activities ( $0.072 \mu$ M >  $EC_{50}$  > 328  $\mu$ M).

The inclusion of two methylene groups between the central phenyl ring and the first nitrogen atom of the diamine chain has a beneficial impact not only increasing the  $EC_{50}$  values but also reducing the cytotoxic effect.

The most active compound is the tetramine **4(3,3)**.



$EC_{50}$  = 0.072  $\mu$ M  $CC_{50}$  = 117.4  $\mu$ M SI = 1625

### References

- J. A. Esté et al. *Lancet* **2007**, 370, 81-88.
- S. Petterson et al. *ChemMedChem* **2008**, 3, 1549-1557.
- S. Petterson et al. *ChemMedChem* **2010**, 5, 1272-1281.
- V. Pérez-Nueno et al. *J.Chem.Inf.Model.* **2008**, 48(3), 509-533.

### Acknowledgements

José A. Esté and Bonaventura Clotet from the Fundació Isricacxa (Hospital Germans Trias i Pujol) for the biological evaluation. Financial support by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad project SAF2010-C21617-C02 is greatly acknowledged. A. Gibert wants to thank IQS School of Engineering for the scholarship.





Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 1455

## Nitrogen positional scanning in tetramines active against HIV-1 as potential CXCR4 inhibitors†

Raimon Puig de la Bellacasa,<sup>a</sup> Albert Gibert,<sup>a</sup> Jesús M. Planesas,<sup>a</sup> Laia Ros-Blanco,<sup>a</sup> Xavier Batllori,<sup>a</sup> Roger Badia,<sup>b</sup> Bonaventura Clotet,<sup>b</sup> José Esté,<sup>b</sup> Jordi Teixidó<sup>a</sup> and José I. Borrell\*<sup>a</sup>

The paradigm, derived from bicyclams and other cyclams, by which it is necessary to use the *p*-phenylene moiety as the central core in order to achieve high HIV-1 antiviral activities has been reexamined for the more flexible and less bulky structures **4**, previously described by our group as potent HIV-1 inhibitors. The symmetrical compounds **7**<sub>(x,x)</sub> and the non-symmetrical compounds **8**<sub>(x,y)</sub> were designed, synthesized and biologically evaluated in order to explore the impact on the biological activity of the distance between the phenyl ring and the first nitrogen atom of the side chains. EC<sub>50</sub> exactly followed the order **7**<sub>(x,x)</sub> < **8**<sub>(x,x)</sub> < **4**<sub>(x,x)</sub> indicating that, for such flexible tetramines, the presence of two methylene units on each side of the central phenyl ring increases the biological activity contrary to AMD3100. A computational study of the interactions of **4**<sub>(3,3)</sub>, **7**<sub>(3,3)</sub> and **8**<sub>(3,3)</sub> with CXCR4 revealed interactions in the same pocket region with similar binding modes for **4**<sub>(3,3)</sub> and **7**<sub>(3,3)</sub> but a different one for **8**<sub>(3,3)</sub>.

Received 24th November 2015,  
Accepted 10th December 2015

DOI: 10.1039/c5ob02419f

www.rsc.org/obc

## Introduction

Since the discovery of the bicyclam AMD3100 (**1**, plerixafor, EC<sub>50</sub> = 0.002 μM),<sup>1,2</sup> the first small molecule CXCR4 inhibitor, a lot of efforts have been devoted to develop more potent, selective and less toxic inhibitors. Such research has included the synthesis of monocyclam derivatives (AMD3465,<sup>3</sup> AMD3451,<sup>4</sup> ...) and non-cyclam derivatives (AMD070,<sup>5</sup> **2**,<sup>6</sup> **3**,<sup>7</sup> ...) (Fig. 1).

The reason for such interest was, initially, the use by the human immunodeficiency virus (HIV) of the chemokine receptor CXCR4 as a coreceptor during the HIV cell fusion and entry, which starts with the interaction of the virus envelop glycoprotein gp120 with the primary receptor CD4.<sup>8</sup> However, more recently, CXCR4 has been connected with the regulation of the trafficking and homing of various cell types including stem cells and cancer stem cells. Among others, the CXCL12/CXCR4 pathway<sup>9</sup> promotes tumor vasculogenesis and angiogenesis in tumor stem-like glioma cells.<sup>10</sup> In fact plerixafor (**1**, AMD3100) has been commercialized (trade name Mozobil) as an immunostimulant used to mobilize stem cells to the peripheral blood for collection and subsequent autologous stem-cell transplantation.<sup>2</sup>

In this context, our work in the field of anti-HIV entry/fusion inhibitors<sup>11–13</sup> identified novel potent CXCR4 coreceptor inhibitors of the general structure **4** (Fig. 2). Among these tetramines, compound **5** was selected as the lead compound because it shows almost the same level of activity (**5**, EC<sub>50</sub> = 0.019 μM) as the reference compound **1** and shows no cell toxicity at concentrations up to 25 μg mL<sup>-1</sup>.<sup>11</sup> More recently, we have synthesized three stereoisomers of compound **5** (**5**(*R,R*), **5**(*S,S*), and the *meso* form **5**(*S,R*)) and evaluated their effect on glioma initiating cells (GICs) in comparison with the prototype compound AMD3100.<sup>14</sup>

Through our research and previous ones, a paradigm has been widely accepted: to use the *p*-phenylene moiety as the central core for the connection of nitrogen heterocycles linked to two nitrogen atoms on both sides of such a core. This paradigm, the presence of a single carbon atom between the central phenyl ring and the first nitrogen of the side chain, comes from the study of Bridger *et al.*<sup>15</sup> who showed that, in the case of analogues **6** (Fig. 2), the HIV-1 antiviral activity of **6a** (*m* = 2; EC<sub>50</sub> = 14.8 μM) was 3–4 orders of magnitude less effective than AMD3100 although in the case of **6b** (*m* = 3; EC<sub>50</sub> = 0.4 μM) the diminution was not so clear.

Our conviction that such a paradigm could not be necessarily valid for structures less hindered than AMD3100 led us to carry out a positional scanning of the nitrogen atoms present on each side of the central phenyl ring of structures **4** in order to explore the impact on the biological activity of the distance between the phenyl ring and the first nitrogen atom of the side chains.

<sup>a</sup> Grup d'Enginyeria Molecular, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, Via Augusta, 390, E-08017 Barcelona, Spain. E-mail: j.i.borrell@iqs.url.edu

<sup>b</sup> AIDS Research Institute IrsiCaixa, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, 08916 Badalona, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5ob02419f

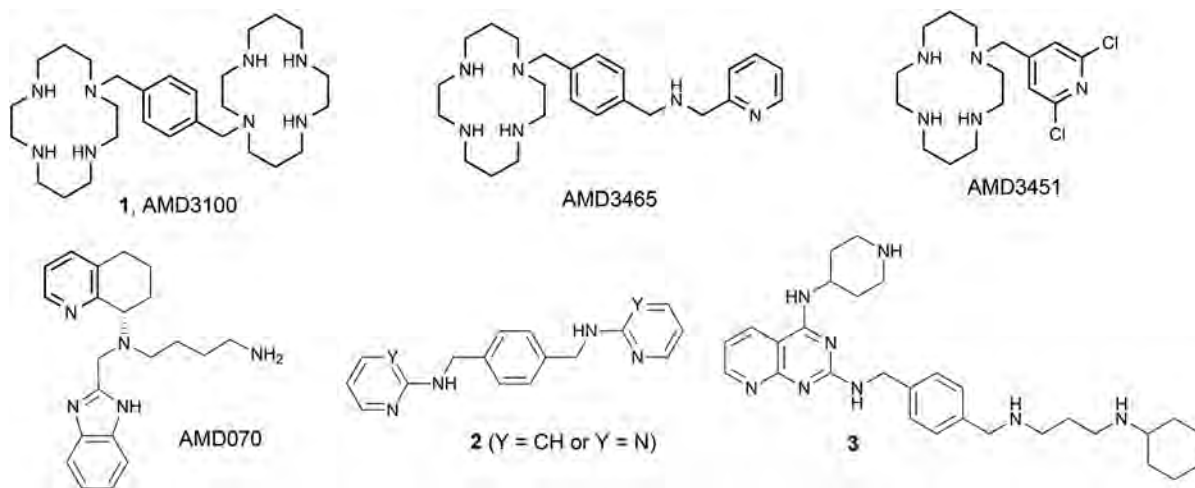


Fig. 1 Structures of the bicyclam AMD3100 (1), monocyclams AMD3465 and AMD3451, and non-cyclam CXCR4 inhibitors AMD070, 2, and 3.

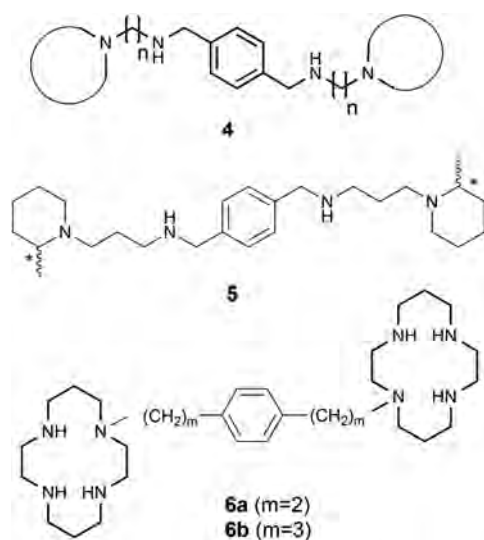


Fig. 2 General structures of tetramines 4, compound 5, and AMD3100 analogues 6.

The present paper describes the design, synthesis and biological evaluation of two families of compounds: the symmetrical compounds 7 (in which  $m = 2$  on both sides) and the non-symmetrical compounds 8 (in which  $m = 1$ , on one side, and  $m = 2$ , on the other side) (Fig. 3).

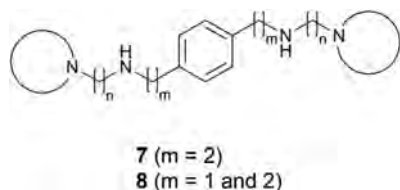


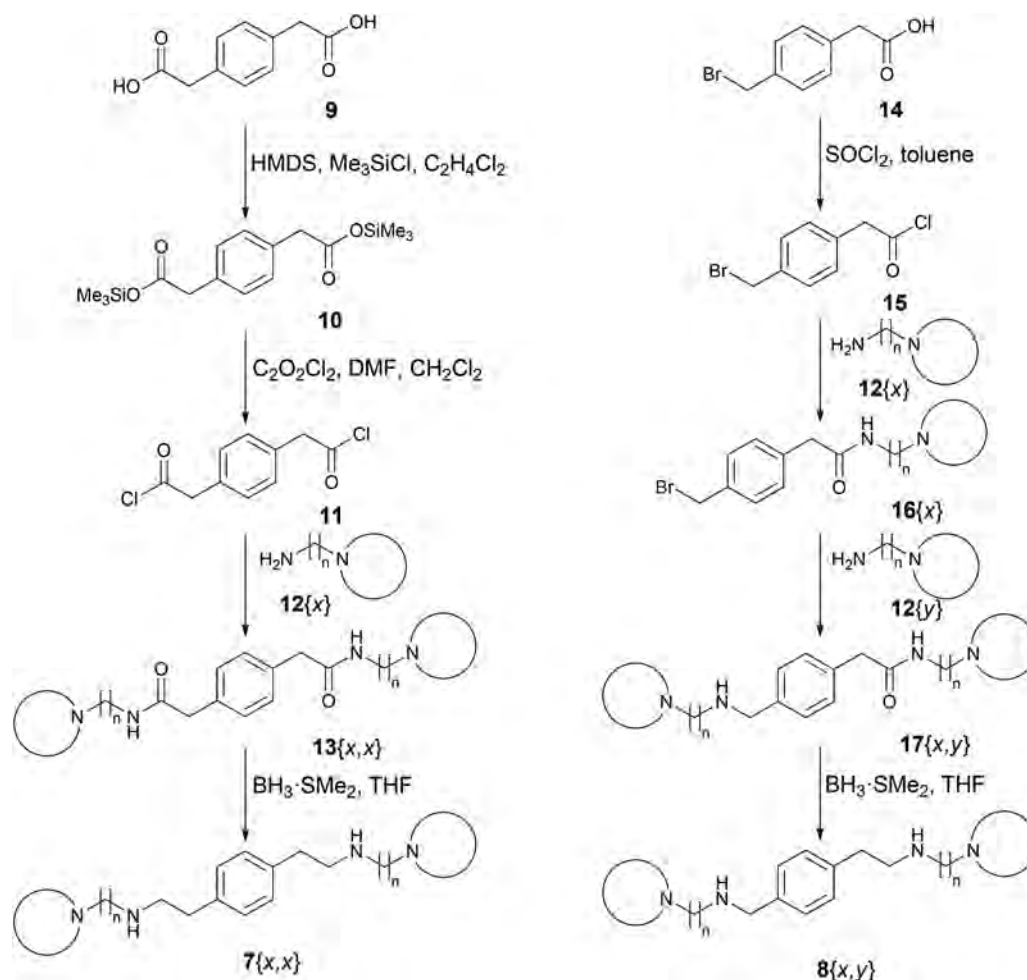
Fig. 3 General structures of the new tetramines 7 and 8.

## Results and discussion

Compounds 4 containing the *p*-phenylene moiety as the central core were synthesized using reductive amination starting from terephthalaldehyde, to afford symmetrical compounds using two equivalents of the same primary amine, or 4-(diethoxymethyl)benzaldehyde which allows the stepwise introduction of two different primary amines to afford non-symmetrical compounds.<sup>11</sup> However, in the case of compounds 7 and 8 it was not possible to use the same synthetic strategy because the corresponding required dialdehydes, 1,4-phenylenediacetaldehyde and 4-(formylmethyl)benzaldehyde, respectively, were not commercially available. Moreover, it was not possible to synthesize them because of their described instability that was also observed in our hands.<sup>16,17</sup> Consequently, it was necessary to develop alternative synthetic routes for 7 and 8.

For the synthesis of the symmetrical tetramines 7{x,x}, we decided to start from 1,4-benzenediacetic acid (9) (Scheme 1) which was transformed to the diacyl dichloride 11 in two steps. Therefore, compound 9 was converted into the bis(trimethylsilyl) 1,4-benzenediacetate (10) upon treatment with hexamethyldisilazane (HMDS)/Me<sub>3</sub>SiCl/1,2-dichloroethane as previously described by Falck-Pedersen *et al.*<sup>18</sup> The subsequent treatment of 10 with oxalyl chloride/DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> yielded 1,4-benzenediacetyl chloride (11) which was converted to the corresponding diamides 13{x,x} upon treatment with two equivalents of the respective amines 12{x}. Finally, the reduction of amides 13{x,x} with BH<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub> in THF yielded the desired symmetrical tetramines 7{x,x} (Scheme 1).

In order to obtain the non-symmetrical compounds 8{x,y}, we selected 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetic acid (14) as the starting material (Scheme 1) due to the different reactivity of the two ends of the molecule which allows the derivatization of both positions with the same or different amines 12{x} to afford compounds 8{x,x} and 8{x,y}, respectively. Thus, the



Scheme 1 Synthetic protocols for the preparation of symmetrical and non-symmetrical diamines 7{x,x} and 8{x,y}, respectively.

first amine 12{x} was introduced by acylation with acid chloride 15, prepared by treating 14 with SOCl<sub>2</sub>/toluene. Subsequently, a second amine unit 12{x} or 12{y} was introduced by nucleophilic substitution of the benzyl bromine atom of the intermediates 16{x}. Finally, the reduction of the resulting compounds 17{x,x} or 17{x,y} with BH<sub>3</sub>·SMe<sub>2</sub> yielded the desired non-symmetrical compounds 8{x,x} or 8{x,y}, respectively (Scheme 1).

A second and important part of our positional scanning of the nitrogen atoms present on each side of the central phenyl ring was the selection of the amines 12{x} (Fig. 4). Such amines are constituted by a nitrogen-containing heterocyclic system (pipercoline, piperidine, piperazine, morpholine, pyrrolidine, and imidazole) linked to a -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- spacer (where n = 2, 3 or 4) which ends in an NH<sub>2</sub> group. Some of these compounds are commercially available, others were previously obtained by our group for the synthesis of tetramines 4{x,y}<sup>11</sup> but some of them have been synthesized specially for this work. This was the case of 12{5} that was obtained using the same protocol previously described by our group.<sup>11</sup> Amines 12{10} and 12{11} in which n = 4 were synthesized by alkylation

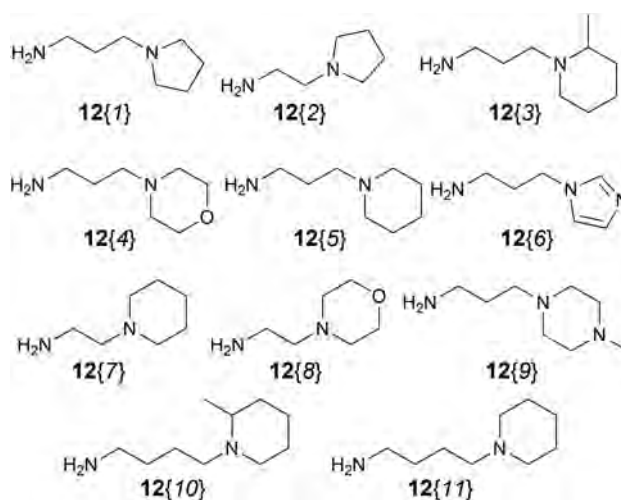


Fig. 4 Amines 12{x} used for the synthesis of compounds 7{x,x} and 8{x,y}.



of the corresponding nitrogenated heterocycle, 2-methylpiperidine (**19**{10}) and piperidine (**19**{11}), with the bromoalkyl phthalimide **18** to afford the intermediates **20**{10} and **20**{11}. The subsequent acid hydrolysis of the phthalimido protecting group yielded the desired amines **12**{10} and **12**{11} (Scheme 2).

Once the symmetrical compounds  $7\{x,x\}$  and the non-symmetrical compounds  $8\{x,y\}$  were synthesized, they were tested together with the amide intermediates  $13\{x,x\}$  and  $17\{x,y\}$  for anti-HIV activity ( $EC_{50}$ ) and cytotoxicity ( $CC_{50}$ ) (Table 1).

From the values obtained some initial conclusions can be drawn: the presence of amide groups dramatically reduces the activity as it can be seen by comparing the  $EC_{50}$  of compounds  $13\{x,x\}$  and  $17\{x,y\}$  with those of compounds  $7\{x,x\}$  and  $8\{x,y\}$ , respectively. Moreover, monoamides  $17\{x,y\}$  showed better activity than diamides  $13\{x,x\}$ . This fact is easily observable by the direct comparison of the  $EC_{50}$  of compounds containing the same amine building blocks:  $17\{3,3\}$  ( $EC_{50} = 1.012 \mu\text{M}$ ) and  $17\{5,5\}$  ( $EC_{50} = 2.539 \mu\text{M}$ ) against  $13\{3,3\}$  ( $EC_{50} = 144.47 \mu\text{M}$ ) and  $13\{5,5\}$  ( $EC_{50} > 282.39 \mu\text{M}$ ), respectively.

On the other hand, the nine new tetramines  $7\{x,x\}$  and six tetramines  $8\{x,y\}$  covered a huge range of biological activities ( $0.072 \mu\text{M} > EC_{50} > 328 \mu\text{M}$ ). Seven of these compounds presented  $EC_{50} \leq 1 \mu\text{M}$ , the most potent being  $7\{3,3\}$  ( $EC_{50} = 0.072 \mu\text{M}$ ).

Among the different amines  $12\{x\}$  used,  $12\{3\}$ ,  $12\{5\}$  and  $12\{1\}$  gave the most active compounds in the three families of compounds  $4\{x,y\}$ ,  $7\{x,x\}$  and  $8\{x,y\}$  when the same amine is present on both ends of the compound. These three amines have in common a propylene spacer ( $-(\text{CH}_2)_3-$ ) connecting the heterocyclic ring and the nitrogen atom closer to the phenyl ring and contain only one nitrogen atom in the heterocyclic ring.

The comparison of the  $EC_{50}$  of compounds  $7\{x,x\}$  with those of compounds  $4\{x,y\}$  prepared using the same amine  $12\{x\}$  clearly showed that higher activities were obtained for compounds  $7\{x,x\}$  in eight out of nine cases. With the sole exception of compounds  $7\{9,9\}$  and  $4\{9,9\}$  prepared with amine  $12\{9\}$ , better activity values and less toxicity were showed in cell tests when the central core is a 1,4-phenylenbis-(ethylene) moiety (compounds  $7\{x,x\}$ ) instead of a 1,4-phenylenebis-(methylene) one (compounds  $4\{x,y\}$ ).

This trend is also observed when the  $EC_{50}$  of compounds  $8\{x,y\}$  are considered. These compounds present a central core with a methylene subunit on one side of the central phenyl

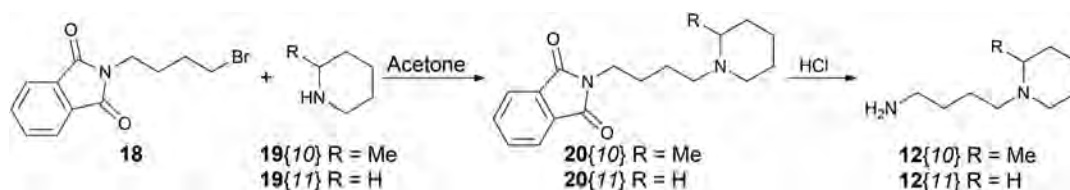
ring and an ethylene subunit on the other side. When we compare the  $EC_{50}$  values of  $7\{3,3\}$  ( $0.072 \mu\text{M}$ ),  $8\{3,3\}$  ( $0.114 \mu\text{M}$ ) and  $4\{3,3\}$  ( $0.121 \mu\text{M}$ ) or those of  $7\{5,5\}$  ( $0.101 \mu\text{M}$ ),  $8\{5,5\}$  ( $0.325 \mu\text{M}$ ) and  $4\{5,5\}$  ( $0.362 \mu\text{M}$ ), we can observe that the  $EC_{50}$  exactly follow the order  $7\{x,x\} < 8\{x,x\} < 4\{x,x\}$ . This observation let us conclude that for the kind of tetramines studied by our group as potential anti-HIV compounds, the presence of two methylene units on each side of the central phenyl ring increases the biological activity contrary to what has been observed in the case of AMD3100.

In the case of the non-symmetrical structures  $4\{x,y\}$  and  $8\{x,y\}$ , prepared using different amines  $12\{x\}$  on each end of the molecule and in contrast to the symmetrical structures, at least in two cases compounds **4** ( $4\{3,4\}$ ,  $EC_{50} = 1.242 \mu\text{M}$ ;  $4\{1,4\}$ ,  $EC_{50} = 4.271 \mu\text{M}$ ) are more active than the corresponding compounds **8** ( $8\{4,3\}$ ,  $EC_{50} = 1.695 \mu\text{M}$ ;  $8\{4,1\}$ ,  $EC_{50} = 9.725 \mu\text{M}$ ). Among these compounds,  $8\{5,3\}$  showed better anti-HIV activity ( $EC_{50} = 0.087 \mu\text{M}$ ).

Another interesting comparison arises from the  $m + n$  value in symmetrical structures  $4\{x,x\}$  and  $7\{x,x\}$ . Thus, in Table 2 are included those structures in which  $m + n = 5$  and the  $EC_{50}$  values clearly show that compounds  $7\{x,x\}$  with  $m = 2$  ( $EC_{50}$  of  $7\{5,5\}$  and  $7\{3,3\}$  are  $0.101$  and  $0.072 \mu\text{M}$  respectively) are nearly 10-fold more active than compounds  $4\{x,x\}$  with  $m = 1$  ( $EC_{50}$  of  $4\{11,11\}$  and  $4\{10,10\}$  are  $0.72$  and  $0.76 \mu\text{M}$  respectively). On the other hand, the comparison of the  $EC_{50}$  values in symmetrical structures  $4\{x,x\}$  and  $7\{x,x\}$  when  $m + n = 4$  (Table 3) helps to conclude that in this case the value of  $m$  is not so important in molecules of this length, as compounds with the same terminal cyclic amine have nearly the same  $EC_{50}$ .

Table 3 also shows that the nature of the terminal heterocyclic ring plays an important role in the biological activity. Thus, symmetrical compounds  $4\{x,x\}$  and  $7\{x,x\}$  prepared with an amine  $12\{x\}$  bearing a pyrrolidine ( $12\{1\}$  or  $12\{2\}$ ) or a piperidine ( $12\{5\}$  or  $12\{7\}$ ) present better anti-HIV activities ( $EC_{50} = 2.51, 1.42, 0.362,$  and  $0.26 \mu\text{M}$ , respectively) while those prepared with an amine  $12\{x\}$  bearing a morpholine ( $12\{4\}$ ,  $12\{8\}$ ) gave  $EC_{50} > 320.1 \mu\text{M}$ .

Finally, in order to globally evaluate the results obtained, the  $EC_{50}$  and  $CC_{50}$  values of AMD3100 were determined ( $EC_{50} = 0.004 \mu\text{M}$ ;  $CC_{50} > 10 \mu\text{M}$ ) by following the same methodology as for our compounds. As it can be seen, compounds  $7\{3,3\}$  ( $EC_{50} = 0.072 \mu\text{M}$ ) and  $8\{5,3\}$  ( $EC_{50} = 0.087 \mu\text{M}$ ) present nearly the same level of activity as the reference and also show a good therapeutic index ( $SI = 1625$  and  $>694$ , respectively).



Scheme 2 Synthesis of the amines **12**{10} and **12**{11}.



Table 1 EC<sub>50</sub> and CC<sub>50</sub> of amides 13{x,x} and 17{x,y}, and tetramines 4{x,y}, 7{x,x} and 8{x,y}

Compound			EC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	CC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	EC <sub>50</sub> (µM)	CC <sub>50</sub> (µM)	SI
	12{x}	12{y}					
13{1,1}	12{1}	12{1}	> 64.6	> 64.6	>155.82	> 155.82	—
13{2,2}	12{2}	12{2}	4.2	>125	10.87	>323.39	>29.8
13{3,3}	12{3}	12{3}	68	>125	144.47	>265.57	>1.8
13{4,4}	12{4}	12{4}	>125	>125	>279.91	>279.91	—
13{5,5}	12{5}	12{5}	>125	>125	>282.39	>282.39	—
13{6,6}	12{6}	12{6}	>125	>125	>306	>306	—
13{7,7}	12{7}	12{7}	2.0	>125	4.82	>301.51	>62.5
13{8,8}	12{8}	12{8}	>125	>125	>298.66	>298.66	—
13{9,9}	12{9}	12{9}	>125	>125	>264.46	>264.46	—
7{1,1}	12{1}	12{1}	0.068	37	0.18	95.70	544
7{2,2}	12{2}	12{2}	0.51	70	1.42	195.22	137
7{3,3}	12{3}	12{3}	0.032	52	0.072	117.45	1625
7{4,4}	12{4}	12{4}	20.73	101	49.52	241.27	5
7{5,5}	12{5}	12{5}	0.042	47	0.101	113.34	1119
7{6,6}	12{6}	12{6}	>125	>125	>328.49	>328.49	—
7{7,7}	12{7}	12{7}	0.1	5.0	0.26	129.33	500
7{8,8}	12{8}	12{8}	>125	>125	>320.1	>320.1	—
7{9,9}	12{9}	12{9}	>36.03	36	>81.02	81.02	—
4{1,1} <sup>a</sup>	12{1}	12{1}	0.9	32.4	2.51	90.4	36
4{2,2} <sup>a</sup>	12{2}	12{2}	10.2	>25	30.9	>75.6	>2.5
4{3,3} <sup>a</sup>	12{3}	12{3}	0.050	>25	0.12	>60.3	>500
4{4,4} <sup>a</sup>	12{4}	12{4}	>125	>125	>320.1	>320.1	—
4{5,5} <sup>a</sup>	12{5}	12{5}	0.14	>25	0.362	>64.65	>179
4{6,6} <sup>a</sup>	12{6}	12{6}	>59.5	59.5	>168.8	168.8	—
4{7,7} <sup>a</sup>	12{7}	12{7}	>11.7	11.7	>32.6	32.6	—
4{8,8} <sup>a</sup>	12{8}	12{8}	>85.7	85.7	>236.4	236.4	—
4{9,9} <sup>a</sup>	12{9}	12{9}	9.5	>125	22.8	>300	>13
4{10,10} <sup>a</sup>	12{10}	12{10}	0.336	>25	0.76	>56.47	>74
4{11,11} <sup>a</sup>	12{11}	12{11}	0.298	>25	0.72	>60.29	>84
4{3,4} <sup>a</sup>	12{3}	12{4}	0.5	>25	1.242	>62.1	>50
4{1,4} <sup>a</sup>	12{1}	12{4}	1.6	>25	4.271	>66.7	>16
17{3,3}	12{3}	12{3}	0.448	>25	1.012	>56.47	>56
17{4,4}	12{4}	12{4}	>25	>25	>59.73	>59.73	—
17{4,1}	12{4}	12{1}	>25	>25	>62.10	>62.10	—
17{4,3}	12{4}	12{3}	2.894	>25	6.720	>58.05	>9
17{5,5}	12{5}	12{5}	1.053	>25	2.539	>60.29	>24
17{5,3}	12{5}	12{3}	0.596	>25	1.390	>58.32	>42
8{3,3}	12{3}	12{3}	0.049	>25	0.114	>58.32	>510
8{4,4}	12{4}	12{4}	>25	>25	61.79	>61.79	—
8{4,1}	12{4}	12{1}	3.779	>25	9.725	>64.34	>7
8{4,3}	12{4}	12{3}	0.706	>25	1.695	>60.00	>35
8{5,5}	12{5}	12{5}	0.130	>25	0.325	>62.40	>192
8{5,3}	12{5}	12{3}	0.036	>25	0.087	>60.29	>694

<sup>a</sup> Compounds previously described by our group.<sup>11</sup> EC<sub>50</sub>: effective concentration 50 or concentration needed to inhibit by 50% HIV-induced cell death evaluated with the MTT method in MT-4 cells. CC<sub>50</sub>: cytotoxic concentration 50 or concentration needed to induce 50% death of non-infected MT-4 cells with the MTT method. Reference compound: AMD3100: EC<sub>50</sub> = 0.004 µM, CC<sub>50</sub> > 10 µM.

In order to understand the results obtained, a computational study was carried out. This study consisted of the analysis of the interactions of CXCR4 with three different molecules: 4{3,3}, 7{3,3} and 8{3,3} (Fig. 5). In our previous work,<sup>19</sup> we evaluated the docking-based virtual screening performance of CXCR4 crystal structures. We showed how PDB 3OE6 achieved the highest virtual screening performance using the docking function Ligandfit<sup>20</sup> and the scoring function DockScore.<sup>21</sup>

In the present work, structures 4{3,3}, 7{3,3} and 8{3,3} were prepared using the protocol LigPrep<sup>22</sup> from Schrödinger. The force field OPLS 2005 was applied to generate possible tautomers, stereoisomers and ionization states at pH 7 ± 2 with an *ionizer*. Protein–ligand interactions established for the

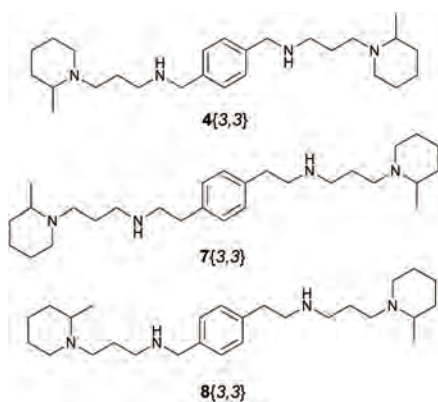
best poses obtained for each structure are shown in Fig. 6. All three compounds 4{3,3}, 7{3,3} and 8{3,3} bind CXCR4 in the same region of the extracellular pocket of CXCR4 because, in general, they have similar interactions with the same residues of CXCR4. Nevertheless, the binding modes and some of the interactions are different depending on each compound. In the best binding pose of 4{3,3} three side chain hydrogen bond donors were found between the two hydrogens of the protonated secondary amine and Asp187 and between the protonated pipercoline amine on the other side of the central aromatic ring and Asp97 oxygen, two ionic interactions were also found between the same protonated amines and Asp187 and Asp97 oxygens as before.

**Table 2** EC<sub>50</sub> and CC<sub>50</sub> of compounds 4{x,x} and 7{x,x} in which m + n = 5

Structure	m	n	EC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)	
	4{11,11}	1	4	0.72	>60.29
	7{5,5}	2	3	0.101	113.34
	4{10,10}	1	4	0.76	>56.47
	7{3,3}	2	3	0.072	117.45

**Table 3** EC<sub>50</sub> and CC<sub>50</sub> of compounds 4{x,x} and 7{x,x} in which m + n = 4

Structure	m	n	EC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)	
	4{1,1}	1	3	2.51	90.4
	7{2,2}	2	2	1.42	195.22
	4{5,5}	1	3	0.362	>64.65
	7{7,7}	2	2	0.26	129.33
	4{4,4}	1	3	>320.1	>320.1
	7{8,8}	2	2	>320.1	>320.1

**Fig. 5** Structures of compounds 4{3,3}, 7{3,3} and 8{3,3}.

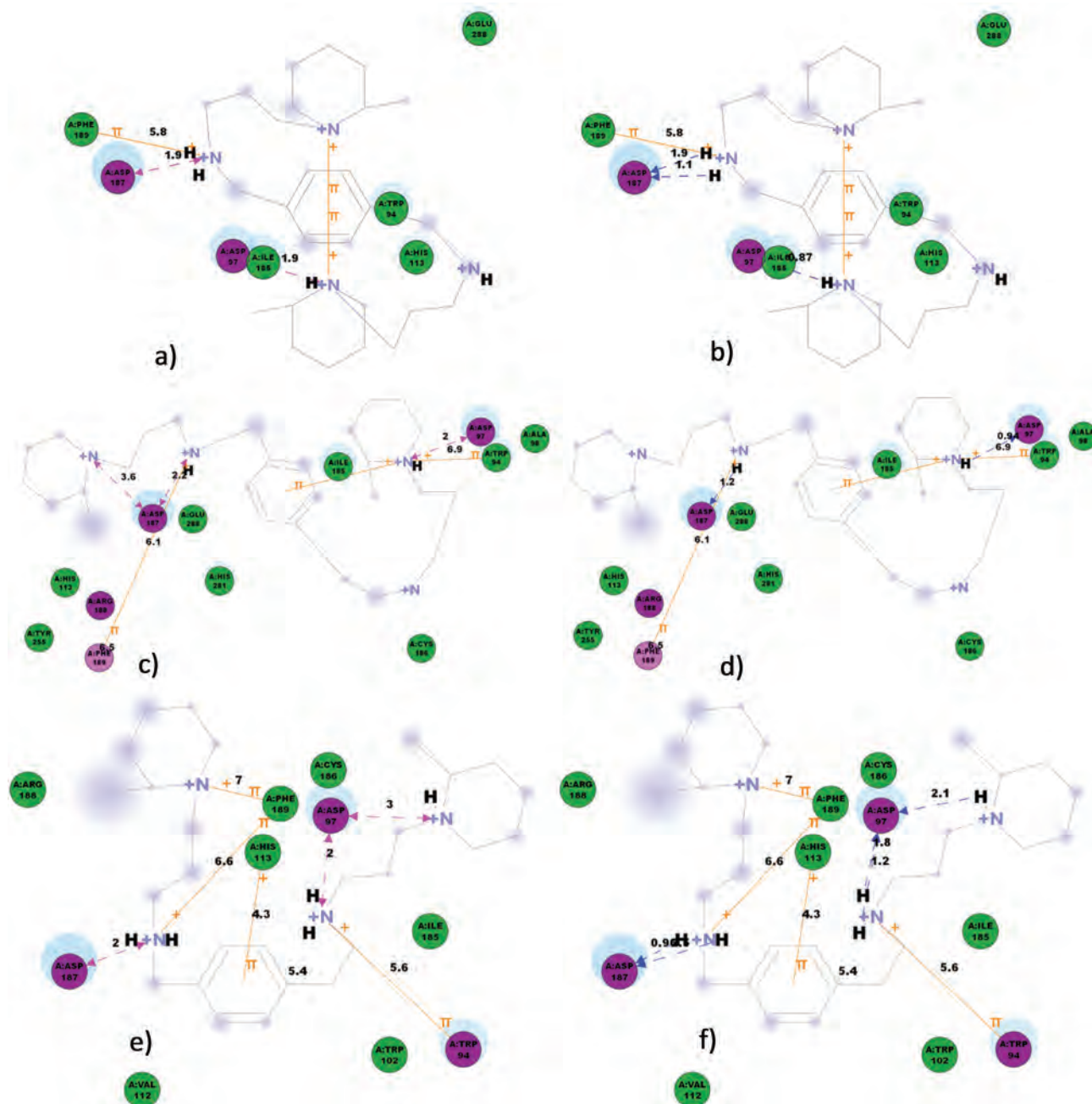
Three  $\pi$  interactions were also found, one between the same protonated secondary amine and Phe189 and two intramolecular  $\pi$  interactions between both protonated pipercoline amines and the central aromatic ring. Also, polar interactions were found between 4{3,3} and Asp97, Arg183, Asp187, Arg188 and His281 and van der Waals interactions with residues Leu41, Tyr45, Trp94, Ala98, Trp102, His113, Tyr116, Ile185, Cys186, Phe189, Tyr190, Tyr255 and Glu288 (Fig. 6).

The best binding pose of 7{3,3} shows two possible side chain hydrogen bond donors between the protonated secondary amine and Asp187 oxygen and between the protonated

pipercoline amine on the other side of the central aromatic ring and Asp97 oxygen. Furthermore, three ionic interactions were also found between Asp187 oxygen and the protonated pipercoline and secondary amine, both on the same side of the structure, and between Asp97 oxygen and the protonated pipercoline on the other side of the central aromatic ring. Three possible  $\pi$  interactions were found, as above for 4{3,3}, one between the protonated secondary amine and Phe189 and two between the protonated pipercoline amine on the other side of the central aromatic ring and Trp94. Polar interactions were also found between 7{3,3} and Asp97, Asp187, Arg188 and Phe189 and van der Waals interactions with residues Asn37, Leu41, Tyr45, Trp94, Ala98, Trp102, His113, Tyr116, Arg183, Ile185, Cys186, Tyr190, Tyr255, His281, Ser285 and Glu288 (Fig. 6).

The best binding conformation of 8{3,3} shows five possible side chain hydrogen bond donors, two between the protonated secondary amine, which is linked to the central aromatic ring by a methylene, and Asp187, and three possible ones between Asp97 and the protonated pipercoline amine and the protonated secondary amine, both in the same amino building block which is linked to the central aromatic ring by an ethylene group. Three possible ionic interactions were also found between Asp187 and the protonated secondary amine linked to the central aromatic ring with a methylene, and between Asp97 and the protonated pipercoline and/or the secondary amine situated in the same amino building block linked with the central aromatic ring by an ethylene. Four possible  $\pi$  interactions were found, two between both the protonated secondary amine and/or with the pipercoline situated in the same building block, which is linked to the central aromatic ring by a methylene, and Phe189, another between the protonated secondary amine linked to the central aromatic ring by an ethylene and Trp94 and between the central aromatic ring and His113. Polar interactions were found between 8{3,3} and Trp94, Asp97 and Asp 187 while van der Waals interactions were established with residues Ala98, Trp102, Val112, His113, Arg183, Ile185, Cys186, Arg188 and Phe189 (Fig. 6).

Protein–ligand interactions can be represented from the protein point of view and also from the ligand point of view. Fig. 7 shows the stronger interactions and the corresponding distances established between structures 4{3,3}, 7{3,3} and 8{3,3} with different residues of CXCR4. Structure 4{3,3} shows less number of interactions than structures 7{3,3} and 8{3,3} and the interactions established are located at one end of the molecule. This observation could explain why this structure showed the highest EC<sub>50</sub> of the three analogues. Despite this 8{3,3} shows more interactions than the other analogues, chiefly the  $\pi$  ones, and it showed higher EC<sub>50</sub> than 7{3,3}. This result could be explained by the fact that 7{3,3} is the only compound that has shown charge interactions at each end of the molecule, at both nitrogens of the pipercolines. Charge interactions are considered the most determinant interactions established by CXCR4<sup>23</sup> and by HIV when they enter a host cell.<sup>24</sup> These charge interactions could block the overall structure of 7{3,3} in the binding site, reducing global movements



**Fig. 6** Docking binding modes of 4{3,3}, 7{3,3} and 8{3,3}. The diagrams show, separately and for a question of clarity, charge interactions (left diagrams) and hydrogen bond interactions (right diagrams) as well as the corresponding distances established between 4{3}, 7{3} and 8{3} and CXCR4. (a) and (b) correspond to the CXCR4-4{3,3} interactions, (c) and (d) to the CXCR4-7{3,3} interactions and (e) and (f) to the CXCR4-8{3,3} interactions found for the best binding poses obtained. The diagrams depict hydrogen bonds (blue arrows), charge interactions (pink arrows),  $\pi$  interactions (orange lines), ionic interactions (magenta circles), solvent (blue halo) and van der Waals interactions (green circles).

of the structure and therefore stabilizing interactions with CXCR4 inhibiting more effectively the HIV activity.

In addition, the representation in Table 4 of the protein-ligand interactions, considering the protein point of view, shows that 8{3} was the ligand which presented fewer interactions (13) with CXCR4 while 7{3,3} was the one which presented more (20). 4{3,3} shows 18 interactions, all of them

with the same amino acids as 7{3,3}. These different interactions could be explained by the study of the binding conformations of 4{3,3}, 7{3} and 8{3,3} which are superposed in Fig. 8. It seems as if all three compounds interacted with CXCR4 in the same pocket region, but if we compare the docked poses of each compound, it is noticeable that compounds 4{3,3} and 7{3,3} present a very similar binding mode



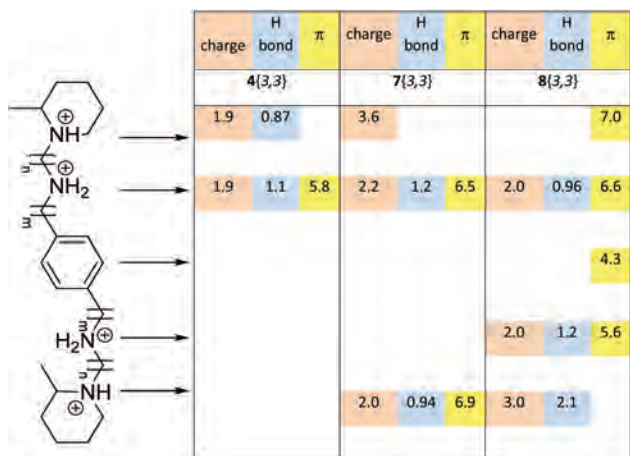


Fig. 7 Representation of the main protein–ligand interactions (charge interactions in pink colour, hydrogen bonding in blue, and  $\pi$  interactions in yellow) and the interaction distances established by structures 4{3,3}, 7{3,3} and 8{3,3}.

(Fig. 8a and b), whilst compound 8{3,3} shows a different one (Fig. 8c), establishing accordingly different interactions with CXCR4.

## Conclusions

The present paper has shown that, contrary to AMD3100 and other cyclams, the paradigm by which it is necessary to use the *p*-phenylene moiety as the central core in order to achieve a high HIV-1 antiviral activity is not necessarily valid for structures less hindered than AMD3100.

Starting from structures 4, previously described by our group as potent CXCR4 coreceptor inhibitors, we carried out a positional scanning of the nitrogen atoms present on each side of the central phenyl ring in order to explore the impact on the biological activity of the distance between the phenyl ring and the first nitrogen atom of the side chains. Consequently, two families of compounds were designed, synthesized and biologically evaluated: the symmetrical compounds 7{x,x} (in which  $m = 2$  on both sides) and the non-symmetrical compounds 8{x,y} (in which  $m = 1$ , on one side, and  $m = 2$ , on the other side) (Fig. 3). The corresponding synthetic itineraries (Scheme 1) use 1,4-benzenediacetic acid (9) and 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetic (14) acid, respectively, and a library of amines of the general structure 12{x} as starting materials.

The results obtained indicate that 12{3}, 12{5} and 12{1} gave the most active compounds in the three families of compounds 4{x,y}, 7{x,x} and 8{x,y} when the same amine is present on both ends of the compound.

Furthermore, the  $EC_{50}$  exactly follows the order 7{x,x} < 8{x,x} < 4{x,x}. This observation let us conclude that for the kind of tetramines studied by our group as potential anti-HIV compounds, the presence of two methylene units on

Table 4 Amino acids involved in the interaction between CXCR4 and 4{3,3}, 7{3,3} and 8{3,3}, respectively

	4{3,3}	7{3,3}	8{3,3}
Pro27			
Glu32			
Asn35			
Asn37			
Lys38			
Leu41			
Tyr45			
Trp94			
Asp97			
Ala98			
Trp102			
Val112			
His113			
Tyr116			
Thr117			
Asp171			
Ser178			
Arg183			
Ile185			
Cys186			
Asp187			
Arg188			
Phe189			
Tyr190			
Pro191			
Asn192			
Asp193			
Val196			
Phe199			
Gln200			
Tyr255			
Ile259			
Asp262			
Leu266			
Glu277			
His281			
Ile284			
Ser285			
Glu288			
Phe292			

each side of the central phenyl ring increases the biological activity contrary to what has been observed in the case of AMD3100.

In order to understand the results obtained, a computational study was carried out in which the interactions of CXCR4 with 4{3,3}, 7{3,3} and 8{3,3} were analyzed. Such a study revealed that although the three compounds could interact with CXCR4 in the same pocket region, the docked poses of compounds 4{3,3} and 7{3,3} show a very similar binding mode (Fig. 8a and b) whilst compound 8{3,3} shows a different one (Fig. 8c), establishing accordingly different interactions with CXCR4.

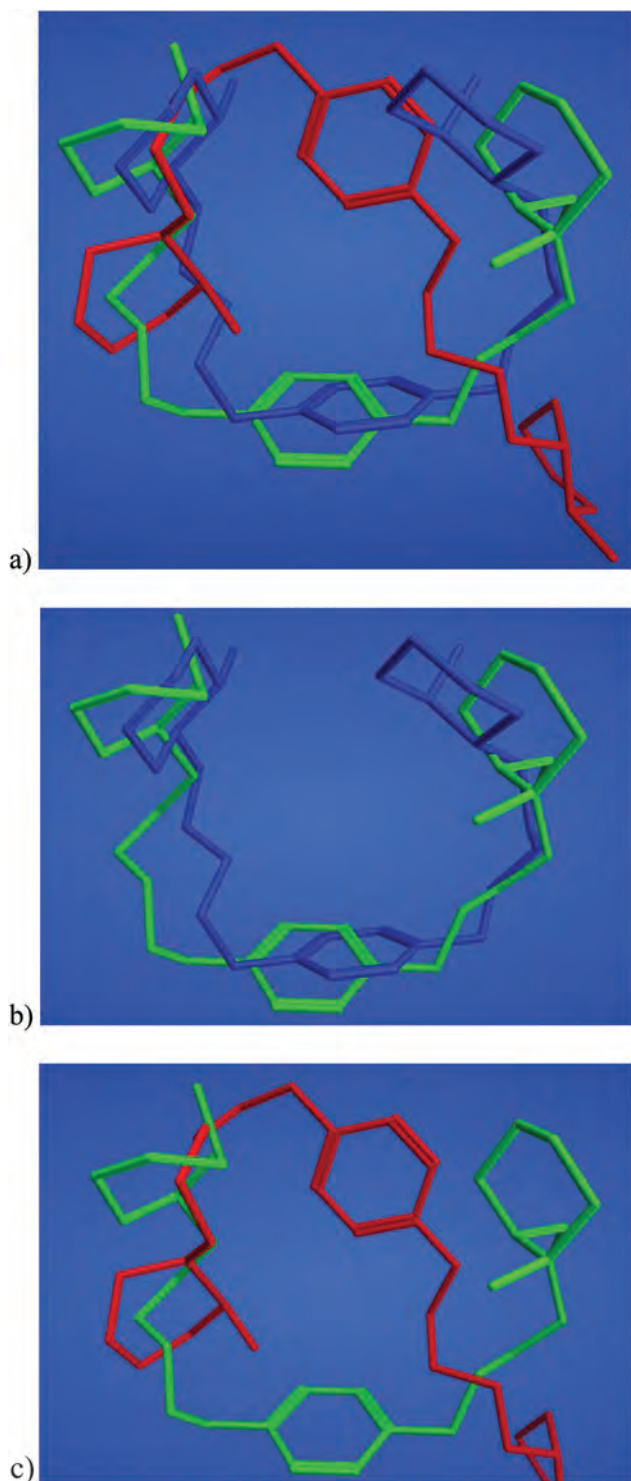


Fig. 8 Superposition of docked structures of 4{3,3} (blue), 7{3,3} (green) and 8{3,3} (red).

## Experimental

### General

All solvents and chemicals were reagent grade. Unless otherwise mentioned, all solvents and chemicals were purchased

from commercial vendors (Fluka, Aldrich, ABCR and ACROS Organics) and used without purification.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Varian 400-MR spectrometer ( $^1\text{H}$ -NMR at 400 MHz and  $^{13}\text{C}$ -NMR at 100.6 MHz). Chemical shifts were reported in parts per million ( $\delta$ ) and are referenced to tetramethylsilane (TMS) in  $^1\text{H}$ -NMR spectra and to the residual signal of the solvents  $\text{CDCl}_3$  (77.0) and methanol- $d_4$  (49.0), in  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra. Coupling constants are reported in hertz (Hz). Standard and peak multiplicities are designed as follows: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; dt, doublet of triplets; t, triplet; q, quadruplet; quint, quintuplet; br, broad signal. IR spectra were recorded on a Nicolet Magna 560 FTIR spectrophotometer and a Thermo Scientific Nicolet iS10 FTIR spectrophotometer with Smart iTr. Wavenumbers ( $\nu$ ) are expressed in  $\text{cm}^{-1}$ . MS data ( $m/z$  (%), EI, 70 eV) were obtained by using an Agilent Technologies 5975 spectrometer and a Hewlett Packard HP5988A quadrupole mass spectrometer operating in electronic ionization (EI) mode at 70 eV and at 4 kV accelerating potential, on a VG AutoSpec (Micromass Instruments) Trisector EBE spectrometer operating in Fast Atom Bombardment (FAB) mode. HRMS data were obtained by using a VG AutoSpec (Micromass Instruments) Trisector EBE high resolution spectrometer (EI or FAB mode). Elemental microanalyses were obtained on a Carlo-Erba CHNS-O/EA 1180 and a EuroVector Instruments Euro EA elemental analyzer. The melting points were determined with a Büchi-Tottoli 530 capillary apparatus and are uncorrected. Automatic flash chromatography was performed in an Isco Combiflash medium pressure liquid chromatograph with RediSep® silica gel columns (35–70  $\mu\text{m}$ ) using a suitable mixture of solvents as the eluent. Microwave irradiation experiments were carried out in an Initiator™ (Biotage) microwave apparatus, operating at a frequency of 2.45 GHz with a continuous irradiation power from 0 to 400 W. Reactions were carried out in 0.5, 2.5, 5, and 20 mL glass tubes, sealed with aluminum/Teflon crimp tops, which can be exposed to temperatures up to 250 °C and 20 bar internal pressure. Temperature was measured with an IR sensor on the outer surface of the process vial. After the irradiation period, the reaction vessel was cooled rapidly to 50 °C by air jet cooling.

### Synthetic procedures

***N,N'*-Bis(3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (13{1,1})**. A mixture of 1,4-benzenediacetic acid (**9**) (2.0 g, 10.30 mmol), hexamethyldisilazane (HMDS) (2.86 mL, 20.60 mmol) and trimethylchlorosilane (12 drops) in dry 1,2-dichloroethane (60 mL) was refluxed overnight under  $\text{N}_2$ . The solution was evaporated at reduced pressure. The residual material was bis(trimethylsilyl) 1,4-benzenediacetate (**10**). This product was dissolved in anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) and anhydrous DMF (4 drops) and oxalyl chloride (1.86 mL, 21.86 mmol) was added dropwise to the solution at 0 °C. The resulting solution was stirred for 1 h at 0 °C under  $\text{N}_2$  and for 1 h at room temperature before the solvent was removed at reduced pressure. The residual material was 1,4-benzenediacetyl dichloride (**11**). Anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (28 mL) was added to

the flask and cooled to 0 °C. 1-(3-Amino-propyl)pyrrolidine (**12**{1,1}) (2.68 mL, 20.60 mmol) and triethylamine (TEA) (3.20 mL, 22.96 mmol) were added. The solution was stirred overnight at room temperature under N<sub>2</sub>. A K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution (25%) (40 mL) was added and the aqueous layer was separated and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 40 mL). The combined organic extracts were washed with water (2 × 40 mL), brine (40 mL) and dried with MgSO<sub>4</sub> and subsequently concentrated. Purification of the residue by flash chromatography (silica, 75:25:2, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) provided 2.43 g (5.84 mmol, 57%) of *N,N'*-bis(3-pyrrolidin-1-yl)propyl-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (**13**{1,1}) as a white solid, mp 160–161 °C. IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3264 (N–H), 3080 (Csp<sup>2</sup>–H), 2962, 2874, 2791 (Csp<sup>3</sup>–H), 1642 (C=O), 1562 (NH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 7.23 (s, 4H, C1–H), 6.92 (br s, 2H, N–H), 3.49 (s, 4H, C3–H), 3.31 (q, <sup>3</sup>J = 5.6 Hz, 4H, C5–H), 2.49 (t, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 4H, C7–H), 2.46–2.40 (m, 8H, C8–H), 1.74–1.68 (m, 8H, C9–H), 1.64 (quint, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 4H, C6–H). <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 170.8 (C4), 134.1 (C2), 129.7 (C1), 54.9 (C7), 54.0 (C8), 43.6 (C3), 39.4 (C5), 27.1 (C6), 23.4 (C9). MS (70 eV, EI): *m/z* (%) = 414.2 (16) [M]<sup>+</sup>, 330.1 (32) [M – C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>, 274.0 (10) [M – C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 260.0 (43) [M – C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 97.9 (31) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>, 83.9 (100) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>, 69.9 (29) [C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N]<sup>+</sup>. HRMS (70 eV, EI): *m/z* calculated for C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 414.2995, [M]<sup>+</sup>; Found: 414.2992.

*N,N'*-Bis(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (**13**{2,2}). As stated above for **13**{1,1}, but using 1,4-benzenediacetic acid (**9**) (2.0 g, 10.30 mmol), hexamethyldisilazane (HMDS) (2.86 mL, 20.60 mmol), trimethylchlorosilane (12 drops), DMF (4 drops), oxalyl chloride (1.86 mL, 21.86 mmol), 1-(2-aminoethyl)pyrrolidine (**12**{2}) (2.65 mL, 20.60 mmol) and triethylamine (TEA) (3.20 mL, 22.96 mmol). The final compound was purified by flash chromatography (silica, 75:25:2, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 3.06 g (7.82 mmol, 76%) of *N,N'*-bis(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (**13**{2,2}) as a white solid, mp 194–196 °C. IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3288 (N–H), 3083 (Csp<sup>2</sup>–H), 2964, 2939, 2872, 2800 (Csp<sup>3</sup>–H), 1648 (C=O), 1549 (NH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 7.24 (s, 4H, C1–H), 6.16 (br s, 2H, N–H), 3.53 (s, 4H, C3–H), 3.32 (q, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 4H, C5–H), 2.54 (t, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, 4H, C6–H), 2.48–2.40 (m, 8H, C7–H), 1.77–1.67 (m, 8H, C8–H). <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 170.8 (C4), 134.0 (C2), 129.6 (C1), 54.3 (C6), 53.7 (C7), 43.3 (C3), 38.2 (C5), 23.4 (C8). MS (70 eV, EI): *m/z* (%) = 386.3 (2) [M]<sup>+</sup>, 246.2 (2) [M – C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 84.1 (100) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>, 70.1 (2) [C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N]<sup>+</sup>. Anal. calculated for C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: C: 68.36%, H: 8.87%, N: 14.49%, O: 8.28%; Found: C: 68.11%, H: 8.75%, N: 14.69%.

*N,N'*-Bis(3-(2-pipecolin-1-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (**13**{3,3}). As stated above for **13**{1,1}, but using 1,4-benzenediacetic acid (**9**) (2.0 g, 10.30 mmol), hexamethyldisilazane (HMDS) (2.86 mL, 20.60 mmol), trimethylchlorosilane (12 drops), DMF (4 drops), oxalyl chloride (1.86 mL, 21.86 mmol), 1-(3-aminopropyl)-2-pipecoline (**12**{3}) (3.77 mL, 20.60 mmol) and triethylamine (TEA) (3.20 mL, 22.96 mmol). The final compound was purified by flash chromatography (silica, 75:25:2, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to

afford 3.46 g (7.35 mmol, 71%) of *N,N'*-bis(3-(2-pipecolin-1-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (**13**{3,3}) as an off-white solid, mp 119–120 °C. IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3292 (N–H), 3074 (Csp<sup>2</sup>–H), 2926, 2858, 2787, 2729 (Csp<sup>3</sup>–H), 1648 (C=O), 1546 (NH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 7.24 (s, 4H, C1–H), 7.09 (br s, 2H, N–H), 3.50 (s, 4H, C3–H), 3.41–3.31 (m, 2H, C5–H), 3.26–3.16 (m, 2H, C5–H), 2.87–2.79 (m, 2H, C8–H), 2.79–2.70 (m, 2H, C7–H), 2.29–2.19 (m, 4H, C7–H, C12–H), 2.07–1.97 (m, 2H, C8–H), 1.70–1.52 (m, 10H, C6–H, C9–H, C10–H, C11–H), 1.48–1.36 (m, 2H, C9–H), 1.35–1.16 (m, 4H, C10–H, C11–H), 1.00 (d, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 6H, C13–H). <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 170.5 (C4), 134.1 (C2), 129.7 (C1), 56.3 (C12), 52.6 (C7), 51.7 (C8), 43.6 (C3), 39.7 (C5), 34.5 (C11), 26.0 (C9), 24.9 (C6), 23.5 (C10), 18.6 (C13). MS (70 eV, EI): *m/z* (%) = 470.4 (6) [M]<sup>+</sup>, 455.4 (20) [M – CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 358.3 (8) [M – C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 112.1 (100) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>. HRMS (70 eV, EI): *m/z* calculated for C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 470.3621, [M]<sup>+</sup>; Found: 470.3615.

*N,N'*-Bis(3-(morpholin-4-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (**13**{4,4}). As stated above for **13**{1,1}, but using 1,4-benzenediacetic acid (**9**) (2.0 g, 10.30 mmol), hexamethyldisilazane (HMDS) (2.86 mL, 20.60 mmol), trimethylchlorosilane (12 drops), DMF (4 drops), oxalyl chloride (1.86 mL, 21.86 mmol), 3-morpholinopropylamine (**12**{4}) (3.01 mL, 20.60 mmol) and triethylamine (TEA) (3.20 mL, 22.96 mmol). The final compound was purified by flash chromatography (silica, 75:25:2, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 3.65 g (8.18 mmol, 79%) of *N,N'*-bis(3-(morpholin-4-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (**13**{4,4}) as a yellow solid, mp 172–173 °C. IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3295 (N–H), 3080 (Csp<sup>2</sup>–H), 2930, 2867, 2804, 2757 (Csp<sup>3</sup>–H), 1643 (C=O), 1547 (NH), 1117, 864. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 7.24 (s, 4H, C1–H), 6.51 (br s, 2H, N–H), 3.62 (t, <sup>3</sup>J = 4.4 Hz, 8H, C9–H), 3.51 (s, 4H, C3–H), 3.31 (q, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 4H, C5–H), 2.42–2.34 (m, 12H, C7–H, C8–H), 1.64 (quint, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 4H, C6–H). <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 170.5 (C4), 134.1 (C2), 129.7 (C1), 66.9 (C9), 57.3 (C7), 53.6 (C8), 43.5 (C3), 39.1 (C5), 25.1 (C6). MS (70 eV, EI): *m/z* (%) = 446.3 (15) [M]<sup>+</sup>, 416.3 (12) [M – CH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 346.1 (4) [M – C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO]<sup>+</sup>, 171.1 (10) [M – C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 100.1 (100) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO]<sup>+</sup>. Anal. calculated for C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: C: 64.55%, H: 8.58%, N: 12.55%, O: 14.33%; Found: C: 64.48%, H: 8.39%, N: 12.66%.

*N,N'*-Bis(3-(piperidin-1-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (**13**{5,5}). As stated above for **13**{1,1}, but using 1,4-benzenediacetic acid (**9**) (2.0 g, 10.30 mmol), hexamethyldisilazane (HMDS) (2.86 mL, 20.60 mmol), trimethylchlorosilane (12 drops), DMF (4 drops), oxalyl chloride (1.86 mL, 21.86 mmol), 1-(3-aminopropyl)piperidine (**12**{5}) (3.38 mL, 20.60 mmol) and triethylamine (TEA) (3.20 mL, 22.96 mmol). The final compound was purified by flash chromatography (silica, 75:25:2, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>3</sub>) to afford 3.45 g (7.79 mmol, 76%) of *N,N'*-bis(3-(piperidin-1-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (**13**{5,5}) as a white solid, mp 151–153 °C. IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3289 (N–H), 3089 (Csp<sup>2</sup>–H), 2930, 2850, 2809, 2771 (Csp<sup>3</sup>–H), 1640 (C=O), 1559 (NH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 7.24 (s, 4H, C1–H), 7.18 (br s, 2H, N–H), 3.49 (s, 4H, C3–H), 3.30



(q,  $^3J = 6.0$  Hz, 4H, C5-H), 2.43–2.28 (m, 12H, C7-H, C8-H), 1.64 (quint,  $^3J = 6.4$  Hz, 4H, C6-H), 1.54 (quint,  $^3J = 5.6$  Hz, 8H, C9-H), 1.48–1.39 (m, 4H, C10-H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 170.7 (C4), 134.1 (C2), 129.6 (C1), 57.8 (C7), 54.5 (C8), 43.5 (C3), 39.5 (C5), 25.9 (C9), 24.9 (C6), 24.2 (C10). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 442.3 (9)  $[\text{M}]^+$ , 344.2 (18)  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}]^+$ , 274.1 (12)  $[\text{M} - \text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2]^+$ , 98.1 (100)  $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}]^+$ , 84.0 (5)  $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}]^+$ . Anal. calculated for  $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_2$ : C: 70.55%, H: 9.56%, N: 12.66%, O: 7.23%; Found: C: 70.40%, H: 9.42%, N: 12.50%.

***N,N'*-Bis(3-(imidazol-1-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (13{6,6})**. As stated above for 13{1,1}, but using 1,4-benzenediacetic acid (9) (2.0 g, 10.30 mmol), hexamethyldisilazane (HMDS) (2.86 mL, 20.60 mmol), trimethylchlorosilane (12 drops), DMF (4 drops), oxalyl chloride (1.86 mL, 21.86 mmol), 1-(3-aminopropyl)imidazole (12{6}) (2.51 mL, 20.60 mmol) and triethylamine (TEA) (3.20 mL, 22.96 mmol). The final compound was purified by flash chromatography (silica, 80:20:1,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ ) to afford 1.75 g (4.29 mmol, 42%) of *N,N'*-bis(3-(imidazol-1-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (13{6,6}) as a yellow crystalline solid, mp 132–133 °C. IR (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3292 (N-H), 3104 ( $\text{Csp}^2\text{-H}$ ), 2930 ( $\text{Csp}^3\text{-H}$ ), 1639 (C=O), 1560 (NH), 1511.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, methanol- $d_4$ ):  $\delta$  (ppm): 7.60 (s, 2H, C8-H), 7.26 (s, 4H, C1-H), 7.08 (s, 2H, C10-H), 6.95 (s, 2H, C9-H), 3.98 (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 4H, C7-H), 3.47 (s, 4H, C3-H), 3.15 (t,  $^3J = 6.7$  Hz, 4H, C5-H), 1.94 (quint,  $^3J = 6.8$  Hz, 4H, C6-H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, methanol- $d_4$ ):  $\delta$  (ppm): 174.2 (C4), 138.4 (C8), 135.7 (C2), 130.4 (C1), 129.0 (C9), 120.6 (C10), 45.5 (C7), 43.5 (C3), 37.6 (C5), 31.9 (C6). MS (FAB):  $m/z$  (%) = 409.1 (100)  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 341.0 (3)  $[\text{M} - \text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2]^+$ . HRMS (FAB):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_2$ : 409.2352,  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; Found: 409.2356.

***N,N'*-Bis(2-(piperidin-1-yl)ethyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (13{7,7})**. As stated above for 13{1,1}, but was carried out by using 1,4-benzenediacetic acid (9) (2.0 g, 10.30 mmol), hexamethyldisilazane (HMDS) (2.86 mL, 20.60 mmol), trimethylchlorosilane (12 drops), DMF (4 drops), oxalyl chloride (1.86 mL, 21.86 mmol), 1-(2-aminoethyl)piperidine (12{7}) (2.99 mL, 20.60 mmol) and triethylamine (TEA) (3.20 mL, 22.96 mmol). Upon removal of the solvent, 4.27 g (10.3 mmol, 100%) of *N,N'*-bis(2-(piperidin-1-yl)ethyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (13{7,7}) were obtained without further purification as a pale orange solid, mp 174–176 °C. IR (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3298 (N-H), 3091 ( $\text{Csp}^2\text{-H}$ ), 2924, 2849, 2779, 2751 ( $\text{Csp}^3\text{-H}$ ), 1642 (C=O), 1556 (NH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 7.26 (s, 4H, C1-H), 6.16 (br s, 2H, N-H), 3.55 (s, 4H, C3-H), 3.27 (q,  $^3J = 6.0$  Hz, 4H, C5-H), 2.34 (t,  $^3J = 6.1$  Hz, 4H, C6-H), 2.31–2.21 (m, 8H, C7-H), 1.47–1.33 (m, 12H, C8-H, C9-H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 170.7 (C4), 134.1 (C2), 129.8 (C1), 56.7 (C6), 54.0 (C7), 43.3 (C3), 36.1 (C5), 25.9 (C8), 24.3 (C9). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 414.3 (4)  $[\text{M}]^+$ , 98.1 (100)  $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}]^+$ . HRMS (70 eV, EI):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_2$ : 414.2995,  $[\text{M}]^+$ ; Found: 414.2987.

***N,N'*-Bis(2-(morpholin-4-yl)ethyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (13{8,8})**. As stated above for 13{1,1}, but

using 1,4-benzenediacetic acid (9) (2.0 g, 10.30 mmol), hexamethyldisilazane (HMDS) (2.86 mL, 20.60 mmol), trimethylchlorosilane (12 drops), DMF (4 drops), oxalyl chloride (1.86 mL, 21.86 mmol), 2-morpholinoethylamine (12{8}) (2.73 mL, 20.60 mmol) and triethylamine (TEA) (3.20 mL, 22.96 mmol). Upon removal of the solvent, 4.33 g (10.3 mmol, 100%) of *N,N'*-bis(2-(morpholin-4-yl)ethyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (13{8,8}) were obtained without further purification as a white solid, mp 173–175 °C. IR (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3287 (N-H), 3061 ( $\text{Csp}^2\text{-H}$ ), 2967, 2932, 2864, 2787 ( $\text{Csp}^3\text{-H}$ ), 1645 (C=O), 1540 (NH), 1117, 868.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 7.27 (s, 4H, C1-H), 6.02 (br s, 2H, N-H), 3.58 (t,  $^3J = 4.6$  Hz, 8H, C8-H), 3.56 (s, 4H, C3-H), 3.31 (q,  $^3J = 5.9$  Hz, 4H, C5-H), 2.42 (t,  $^3J = 6.1$  Hz, 4H, C6-H), 2.36 (t,  $^3J = 4.4$  Hz, 8H, C7-H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 170.6 (C4), 134.1 (C2), 129.8 (C1), 66.8 (C8), 56.5 (C6), 53.1 (C7), 43.3 (C3), 35.7 (C5). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 418.3 (5)  $[\text{M}]^+$ , 100.1 (100)  $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}]^+$ . Anal. calculated for  $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_4$ : C: 63.13%, H: 8.19%, N: 13.39%, O: 15.29%; Found: C: 63.30%, H: 8.17%, N: 13.23%.

***N,N'*-Bis(3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (13{9,9})**. As stated above for 13{1,1}, but using 1,4-benzenediacetic acid (9) (2.0 g, 10.30 mmol), hexamethyldisilazane (HMDS) (2.86 mL, 20.60 mmol), trimethylchlorosilane (12 drops), DMF (4 drops), oxalyl chloride (1.86 mL, 21.86 mmol), 1-(3-aminopropyl)-4-methylpiperazine (12{9}) (3.58 mL, 20.60 mmol) and triethylamine (TEA) (3.20 mL, 22.96 mmol). The final compound was purified by flash chromatography (silica, 75:25:2,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ ) to afford 2.63 g (5.56 mmol, 54%) of *N,N'*-bis(3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)-benzene (13{9,9}) as a yellow solid, mp 161–163 °C. IR (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3240 (N-H), 3066 ( $\text{Csp}^2\text{-H}$ ), 2943, 2876, 2830, 2811 ( $\text{Csp}^3\text{-H}$ ), 1644 (C=O), 1576 (NH).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, methanol- $d_4$ ):  $\delta$  (ppm): 7.25 (s, 4H, C1-H), 3.47 (s, 4H, C3-H), 3.55 (s, 4H, C3-H), 3.22 (t,  $^3J = 6.8$  Hz, 4H, C5-H), 2.81 (s, 8H, C9-H), 2.63 (s, 8H, C8-H), 2.52 (s, 6H, C10-H), 2.46 (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 4H, C7-H), 1.70 (quint,  $^3J = 6.8$  Hz, 4H, C6-H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, methanol- $d_4$ ):  $\delta$  (ppm): 174.1 (C4), 135.8 (C2), 130.3 (C1), 56.2 (C7), 55.0 (C9), 52.5 (C8), 44.9 (C10), 43.5 (C3), 38.4 (C5), 27.1 (C6). MS (FAB):  $m/z$  (%) = 473.1 (100)  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 373.0 (4)  $[\text{M} - \text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_2]^+$ . HRMS (FAB):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_2$ : 473.3604,  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ; Found: 473.3604.

***N,N'*-Bis(3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (7{1,1})**. The borane dimethylsulfide complex (1.19 mL, 11.89 mmol) was added at 0 °C to a solution of *N,N'*-bis(3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (13{1,1}) (414.58 mg, 1.0 mmol) in anhydrous THF (27 mL). The solution was refluxed for 6 h under  $\text{N}_2$ , cooled down to room temperature, diluted with 7.5 mL of 1.25 M HCl/MeOH solution and refluxed for 1 h. The solvent was removed *in vacuo* and the crude material was diluted with 1 M NaOH solution (pH 14). The aqueous solution was extracted twice with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried with  $\text{MgSO}_4$  and concentrated. Purification of the residue by flash chromatography (basic alumina,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ; 100:0 to 90:10 in 18 min) afforded 296 mg

(0.77 mmol, 77%) of *N,N'*-bis(3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (**7{1,1}**) as a white solid, mp 60–62 °C. IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3263 (N–H), 2948, 2801 (Csp<sup>3</sup>–H), 1697 (NH), 1458 (Csp<sup>3</sup>–H), 887 (NH). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 7.13 (s, 4H, C1–H), 2.90–2.82 (m, 4H, C4–H), 2.81–2.74 (m, 4H, C3–H), 2.68 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 4H, C5–H), 2.50–2.42 (m, 12H, C7–H, C8–H), 1.91 (br s, 2H, N–H), 1.78–1.72 (m, 8H, C9–H), 1.69 (quint, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 4H, C6–H). <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 137.9 (C2), 128.9 (C1), 54.9 (C7), 54.4 (C8), 51.3 (C4), 48.6 (C5), 36.0 (C3), 29.4 (C6), 23.5 (C9). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 386.4 (2) [M]<sup>+</sup>, 302.2 (4) [M – C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>, 274.2 (8) [M – C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 141.1 (47) [C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 112.1 (9) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 98.1 (11) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>, 84.1 (100) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>, 70.1 (8) [C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N]<sup>+</sup>. HRMS (70 eV, EI):  $m/z$  calculated for C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>: 386.3409, [M]<sup>+</sup>; Found: 386.3405.

***N,N'*-Bis(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (7{2,2})**. As stated above for **7{1,1}**, but using the borane dimethylsulfide complex (0.58 mL, 6.15 mmol), *N,N'*-bis(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (**13{2,2}**) (466.2 mg, 1.21 mmol), anhydrous THF (4 mL), 1.25 M HCl/MeOH (9 mL). The final compound was purified by flash chromatography (basic alumina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; 100:0 to 90:10 in 18 min) to afford 267.0 mg (74.5 mmol, 75%) of *N,N'*-bis(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (**7{2,2}**) as a yellow oil. IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3305 (N–H), 2929, 2875, 2796 (Csp<sup>3</sup>–H), 1673 (NH), 1458. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 7.13 (s, 4H, C1–H), 2.91–2.84 (m, 4H, C4–H), 2.81–2.73 (m, 8H, C3–H, C5–H), 2.59 (t, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 4H, C6–H), 2.52–2.45 (m, 8H, C7–H), 2.17 (br s, 2H, N–H), 1.78–1.71 (m, 8H, C8–H). <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 137.7 (C2), 128.7 (C1), 55.9 (C6), 54.2 (C7), 51.4 (C4), 48.4 (C5), 35.9 (C3), 23.4 (C8). MS (FAB):  $m/z$  (%) = 359.3 (100) [M + H]<sup>+</sup>, 358.3 (14) [M]<sup>+</sup>, 288.3 (4) [M – C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N]<sup>+</sup>, 274.3 (12) [M – C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>, 231.1 (37) [M – C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 127.1 (15) [C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. HRMS (FAB):  $m/z$  calculated for C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>: 359.3175, [M + H]<sup>+</sup>; Found: 359.3159.

***N,N'*-Bis(3-(2-pipecolin-1-yl)propyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (7{3,3})**. As stated above for **7{1,1}**, but using the borane dimethylsulfide complex (1.19 mL, 11.89 mmol), *N,N'*-bis(3-(2-pipecolin-1-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (**13{3,3}**) (470.7 mg, 1.0 mmol), anhydrous THF (27 mL), 1.25 M HCl/MeOH (7.5 mL). The final compound was purified by flash chromatography (basic alumina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; 100:0 to 90:10 in 18 min) to afford 237.0 mg (0.53 mmol, 53%) of *N,N'*-bis(3-(2-pipecolin-1-yl)propyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (**7{3,3}**) as an orange oil. IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3280 (N–H), 2930, 2854, 2794 (Csp<sup>3</sup>–H), 1655 (NH), 1449, 1372. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 7.13 (s, 4H, C1–H), 2.89–2.80 (m, 6H, C4–H, C8–H), 2.80–2.74 (m, 4H, C3–H), 2.73–2.65 (m, 2H, C7–H), 2.62 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 4H, C5–H), 2.36–2.27 (m, 2H, C7–H), 2.26–2.18 (m, 2H, C12–H), 2.12–2.04 (m, 2H, C8–H), 1.92 (br s, 2H, N–H), 1.69–1.61 (m, 6H, C6–H, C10–H), 1.60–1.53 (m, 4H, C9–H, C11–H), 1.52–1.43 (m, 2H, C9–H), 1.31–1.21 (m, 4H, C10–H, C11–H), 1.02 (d, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, 6H, C13–H). <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 138.0 (C2), 129.0 (C1), 56.1 (C12), 52.4 (C7), 52.3 (C8),

51.4 (C4), 49.0 (C5), 36.2 (C3), 34.8 (C11), 26.3 (C9), 26.0 (C6), 24.2 (C10), 19.3 (C13). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 442.4 (3) [M]<sup>+</sup>, 330.3 (9) [M – C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 302.3 (18) [M – C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N]<sup>+</sup>, 169.2 (97) [C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 140.1 (7) [C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N]<sup>+</sup>, 126.1 (13) [C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 112.1 (100) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 98.1 (28) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>. HRMS (70 eV, EI):  $m/z$  calculated for C<sub>28</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>: 442.4035, [M]<sup>+</sup>; Found: 442.4027.

***N,N'*-Bis(3-(morpholin-4-yl)propyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (7{4,4})**. As stated above for **7{1,1}**, but using the borane dimethylsulfide complex (0.48 mL, 5.1 mmol), *N,N'*-bis(3-(morpholin-4-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (**13{4,4}**) (446.6 mg, 1.0 mmol), anhydrous THF (4 mL), 1.25 M HCl/MeOH (7.5 mL). The final compound was purified by flash chromatography (basic alumina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; 100:0 to 90:10 in 18 min) to afford 339.1 mg (0.81 mmol, 81%) of *N,N'*-bis(3-(morpholin-4-yl)propyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (**7{4,4}**) as a yellow oil. IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3292 (N–H), 2928, 2852, 2807 (Csp<sup>3</sup>–H), 1673 (NH), 1457, 1118, 863. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 7.15 (s, 4H, C1–H), 3.65 (t, <sup>3</sup>J = 4.6 Hz, 8H, C9–H), 2.92–2.85 (m, 4H, C4–H), 2.83–2.77 (m, 4H, C3–H), 2.70 (t, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, 4H, C5–H), 2.46–2.32 (m, 14H, C7–H, C8–H, N–H), 1.68 (quint, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 4H, C6–H). <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 137.6 (C2), 128.8 (C1), 66.8 (C9), 57.3 (C7), 53.7 (C8), 51.0 (C4), 48.4 (C5), 35.6 (C3), 26.3 (C6). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 418.3 (6) [M]<sup>+</sup>, 388.3 (5) [M – CH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 157.1 (21) [C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 128.1 (7) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>NO]<sup>+</sup>, 114.1 (10) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NO]<sup>+</sup>, 100.1 (100) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO]<sup>+</sup>. HRMS (70 eV, EI):  $m/z$  calculated for C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 418.3308, [M]<sup>+</sup>; Found: 418.3311.

***N,N'*-Bis(3-(piperidin-1-yl)propyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (7{5,5})**. As stated above for **7{1,1}**, but using the borane dimethylsulfide complex (1.19 mL, 11.89 mmol), *N,N'*-bis(3-(piperidin-1-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (**13{5,5}**) (442.6 mg, 1.0 mmol), anhydrous THF (27 mL), 1.25 M HCl/MeOH (7.5 mL). The final compound was purified by flash chromatography (basic alumina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; 100:0 to 90:10 in 18 min) to afford 252.5 mg (0.61 mmol, 61%) of *N,N'*-bis(3-(piperidin-1-yl)propyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (**7{5,5}**) as a yellow oil. IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3283 (N–H), 2933, 2852, 2801 (Csp<sup>3</sup>–H), 1676 (NH), 1443. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 7.13 (s, 4H, C1–H), 2.89–2.82 (m, 4H, C4–H), 2.81–2.73 (m, 4H, C3–H), 2.65 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 4H, C7–H), 2.41–2.26 (m, 12H, C5–H, C8–H), 2.20 (br s, 2H, N–H), 1.67 (quint, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 4H, C6–H), 1.58–1.49 (m, 8H, C9–H), 1.47–1.36 (m, 4H, C10–H). <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 137.9 (C2), 129.0 (C1), 57.9 (C5), 54.8 (C8), 51.3 (C4), 48.8 (C7), 36.0 (C3), 27.1 (C6), 26.1 (C9), 24.6 (C10). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 414.4 (1) [M]<sup>+</sup>, 316.3 (3) [M – C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>, 288.2 (4) [M – C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 155.2 (60) [C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 126.1 (6) [C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N]<sup>+</sup>, 112.1 (9) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>, 98.1 (100) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>, 84.1 (5) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N]<sup>+</sup>. HRMS (70 eV, EI):  $m/z$  calculated for C<sub>26</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>: 414.3722, [M]<sup>+</sup>; Found: 414.3710.

***N,N'*-Bis(3-(imidazol-1-yl)propyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (7{6,6})**. As stated above for **7{1,1}**, but using the borane dimethylsulfide complex (1.19 mL, 11.89 mmol), *N,N'*-bis(3-(imidazol-1-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (**13{6,6}**) (408.5 mg, 1.0 mmol), anhydrous THF



(27 mL), 1.25 M HCl/MeOH (7.5 mL). The final compound was purified by flash chromatography (basic alumina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; 100:0 to 90:10 in 18 min) to afford 340.5 mg (0.89 mmol, 89%) of *N,N'*-bis(3-(imidazol-1-yl)propyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (7{6,6}) as a yellow oil. IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3283 (N-H), 3106 (Csp<sup>2</sup>-H), 2932, 2822 (Csp<sup>3</sup>-H), 1666 (NH), 1509, 1443. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 7.40 (s, 2H, C8-H), 7.13 (s, 4H, C1-H), 7.03 (t, <sup>3</sup>J = 1.1 Hz, 2H, C10-H), 6.86 (t, <sup>3</sup>J = 1.3 Hz, 2H, C9-H), 3.98 (t, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, 4H, C7-H), 2.86–2.80 (m, 4H, C4-H), 2.79–2.72 (m, 4H, C3-H), 2.57 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 4H, C5-H), 1.89 (m, 6H, C6-H, N-H). <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 138.0 (C2), 137.4 (C8), 129.5 (C10), 129.0 (C1), 119.0 (C9), 51.1 (C4), 46.3 (C5), 44.8 (C7), 36.1 (C3), 31.4 (C6). MS (FAB):  $m/z$  (%) = 381.3 (43) [M + H]<sup>+</sup>, 380.3 (3) [M]<sup>+</sup>, 341.0 (3) [M - C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 137.0 (100) [C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>]<sup>+</sup>. HRMS (FAB):  $m/z$  calculated for C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>6</sub>: 381.2767, [M + H]<sup>+</sup>; Found: 381.2771.

***N,N'*-Bis(2-(piperidin-1-yl)ethyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (7{7,7})**. As stated above for 7{1,1}, but using the borane dimethylsulfide complex (1.19 mL, 11.89 mmol), *N,N'*-bis(2-(piperidin-1-yl)ethyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (13{7,7}) (414.6 mg, mmol), anhydrous THF (27 mL), 1.25 M HCl/MeOH (7.5 mL). The final compound was purified by flash chromatography (basic alumina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; 100:0 to 90:10 in 18 min) to afford 320.4 mg (82.8 mmol, 83%) of *N,N'*-bis(2-(piperidin-1-yl)ethyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (7{7,7}) as a yellow oil. IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3300 (N-H), 2933, 2851, 2801 (Csp<sup>3</sup>-H), 1678 (NH), 1442. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 7.14 (s, 4H, C1-H), 2.89–2.84 (m, 4H, C4-H), 2.82–2.75 (m, 4H, C3-H), 2.72 (t, 4H, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, C5-H), 2.42 (t, 4H, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, C6-H), 2.38–2.29 (m, 8H, C7-H), 1.91 (br s, 2H, N-H), 1.55–1.47 (m, 8H, C8-H), 1.44–1.36 (m, 4H, C9-H). <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 137.8 (C2), 128.7 (C1), 58.5 (C6), 54.7 (C7), 51.4 (C4), 46.6 (C5), 35.9 (C3), 26.0 (C8), 24.4 (C9). MS (FAB):  $m/z$  (%) = 387.4 (100) [M + H]<sup>+</sup>, 386.3 (11) [M]<sup>+</sup>, 288.3 (11) [M - C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N]<sup>+</sup>, 141.1 (9) [C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 112.1 (89) [C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N]<sup>+</sup>. HRMS (FAB):  $m/z$  calculated for C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 387.3488, [M + H]<sup>+</sup>; Found: 387.3496.

***N,N'*-Bis(2-(morpholin-4-yl)ethyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (7{8,8})**. As stated above for 7{1,1}, but using the borane dimethylsulfide complex (0.48 mL, 5.1 mmol), *N,N'*-bis(2-(morpholin-4-yl)ethyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (13{8,8}) (418.5 mg, 1.0 mmol), anhydrous THF (4 mL), 1.25 M HCl/MeOH (7.5 mL). The final compound was purified by flash chromatography (basic alumina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; 100:0 to 90:10 in 18 min) to afford 375.2 mg (0.96 mmol, 96%) of *N,N'*-bis(2-(morpholin-4-yl)ethyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (7{8,8}) as a yellow oil. IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3305 (N-H), 2932, 2852, 2810 (Csp<sup>3</sup>-H), 1672 (NH), 1455, 1117, 867. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 7.14 (s, 4H, C1-H), 3.63 (t, <sup>3</sup>J = 4.6 Hz, 8H, C8-H), 2.91–2.84 (m, 4H, C4-H), 2.83–2.75 (m, 4H, C3-H), 2.72 (t, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, 4H, C5-H), 2.47 (t, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 4H, C6-H), 2.42–2.35 (m, 8H, C7-H), 1.78 (br s, 2H, N-H). <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 137.8 (C2), 128.7 (C1), 66.9 (C8), 58.1 (C6),

53.6 (C7), 51.2 (C4), 45.9 (C5), 35.9 (C3). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 390.3 (4) [M]<sup>+</sup>, 360.3 (2) [M - CH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 304.2 (3) [M - C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>NO]<sup>+</sup>, 290.2 (27) [M - C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO]<sup>+</sup>, 143.1 (14) [C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 114.1 (23) [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NO]<sup>+</sup>, 100.1 (100) [C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NO]<sup>+</sup>. HRMS (EI):  $m/z$  calculated for C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 390.2995, [M]<sup>+</sup>; Found: 390.2992.

***N,N'*-Bis(3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (7{9,9})**. As stated above for 7{1,1}, but using the borane dimethylsulfide complex (1.19 mL, 11.89 mmol), *N,N'*-bis(3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)-1,4-di(aminocarbonylmethyl)benzene (13{9,9}) (472.6 mg, 1.0 mmol), anhydrous THF (27 mL), 1.25 M HCl/MeOH (7.5 mL). The final compound was purified by flash chromatography (basic alumina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH; 100:0 to 90:10 in 18 min) to afford 379.8 mg (0.85 mmol, 85%) *N,N'*-bis(3-(4-methylpiperazin-1-yl)propyl)-1,4-bis(2-aminoeth-1-yl)benzene (7{9,9}) as a yellow crystalline solid, mp 56–58 °C. IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3286 (N-H), 2934, 2876, 2794 (Csp<sup>3</sup>-H), 1671 (NH), 1458. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 7.13 (s, 4H, C1-H), 2.89–2.81 (m, 4H, C4-H), 2.81–2.73 (m, 4H, C3-H), 2.65 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 4H, C5-H), 2.59–2.28 (m, 18H, C8-H, C9-H, N-H), 2.36 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 4H, C7-H), 2.27 (s, 6H, C10-H), 1.66 (quint, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 4H, C6-H). <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm): 137.9 (C2), 128.9 (C1), 56.9 (C7), 55.1 (C9), 53.3 (C8), 51.2 (C4), 48.5 (C5), 46.1 (C10), 36.0 (C3), 27.0 (C6). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 444.4 (19) [M]<sup>+</sup>, 429.4 (3) [M - CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 414.4 (3) [M - C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>]<sup>+</sup>, 401.4 (11) [M - C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N]<sup>+</sup>, 170.2 (16) [C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 141.1 (11) [C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 127.1 (19) [C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 113.1 (100) [C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 99.1 (13) [C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. HRMS (70 eV, EI):  $m/z$  calculated for C<sub>26</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>: 444.3940, [M]<sup>+</sup>; Found: 444.3943.

**2-(4-(Bromomethyl)phenyl)acetyl chloride (15)**. To a solution of 0.235 g (1 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetic acid (14) in 10 mL of toluene was added 0.385 g (3.2 mmol) of thionyl chloride. The mixture was heated to 90 °C for 6 hours to obtain a yellow solution. The mixture was cooled to room temperature and the solvent was removed under reduced pressure to give 0.237 g (0.96 mmol, 96%) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetyl chloride (15) as a yellow solid which was used without further purification. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 7.44–7.38 (m, 2H, C3-H), 7.28–7.24 (m, 2H, C4-H), 4.48 (s, 2H, C1-H), 4.14 (s, 2H, C6-H). <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 171.6 (C7), 137.8 (C2), 131.3 (C5), 129.9 (C3), 129.6 (C4), 52.6 (C6), 32.6 (C1).

**2-(4-(Bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide (16{4})**. 0.3884 g (1.57 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetyl chloride (15) was dissolved in 10 mL of acetonitrile and cooled at 0 °C and it was added dropwise to a solution of 0.226 g (1.57 mmol) of *N*-aminopropylmorpholine (12{4}) and 0.651 g (4.71 mmol) of potassium carbonate in 10 mL of acetonitrile. The solution was heated under microwave irradiation at 100 °C for 25 minutes. The mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The orange solid was dissolved in 10 mL of chloroform and the solution was filtered again. The solvent was removed under reduced pressure to obtain 0.379 g (1.07 mmol, 68%) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide

(16{4}) as an orange foamy solid.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.50–7.30 (m, 4H, C3–H, C4–H), 4.57 (s, 2H, C1–H), 4.25–3.91 (m, 4H, C12–H, C13–H), 3.58 (s, 2H, C6–H), 3.37 (q,  $J = 6.1$  Hz, 2H, C9–H), 2.92 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H, C11–H), 2.14–2.04 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2H, C10–H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 171.9 (C7), 136.3 (C2), 135.7 (C5), 129.7 (C3), 129.0 (C4), 63.4 (C13), 55.1 (C11), 52.0 (C12), 46.0 (C1), 43.2 (C6), 36.1 (C9), 23.1 (C10).

**2-(4-(Bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)acetamide (16{1}).** As stated above for 16{4}, but using 0.224 g (0.905 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetyl chloride (15), 6 mL of acetonitrile, 0.116 g (0.905 mmol) of *N*-aminopropylpyrrolidine (12{1}), and 0.375 g (2.715 mmol) of potassium carbonate in 4 mL of acetonitrile. The crude product was purified using chromatographic filtration (basic alumina, cyclohexane) to afford 0.215 g (0.634 mmol, 70%) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)acetamide (16{1}) as a pale orange foamy solid.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.45 (br m, 1H, N8–H), 7.41–7.33 (m, 4H, C3–H, C4–H), 4.56 (s, 2H, C1–H), 3.58 (s, 2H, C6–H), 3.37 (q,  $J = 6.1$  Hz, 2H, C9–H), 2.98 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H, C11–H), 3.25–2.50 (s, 4H, C12–H), 2.07–2.17 (m, 4H, C13–H), 2.06–2.01 (m, 2H, C10–H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 171.9 (C7), 136.2 (C2), 135.7 (C5), 129.7 (C3), 129.0 (C4), 53.7 (C12), 52.7 (C11), 46.0 (C1), 43.3 (C6), 36.1 (C9), 25.2 (C14), 23.2 (C13).

**2-(4-(Bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide (16{5}).** As stated above for 16{4}, but using 0.529 g (2.14 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetyl chloride (15), 20 mL of acetonitrile, 0.304 g (2.14 mmol) of 3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine (12{5}) and 0.887 g (6.42 mmol) of potassium carbonate. 0.2268 g (0.64 mmol, 30%) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide (16{5}) were obtained as a dark orange foamy solid.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$  (ppm): 7.47–7.25 (m, 5H, C3–H, C4–H, N8–H), 4.62 (s, 2H, C1–H), 3.54 (s, 2H, C6–H), 3.16–3.04 (m, 2H, C9–H), 2.15–1.65 (m, 14H, C10–H, C11–H, C12–H, C13–H, C14–H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta$  (ppm): 170.4 (C7), 132.8 (C2), 129.9 (C5), 129.0 (C3), 128.6 (C4), 54.1 (C11), 52.8 (C12), 45.1 (C6), 42.0 (C9), 35.7 (C1), 24.0 (C10), 22.8 (C13), 21.2 (C14).

**2-(4-(Bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)acetamide (16{3}).** As stated above for 16{4}, but using 0.4905 g (1.98 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)acetyl chloride (15), 20 mL of acetonitrile, 0.310 g (1.98 mmol) of 3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine (12{3}) and 0.821 g (5.94 mmol) of potassium carbonate. 0.1455 g (0.40 mmol, 20%) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)acetamide (16{3}) were obtained as a dark orange foamy solid.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.37–7.33 (m, 2H, C3–H), 7.30–7.25 (m, 2H, C4–H), 7.15 (br s, 1H, N8–H), 4.58 (s, 2H, C1–H), 3.53 (s, 2H, C6–H), 3.43–3.35 (m, 1H, C9–H), 3.27–3.18 (m, 1H, C9–H), 2.84–2.78 (m, 1H, C11–H), 2.78–2.71 (m, 1H, C12–H), 2.25–2.19 (m, 2H, C12–H, C16–H), 2.03–1.97 (m, 1H, C11–H), 1.66–1.51 (m, 5H, C13–H, C10–H, C14–H, C15–H), 1.43–1.37 (m, 1H, C10–H), 1.30 (m, 1H, C14–H), 1.21–1.15 (m, 1H, C15–H), 0.98 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, C17–H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 170.3 (C7), 136.2 (C2), 135.7 (C5), 129.6 (C3), 129.0 (C4), 56.3 (C16), 52.7 (C12), 51.7 (C11), 45.9 (C1), 43.6 (C6), 39.9 (C9), 34.5 (C15), 25.9 (C10), 24.9 (C13), 23.5 (C14), 18.6 (C17).

**2-(4-((3-Morpholinopropylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide (17{4,4}).** 0.1475 g (0.42 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide (16{4}) were dissolved in 6 mL of acetonitrile and a few drops of methanol and cooled at 0 °C and it was added dropwise to a solution of 0.0599 g (0.42 mmol) of 3-aminopropyl-*N*-morpholine (12{4}) and 0.1741 g (1.26 mmol) of potassium carbonate in 4 mL of acetonitrile. The solution was heated under microwave irradiation at 150 °C for 25 minutes. The mixture was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 95 : 5 : 0.5;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ ) to afford 0.0598 g (0.143 mmol, 34%) of 2-(4-((3-morpholinopropylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide (17{4,4}) as an orange oil. IR (KBr)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3292 (N–H), 2927, 2854, 2813 ( $\text{Csp}^3\text{-H}$ ), 1649 (C=O), 1552 (N–H), 1116 (C–O–C), 862 (C–O–C).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.32–7.28 (m, 2H, C2–H), 7.25–7.20 (m, 2H, C3–H), 6.37 (br s, 1H, N8–H), 3.77 (s, 2H, C1–H), 3.72–3.56 (m, 8H, C13–H), 3.53 (s, 2H, C6–H), 3.31 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H, C9–H), 2.70 (t,  $J = 6.9$ , 2H, C15–H), 2.45–2.32 (m, 13H, N14–H, C11–H, C12–H), 1.72 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H, C10–H), 1.66–1.58 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2H, C16–H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 170.8 (C7), 139.3 (C2), 133.7 (C5), 129.3 (C3), 128.6 (C4), 66.9 (C13), 57.2 (C1), 53.8 (C11, C12), 48.0 (C15), 43.6 (C6), 38.9 (C9), 26.5 (C10), 25.1 (C16). MS (70 eV, EI)  $m/z$  (%) = 418.4 (17)  $[\text{M}]^+$ , 388.3 (12)  $[\text{M} - \text{CH}_2\text{O}]^+$ , 276.2 (29)  $[\text{M} - \text{C}_7\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}]^+$ , 100.1 (100)  $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_3$   $[\text{M}]^+$ : 418.2944; Found: 418.2940.

**2-(4-((3-(Pyrrolidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide (17{4,1}).** As stated above for 17{4,4}, but using 0.8193 g (2.31 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide (16{4}), 20 mL of acetonitrile, 0.2967 g (2.31 mmol) of 3-aminopropyl-*N*-pyrrolidine (12{1}) and 0.959 g (6.94 mmol) of potassium carbonate. Upon removal of the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98 : 2 : 0.5;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ ) to afford 0.2790 g (0.693 mmol, 30%) of 2-(4-((3-(pyrrolidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide (17{4,1}) as an orange oil. IR (KBr)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3284 (N–H), 2951, 2854, 2806 ( $\text{Csp}^3\text{-H}$ ), 1647 (C=O), 1550 (N–H), 1116 (C–O–C), 862 (C–O–C).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.35–7.27 (m, 2H, C3–H), 7.25–7.17 (m, 2H, C4–H), 6.50 (br m, 1H, N8–H), 3.78 (s, 2H, C7–H), 3.63–3.55 (m, 4H, C13–H), 3.52 (s, 2H, C6–H), 3.29 (q,  $J = 6.5$  Hz, 2H, C9–H), 2.71 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H, C15–H), 2.60–2.39 (m, 7H, N14–H, C17–H, C18–H), 2.39–2.30 (m, 6H, C11–H, C12–H), 1.85–1.68 (m, 6H, C16–H, C19–H), 1.62 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2H, C10–H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 170.9 (C7), 139.2 (C2), 133.7 (C5), 129.3 (C3), 128.6 (C4), 66.8 (C13), 57.1 (C11), 54.7 (C17), 54.2 (C18), 53.6 (C12), 53.4 (C1), 48.1 (C15), 43.5 (C6), 38.8 (C9), 29.0 (C16), 25.2 (C10), 23.4 (C19). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 402.4 (1)  $[\text{M}]^+$ ,

372.3 (2)  $[M - CH_2O]^+$ , 276.2 (14)  $[M - C_7H_{14}N_2]^+$ , 189.1 (10)  $[M - C_{11}H_{23}N_3O]^+$ , 171.1 (11)  $[C_8H_{15}N_2O_2]^+$ , 127.1 (38)  $[C_7H_{15}N_2]^+$ , 100.1 (100)  $[C_5H_{10}NO]^+$ , 84.1 (100)  $[C_5H_{10}N]^+$ , 70.1 (30)  $[C_4H_8N]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$  calculated for  $C_{23}H_{37}N_4O_2$   $[M - H]^+$ : 401.2917; Found: 401.2915.

**2-(4-((3-(2-Methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-N-(3-morpholinopropyl)acetamide (17{4,3})**. As stated above for 17{4,4}, but using 0.7520 g (2.12 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-N-(3-morpholinopropyl)acetamide (16{4}), 20 mL of acetonitrile, 0.331 g (2.12 mmol) of 3-aminopropyl-N-pipecoline (12{3}) and 0.879 g (6.36 mmol) of potassium carbonate. Upon removal of the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98:2:0.5;  $CH_2Cl_2/MeOH/NH_3$ ) to afford 0.1826 g (0.424 mmol, 20%) of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-N-(3-morpholinopropyl)acetamide (17{4,4}) as a dark orange oil. IR (KBr)  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ): 3289 (N-H), 3054 (Csp<sup>2</sup>-H), 2930, 2853, 2807 (Csp<sup>3</sup>-H), 1647 (C=O), 1551 (N-H), 1445 (CH<sub>2</sub>), 1118 (C-O-C), 863 (C-O-C). <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 7.31 (m, 2H, C3-H), 7.21 (m, 2H, C4-H), 6.39 (br m, 1H, N8-H), 3.77 (s, 2H, C1-H), 3.58 (m, 4H, C13-H), 3.53 (s, 2H, C6-H), 3.30 (m, 2H, C9-H), 2.91–2.80 (m, 1H, C17-H), 2.78–2.68 (m, 1H, C1-H8), 2.65 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H, C15-H), 2.46–2.19 (m, 9H, C11-H, C12-H, C18-H, C22-H, N14-H), 2.08–2.14 (m, 1H, C17-H), 1.77–1.21 (m, 10H, C10-H, C16-H, C19-H, C20-H, C21-H), 1.04 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, C23-H). <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 170.9 (C7), 139.6 (C2), 133.6 (C5), 129.3 (C3), 128.6 (C4), 66.8 (C13), 57.2 (C11), 55.9 (C22), 53.6 (C12), 53.6 (C1), 52.2 (C17), 52.0 (C18), 48.4 (C15), 43.6 (C6), 38.9 (C9), 34.6 (C21), 26.1 (C10), 25.8 (C16), 25.2 (C19), 23.9 (C20), 19.0 (C23). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 430.1 (15)  $[M]^+$ , 429.1 (31)  $[M - H]^+$ , 400.1 (2)  $[M - CH_2O]^+$ , 331.0 (3)  $[M - C_6H_{11}N]^+$ , 303.9 (4)  $[M - C_8H_{16}N]^+$ , 275.9 (12)  $[M - C_9H_{18}N_2]^+$ , 170.8 (13)  $[C_8H_{15}N_2O_2]^+$ , 154.8 (19)  $[C_9H_{19}N_2]^+$ , 125.9 (28)  $[C_8H_{16}N]^+$ , 111.9 (100)  $[C_7H_{14}N]^+$ , 99.9 (40)  $[C_5H_{10}NO]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$  calculated for  $C_{25}H_{42}N_4O_2$   $[M]^+$ : 430.3308; Found: 430.3303.

**2-(4-((3-(Piperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-N-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide (17{5,5})**. As stated above for 17{4,4}, but using 0.7192 g (2.03 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-N-(3-piperidin-1-ylpropyl)acetamide (16{5}), 20 mL of acetonitrile, 0.2895 g (2.03 mmol) of 3-aminopropyl-N-piperidine (12{5}) and 0.8417 g (6.09 mmol) of potassium carbonate. Upon removal of the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98:2:0.5;  $CH_2Cl_2/MeOH/NH_3$ ) to afford 0.1515 g (0.365 mmol, 18%) of 2-(4-((3-(piperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-N-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide (17{5,5}) as an orange oil. IR (KBr)  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ): 3293 (N-H), 3055 (Csp<sup>2</sup>-H), 2931, 2852, 2768 (Csp<sup>3</sup>-H), 1644 (C=O), 1548 (N-H), 1441. <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 7.35–7.28 (m, 2H, C3-H), 7.22 (m, 2H, C4-H), 7.00 (br m, 1H, N8-H), 3.76 (s, 2H, C1-H), 3.50 (s, 2H, C6-H), 3.30 (m, 2H, C9-H), 2.69 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H, C16-H), 2.48–2.22 (m, 13H, N15-H, C11-H, C12-H, C18-H, C19-H), 1.78–1.38 (m, 16H, C10-H, C17-H, C13-H, C14-H, C20-H, C21-H). <sup>13</sup>C-NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 170.8 (C7), 138.5 (C2), 133.8 (C5), 129.2 (C3), 129.0 (C4), 57.9 (C11), 57.7 (C18), 54.6 (C12), 54.5

(C19), 53.4 (C1), 48.2 (C16), 43.6 (C6), 39.5 (C9), 26.0 (C17), 26.0 (C10), 25.0 (C14, C21), 24.3 (C20), 24.2 (C13). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 414.4 (5)  $[M]^+$ , 288.3 (22)  $[M - C_8H_{16}]^+$ , 274.3 (91)  $[M - C_8H_{16}N]^+$ , 169.2 (27)  $[C_9H_{17}N_2O]^+$ , 141.1 (46)  $[C_8H_{17}N_2]^+$ , 126.1 (11)  $[C_8H_{16}N]^+$ , 112.1 (43)  $[C_7H_{14}N]^+$ , 98.0 (100)  $[C_6H_{12}N]^+$ , 84.0 (48)  $[C_5H_{10}N]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$  calculated for  $C_{25}H_{42}N_4O$   $[M]^+$ : 414.3359; Found: 414.3359.

**2-(4-((3-(2-Methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-N-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide (17{5,3})**. As stated above for 17{4,4}, but using 1.0457 g (2.96 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-N-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide (16{5}), 20 mL of acetonitrile, 0.4625 g (2.96 mmol) of 3-aminopropyl-N-pipecoline (12{3}) and 1.2273 g (8.88 mmol) of potassium carbonate. Upon removal of the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98:2:0.5;  $CH_2Cl_2/MeOH/NH_3$ ) to afford 0.3426 g (0.799 mmol, 27%) of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-N-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide (17{5,3}) as a dark orange oil. IR (KBr)  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ): 3286 (N-H), 3054 (Csp<sup>2</sup>-H), 2931, 2852, 2800 (Csp<sup>3</sup>-H), 1647 (C=O), 1552 (N-H). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 7.33–7.27 (m, 2H, C3-H), 7.22 (m, 2H, C4-H), 7.02 (br s, 1H, N8-H), 3.72 (s, 2H, C1-H), 3.50 (s, 2H, C6-H), 3.30 (q,  $J = 5.8$  Hz, 2H, C9-H), 2.92–2.75 (m, 2H, C18-H, C19-H), 2.72–2.62 (m, 2H, C16-H), 2.52–2.22 (m, 9H, C11-H, C12-H, N15-H, C23-H, C19-H), 2.21–2.09 (m, 1H, C18-H), 1.80–1.22 (m, 16H, C10-H, C13-H, C14-H, C17-H, C20-H, C21-H, C22-H), 1.06 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, C24-H). <sup>13</sup>C NMR (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 170.7 (C7), 138.7 (C2), 134.1 (C5), 129.3 (C3), 128.6 (C4), 57.9 (C19), 56.1 (C22), 54.5 (C12), 53.5 (C1), 52.2 (C11), 51.9 (C18), 48.3 (C16), 43.7 (C6), 39.6 (C9), 34.3 (C22), 26.0 (C13, C14), 25.9 (C10), 25.4 (C17), 25.1 (C20), 24.3 (C21), 18.8 (C24). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 428.5 (5)  $[M]^+$ , 288.3 (21)  $[M - C_9H_{18}N]^+$ , 274.3 (60)  $[M - C_9H_{18}N_2]^+$ , 169.2 (26)  $[C_9H_{17}NO]^+$ , 155.2 (59)  $[C_9H_{19}N_2]^+$ , 126.1 (38)  $[C_8H_{16}N]^+$ , 112.0 (75)  $[C_7H_{14}N]^+$ , 98.2 (100)  $[C_6H_{12}N]^+$ , 84.1 (34)  $[C_5H_{10}N]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$  calculated for  $C_{26}H_{44}N_4O$   $[M]^+$ : 428.3515; Found: 428.3495.

**2-(4-((3-(2-Methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-N-(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)acetamide (17{3,3})**. As stated above for 17{4,4}, but using 0.6312 g (1.72 mmol) of 2-(4-(bromomethyl)phenyl)-N-(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)acetamide (16{3}), 20 mL of acetonitrile, 0.2688 g (1.72 mmol) of 3-aminopropyl-N-pipecoline (12{3}) and 0.7132 g (5.16 mmol) of potassium carbonate. Upon removal of the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 99:1:0.5;  $CH_2Cl_2/MeOH/NH_3$ ) to afford 0.2437 g (0.55 mmol, 32%) of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-N-(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)acetamide (17{3,3}) as a dark orange oil. IR (KBr)  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ): 3286 (N-H), 3054 (Csp<sup>2</sup>-H), 2929, 2854, 2793 (Csp<sup>3</sup>-H), 1647 (C=O), 1552 (N-H). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 7.33–7.27 (m, 2H, C3-H), 7.24–7.18 (m, 2H, C4-H), 6.94 (br m, 1H, N8-H), 3.76 (s, 2H, C1-H), 3.51 (s, 2H, C6-H), 3.32–3.40 (m, 1H, C9-H), 3.17–3.24 (m, 1H, C9-H), 2.89–2.62 (m, 4H, C11-H, C12-H, C21-H, C22-H), 2.47–1.94 (m, 7H, C11-H, C12-H, C16-H, C21-H, C22-H, C26-H, N8-H),



1.71–1.14 (m, 16H, C10–H, C13–H, C14–H, C15–H, C20–H, C23–H, C24–H, C25–H), 1.08–0.94 (m, 6H, C17–H, C27–H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 170.7 (C7), 138.9 (C2), 133.8 (C5), 129.3 (C3), 128.7 (C4), 56.3 (C16), 55.9 (C26), 53.7 (C1), 52.6 (C11), 52.3 (C12), 51.8 (C21), 48.4 (C22), 43.7 (C6), 39.6 (C9), 34.6 (C15, C25), 26.1 (C10), 25.8 (C20), 25.0 (C13), 23.8 (C14), 23.3 (C23), 22.5 (C24), 19.2 (C17), 18.9 (C27). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 442.8 (2)  $[\text{M}]^+$ , 302.3 (10)  $[\text{M} - \text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}]^+$ , 288.1 (29)  $[\text{M} - \text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2]^+$ , 183.2 (9)  $[\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}]^+$ , 155.2 (23)  $[\text{C}_9\text{H}_{19}\text{N}]^+$ , 126.1 (19)  $[\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}]^+$ , 112.1 (100)  $[\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}]^+$ , 98.1 (66)  $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}$   $[\text{M}]^+$ : 442.3672; found: 442.3673.

***N*-(4-(2-(3-Morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-morpholinopropan-1-amine (8{4,4})**. The borane dimethylsulfide complex (0.450 mL, 5.93 mmol) was added dropwise at 0 °C to a solution of 2-(4-((3-morpholinopropylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide (17{4,4}) (0.315 g, 0.792 mmol) in anhydrous THF (15 mL). The solution was refluxed for 6 h under  $\text{N}_2$ , cooled down to room temperature, diluted with 8 mL of 1.25 M HCl/MeOH solution and refluxed for 1 h. The solvent was removed *in vacuo* and the crude material was diluted with 1 M NaOH solution until pH = 14. The aqueous solution was extracted five times with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dried with  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated. Purification of the residue by automatic flash chromatography (basic alumina,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ , 98 : 2 : 0.5) afforded 0.1487 g (0.368 mmol, 46%) of *N*-(4-(2-(3-morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-morpholinopropan-1-amine (8{4,4}) as a yellow oil. IR (KBr)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3297 (N–H), 2936, 2852, 2807 (Csp<sup>3</sup>–H), 1669 (N–H), 1456 (CH<sub>2</sub>), 1117 (C–O–C), 862 (C–O–C).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.26 (m, 2H, C3–H), 7.18–7.13 (m, 2H, C4–H), 3.81–3.72 (m, 2H, C1–H), 3.72–3.62 (m, 8H, C13–H), 2.89–2.84 (m, 2H, C7–H), 2.79 (m, 2H, C8–H), 2.74–2.61 (m, 4H, C9–H, C15–H), 2.46–2.28 (m, 12H, C11–H, C12–H), 2.08 (br s, 2H, N8–H, N14–H), 1.75–1.61 (m, 4H, C10–H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 138.3 (C2), 137.6 (C5), 128.8 (C3), 128.4 (C4), 66.8 (C13), 57.3 (C11), 53.7 (C12), 53.7 (C1), 51.1 (C7), 48.3 (C9), 48.0 (C15), 35.8 (C6), 26.5 (C10). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 404.3 (6)  $[\text{M}]^+$ , 374.3 (6)  $[\text{M} - \text{CH}_2\text{O}]^+$ , 157.1 (13)  $[\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}]^+$ , 114.1 (15)  $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}]^+$ , 100.1 (100)  $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}]^+$ , 86.1 (5)  $[\text{C}_4\text{H}_8\text{NO}]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_2$   $[\text{M}]^+$ : 404.3151; Found: 404.3158.

***N*-(4-(2-(3-Morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-(pyrrolidin-1-yl)propan-1-amine (8{4,1})**. As stated above for 8{4,4}, but using 0.2374 g (0.59 mmol) of 2-(4-((3-(pyrrolidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide (17{4,1}), 0.335 mL (0.2689 g, 3.54 mmol) of the borane dimethylsulfide complex, 15 mL of THF and 7 mL of 1.25 M HCl/MeOH. Upon removal of the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98 : 2 : 0.5;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ ) to afford 0.1100 g (0.28 mmol, 48%) of *N*-(4-(2-(3-morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-(pyrrolidin-1-yl)propan-1-amine (8{4,1}). IR (KBr)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3288 (N–H), 2930, 2852, 2804 (Csp<sup>3</sup>–H), 1663 (N–H), 1457 (CH<sub>2</sub>), 1118 (C–O–C), 862 (C–O–C).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.28–7.21 (m, 2H, C3–H), 7.13–7.19 (m, 2H, C4–H), 3.79–3.72

(m, 2H, C1–H), 3.64–3.67 (m, 4H, C13–H), 2.90–2.84 (m, 2H, C7–H), 2.76–2.81 (m, 2H, C6–H), 2.66–2.72 (m, 4H, C9–H, C15–H), 2.53–2.33 (m, 12H, C11–H, C12–H, C17–H, C18–H), 2.01 (s, 2H, N8–H, N14–H), 1.82–1.57 (m, 8H, C10–H, C16–H, C19–H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 138.5 (C2), 137.6 (C5), 128.6 (C3), 128.2 (C4), 66.9 (C13), 57.3 (C11, C17), 54.2 (C18), 53.7 (C12), 53.6 (C1), 51.1 (C7), 48.3 (C9), 48.0 (C15), 35.8 (C6), 26.5 (C10, C16), 23.3 (C19). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 388.2 (32)  $[\text{M}]^+$ , 387.2 (79)  $[\text{M} - \text{H}]^+$ , 358.2 (3)  $[\text{M} - \text{CH}_2\text{O}]^+$ , 290.0 (9)  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}]^+$ , 262.0 (17)  $[\text{M} - \text{C}_7\text{H}_{15}\text{N}_2]^+$ , 156.9 (36)  $[\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}]^+$ , 99.9 (100)  $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}]^+$ , 84.0 (100)  $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}]^+$ , 70.1 (24)  $[\text{C}_4\text{H}_8\text{N}]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}$   $[\text{M} - \text{H}]^+$ : 387.3124; Found: 387.3123.

***N*-(4-(2-(3-Morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine (8{4,3})**. As stated above for 8{4,4}, but using 0.1678 g (0.39 mmol) of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-morpholinopropyl)acetamide (17{4,3}), 0.222 mL (0.1778 g, 2.34 mmol) of the borane dimethylsulfide complex, 10 mL of THF and 5 mL of 1.25 M HCl/MeOH. Upon removal of the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98 : 2 : 0.5;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ ) to afford 0.0764 g (0.18 mmol, 47%) of *N*-(4-(2-(3-morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine (8{4,3}). IR (KBr)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3288 (N–H), 2929, 2852, 2805 (Csp<sup>3</sup>–H), 1671 (N–H), 1455 (CH<sub>2</sub>), 1118 (C–O–C), 862 (C–O–C).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.29–7.10 (m, 4H, C3–H, C4–H), 3.82–3.72 (m, 2H, C1–H), 3.71–3.61 (m, 4H, C13–H), 2.89–2.84 (m, 2H, C7–H), 2.78–2.81 (m, 2H, C6–H), 2.75–2.63 (m, 6H, C9–H, C15–H, C17–H, C18–H), 2.50–1.95 (m, 11H, C11–H, C12–H, C17–H, C18–H, C22–H, N8–H, N14–H), 1.71–1.25 (m, 10H, C10–H, C16–H, C19–H, C20–H, C21–H), 1.10–0.97 (m, 3H, C23–H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 138.6 (C2), 137.9 (C5), 128.6 (C3), 128.2 (C4), 66.9 (C13), 57.3 (C11), 55.9 (C22), 53.7 (C12), 53.6 (C1), 52.2 (C17, C18), 51.1 (C7), 48.4 (C9), 48.3 (C15), 35.8 (C6), 34.5 (C21), 26.6 (C10), 26.0 (C16), 25.5 (C19), 23.8 (C20), 18.9 (C23). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 416.1 (20)  $[\text{M}]^+$ , 415.1 (38)  $[\text{M} - \text{H}]^+$ , 386.1 (16)  $[\text{M} - \text{CH}_2\text{O}]^+$ , 259.9 (11)  $[\text{M} - \text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}]^+$ , 156.8 (24)  $[\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}]^+$ , 125.9 (32)  $[\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}]^+$ , 111.9 (100)  $[\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}]^+$ , 99.9 (61)  $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}$   $[\text{M} - \text{H}]^+$ : 415.3437; Found: 415.3438.

***N*-(4-(2-(3-Piperidin-1-yl)propylamino)ethyl)benzyl)-3-(piperidin-1-yl)propan-1-amine (8{5,5})**. As stated above for 8{4,4}, but using 0.1134 g (0.27 mmol) of 2-(4-((3-(piperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide (17{5,5}), 0.156 mL (0.1247 g, 1.64 mmol) of the borane dimethylsulfide complex, 10 mL of THF and 5 mL of 1.25 M HCl/MeOH. Upon removal of the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98 : 2 : 0.5;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ ) to afford 0.0403 g (0.101 mmol, 37%) of *N*-(4-(2-(3-morpholinopropylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine (8{5,5}). IR (KBr)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3285 (N–H), 2928, 2852, 2800 (Csp<sup>3</sup>–H), 1673 (N–H), 1455 (CH<sub>2</sub>).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.27–7.22 (m, 2H, C3–H), 7.19–7.12 (m, 2H, C4–H), 3.76 (s, 2H, C1–H),

2.90–2.84 (m, 2H, C7–H), 2.77–2.82 (m, 2H, C6–H), 2.67 (t,  $J = 6.9$  Hz, 4H, C9–H), 2.47–2.21 (m, 12H, C11–H, C12–H), 2.05 (br s, 2H, N8–H), 1.70 (m, 4H, C10–H), 1.54 (m, 8H, C13–H), 1.41 (m, 4H, C14–H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 138.5 (C2), 137.7 (C5), 128.7 (C3), 128.2 (C4), 57.7 (C11), 54.6 (C12), 53.5 (C1), 51.0 (C7), 48.7 (C9), 35.7 (C6), 26.7 (C10), 25.9 (C13), 24.3 (C14). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 400.4 (1)  $[\text{M}]^+$ , 260.2 (3)  $[\text{M} - \text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2]^+$ , 155.1 (7)  $[\text{C}_9\text{H}_{19}\text{N}_2]^+$ , 112.1 (8)  $[\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}]^+$ , 98.1 (100)  $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}]^+$ , 84.0 (8)  $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{N}_4$   $[\text{M}]^+$ : 400.3566; Found: 400.3577.

***N*-(4-(2-(3-(Piperidin-1-yl)propylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine (8{5,3})**. As stated above for 8{4,4}, but using 0.1848 g (0.43 mmol) of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-(piperidin-1-yl)propyl)acetamide (17{5,3}), 0.245 mL (0.1965 g, 2.59 mmol) of the borane dimethylsulfide complex, 12 mL of THF and 6 mL of 1.25 M HCl/MeOH. Upon removal of the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98 : 2 : 0.5;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ ) to afford 0.0642 g (0.16 mmol, 36%) of *N*-(4-(2-(3-(piperidin-1-yl)propylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine (8{5,3}). IR (KBr)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3283 (N–H), 2931, 2852, 2800 ( $\text{Csp}^3\text{--H}$ ), 1671 (N–H), 1443 ( $\text{CH}_2$ ).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.27–7.20 (m, 2H, C3–H), 7.13–7.18 (m, 2H, C4–H), 3.74 (s, 2H, C1–H), 2.88–2.84 (m, 2H, C7–H), 2.82–2.77 (m, 2H, C6–H), 2.76–2.63 (m, 4H, C9–H, C16–H), 2.48–1.99 (m, 13H, C11–H, C12–H, C18–H, C19–H, C23–H, N8–H, N15–H), 1.71–1.63 (m, 4H, C10–H, C17–H), 1.62–1.24 (m, 12H, C13–H, C14–H, C20–H, C21–H, C22–H), 1.04 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, C24–H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 138.6 (C2), 137.6 (C5), 128.6 (C3), 128.2 (C4), 57.7 (C11, C18), 55.9 (C23), 54.6 (C12), 53.7 (C1), 52.3 (C19), 51.1 (C7), 48.7 (C9), 48.3 (C16), 35.9 (C6), 34.6 (C22), 26.9 (C10), 26.1 (C14), 25.9 (C13), 25.7 (C17), 24.4 (C21), 19.0 (C24). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 414.4 (8)  $[\text{M}]^+$ , 260.2 (18)  $[\text{M} - \text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2]^+$ , 155.1 (33)  $[\text{C}_9\text{H}_{19}\text{N}_2]^+$ , 126.1 (19)  $[\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}]^+$ , 112.1 (87)  $[\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}]^+$ , 98.2 (100)  $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}]^+$ , 84.1 (16)  $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_4$   $[\text{M}]^+$ : 414.3722; Found: 414.3732.

***N*-(4-(2-(3-(2-Methylpiperidin-1-yl)propylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine (8{3,3})**. As stated above for 8{4,4}, but using 0.2015 g (0.46 mmol) of 2-(4-((3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)methyl)phenyl)-*N*-(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propyl)acetamide (17{3,3}), 0.259 mL (0.2075 g, 2.73 mmol) of the borane dimethylsulfide complex, 13 mL of THF and 6 mL of 1.25 M HCl/MeOH. Upon removal of the solvent, the residue was separated by automatic flash chromatography (basic alumina; 98 : 2 : 0.5;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ ) to afford 0.088 g (0.205 mmol, 45%) of *N*-(4-(2-(3-(2-methylpiperidin-1-yl)propylamino)ethyl)benzyl)-3-(2-methylpiperidin-1-yl)propan-1-amine (8{3,3}). IR (KBr)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3280 (N–H), 2929, 2853, 2793 ( $\text{Csp}^3\text{--H}$ ), 1673 (N–H), 1449 ( $\text{CH}_2$ ).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7.27–7.22 (m, 2H, C3–H), 7.19–7.10 (m, 2H, C4–H), 3.76 (s, 2H, C1–H), 2.95–2.59 (m, 12H, C6–H, C7–H, C9–H, C19–H, C11–H, C12–H), 2.44–2.06 (m, 10H, C11–H, C12–H, C16–H, N8–H, N18–H), 1.73–1.22 (m, 16H, C10–H, C13–H, C14–H, C15–H, C20–H), 1.10–0.99

(m, 6H, C17–H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) (major isomer): 138.5 (C2), 137.7 (C5), 128.7 (C3), 128.3 (C4), 55.9 (C16), 53.6 (C1), 52.2 (C11, C12), 51.1 (C7), 48.8 (C9), 48.3 (C19), 35.8 (C6), 34.5 (C15), 25.9 (C13), 25.5 (C10, C20), 23.8 (C14), 18.9 (C17); (minor isomer): 138.2 (C2), 138.0 (C5), 128.83 (C3), 128.48 (C4). MS (70 eV, EI):  $m/z$  (%) = 428.6 (12)  $[\text{M}]^+$ , 288.1 (10)  $[\text{M} - \text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}]^+$ , 274.1 (22)  $[\text{M} - \text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2]^+$ , 169.1 (36)  $[\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}_2]^+$ , 126.1 (25)  $[\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}]^+$ , 112.1 (100)  $[\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}]^+$ , 98.1 (69)  $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}]^+$ . HRMS (EI):  $m/z$  calculated for  $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{N}_4$   $[\text{M}]^+$ : 428.3879; Found: 428.3870.

### Antiviral activity evaluation

HIV-1 strains were titered in MT-4 cells after acute infection, and infectivity was measured by evaluating the cytopathic effect induced after 5-day cultures as described.<sup>25,26</sup> Anti-HIV activity ( $\text{EC}_{50}$ ) and cytotoxicity ( $\text{CC}_{50}$ ) measurements of MT-4 cells were based on the viability of cells that had been infected or not infected with HIV-1, all exposed to various concentrations of the test compound. After the MT-4 cells were allowed to proliferate for 5 days, the number of viable cells was quantified by a tetrazolium-based colorimetric method (MTT method).

### Acknowledgements

Financial support by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad project SAF2010-C21617-C02, BFU2012-31569 and FIS PI13/01083 is greatly acknowledged. R. Puig de la Bellacasa wants to thank Generalitat de Catalunya (AGAUR) for a FI scholarship. A. Gibert wants to thank IQS for a scholarship. R. Badía is a Sara Borrell fellow from FIS.

### References

- G. A. Donzella, D. Schols, S. W. Lin, J. A. Esté, K. A. Nagashima, P. J. Maddon, G. P. Allaway, T. P. Sakmar, G. Henson, E. De Clercq and J. P. Moore, *Nat. Med.*, 1998, **4**, 72.
- (a) G. M. Keating, *Drugs*, 2011, **71**, 1623; (b) G. Calandra, G. Bridger and S. Fricker, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2010, **341**, 173; (c) <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Plerixafor>.
- S. Hatse, K. Princen, E. De Clercq, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, P. E. Hernandez-Abad, R. T. Skerlj, G. J. Bridger and D. Schols, *Biochem. Pharmacol.*, 2005, **70**, 752.
- K. Princen, S. Hatse, K. Vermeire, S. Aquaro, E. De Clercq, L. O. Gerlach, M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, R. Skerlj, G. Bridger and D. Schols, *J. Virol.*, 2004, **78**, 12996.
- N. D. Stone, S. B. Dunaway, C. Flexner, C. Tierney, G. B. Calandra, S. Becker, Y. J. Cao, I. P. Wiggins, J. Conley, R. T. MacFarland, J. G. Park, C. Lalama, S. Snyder, B. Kallungal, K. L. Klingman and C. W. Hendrix, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, **51**, 2351.

- 6 (a) Y = CH: W. Zhan, Z. Liang, A. Zhu, S. Kurtkaya, H. Shim, J. P. Snyder and D. C. Liotta, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**(23), 5655; (b) Y = N: Z. Liang, W. Zhan, A. Zhu, Y. Yoon, S. Lin, M. Sasaki, J. M. Klapproth, H. Yang, H. E. Grossniklaus, J. Xu, M. Rojas, R. J. Voll, M. M. Goodman, R. F. Arrendale, J. Liu, C. C. Yun, J. P. Snyder, D. C. Liotta and H. Shim, *PLoS One*, 2012, **7**, e34038.
- 7 C. H. Wu, C. P. Chang, J. S. Song, J. J. Jan, M. C. Chou, S. H. Wu, K. C. Yeh, Y. C. Wong, C. J. Hsieh, C. T. Chen, T. T. Kao, S. Y. Wu, C. F. Yeh, C. T. Tseng, Y. S. Chao and K. S. Shia, *ChemMedChem*, 2012, **7**, 209.
- 8 J. A. Esté and A. Telenti, *Lancet*, 2007, **370**, 81.
- 9 B. A. Teicher and S. P. Fricker, *Clin. Cancer Res.*, 2010, **16**, 2927.
- 10 M. Terasaki, Y. Sugita, F. Arakawa, Y. Okada, K. Ohshima and M. Shigemori, *Brain Tumor Pathol.*, 2011, **28**, 89–97.
- 11 (a) S. Pettersson, V. I. Pérez-Nueno, L. Ros-Blanco, R. Puig de La Bellacasa, M. O. Rabal, X. Batllori, B. Clotet, I. Clotet-Codina, M. Armand-Ugón, J. Esté, J. I. Borrell and J. Teixidó, *ChemMedChem*, 2008, **3**, 1549; (b) S. Pettersson, *PhD Dissertation*, Universitat Ramon Llull, Barcelona, 2009, pp. 250–251 (<http://hdl.handle.net/10803/9298>); (c) L. Ros, *PhD Dissertation*, Universitat Ramon Llull, Barcelona, 2011, pp. 170–171 (<http://hdl.handle.net/10803/31981>).
- 12 S. Pettersson, V. I. Pérez-Nueno, M. P. Mena, B. Clotet, J. A. Esté, J. I. Borrell and J. Teixidó, *ChemMedChem*, 2010, **5**, 1272.
- 13 V. I. Pérez-Nueno, D. W. Ritchie, O. Rabal, R. Pascual, J. I. Borrell and J. Teixidó, *J. Chem. Inf. Model.*, 2008, **48**, 509.
- 14 L. Ros-Blanco, J. Anido, R. Bossier, J. Esté, B. Clotet, A. Kosoy, L. Ruíz-Ávila, J. Teixidó, J. Seoane and J. I. Borrell, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 7560.
- 15 G. J. Bridger, R. T. Skerlj, D. Thornton, S. Padmanabhan, S. A. Martellucci, G. W. Henson, M. J. Abrams, N. Yamamoto, K. De Vreese, R. Pauwel and E. De Clercq, *J. Med. Chem.*, 1995, **38**, 366.
- 16 W. Kuhn, Method for stabilising phenylacetaldehyde, *PCT Int. Appl. WO*, 2002046135, 2001.
- 17 C. Campà, F. Sanchez-Ferrando and M. Tristan-Polo, *Nouv. J. Chim.*, 1985, **9**, 493.
- 18 M. L. Falck-Pedersen and K. Undheim, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 7761.
- 19 J. M. Planesas, V. I. Pérez-Nueno, J. I. Borrell and J. Teixidó, *J. Mol. Graphics Modell.*, 2012, **38**, 123.
- 20 C. M. Venkatachalam, X. Jiang, T. Oldfield and M. Waldman, *J. Mol. Graphics Modell.*, 2003, **21**, 289.
- 21 M. Montes, M. A. Miteva and B. O. Villoutreix, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, 2007, **68**, 712.
- 22 LigPrep, *Version 2.4*, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2010.
- 23 A. S. Karaboga, J. M. Planesas, F. Petronin, J. Teixidó, M. Souchet and V. I. Pérez-Nueno, *J. Chem. Inf. Model.*, 2013, **53**, 1043.
- 24 P. R. Clapham and A. McKnight, *Br. Med. Bull.*, 2001, **58**, 43.
- 25 G. Moncunill, M. Armand-Ugón, E. Pauls, B. Clotet and J. A. Esté, *AIDS*, 2008, **22**, 23.
- 26 M. Armand-Ugón, I. Clotet-Codina, C. Tintori, F. Manetti, B. Clotet, M. Botta and J. A. Esté, *Virology*, 2005, **343**, 141.







Aquesta tesi s'ha dut a terme al Laboratori de Síntesi  
del Grup d'Enginyeria Molecular (GEM) del Departament de Química Orgànica i Farmacèutica d'IQS  
sota la direcció dels Drs. José I. Borrell Bilbao i Jordi Teixidó i Closa  
Barcelona, 15 de Juliol del 2016.





